

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC  
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

**HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ**  
-----



**VŨ VĂN DŨNG**

**NGHIÊN CỨU TUYỂN CHỌN CÁC CHỦNG VI KHUẨN  
CHỊU MẶN CÓ ĐẶC TÍNH KÍCH THÍCH SINH TRƯỞNG  
THỰC VẬT VÀ TÁC ĐỘNG ĐẾN BIỂU HIỆN GEN LIÊN  
QUAN ĐẾN ĐÁP ỨNG MẶN CỦA CÂY LÚA**

**LUẬN ÁN TIẾN SỸ CÔNG NGHỆ SINH HỌC**

**HÀ NỘI – 2023**

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC  
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

**HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ**  
-----

**VŨ VĂN DŨNG**

**NGHIÊN CỨU TUYỂN CHỌN CÁC CHỦNG VI KHUẨN  
CHỊU MẶN CÓ ĐẶC TÍNH KÍCH THÍCH SINH TRƯỞNG  
THỰC VẬT VÀ TÁC ĐỘNG ĐẾN BIỂU HIỆN GEN LIÊN  
QUAN ĐẾN ĐÁP ỨNG MẶN CỦA CÂY LÚA**

Chuyên ngành: Công nghệ sinh học

Mã số: 9420201

**LUẬN ÁN TIẾN SỸ CÔNG NGHỆ SINH HỌC**

**NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:**

1. GS. TS. Nguyễn Huy Hoàng
2. PGS. TS. Đỗ Hữu Nghị

**Hà Nội – 2023**

## **LỜI CAM ĐOAN**

Tôi xin cam đoan luận án là công trình nghiên cứu do chính tôi thực hiện. Các kết quả trong luận án được thể hiện trung thực, một phần kết quả của luận án được công bố trên các tạp trí khoa học chuyên ngành với sự đồng thuận và xác nhận của các đồng tác giả. Một phần kết quả còn lại chưa được ai công bố trong bất kỳ tài liệu, tạp chí nào khác.

**Tác giả luận án**

**NCS. Vũ Văn Dũng**

## LỜI CẢM ƠN

Trước hết, em xin được gửi lòng biết ơn đến hai người thầy là GS.TS. Nguyễn Huy Hoàng, Viện trưởng Viện Nghiên cứu hệ gen và PGS.TS. Đỗ Hữu Nghị, Phó viện trưởng Viện Hoá học các Hợp chất thiên nhiên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã trực tiếp giúp đỡ và chỉ bảo trong suốt quá trình học tập và thực hiện luận án..

Nghiên cứu sinh xin trân trọng cảm ơn các cán bộ Phòng Hệ gen học chức năng, Viện Nghiên cứu hệ gen đã giúp đỡ và hướng dẫn tận tình trong quá trình học tập và thực hiện luận án.

Nghiên cứu sinh xin trân trọng cảm ơn Ban Lãnh đạo, Phòng Quản lý tổng hợp, Viện Nghiên cứu hệ gen đã giúp đỡ và tạo điều kiện thuận lợi về mọi mặt, hỗ trợ thực hiện các thủ tục cần thiết để hoàn thành chương trình học và luận án.

Nghiên cứu sinh xin trân trọng cảm ơn Ban Giám đốc, tập thể cán bộ giảng viên Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tạo điều kiện thuận lợi trong suốt quá trình học tập và thực hiện luận án.

Nghiên cứu sinh xin trân trọng cảm ơn Đảng uỷ, Lãnh đạo Viện Hoá học-Vật liệu và Phòng Hoá học các Hợp chất thiên nhiên, Viện Hoá học- Vật liệu, Viện Khoa học và Công nghệ quân sự đã cho phép, tạo điều kiện về thời gian, thiết bị nghiên cứu và động viên tinh thần trong suốt thời gian thực hiện luận án.

Nghiên cứu sinh xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đối với gia đình, người thân và bạn bè đồng nghiệp đã luôn động viên, giúp đỡ trong quá trình học tập và thực hiện luận án.

*Hà Nội, ngày tháng năm 2023*

**Nghiên cứu sinh**

**Vũ Văn Dũng**

## MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN .....	i
LỜI CẢM ƠN .....	ii
MỤC LỤC.....	iii
DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT .....	vii
DANH MỤC HÌNH .....	ix
DANH MỤC BẢNG.....	xi
MỞ ĐẦU.....	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN.....	4
1. 1. Tổng quan về vi sinh vật kích thích sinh trưởng thực vật.....	4
1.1.1. Khái niệm vi sinh vật kích thích sinh trưởng thực vật.....	4
1.1.2. Đặc điểm của vi sinh vật kích thích sinh trưởng thực vật.....	4
1.1.2.1. Khả năng cố định nitơ .....	5
1.1.2.2. Khả năng hòa tan phosphate .....	6
1.1.2.3. Khả năng sinh tổng hợp IAA .....	8
1.1.2.4. Khả năng sinh ACC deaminase .....	10
1.1.2.5. Khả năng sinh siderophores .....	11
1.2. Vi sinh vật chịu mặn và cơ chế hỗ trợ thực vật chịu mặn nhờ PGPB.....	12
1.2.1. Vi sinh vật chịu mặn .....	12
1.2.2. Cơ chế hỗ trợ thực vật chịu mặn nhờ PGPB .....	13
1.2.2.1. Tích lũy các chất thẩm thấu .....	14
1.2.2.2. Cải thiện sự hấp thu chất dinh dưỡng .....	14
1.2.2.3. Sinh tổng hợp IAA .....	15
1.2.2.4. Sinh tổng hợp ACC deaminase .....	16
1.2.2.5. Exo-polysaccharide .....	16
1.2.2.6. Hoạt hóa hệ enzyme chống oxi hóa .....	17
1.2.2.7. Tăng cường sự biểu hiện các gen liên quan đến đáp ứng mặn .....	17
1.3. Sự đáp ứng với stress mặn của cây lúa .....	18
1.3.1. Ảnh hưởng của stress mặn lên cây lúa.....	18
1.3.2. Cơ chế dung nạp muối ở cây lúa.....	19
1.3.2.1. Cân bằng nội môi ion .....	19
1.3.2.2. Cân bằng nội môi ion .....	21
1.4. Tình hình nghiên cứu về PGPB hỗ trợ cây trồng chịu mặn.....	25

1.4.1. Trên thế giới .....	25
1.4.2. Tại Việt Nam.....	31
1.5. Phương pháp phân tích hệ gen bằng công nghệ giải trình tự gen thế hệ mới ....	32
<b>CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP .....</b>	<b>35</b>
2.1. Nguyên vật liệu .....	35
2.1.1. Nguyên liệu .....	35
2.1.2. Hóa chất, môi trường và thiết bị .....	35
2.2. Phương pháp nghiên cứu.....	387
2.2.1. Phương pháp lấy mẫu.....	38
2.2.2. Phân lập các chủng vi khuẩn chịu mặn .....	38
2.2.3. Sàng lọc các chủng vi khuẩn có khả năng sinh IAA.....	39
2.2.4. Sàng lọc các chủng vi khuẩn có khả năng tổng hợp ACC deaminase .....	39
2.2.5. Sàng lọc các chủng vi khuẩn có khả năng phân giải phosphate .....	40
2.2.6. Sàng lọc các chủng vi khuẩn có khả năng cố định nitơ .....	40
2.2.7. Sàng lọc các chủng vi khuẩn có khả năng phân hủy cellulose .....	40
2.2.8. Khả năng sinh siderophores .....	41
2.2.9. Phân loại vi sinh vật .....	41
2.2.9.1. Xác định một số đặc điểm về hình thái và sinh hoá.....	41
2.2.9.2. Phương pháp giải trình tự 16S rRNA.....	42
2.2.10. Ảnh hưởng của một số yếu tố đến sinh trưởng và tổng hợp IAA của các chủng vi khuẩn chọn lọc .....	43
2.2.10.1 Ảnh hưởng của pH và nhiệt độ đến sinh trưởng của các chủng vi khuẩn chọn lọc .....	43
2.2.10.2. Ảnh hưởng nguồn nitơ đến sinh trưởng và sinh IAA của các chủng vi khuẩn chọn lọc .....	43
2.2.10.3. Ảnh hưởng nồng độ L-tryptophan đến sinh trưởng và sinh IAA của các chủng vi khuẩn chọn lọc .....	43
2.2.10.4. Ảnh hưởng nguồn carbon đến sinh trưởng và sinh IAA của các chủng vi khuẩn chọn lọc .....	44
2.2.10.5. Ảnh hưởng của nồng độ muối đến sinh trưởng và tổng hợp IAA của các chủng vi khuẩn chọn lọc .....	44
2.2.11. Phương pháp xác định chlorophyll trong lá lúa .....	44

2.2.12. Đánh giá khả năng làm giảm tác động của stress mặn đối với cây lúa của các chủng vi khuẩn chọn lọc .....	44
2.2.13. Đánh giá sự biểu hiện của các gen liên quan đến đáp ứng mặn ở cây lúa dưới sự hỗ trợ của chủng vi khuẩn chọn lọc.....	45
2.2.13.1. Tách chiết RNA và tổng hợp cDNA .....	46
2.2.13.2. Kỹ thuật RT-PCR.....	46
2.2.14. Phân tích hệ gen của chủng vi khuẩn chọn lọc bằng phương pháp giải trình tự gen thế hệ mới.....	48
2.2.14.1. Tách chiết, tinh sạch và tạo thư viện DNA .....	48
2.2.14.2 Phân tích hệ gen vi khuẩn .....	49
2.2.15. Phân tích thống kê.....	50
2.2.16. Địa điểm nghiên cứu .....	50
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	51
3.1. Phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn có khả năng chịu mặn sinh chất kích thích sinh trưởng thực vật.....	51
3.1.1. Phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn sinh IAA .....	51
3.1.2. Sàng lọc các chủng vi khuẩn sinh ACC deaminase .....	53
3.1.3. Sàng lọc các chủng vi khuẩn có hoạt tính cố định nitơ.....	55
3.1.4. Sàng lọc các chủng vi khuẩn hoà tan phosphate.....	56
3.1.5. Sàng lọc các chủng vi khuẩn phân giải cellulose.....	58
3.2. Nghiên cứu một số đặc điểm hình thái, sinh hoá và giải trình tự 16S rRNA ....	61
3.2.1. Nghiên cứu một số đặc điểm hình thái của các chủng vi khuẩn chọn lọc .....	61
3.2.2. Xác định một số đặc điểm sinh hóa của các chủng vi khuẩn chọn lọc .....	65
3.2.3. Giải trình tự 16S rRNA của các chủng chọn lọc và xây dựng cây phát sinh chủng loài .....	66
3.3. Nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến sinh trưởng và tổng hợp IAA của một số chủng vi khuẩn chọn lọc .....	71
3.3.1. Ảnh hưởng nhiệt độ, pH đến khả năng sinh trưởng của các chủng vi khuẩn chọn lọc .....	71
3.3.2. Ảnh hưởng của nguồn nitơ đến khả năng sinh trưởng và tổng hợp IAA của các chủng vi khuẩn chọn lọc .....	72
3.3.3. Ảnh hưởng của L-tryptophan đến đến khả năng sinh tổng hợp IAA của các chủng vi khuẩn chọn lọc .....	74

3.3.4. Ảnh hưởng của nguồn carbon đến khả năng sinh trưởng và tổng hợp IAA của các chủng vi khuẩn chọn lọc .....	75
3.3.5. Ảnh hưởng nồng độ NaCl đến khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp IAA của các chủng vi khuẩn chọn lọc.....	77
3.4. Đánh giá khả năng hỗ trợ cây lúa chịu mặn của một số chủng vi khuẩn chọn lọc .....	80
3.4.1. Lựa chọn nồng độ muối để gây stress mặn ở cây lúa .....	80
3.4.2. Đánh giá khả năng hỗ trợ cây lúa chịu mặn của một số chủng vi khuẩn chọn lọc .....	81
3.5. Nghiên cứu sự biểu hiện các gen liên quan đến đáp ứng mặn của cây lúa dưới sự hỗ trợ của chủng RL7 và DM10.....	86
3.5.1. Ảnh hưởng của chủng RL7 và DM10 đến sự sinh trưởng cây lúa khi bị nhiễm mặn	86
3.5.1.1. Ảnh hưởng của chủng RL7 .....	86
3.5.1.2. Ảnh hưởng của chủng DM10.....	88
3.5.2 Nghiên cứu sự biểu hiện của các gen liên quan đến đáp ứng mặn của cây lúa dưới sự hỗ trợ của chủng RL7 và DM10 .....	91
3.5.2.1. Sự biểu hiện của các gen liên quan đến đáp ứng mặn của cây lúa dưới sự hỗ trợ của chủng RL7.....	91
3.5.2.2 Sự biểu hiện của các gen liên quan đến đáp ứng mặn của cây lúa dưới sự hỗ trợ của chủng DM10 .....	92
3.6. Giải trình tự hệ gen của một số chủng chọn lọc.....	96
3.6.1. Lắp ráp các đoạn trình tự và chú giải chức năng .....	96
3.6.2. Phân loại dựa trên chỉ số tương đồng toàn bộ hệ gen .....	96
3.6.3. Phân loại các nhóm gen chức năng .....	97
3.6.4. Gen liên quan đến khả năng kích thích sinh trưởng thực vật.....	99
3.6.5. Gen liên quan đến khả năng chịu mặn. ....	103
3.6.6. Các gen liên quan đến hệ thống bài tiết .....	104
3.6.7. Các gen liên quan đến quá trình nội sinh .....	105
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	106
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH .....	107
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	108



## DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT

<b>Viết tắt</b>	<b>Viết đầy đủ</b>	<b>Tên tiếng việt</b>
ABA	Acid abscisic	
ACC	1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid	
ACCD	ACC deaminase	
APX	Ascorbate peroxidase	
AREB	ABA-responsive element	
ATP	Adenosine triphosphate	
BADH	Betaine aldehyde dehydrogenase	
BZ8	Aba responsive bZIP protein	
CAT	Catalase	
CDPK	Ca <sup>2+</sup> dependent protein kinase	
CDS	Coding DNA sequence	
DM	Dworkin and Foster salts media	
DNA	Deoxyribonucleic acid	
DREB	Dehydration responsive element-binding protein	
EPS	Exo-polysaccharide	
EREBP1	Ethylene responsive element binding protein	
GIG	Gigantea	
GPX	Glutathion peroxidase	
GR	Glutathion reductase	
GST	Glutathion tranferase	
HDAC	Histone deacetylases	
HKT	K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> transpoter	
IAA	3-Indole acetic acid	
LB	Luria Broth	
LEAP	Late embryogenesis abundant proteins	
LYSO	Lysophospholipase	
MAPK5	Mitogen activated protein kinase	
MYC	Myelocytomatosis oncogenes	

NA	Nutrien agar	
NADP-ME2	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-malic enzyme	
NCED	9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase	
NHX	Sodium proton antiporter	
P5CS	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthas	
<i>PBZ</i>	Probenazole	
PGPB	Plant growth promoting bacteria	Vi sinh vật kích thích sinh trưởng thực vật
POX	Peroxidase	
PR	Pathogenesis-related protein	
RLK	Receptor-like kinases	
RNA	Ribonucleic acid	
ROS	Reactive oxygen species	Các chất oxi hoá
RT-PCR	Realtime-Polymerase chain reaction	
SAPK	Serine/threonine-protein kinase	
SERK	Somatic embryogenesis receptor kinase	
SnRK	sucrose non-fermentation-related protein kinase	
SOD	Superoxide dismutase	
SOS	Salt-overly-sensitive	
TF	Transcription factor	Nhân tố sao mã

## DANH MỤC HÌNH

<i>Hình 1.1.</i> Đặc điểm của vi sinh vật kích thích sinh trưởng thực vật.....	5
<i>Hình 1.2.</i> Cơ chế hòa tan phosphate của vi sinh vật .....	7
<i>Hình 1.3.</i> Con đường sinh tổng hợp IAA .....	9
<i>Hình 1.4.</i> Vai trò của PGPB sinh ACC deaminase trong việc kích thích sinh trưởng thực vật khi bị stress phi sinh học .....	11
<i>Hình 1.5.</i> Cơ chế làm tăng tính chịu mặn ở thực vật nhờ PGPB .....	14
<i>Hình 1.6.</i> Sự đáp ứng với stress mặn ở cây lúa .....	19
<i>Hình 1.7.</i> Sự đáp ứng với stress mặn ở cây lúa qua cân bằng nội môi ion .....	20
<i>Hình 1.8.</i> Sự đáp ứng với stress mặn ở lúa qua cân bằng thẩm thấu .....	21
<i>Hình 2.1.</i> Sơ đồ tóm tắt các nội dung nghiên cứu.....	37
<i>Hình 2.2.</i> Sơ đồ các bước phân tích hệ gene.....	50
<i>Hình 3.1.</i> Kết quả đo hoạt độ ACC deaminase của các chủng vi khuẩn chọn lọc....	54
<i>Hình 3.2.</i> Hàm lượng amoni sinh ra từ các chủng vi khuẩn chọn lọc.....	56
<i>Hình 3.3.</i> Hàm lượng phosphate giải phóng ra môi trường của các chủng chọn lọc	57
<i>Hình 3.4.</i> Hoạt độ cellulose của các chủng chọn lọc .....	58
<i>Hình 3.5.</i> Hình thái tế bào và khuẩn lạc của một số chủng chọn lọc.....	64
<i>Hình 3.8.</i> Ảnh hưởng pH đến khả năng sinh trưởng của các chủng chọn lọc .....	72
<i>Hình 3.9.</i> Ảnh hưởng của nguồn nitơ đến khả năng sinh trưởng và tổng hợp IAA..	73
<i>Hình 3.10.</i> Ảnh hưởng của L-tryptophan đến khả năng sinh trưởng và tổng hợp IAA .....	74
<i>Hình 3.11.</i> Ảnh hưởng nguồn của carbon đến khả năng sinh trưởng và tổng hợp IAA.....	76
<i>Hình 3.12.</i> Ảnh hưởng nồng độ NaCl đến khả năng sinh trưởng và tổng hợp IAA của các chủng chọn lọc .....	78
<i>Hình 3.13.</i> Ảnh hưởng nồng độ muối lên sự sinh trưởng cây lúa.....	81
<i>Hình 3.14.</i> Ảnh hưởng của các chủng vi sinh vật chọn lọc lên sự phát triển của cây lúa khi bị nhiễm mặn.....	82
<i>Hình 3.15.</i> Ảnh hưởng của các chủng vi sinh vật chọn lọc lên hàm lượng chlorophyll trong lá lúa khi bị nhiễm mặn.....	82
<i>Hình 3.16.</i> Ảnh hưởng chủng RL7 lên sự sinh trưởng cây lúa khi bị nhiễm mặn.....	86
<i>Hình 3.18.</i> Ảnh hưởng của chủng RL7 lên hàm lượng chlorophyll trong lá lúa khi bị nhiễm mặn .....	87
<i>Hình 3.19.</i> Ảnh hưởng chủng DM10 lên sự sinh trưởng cây lúa khi bị nhiễm mặn	89

<i>Hình 3.20.</i> Ảnh hưởng của chủng DM10 lên chiều cao cây, chiều dài rễ và trọng lượng khô khi bị nhiễm mặn .....	89
<i>Hình 3.21.</i> Ảnh hưởng của chủng DM10 lên hàm lượng chlorophyll trong lá lúa khi bị nhiễm mặn.....	90
<i>Hình 3.22.</i> Sự biểu hiện của các gen liên quan đến đáp ứng mặn ở cây lúa dưới sự hỗ trợ của chủng RL7 .....	92
<i>Hình 3.23.</i> Sự biểu hiện của các gen liên quan đến đáp ứng mặn ở cây lúa dưới sự hỗ trợ của chủng DM10 .....	92
<i>Hình 3.24.</i> Tóm tắt một số con đường có thể làm tăng khả năng chịu mặn ở cây lúa với sự hỗ trợ của chủng RL7 và DM10.....	93

## DANH MỤC BẢNG

<i>Bảng 1.1.</i> PGPB và cơ chế thúc đẩy sự phát triển của một số loại cây trồng .....	26
<i>Bảng 2.1.</i> Thành phần phản ứng PCR nhân gen 16S rRNA .....	43
<i>Bảng 2.2.</i> Thành phần của phản ứng cDNA .....	46
<i>Bảng 2.3.</i> Trình tự các đoạn mồi .....	47
<i>Bảng 2.4.</i> Thành phần phản ứng RT-PCR .....	478
<i>Bảng 3.1.</i> Kết quả phân lập, sàng lọc các chủng có khả năng sinh IAA .....	52
<i>Bảng 3.2.</i> Kết quả sàng lọc khả năng sinh IAA, ACC deaminase, cố định nitơ, hoà tan phosphate và phân giải cellulose.....	59
<i>Bảng 3.3.</i> Bảng tổng hợp 12 chủng chọn lọc .....	61
<i>Bảng 3.4.</i> Hình thái tế bào và khuẩn lạc của các chủng chọn lọc .....	62
<i>Bảng 3.5.</i> Đặc điểm sinh hóa Kit API 20 E .....	65
<i>Bảng 3.6.</i> Môi trường quan di truyền giữa các chủng phân lập với các chủng vi sinh vật có trong ngân hàng gen dựa vào trình tự 16S rRNA.....	67
<i>Bảng 3.7.</i> Bảng tổng hợp môi trường sinh IAA của các chủng chọn lọc .....	77
<i>Bảng 3.8.</i> Ảnh hưởng của các chủng vi sinh vật chọn lọc lên sự phát triển của cây lúa khi bị nhiễm mặn.....	81
<i>Bảng 3.9.</i> Mật độ vi sinh vật trong đất và rễ .....	84
<i>Bảng 3.10.</i> Ảnh hưởng của chủng RL7 đến khả năng sinh trưởng cây lúa khi bị nhiễm mặn .....	86
<i>Bảng 3.11.</i> Ảnh hưởng của chủng DM10 đến khả năng sinh trưởng cây lúa khi bị nhiễm mặn .....	88
<i>Bảng 3.12.</i> Đặc điểm genome chủng DM10 và C7 .....	96
<i>Bảng 3.13.</i> Phân loại nhóm gen chức năng protein trực giao COGs .....	97
<i>Bảng 3.14.</i> Danh sách một số gen có liên quan đến khả năng kích thích sinh trưởng thực vật trong hệ gen của chủng DM10 và C7.....	99

## MỞ ĐẦU

Sự sinh trưởng và năng suất của cây trồng bị ảnh hưởng nghiêm trọng bởi các yếu tố căng thẳng sinh học và phi sinh học. Các yếu tố stress sinh học như côn trùng phá hoại hoặc vi sinh vật gây bệnh cho cây trồng. Các yếu tố stress phi sinh học bao gồm hạn hán, độ mặn, nhiệt độ, kim loại nặng và các chất ô nhiễm hữu cơ. Trong số các yếu tố stress phi sinh học, độ mặn ảnh hưởng nghiêm trọng nhất và được coi là một trong những yếu tố hạn chế đáng kể nhất đối với năng suất nông nghiệp và an ninh lương thực. Hiện nay, xâm nhập mặn đang lan rộng trên toàn cầu với tốc độ tăng nhanh và làm tăng nguy cơ mất an ninh lương thực ở một số quốc gia. Các khu vực đồng bằng của Ấn Độ, Myanmar và Bangladesh là những vùng sản xuất lúa gạo lớn của thế giới đang phải đối mặt với mối đe dọa nghiêm trọng về an ninh lương thực do đất ven biển bị nhiễm mặn. Ở Việt Nam, xâm nhập mặn xuất hiện không theo chu kỳ ở các vùng ven biển nhất là ở vùng Đồng bằng sông Cửu Long, gây thiệt hại lớn cho sản xuất nông nghiệp đặc biệt là lúa nước. Theo thống kê năm 2015, ước tính có khoảng 35,5% diện tích trồng lúa 8 tỉnh ven biển bị ảnh hưởng. Xâm nhập mặn tăng kỷ lục trong năm 2016 gây ra thiệt hại 139.000 ha lúa ở đồng bằng sông Cửu Long với ước tính năng suất giảm 30-70%. Năm 2020, xâm nhập mặn gây thiệt hại khoảng 34.600 ha thuộc 4 tỉnh Cà Mau, Kiên Giang, Bến Tre và Sóc Trăng với năng suất ước tính giảm từ 30-70%.

Có nhiều biện pháp khắc phục xâm nhiễm mặn như là xây dựng hệ thống ngăn mặn lấy ngọt tiêu úng, tạo ra các giống lúa chịu mặn và gia tăng rừng ngập mặn ven biển... Những phương pháp này đòi hỏi nhiều thời gian và kinh phí. Gần đây, trên thế giới có nhiều nghiên cứu ứng dụng vi sinh vật chịu mặn kích thích sinh trưởng thực vật (PGPB) để giảm thiểu tác hại của các yếu tố stress sinh học và phi sinh học khác nhau ở thực vật. Kết quả cho thấy PGPB với khả năng sinh axit indole-3-acetic (IAA), 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase (ACC deaminase), cố định nitơ, phân giải phosphate và sinh siderophores... hỗ trợ cho cây trồng chống chịu với stress mặn, có thể được sử dụng để cải tạo, nâng cao năng suất của các hệ sinh thái nông nghiệp vùng đất nhiễm mặn.

Ở Việt Nam, việc sử dụng PGPB chịu mặn để tăng khả năng chống chịu mặn của cây lúa còn chưa được chú ý. Các nghiên cứu mới tập trung vào phân lập các chủng vi sinh vật có hoạt tính sinh học như cố định nitơ, phân giải phosphate và sinh

IAA... Chưa có các nghiên cứu đánh giá hiệu quả của vi sinh vật chịu mặn sinh IAA và sinh ACC deaminase trong việc hỗ trợ cây lúa sinh trưởng và phát triển trong điều kiện nhiễm mặn, đồng thời, chưa có nghiên cứu về sự biểu hiện của các gen liên quan đến đáp ứng mặn ở cây lúa do sự hỗ trợ của vi sinh vật. Vì vậy, luận án: *“Nghiên cứu tuyển chọn các chủng vi khuẩn chịu mặn có đặc tính kích thích sinh trưởng thực vật và tác động đến biểu hiện gen liên quan đến đáp ứng mặn của cây lúa.”* được thực hiện với mục tiêu và nội dung sau:

#### **Mục Tiêu:**

Phân lập, tuyển chọn được các chủng vi khuẩn chịu mặn sinh chất kích thích sinh trưởng thực vật (IAA, ACC deaminase, phân giải phosphate, phân giải cellulose, cố định nitơ và sinh siderophores) và nghiên cứu biểu hiện gen liên quan đến đáp ứng mặn của cây lúa.

#### **Nội dung:**

1. Phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn chịu mặn có khả năng sinh chất kích thích sinh trưởng thực vật như IAA, ACC deaminase, phân giải phosphate, phân giải cellulose, cố định nitơ và sinh siderophores;
2. Đánh giá khả năng hỗ trợ cây lúa chịu mặn của các chủng vi khuẩn chọn lọc;
3. Nghiên cứu sự biểu hiện của các gen liên quan đến đáp ứng với stress mặn ở cây lúa dưới sự hỗ trợ của chủng vi khuẩn chọn lọc;
4. Giải trình tự hệ gen của chủng khuẩn chọn lọc và xác định các gen liên quan đến khả năng chịu mặn và sinh chất kích thích sinh trưởng thực vật.

#### **Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài:**

Đề tài luận án phân lập các chủng vi khuẩn chịu mặn có khả năng sinh chất kích thích sinh trưởng thực vật, từ đó chọn lọc được các chủng vi khuẩn có khả năng hỗ trợ cây lúa sinh trưởng và phát triển trong điều kiện nhiễm mặn. Kết quả của đề tài luận án có ý nghĩa phục vụ công tác tạo chế phẩm sinh học, nâng cao hiệu quả sản xuất cây lúa ở các vùng trồng lúa bị nhiễm mặn. Kết quả của đề tài luận án cũng bổ sung và làm giàu thêm nguồn gen vi sinh vật hữu ích và cung cấp các thông tin về các gen chịu mặn ở cây lúa được kích thích bởi các chủng vi khuẩn kích thích sinh trưởng thực vật.

**Đóng góp mới của luận án:**

Luận án phân lập và sàng lọc các chủng vi khuẩn chịu mặn sinh IAA, ACC deaminase và phân giải phosphate từ các nguồn phân lập khác nhau. Từ đó lựa chọn các chủng chịu mặn mang nhiều nhiều đặc điểm của vi sinh vật kích thích sinh trưởng thực vật và có tiềm năng làm chế phẩm sinh học.

Đánh giá biến đổi biểu hiện của các gen liên quan đến khả năng chịu mặn ở cây lúa với sự hỗ trợ của các chủng vi khuẩn chọn lọc.

Giải trình tự toàn bộ hệ gen của chủng vi khuẩn chọn lọc từ đó xác định được các gen liên quan đến khả năng kích thích sinh trưởng và chịu mặn.



## CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

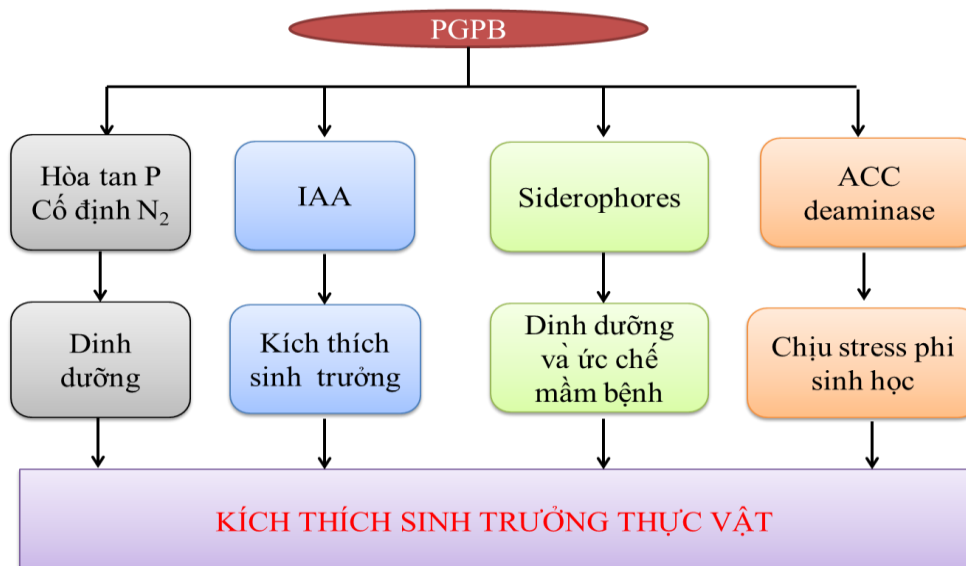
### 1. 1. Tổng quan về vi sinh vật kích thích sinh trưởng thực vật

#### 1.1.1. Khái niệm vi sinh vật kích thích sinh trưởng thực vật

Vi sinh vật bao gồm vi khuẩn, xạ khuẩn, nấm, tảo và động vật nguyên sinh giữ vai trò quan trọng trong việc cấu thành chất lượng đất. Sự đa dạng về chủng loài và mật độ của các loài vi sinh vật phụ thuộc nhiều vào loại đất. Vi sinh vật đất có khả năng phát triển nhanh chóng nhờ sử dụng các chất dinh dưỡng trong đất. Nhóm vi sinh vật này có thể phân bố tự do trong đất, vùng đất xung quanh rễ cây hoặc xâm nhập vào rễ (nội sinh). Đặc biệt, mật độ vi sinh vật được tìm thấy xung quanh rễ cây lớn hơn nhiều so với mật độ vi sinh vật ở các khu vực khác. Nguyên nhân làm mật độ vi sinh vật xung quanh vùng rễ cây cao có thể là các chất dinh dưỡng (axit amin, đường và axit hữu cơ) do hệ rễ tiết ra được các vi sinh vật tại vùng rễ sử dụng cho quá trình trao đổi chất để tồn tại, sinh trưởng và phát triển [1]. Sự tương tác giữa vi sinh vật đất và cây có thể có lợi, có hại hoặc trung tính đối tùy thuộc vào điều kiện của đất. Thậm chí, khi điều kiện đất thay đổi, tác dụng của một loại vi sinh vật cụ thể đối với cây trồng cũng có thể thay đổi theo. Vi sinh vật tồn tại tự do trong đất, ở vùng rễ cây hoặc cư trú nội sinh ở mô thực vật có khả năng làm tăng cường quá trình sinh trưởng và phát triển của thực vật và hỗ trợ thực vật chống lại bệnh tật hoặc tác hại của các yếu stress phi sinh học được gọi chung là vi sinh vật kích thích sinh trưởng thực vật (PGPB) [2].

#### 1.1.2. Đặc điểm của vi sinh vật kích thích sinh trưởng thực vật

Vi sinh vật kích thích sinh trưởng thực vật có thể thúc đẩy sự sinh trưởng và phát triển của thực vật một cách gián tiếp hoặc trực tiếp. Sự thúc đẩy quá trình sinh trưởng ở thực vật xảy ra gián tiếp khi những vi sinh vật này làm giảm hoặc ngăn chặn một số tác động có hại của mầm bệnh (thường là nấm). Trong khi đó, sự thúc đẩy trực tiếp quá trình tăng trưởng thực vật là do các vi sinh vật này tạo điều kiện thuận lợi cho cây trồng thu nhận các chất dinh dưỡng có sẵn trong môi trường như nitơ, sắt và phosphate hòa tan. Đặc biệt, nhóm vi sinh vật này còn có khả năng làm thay đổi nồng độ hormone, điều hòa quá trình tăng trưởng ở thực vật (auxin, cytokinin và ethylene), nhờ đó cây trồng có thể hấp thu và sử dụng một cách có hiệu quả. Một số đặc điểm quan trọng của PGPB được trình bày ở Hình 1.1[2].



Hình 1.1. Đặc điểm của vi sinh vật kích thích sinh trưởng thực vật

#### 1.1.2.1. Khả năng cố định nitơ

Tất cả các sinh vật cần nitơ để tổng hợp các phân tử sinh học như protein và axit nucleic. Tuy nhiên, nguồn nitơ chính trong tự nhiên là nitơ khí quyển ( $N_2$ ) thì hầu hết các sinh vật sống bao gồm cả sinh vật nhân chuẩn không sử dụng được. Cố định nitơ sinh học là quá trình khử  $N_2$  thành ammoniac ( $NH_3$ ) thông qua các vi sinh vật cố định nitơ nhờ đó mà thực vật có thể hấp thụ được nguồn dinh dưỡng nitơ tự nhiên này. Vi sinh vật cố định nitơ có thể ở trạng thái cộng sinh (như hình thành các nốt sần rễ cây đặc biệt là cây họ Đậu) hoặc không cộng sinh (sống tự do trong đất). Các vi sinh vật cố định nitơ thực hiện quá trình cố định nitơ nhờ phức hệ enzyme nitrogenase với sự tham gia của ATP [3]. Vi sinh vật cố định nitơ thuộc nhiều chi khác nhau như: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Herbaspirillum*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azotobacter* và *Klebsiella* ...

*Klebsiella oxytoca* M5a1 là vi sinh vật cố định nitơ đầu tiên mà các gen liên quan đến quá trình tổng hợp nitơ và chức năng của enzyme nitrogenase được xác định và mô tả. Trong bộ gen của vi sinh vật này, 20 gen *nif* được phân bố trong vùng nhiễm sắc thể 24 kb, được tổ chức thành 8 operon: *nifJ*, *nifHDKTY*, *nifENX*, *nifUSVWZ*, *nifM*, *nifF*, *nifLA*, và *nifBQ*. Gen *nifD* và *nifK* mã hóa cho FeMo-protein, gen *nifH* mã hóa cho Fe-protein [4].

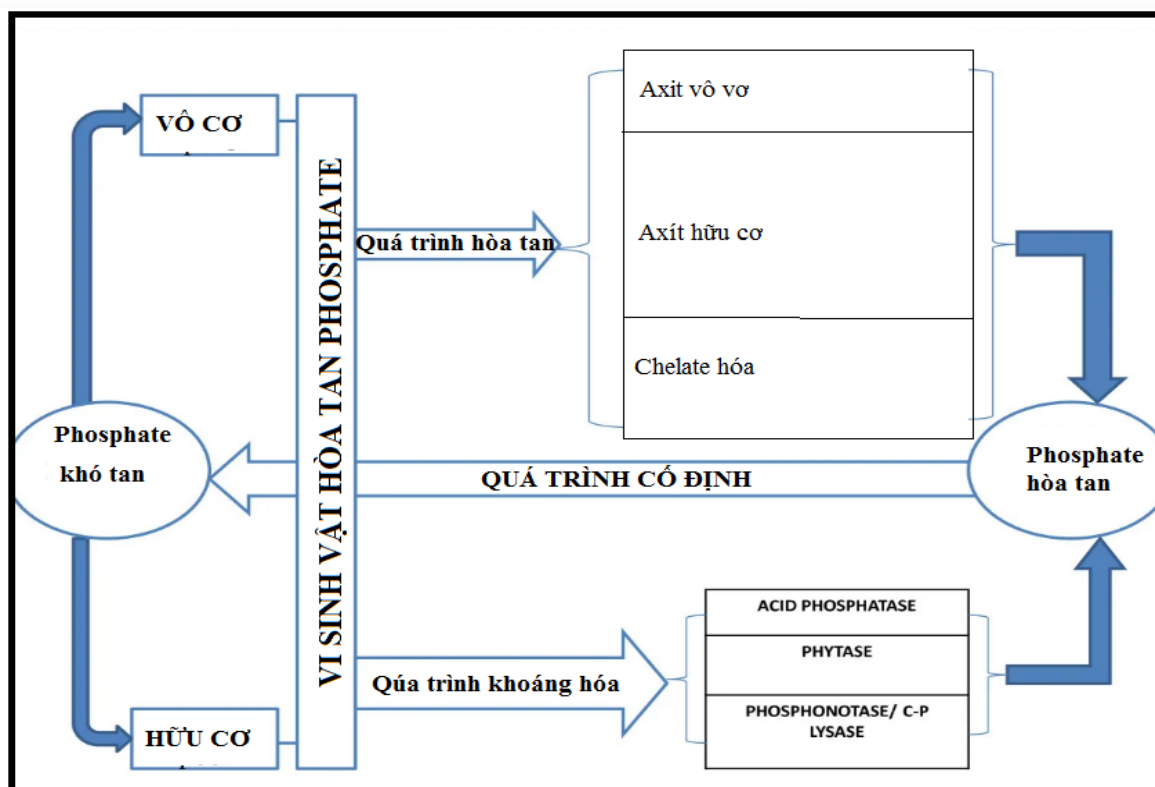
Một số loài trong chi *Bacillus* có khả năng cố định nitơ như *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. circulans*, *B. aerophilus*, *B. flexus* và *B. oceanisediminis*. Cơ sở phân tử của quá trình cố định nitơ ở các loài *Bacillus* dị dưỡng này đã được chứng

minh là nhờ vào sự có mặt của gen *NifH* [5]. Văn Thị Phương Như và Cao Ngọc Diệp (2014) [6] đã chứng minh rằng sử dụng 02 chủng cố định nitơ phân lập từ rễ lúa (*Azospirillum amazonense* và *Burkholderia kururiensis*) có thể cung cấp 50% đạm sinh học cho nhu cầu sinh trưởng và phát triển của cây lúa, cải thiện chất lượng hạt và chất lượng đất trồng lúa ở thành phố Tuy Hòa, tỉnh Phú Yên. Kết quả phân tích gen cho thấy cả hai chủng này đều mang gen *NifH*.

#### 1.1.2.2. Khả năng hòa tan phosphate

Phospho (P) là một trong những nguyên tố thiết yếu cho quá trình sinh trưởng và phát triển của cây trồng, chiếm khoảng 0,2% trọng lượng khô của cây. Phospho được xếp vị trí thứ hai (sau nitơ) trong số các chất dinh dưỡng phổ biến, có ảnh hưởng lớn đến sự phát triển của cây trồng. Cây trồng chỉ hấp thu phospho ở dạng muối hòa tan. Tuy nhiên, trong đất nguyên tố này tồn tại chủ yếu ở dạng muối phosphate không tan của sắt, nhôm và canxi. Hàm lượng phospho trung bình trong đất chiếm khoảng 0,05% (w/w), tuy nhiên chỉ có khoảng 0,1% lượng này là cây trồng có khả năng sử dụng được. Trong quá trình canh tác, khoảng 70-90% lượng phospho ở dạng phosphate được giữ lại thông qua liên kết với  $\text{Ca}^{2+}$  để tạo thành canxi phosphate trong đá vôi, trong đất hoặc với  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  để tạo thành nhôm phosphate ( $\text{AlPO}_4$ ), sắt phosphate ( $\text{FePO}_4$ ) không tan trong đất chua [7].

Một số vi sinh vật có khả năng hòa tan và khoáng hóa phosphate khó tan để cung cấp cho quá trình sinh trưởng và phát triển ở cây trồng. Ngoài phân lân hóa học, quá trình hòa tan và khoáng hóa phosphate của vi sinh vật là cách khả thi duy nhất để tăng nguồn phosphate hòa tan cho cây trồng. Trong môi trường tự nhiên, nhiều vi sinh vật trong đất và rễ có hiệu quả trong việc giải phóng phosphate từ phosphate không tan trong đất thông qua quá trình hòa tan và khoáng hóa [8]. Các vi sinh vật này làm tăng tính khả dụng sinh học của phosphate không tan để thực vật sử dụng. Nhóm vi sinh vật này được gọi là vi sinh vật hòa tan phosphate chủ yếu gồm vi khuẩn, nấm, xạ khuẩn và tảo. Bên cạnh đó, các vi sinh vật đất chịu mặn (halophilic) cũng thể hiện khả năng hòa tan phosphate, nhờ đó kích thích quá trình sinh trưởng và phát triển của cây trồng trong điều kiện nhiễm mặn. Vi sinh vật hòa tan phosphate bằng nhiều cơ chế khác nhau như: hòa tan bằng axit, chelat hóa và khoáng hóa (Hình 1.2).



Hình 1.2. Cơ chế hòa tan phosphate của vi sinh vật [8]

+) Hoà tan bằng axit: Cơ chế chính của quá trình hòa tan phosphate trong đất là làm giảm pH của đất thông qua sản xuất axit hữu cơ hoặc giải phóng các proton. Trong đất kiềm, phosphate kết hợp với canxi tạo canxi phosphate, không hòa tan trong đất. Độ hòa tan của hợp chất này tăng lên khi pH của đất giảm xuống. Sự có mặt của các axit hữu cơ làm giảm pH khiến cho hợp chất phosphate ở dạng kết tủa dễ dàng bị hòa tan [8]. Các vi sinh vật khác nhau tạo ra các loại và lượng axit hữu cơ khác nhau. Hiệu quả của quá trình hòa tan phụ thuộc vào độ mạnh và tính chất của axit sinh ra. Trong đó, các axit tri- và di-carboxylic có hiệu quả hơn so với các axit monobasic và axit vòng thơm. Các axit béo được cho là có khả năng hòa tan phosphate hiệu quả hơn so với axit phenolic, citric và fumaric. Một số axit hữu cơ khác có khả năng hòa tan phosphate như axit citric, lactic, gluconic, 2-ketogluconic, oxalic, glyconic, acetic, malic, fumaric, succinic, malonic, glutaric, propionic, butyric, glyoxalic và adipic. Trong đó, axit gluconic và axit ketogluconic là hai axit có khả năng hòa tan phosphate mạnh hơn. Cụ thể, axit gluconic là axit hữu cơ chính được sản xuất bởi các vi khuẩn như *Pseudomonas* sp., *Erwinia herbicola* và *B. cepacia*. Axit ketogluconic xuất hiện ở một số chủng *R. leguminosarum*, *R. meliloti* và *B. firmus*. Ngoài ra, hai loài *B. licheniformis* và *B. amyloliquefaciens* có khả

năng hòa tan phosphate mạnh do khả năng sinh hỗn hợp nhiều loại axit hữu cơ như lactic, isovaleric, isobutyric và axetic [9].

+) Quá trình chelat hóa: Các axit hữu cơ và vô cơ được sản xuất bởi vi sinh vật hòa tan phosphate bằng cách chelat hoá với các cation và cạnh tranh vị trí hấp phụ trong đất với phosphate. Các nhóm hydroxyl và carboxyl của phức axit chelate-cation liên kết với phosphate, tạo thành các dạng hòa tan [10]. Axit 2-ketogluconic có thể hình thành phức chelat  $\text{Ca}^{2+}$  mạnh. Axit nitric và axit sulphuric phản ứng với canxi phosphate và chuyển hóa thành dạng hòa tan.

+) Quá trình khoáng hóa: Thực vật và động vật chứa một lượng lớn các hợp chất phosphate hữu cơ như axit nucleic, phospholipid, phosphate đường, axit phytic, polyphosphate và phosphonate. Các vi sinh vật khoáng hóa phospho hữu cơ trong đất bằng cách sản xuất các phosphatase như phytase thủy phân các dạng hữu cơ của các hợp chất phosphate, do đó giải phóng phosphate vô cơ để thực vật sử dụng. Một số nấm sản xuất phytase như: *Aspergillus candus*, *A. fumigatus*, *A. fumigatus*. *Bacillus* và *Streptomyces* spp. có khả năng khoáng hóa các phosphate hữu cơ phức tạp nhờ vào sản xuất các enzyme ngoại bào như phosphoesterase, phosphodiesterase, phytase và phospholipases [10].

Sử dụng vi sinh vật hòa tan phosphate như một loại chế phẩm vi sinh để phục hồi đất bạc màu và khôi phục năng suất của đất sản xuất nông nghiệp. Chủng *B. thuringiensis* có khả năng hòa tan phosphate cao làm tăng chiều dài của rễ lúa trong phòng thí nghiệm. Khi sử dụng kết hợp hai chủng *Azotobacter chroococcum* và *B. subtilis* năng suất lúa mì được cải thiện đáng kể [11].

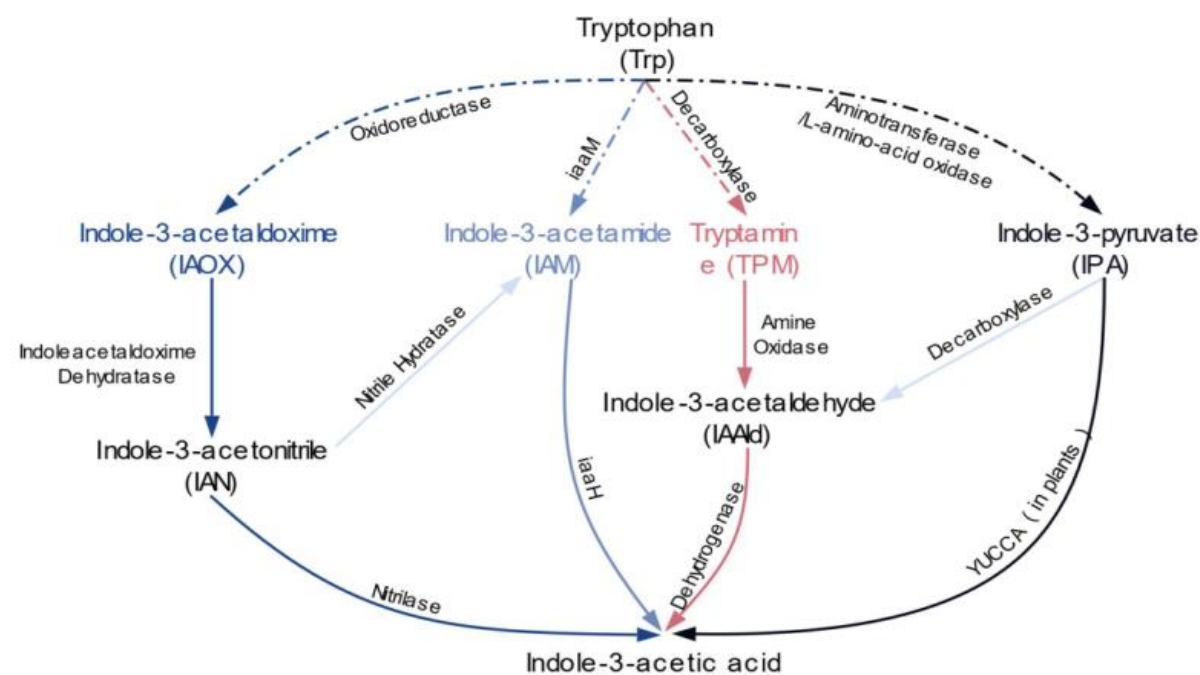
Sử dụng vi sinh vật hòa tan phosphate phục hồi và cải tạo đất nông nghiệp nhiễm mặn-kiềm sẽ cho hiệu quả cao mà không gây ra bất kỳ nguy hiểm nào về môi trường hoặc sức khỏe do quá trình sử dụng phân bón tổng hợp liên tục. Chủng *Kushneria* sp. YCWA18 chịu mặn, hòa tan phosphate vô cơ và phosphate hữu cơ có thể được sử dụng để cải tạo đất nông nghiệp nhiễm kiềm mặn [12]

Theo Văn Thị Phương Như và Cao Ngọc Diệp (2014) [13] hai chủng vi khuẩn *P. putida* TAL01 và *B. subtilis* TAL04 hòa tan phosphate khó tan đã cung cấp 50% lân hữu dụng cho cây lúa trồng trên đất thịt pha cát ở thành phố Tuy Hòa, tỉnh Phú Yên.

### 1.1.2.3. Khả năng sinh tổng hợp IAA

Axit indole-3-acetic (IAA) là hormone kích thích sự phát triển ở thực vật, thuộc nhóm auxin, là nhóm có tác dụng sinh lý mạnh nhất. IAA ảnh hưởng đến sự phân chia, kéo dài và biệt hóa tế bào; kích thích sự nảy mầm của hạt và củ; tăng tỷ lệ phát triển xylem và rễ; kiểm soát các quá trình sinh trưởng sinh dưỡng; hình thành rễ bên; sự ra hoa; ảnh hưởng đến quá trình quang hợp, hình thành sắc tố, sinh tổng hợp các chất chuyển hóa khác nhau và chống lại các điều kiện bất lợi [14].

Kết quả phân tích ở các loài vi sinh vật khác nhau cho thấy sự tương đồng giữa con đường sinh tổng hợp IAA ở thực vật và vi sinh vật. IAA thường được tổng hợp theo hai con đường là phụ thuộc và không phụ thuộc tryptophan. Ở vi sinh vật con đường tổng hợp IAA không phụ thuộc tryptophan còn chưa rõ ràng. Có bốn con đường tổng hợp IAA phụ thuộc tryptophan được phân loại dựa trên hợp chất trung gian trong quá trình chuyển hóa gồm indole-3-pyruvate (IPA), tryptamine (TPM), indole-3-acetonitrile (IAN) và indole-3-acetamide (IAM) (Hình 1.3).



Hình 1.3. Con đường sinh tổng hợp IAA [15]

Con đường tổng hợp IAA từ indole-3-acetamide (IAM): Con đường tổng hợp IAA qua hợp chất trung gian indole-3-acetamide được đánh giá là phổ biến nhất và đặc trưng cho sự tổng hợp IAA của vi sinh vật. Đầu tiên tryptophan được chuyển thành IAM bởi enzyme tryptophan-2-monooxygenase (*IaaM*) mã hóa bởi gen *IaaM*. Tiếp theo, IAM được chuyển thành IAA thông qua sự xúc tác của IAM hydrolase (*IaaH*) mã hóa bởi gen *iaaH* [16]

Con đường tổng hợp IAA từ indole-3-pyruvate (IPyA): Con đường indole-3-pyruvate được cho là một con đường chính cho sinh tổng hợp IAA trong thực vật. Tuy nhiên, các gen chủ chốt và enzyme chưa được xác định trong các loài thực vật. Ở vi sinh vật, sản xuất IAA thông qua con đường IPyA đã được mô tả ở nhiều loài như *Pantoea agglomerans*, *Bradyrhizobium* sp., *Azospirillum* sp., *Rhizobium* sp., *Enterobacter cloacae* và vi khuẩn lam. Bước đầu tiên trong con đường này là biến đổi tryptophan thành IPyA nhờ vào vai trò xúc tác của aminotransferase (transamination). Trong tỷ lệ giới hạn thì IPyA bị decarboxylated thành indole-3-acetaldehyd (IAAld) bởi decarboxylase indole-3-pyruvate (IPDC). Trong bước cuối cùng IAAld bị oxy hóa thành IAA [17].

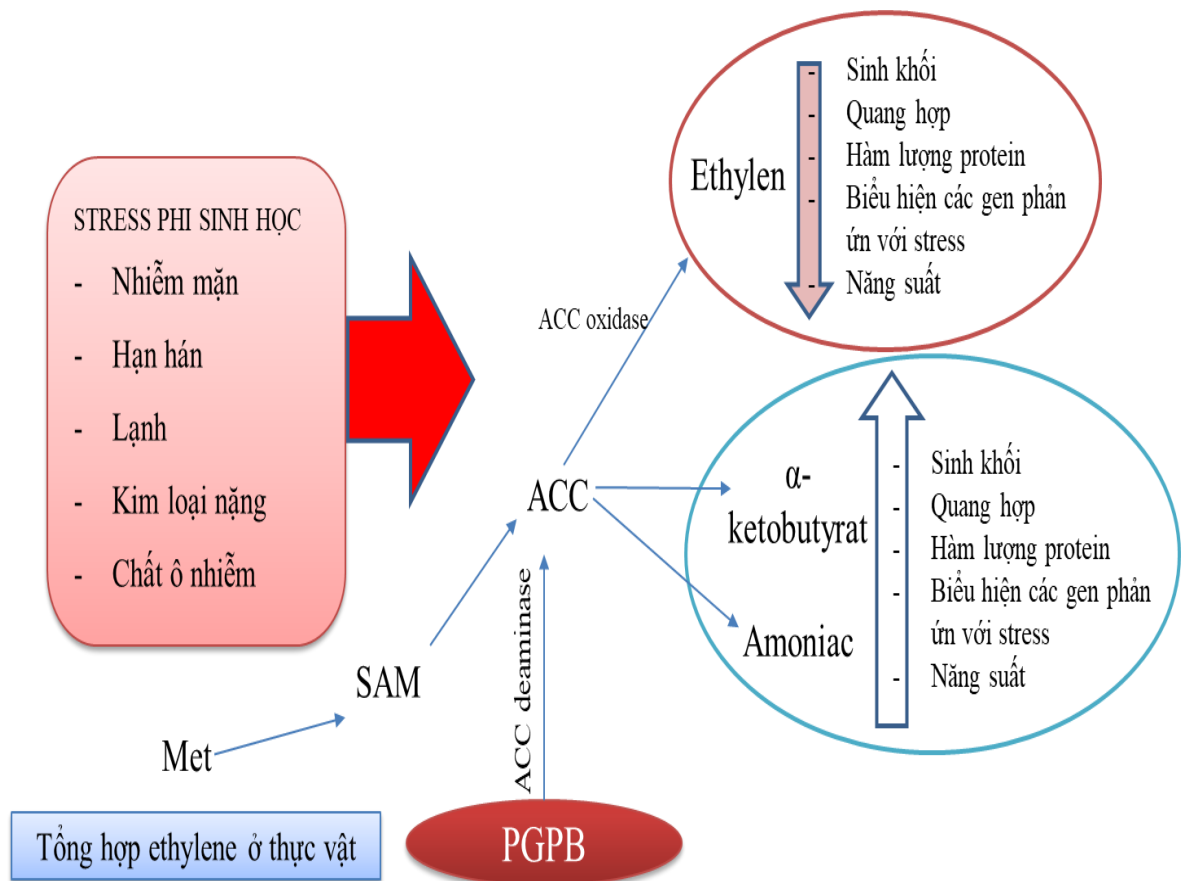
Con đường tổng hợp IAA từ tryptamine (TPM): Tryptophan được chuyển hoá thành TPM bởi decarboxylase sau đó TPM chuyển hoá thành IAAld bởi amine oxidase. Cuối cùng IAAld được chuyển hoá thành IAA bởi dehydrogenases. Trp có thể được chuyển hoá trực tiếp thành IAAld bởi tryptophan side chain monooxygenase theo con đường tổng hợp IAA từ tryptophan side-chain oxidase (TSO). Tuy nhiên con đường này chỉ được tìm thấy trong *P. fluorescens* CHA0 [18]

Con đường tổng hợp IAA từ indole-3-acetonitrile (IAN): Đầu tiên tryptophan chuyển hoá thành indole-3-acetaldoxime (IAOX) bởi oxidoreductase, tiếp theo IAOX được chuyển hoá thành indole-3-acetonitrile (IAN) bởi indoleacetaldoxime dehydratase. Khi đó, IAN có thể được chuyển hoá thành IAA bởi nitrilases hoặc hệ NHase/amidase [19].

#### 1.1.2.4. Khả năng sinh ACC deaminase

Khả năng sinh enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase (ACCD) là một đặc điểm quan trọng của PGPB, giúp thực vật sinh trưởng và chống chịu với các yếu tố stress phi sinh học như hạn hán và nhiễm mặn. Ethylene là hormone thuộc nhóm ức chế sự phát triển của thực vật. Khi gặp các yếu tố stress môi trường như nhiệt độ cao, nhiệt độ thấp, hạn hán, kim loại nặng, chất ô nhiễm hữu cơ và độ mặn cao cây trồng sản sinh ra ethylene để hạn chế quá trình phát triển của thân và rễ. Hiện tượng này được gọi là stress ethylene. Thực vật phản ứng với stress bằng cách sản xuất hợp chất axit 1-amino-cyclopropane-1-carboxylic (ACC), tiền chất của ethylene. ACC được cây trồng tiết vào trong đất ở vị trí xung quanh vùng rễ và được hệ thống rễ hấp thụ lại một lần nữa trước khi chuyển thành

ethylene. Cơ chế để vi sinh vật kích thích sinh trưởng thực vật làm giảm stress là làm giảm nồng độ ethylene thông qua việc thủy phân tiền chất là ACC bằng ACC deaminase. Vi sinh vật kích thích tăng trưởng thực vật chứa ACC deaminase có thể phân giải ACC thành amoniac và  $\alpha$ -ketobutyrate, làm giảm hàm lượng ethylene bên trong cây (Hình 1.4). Do đó, PGPB chứa ACC deaminase có khả năng hạn chế tác hại của các yếu tố stress phi sinh học. Một số nghiên cứu cho thấy, thực vật được nhiễm PGPB có chứa ACC deaminase, có thể hỗ trợ cây trồng chống chịu nhiều yếu tố stress khác nhau như nhiễm mặn, hạn hán, lũ lụt và mầm bệnh. Gen *acdS* mã hóa ACC deaminase đã được phát hiện trong một số loài vi khuẩn và nấm. Gần đây, ACC deaminase đã được tìm thấy trong nhiều loại vi khuẩn gram âm, vi khuẩn gram dương đặc biệt là vi khuẩn nội sinh [21].



Hình 1.4. Vai trò của PGPB sinh ACC deaminase trong việc kích thích sinh trưởng thực vật khi bị stress phi sinh học [20]

#### 1.1.2.5. Khả năng sinh siderophores

Siderophores là các phân tử hữu cơ nhỏ được tạo ra bởi các vi sinh vật trong điều kiện hạn chế sắt, hỗ trợ tăng cường quá trình hấp thu sắt. Các vi sinh vật tạo ra một loạt các siderophores, hầu hết là catecholate (enterobactin), một số ít là



carboxylate (rhizobactin) và hydroxamate (ferrioxamine) [22]. Tuy nhiên, cũng có một số loại siderophores của vi sinh vật có chứa hỗn hợp các nhóm chức pyoverdine [23]. Một số loài vi sinh vật có khả năng tìm hãm hoặc tiêu diệt nấm bệnh bằng cách sử dụng các siderophores tự sinh. Nguyên nhân có thể là do các siderophores có ái lực với sắt lớn hơn nhiều so với nấm bệnh, vì vậy, nấm bệnh không thể phát triển trong rễ của cây chủ do thiếu sắt. Một số tác giả đã chứng minh bằng thực nghiệm về vai trò của siderophores trong việc ngăn chặn các bệnh thực vật gây ra bởi nấm. Nghiên cứu sử dụng các chủng vi sinh vật mang đột biến khiếm khuyết sinh tổng hợp siderophore cho thấy các chủng này kém hiệu quả hơn các chủng đối chứng trong việc bảo vệ cây chống lại nấm bệnh. Rungin và cộng sự (2012) [24] cho thấy cây lúa nhiễm chủng xạ khuẩn nội sinh *Streptomyces* sinh siderophores có sinh khối rễ và chồi tăng hơn so với đối chứng do sự tăng cường cung cấp Fe.

## **1.2. Vi sinh vật chịu mặn và cơ chế hỗ trợ thực vật chịu mặn nhờ PGPB**

### **1.2.1. Vi sinh vật chịu mặn**

Vi sinh vật chịu mặn có thể sinh trưởng trong dải nồng độ muối từ 1 đến 33%. Vi sinh vật chịu mặn nhẹ có khả năng sinh trưởng ở dải nồng độ muối từ 1 đến 8%, chịu mặn trung bình từ 8 đến 15% và khả năng chịu mặn cao có thể sinh trưởng ở nồng độ muối trên 15% [25]. Vi khuẩn chịu mặn sử dụng một loạt các chiến lược để phát triển và tồn tại trong môi trường mặn. Các chiến lược này bao gồm (1) giảm thiểu sự hấp thu muối do các thành phần cấu tạo của màng tế bào hoặc thành tế bào; (2) điều chỉnh nồng độ ion nội bào bằng cách bơm các ion ra khỏi tế bào thông qua kênh vận chuyển  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  và  $\text{K}^+/\text{Na}^+$ ; (3) tích lũy các chất hòa tan tương thích như sucrose, trehalose, glycosylglycerol và glycinebetaine tổng hợp nội sinh; (4) sản xuất protein và enzym thích nghi với nồng độ muối cao và (5) tổng hợp exopolysaccharides tạo màng sinh học ngăn chặn sự hấp thu muối [26, 27].

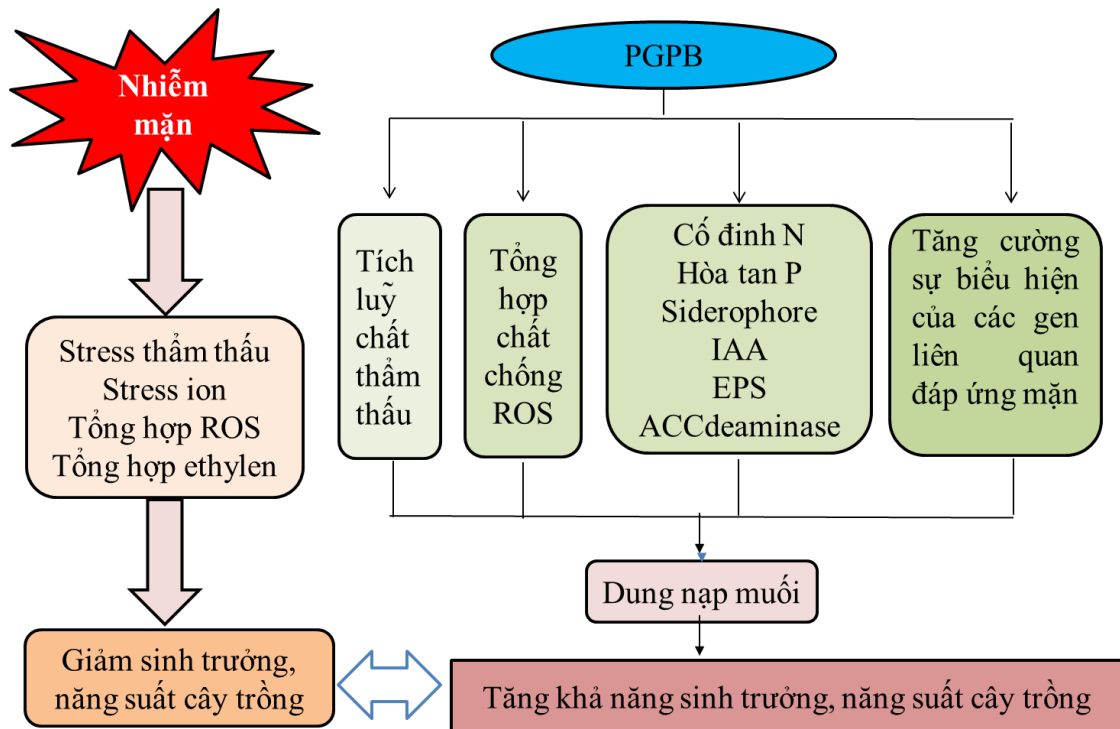
Vi sinh vật chịu mặn thường phân bố phổ biến ở vùng rễ của các loài cây ưa mặn, chúng có các đặc điểm của PGPB và các đặc điểm này vẫn có khả năng duy trì ngay cả ở nồng độ muối cao. Những vi sinh vật này hỗ trợ cho cây trồng chịu mặn và có vai trò quan trọng trong nông nghiệp do có tiềm năng trong việc cải thiện năng suất cây trồng ở các vùng khô hạn và nhiễm mặn. Tiwari và cộng sự (2011) [28] đã phân lập được các chủng *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas mendocina*, *Arthrobacter* sp., *Halomonas* sp., và *Nitrinicola lacisaponensis* chịu mặn từ 2 đến

25% NaCl có các đặc điểm kích thích sinh trưởng thực vật như hòa tan phosphate và sản xuất IAA, siderophore và ACC deaminase. Zhang và cộng sự (2018) [29] đã phân lập được 305 chủng vi khuẩn chịu mặn từ đất vùng rễ lúa tại Giang Tô, Trung Quốc, trong số đó có 162 chủng có khả năng chịu được muối với nồng độ NaCl lên đến 150 g/l. Kết quả phân loại 74 chủng chịu mặn cho thấy thuộc các bộ *Bacillales* (72%), *Actinomycetales* (22%), *Rhizobiales* (1%) và *Oceanospirillales* (4%). Hầu hết các dòng phân lập có tiềm năng trong việc cải thiện khả năng chịu mặn, tăng trưởng và năng suất lúa.

### **1.2.2. Cơ chế hỗ trợ thực vật chịu mặn nhờ PGPB**

Nhiễm mặn làm giảm sự tăng trưởng và phát triển ở thực vật bằng cách thay đổi quá trình sinh hóa và sinh lý của cây như quá trình phát triển lá, tăng trưởng hệ rễ, hấp thụ nước, độ dẫn khí khổng và quang hợp. Nguyên nhân là do sự mất cân bằng thẩm thấu và gây độc ion. Sự mất cân bằng thẩm thấu ở giai đoạn đầu xảy ra ngay lập tức khi nồng độ muối tăng lên trên ngưỡng xung quanh rễ, gây ra sự thiếu hụt nước trong rễ và làm tăng trưởng chồi bị hạn chế. Tuy nhiên, hiện tượng này sau đó có thể phục hồi để tốc độ tăng trưởng của cây được ổn định. Giai đoạn thứ hai phát triển theo thời gian và được thúc đẩy bởi độc tính của các ion  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  dư thừa tích tụ trong tế bào chất. Khi nồng độ muối vượt quá tốc độ thải trừ của rễ hoặc khả năng ngăn chặn muối vào tế bào, nó sẽ tích tụ trong tế bào chất và phá vỡ cấu trúc và chức năng của tế bào [30]. Do đó, việc tăng cường khả năng chịu mặn ở thực vật đều hướng đến duy trì cân bằng thẩm thấu và cân bằng nội môi ion.

Vi sinh vật kích thích sinh trưởng thực vật làm tăng khả năng chịu mặn của thực vật nhờ các cơ chế sau (Hình 1.5): (1) tích lũy các chất thẩm thấu để giảm bớt sự mất cân bằng áp suất thẩm thấu; (2) tổng hợp các chất chống oxy hóa để ngăn chặn stress oxy hóa; (3) tăng hấp thụ dinh dưỡng ở thực vật nhờ quá trình cố định nitơ, hòa tan phosphate và sinh siderophores hấp thụ Fe; (4) sinh tổng hợp ACC deaminase, chuyển đổi ACC tiền thân ethylene ở thực vật thành amoniac và  $\alpha$ -ketobutyrate do đó làm giảm sự tích tụ ethylene trong thực vật và tránh ức chế tăng trưởng qua trung gian ethylene để đáp ứng với các stress phi sinh học như hạn, mặn; (5) sinh tổng hợp IAA; (6) tổng hợp exo-polysacaride (EPS) tạo vỏ bọc quanh rễ để liên kết các cation (đặc biệt là  $\text{Na}^+$ ) trong rễ và ngăn chặn sự vận chuyển lên lá; (7) Tăng cường sự biểu hiện của các gen phản ứng với stress mặn;



Hình 1.5. Cơ chế làm tăng tính chịu mặn ở thực vật nhờ PGPB

### 1.2.2.1. Tích lũy các chất thẩm thấu

Sự tích tụ của các ion muối xung quanh rễ cây gây ra stress thẩm thấu và mất cân bằng thẩm thấu. Thực vật tích lũy các chất thẩm thấu hữu cơ như proline, glycine, betaine, polyamine, các hợp chất amoni bậc bốn và các axit amin khác để phản ứng với các stress phi sinh học [31]. Vi sinh vật cũng sử dụng cơ chế này để thích nghi với stress thẩm thấu thường xảy ra khi nhiễm mặn [32]

Vi sinh vật kích thích tăng trưởng thực vật làm tăng khả năng giữ nước của thực vật thông qua tích lũy các chất thẩm thấu như proline, trehalose và glycine betaines hỗ trợ thực vật vượt qua cú sốc thẩm thấu ban đầu sau khi nhiễm mặn. Vardharajula và cộng sự (2011) [33] đã chỉ ra rằng *Bacillus* sp. đã hỗ trợ kích thích sự sinh trưởng của cây ngô khi bị hạn và nhiễm mặn do sự tích lũy proline và một số loại đường hoà tan.

### 1.2.2.2. Cải thiện sự hấp thu chất dinh dưỡng

Khả năng hấp thu các chất dinh dưỡng của cây trồng phụ thuộc vào các yếu tố như: pH của đất, độ ẩm, kết cấu và thành phần vi sinh vật trong đất. Trong hầu hết các trường hợp, cây trồng hấp thu chất dinh dưỡng trong phạm vi pH 5-7. Khi bị hạn mặn, các chất hợp chất trong đất hình thành cấu trúc ổn định thông qua liên kết

với các cation và anion, do đó làm thay đổi pH và ngăn cản sự hấp thụ chất dinh dưỡng của cây trồng.

Nitơ là nguyên tố dinh dưỡng quan trọng cần thiết cho sự phát triển của thực vật, sự hấp thụ bị hạn chế khi chịu tác động của mặn. Việc nhiễm PGPB có khả năng cố định nitơ làm tăng sự hấp thụ nitơ bằng cách liên kết cộng sinh và không cộng sinh với cây trồng [34].

Phospho là yếu tố dinh dưỡng thiết yếu cho quá trình quang hợp, hô hấp và sinh tổng hợp các đại phân tử ở cây trồng. Trong đất, phospho tồn tại ở cả hai dạng: vô cơ và hữu cơ. Tuy nhiên, đối với các loại đất nông nghiệp, tính khả dụng của phospho rất hạn chế. Đặc biệt, nhiễm mặn làm cho phospho khả dụng trong đất bị lắng đọng và cạn kiệt. Các vi sinh vật hòa tan phosphate, có khả năng hòa tan trầm tích phospho, nhờ đó làm tăng hàm lượng phospho khả dụng trong đất cho cây trồng gặp hạn mặn có thể sử dụng [35]

Sắt (Fe) đóng vai trò là cofactor của 140 enzyme, xúc tác cho một loạt phản ứng sinh hóa của các quá trình trao đổi chất ở cây trồng. Thực vật và vi sinh vật không hấp thụ được sắt ở dạng hydroxit không tan. Khi đất bị nhiễm mặn, lượng sắt không tan tăng lên, sắt hòa tan giảm xuống. Vi sinh vật sinh tổng hợp siderophores như một phương tiện để thu nhận Fe. Thực vật có hai cách để hấp thụ sắt. Thực vật có thể hấp thụ sắt từ các phức siderophores bằng cách phân hủy cấu trúc chelat hoặc hấp thụ trực tiếp [36].

### **1.2.2.3. Sinh tổng hợp IAA**

Một trong những cơ chế chung để thực vật thích ứng với các yếu tố stress là sự thay đổi hình thái rễ. Các hormone kích thích sinh trưởng ở thực vật, đặc biệt là auxin, đóng vai trò quan trọng trong quá trình này. Trong đó, IAA là loại hormone tự nhiên, thuộc nhóm auxin do cây trồng hoặc một số vi sinh vật tổng hợp ra. Hợp chất này tham gia vào quá trình phân chia và phát triển tế bào, biệt hóa tế bào và mô, kích thích sự nảy mầm của hạt, hình thành và phát triển hệ thống rễ, sự hình thành rễ bên. Ngoài ra, IAA kích thích quá trình quang hợp thông qua tăng cường hình thành các sắc tố. Trên cơ sở đó, IAA hỗ trợ cây trồng chống chịu với các điều kiện bất lợi trong đó có hạn mặn.

Tác dụng tích cực của vi sinh vật sinh IAA đối với sự phát triển của cây trồng trong điều kiện hạn mặn đã được chứng minh. Cụ thể, Saghaf và cộng sự

(2018) [37] đã ngâm hạt giống cây cải dầu (*Brassica napus* L.) với IAA thu được từ vi khuẩn đất *Rhizobium* và nhận thấy khả năng sinh trưởng và phát triển của cây cải dầu cải thiện đáng kể trong điều kiện gặp stress muối. Tương tự, tăng khả năng hấp thu các chất dinh dưỡng, nước và sự hình thành rễ bên của cây lúa mì (*Triticum aestivum*) trong điều hạn hán khi ủ hạt giống với IAA thu được từ *Azospirillum* sp. và *R. leguminosarum* [38].

#### **1.2.2.4. Sinh tổng hợp ACC deaminase**

Như đã mô tả ở trên, PGPB tiết ra ACC deaminase có thể làm giảm mức ethylene bằng cách chuyển hóa ACC, một tiền chất của ethylene do thực vật sản xuất, thành  $\alpha$ -ketobutyrate và amoniac. Các cây trồng được nhiễm PGPB sinh ACC deaminase có rễ phát triển dài hơn, do giảm ethylene làm tăng cường khả năng chống chịu mặn [39].

Aslam và Ali (2018) [40] đã báo cáo một số loài sinh ACC deaminase thuộc các chi *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Gracilibacillus*, *Virgibacillus*, *Salinicoccus*, *Pseudomonas* và *Exiguobacterium* được phân lập từ cây *Suaeda fruticosa* (L.) Forssk có khả năng kích thích sinh trưởng của ngô trong điều kiện nhiễm mặn. Jaemsaeng và cộng sự (2018) [41] đã nghiên cứu vai trò của ACC deaminase trong việc hỗ trợ lúa chịu stress mặn. Cây lúa nhiễm chủng xạ khuẩn *Streptomyces* mang gen *acdS* tổng hợp ACC deaminase có khả năng làm tăng khả năng chịu mặn so với cây lúa được cấy cùng chủng *Streptomyces* bị bất hoạt gen *acdS*. Theo Xu và cộng sự (2021) [42] các chủng thuộc các chi *Pseudomonas corrugata*, *Enterobacter soli* và *Achromobacter ruhlandii* có khả năng sinh ACC deaminase và làm tăng khả năng chịu mặn ở cây nho.

#### **1.2.2.5. Exo-polysaccharide**

Vi sinh vật hạn chế sự hấp thu muối của thực vật bằng nhiều cách thức khác nhau như: bẫy các cation trong ma trận exo-polysaccharide (EPS), thay đổi cấu trúc rễ bằng mở rộng thân rễ và điều chỉnh sự biểu hiện của chất vận chuyển ái lực ion. PGPB có khả năng tổng hợp EPS, tạo thành một ma trận gồm các vi hạt, giữ vai trò như một lớp màng bảo vệ giúp cây trồng chống lại sự biến động của môi trường bằng cách tăng cường khả năng giữ nước, chất dinh dưỡng trong đất và sự hình thành các tế bào biểu mô [43]. Atouei và cộng sự (2019) [44] nhận thấy rằng EPS tạo ra bởi các chủng có khả năng chịu mặn như *B. subtilis* subsp. *inaquosorum* và *Marinobacter lipolyticus* SM19 đã giúp cây lúa mì sinh trưởng và phát triển bình

thường trong điều kiện hạn hán và nhiễm mặn. Chu và cộng sự (2019) [45] đã chứng minh được vai trò của EPS từ *Pseudomonas* PS01 trong việc điều chỉnh các gen liên quan đến khả năng chống chịu lại các yếu tố bất lợi ở cây *Arabidopsis thaliana*.

#### **1.2.2.6. Hoạt hóa hệ enzyme chống oxi hóa**

Khi đối mặt với các yếu tố stress phi sinh học, thực vật sản xuất một lượng lớn các chất oxi hóa (ROS) như là gốc tự do superoxide ( $O_2^-$ ), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), gốc tự do hydroxyl ( $OH^-$ ) và các gốc tự do alkaline. ROS tiếp xúc với protein, lipids và DNA tạo ra các phản ứng oxi hóa làm phá hủy chức năng của tế bào thực vật. Để đối phó với tình trạng này, thực vật đã sử dụng hệ thống phòng thủ chống oxi hóa gồm các thành phần là enzyme hoặc không phải enzyme để ngăn chặn sự tích lũy ROS và các stress oxi hóa. Các enzyme chống oxi hoá bao gồm peroxidases, superoxide dismutase, catalase, ascorbate peroxidase, glutathione reductase, dehydroascorbate reductase, monodehydroascorbate reductase, glutathione peroxidases và glutathione-S-transferase. Các thành phần không phải enzyme bao gồm glutathione, tocopherol, anthocyanins, hợp chất phenolic (như flavonoid, lutein và tannin) và axit ascorbic [46].

Sử dụng PGPB cảm ứng sự biểu hiện quá mức của các enzyme chống oxi hóa là một trong những phương thức giúp thực vật dung nạp các yếu tố stress. Một số nghiên cứu chỉ ra rằng sử dụng PGPB có thể làm tăng hoạt tính của các enzyme chống oxi hóa ở thực vật như POX, SOD, CAT, APX và GR [47]. Patel và Saraf (2013) [48] đã công bố một số loài *E. cloacae*, *P. pseudoalcaligenes* và *Bacillus* sp., có khả năng làm tăng mức độ biểu hiện APX và CAT trong lá cây *Jatropha*, kích thích sự hình thành rễ, tăng sinh khối, tăng khả năng hấp thụ N, P, K và hàm lượng chlorophyll, nhờ đó loại cây này có thể chống chịu lại stress mặn.

#### **1.2.2.7. Tăng cường sự biểu hiện các gen liên quan đến đáp ứng mặn**

Vi sinh vật chịu mặn kích thích sinh trưởng thực vật có khả năng hỗ trợ thực vật chịu mặn do làm tăng cường sự biểu hiện của các gen liên quan đến đáp ứng mặn. Nghiên cứu của Sukweenadhi và cộng sự (2015) [49] cho thấy nhiễm PGPB ở cây *Arabidopsis* làm tăng đáng kể mức độ phiên mã của *AtRSA1* và *AtWRKY8* và làm giảm sự biểu hiện của *AtVQ9* khi bị nhiễm mặn. Gen *AtRSA1* tạo thành một phức hợp với yếu tố phiên mã AtRITF1 để điều chỉnh cân bằng nội môi ion  $Na^+$  và

giải độc ROS trong quá trình stress muối; *AtWRKY8* và *AtVQ9* cũng tham gia vào việc duy trì cân bằng nội môi ion, làm giảm tỷ lệ  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  trong tế bào chất. Nhiễm chủng *Enterobacter* sp. EJ01 làm tăng biểu hiện của các gen liên quan đến đáp ứng với stress mặn ở *Arabidopsis* gồm *RAB18*, *P5CS1*, *P5CS2*, *MPK3* và *MPK6* [50]. Nhiễm *B. subtilis* GB03 làm tăng khả năng sinh trưởng cây *P. tenuiflora* khi bị nhiễm mặn, đồng thời làm tăng biểu hiện của gen *PtHKT1* (tham gia vào quá trình thu nhận  $\text{Na}^+$  từ xylem) và *SOS1* dẫn đến giảm tích lũy  $\text{Na}^+$  và làm giảm biểu hiện *PtHKT2* (hấp thụ  $\text{Na}^+$  ở rễ) [51]. Khan và cộng sự (2019) nhiễm chủng *Arthrobacter woluwensis* AK1 vào cây đậu tương làm tăng sự biểu hiện các gen *GmLAX1* (kháng auxin 1), *GmAKT2* (kênh kali), *GmST1* (chịu mặn 1) và *GmSALT3* (gen liên quan đến tính chịu mặn trên nhiễm sắc thể số 3) và giảm biểu hiện của gen vận chuyển ion *GmNHX1* và *GmCLC1* khi bị nhiễm mặn [52]

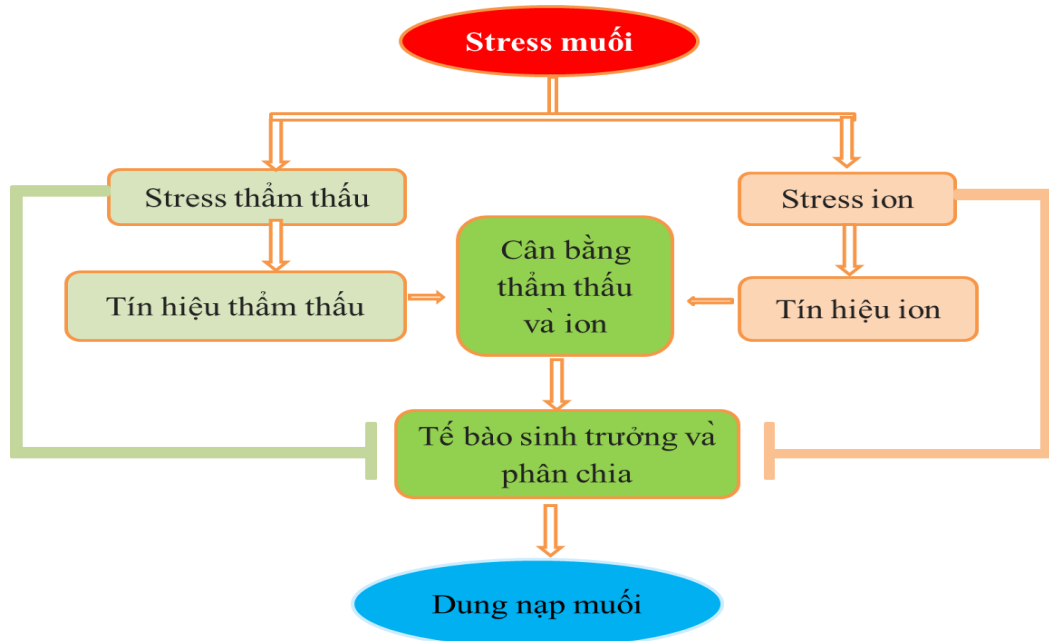
### 1.3. Sự đáp ứng với stress mặn của cây lúa

#### 1.3.1. Ảnh hưởng của stress mặn lên cây lúa

Lúa là cây lương thực nhạy cảm với muối. Stress mặn làm thay đổi hình thái cây lúa như suy giảm khả năng hình thành hệ thống rễ, héo lá, giảm đẻ nhánh hơn trên mỗi cây, giảm sinh khối, giảm chiều cao cây, giảm số hạt lúa và nhiều hạt lép hơn trên bông và cuối cùng dẫn đến giảm năng suất [53]. Stress mặn ảnh hưởng đến sinh lý và sinh hóa thực vật ở tất cả các giai đoạn phát triển từ nảy mầm đến già đi, làm mất cân bằng thẩm thấu và ion cuối cùng gây ra stress oxy hóa và cạn kiệt chất dinh dưỡng trong tế bào thực vật [54].

Stress muối liên tục làm giảm áp lực trương nước của tế bào thực vật, do đó làm giảm sự phát triển của tế bào, thực vật phải điều chỉnh thẩm thấu để duy trì sự mở rộng và tăng trưởng của tế bào [55]. Stress thẩm thấu (gây ra bởi thế nước thấp hơn của dung dịch bên ngoài) được thực vật nhanh chóng cảm nhận ngay sau khi tiếp xúc với điều kiện mặn và dẫn đến thiếu hụt nước và chất hòa tan trong cây. Stress thẩm thấu cũng dẫn đến việc đóng khí khổng nhanh chóng, làm giảm khả năng đồng hóa  $\text{CO}_2$  và ức chế quá trình quang hợp ở thực vật [56]. Stress ion làm tích tụ  $\text{Na}^+$  và  $\text{Cl}^-$  trong tế bào thực vật, cuối cùng dẫn đến lá già sớm và thậm chí chết cây, điều này là do độc tính của  $\text{Na}^+$  làm ức chế hoạt động của các enzyme, ảnh hưởng tiêu cực đến quá trình trao đổi chất, bao gồm chu trình Calvin và các con đường khác [57]. Thừa  $\text{Na}^+$  trong tế bào chất cũng cản trở sự hấp thụ và vận chuyển kali ( $\text{K}^+$ ) và các chất dinh dưỡng đa lượng và vi lượng khác, bao gồm nitơ (N), phospho (P), kali ( $\text{K}^+$ ), canxi ( $\text{Ca}^{2+}$ ) và kẽm

( $Zn^{2+}$ ) [53,58]. Ngoài gây ra stress thẩm thấu và ion, stress muối còn gây ra sự tích tụ trong tế bào các chất oxi hoá (ROS), có thể gây tổn hại nghiêm trọng đến cấu trúc tế bào và các đại phân tử như DNA, lipid và enzyme [59].



Hình 1.6. Sự đáp ứng với stress mặn ở cây lúa [60]

### 1.3.2. Cơ chế dung nạp muối ở cây lúa

Khi bị stress do muối, cây lúa phải điều chỉnh các quá trình sinh lý và sinh hóa liên quan đến việc điều chỉnh cân bằng nội môi ion và thẩm thấu (Hình 1.6).

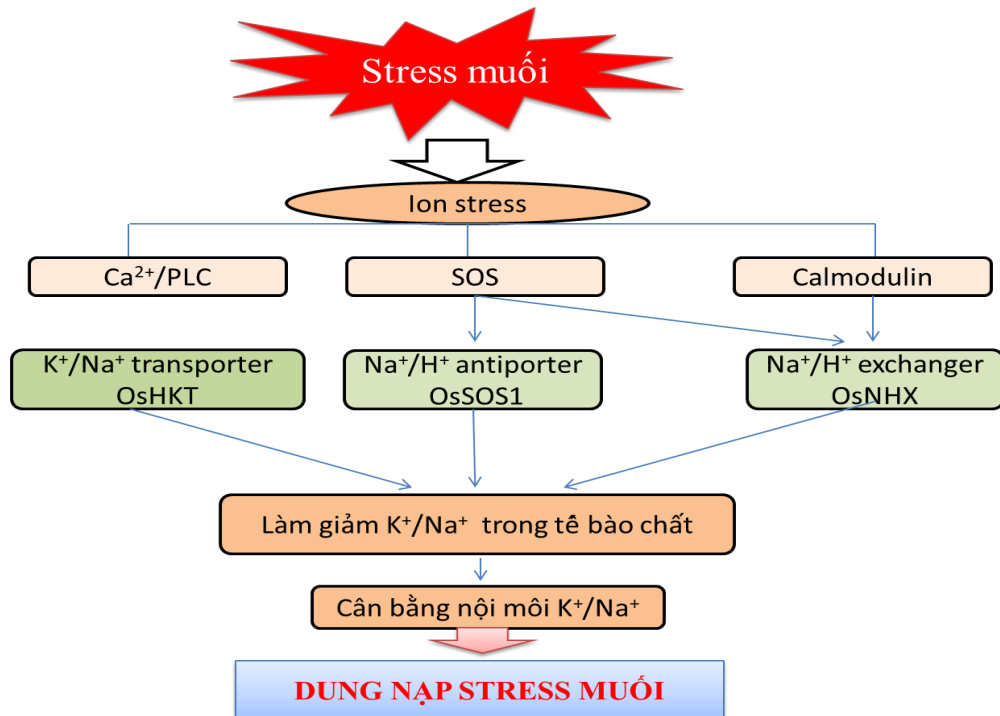
#### 1.3.2.1. Cân bằng nội môi ion

Stress muối thường gây ra do nồng độ  $Na^+$  và  $Cl^-$  cao trong đất.  $Na^+$  và  $K^+$  được vận chuyển vào tế bào bằng cách sử dụng cùng kênh vận chuyển, do đó thừa  $Na^+$  gây ra sự cạnh tranh với  $K^+$  và làm giảm sự vận chuyển  $K^+$  [60].  $K^+$  quan trọng đối với các hoạt động xúc tác của nhiều enzyme cũng như quá trình điều hòa thẩm thấu và tổng hợp protein, duy trì hoạt động của tế bào và quá trình quang hợp [61]. Do đó, việc duy trì cân bằng nội môi  $Na^+/K^+$  của tế bào là một yếu tố quan trọng quyết định khả năng tồn tại của thực vật trong thời kỳ stress muối.

Các cơ chế làm giảm  $Na^+$  trong tế bào chất bao gồm sự hạn chế hấp thu  $Na^+$ , tăng dòng chảy  $Na^+$  và ngăn  $Na^+$  trong không bào. Cơ chế này được thực hiện bởi các bơm ion như symporter, antiporters và protein vận chuyển trên màng [62,63]. Gen Salt Overly Sensitive (SOS1) mã hoá kênh vận chuyển  $Na^+/H^+$  antiporter trên màng tế bào chất có vai trò loại trừ  $Na^+$  khỏi thân, làm giảm tỷ lệ  $Na^+/K^+$  trong tế bào và làm tăng khả năng chịu muối [64]. Ở loài *Arabidopsis* kênh vận chuyển



SOS1 được xác định là kênh vận chuyển  $\text{Na}^+$  duy nhất trong biểu bì đầu rễ và các tế bào nhu mô xylem [65], cây Arabidopsis mất gen SOS1 đã được chứng minh là tích lũy  $\text{Na}^+$  cao hơn, trong khi sự biểu hiện quá mức của gen SOS1 ở cây Arabidopsis chuyển gen cho thấy giảm tích lũy  $\text{Na}^+$  đồng thời khả năng chống chịu mặn được cải thiện [66]. Gen *OsNHX1* mã hoá cho kênh vận chuyển  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter NHX1. Các  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter của không bào như OsNHX1, OsNHX2, OsNHX3, OsNHX4, OsNHX5 và OsARP/OsCTP đóng vai trò quan trọng trong việc giữ  $\text{Na}^+$  trong không bào và làm tăng tích lũy  $\text{K}^+$  trong tế bào chất, do đó tăng khả năng chịu mặn của cây lúa. Khi nồng độ ion  $\text{Na}^+$  trong tế bào chất cao hơn so với không bào, các kênh  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporters của không bào đóng lại và  $\text{Na}^+$  được giữ tạm thời trong không bào [67,68]. Trong con đường nhạy cảm quá mức với muối (SOS), protein liên kết trực tiếp với  $\text{Ca}^{2+}$  và kích hoạt hệ thống SOS2- serine/threonine protein kinase [69]. SOS3 kết hợp SOS2 trên màng tế bào tạo phức hợp SOS2-SOS3 để hoạt hóa SOS1- một  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter trên màng và bơm  $\text{Na}^+$  ra khỏi tế bào [70]. Khi nồng độ ion  $\text{Na}^+$  trong tế bào chất cao hơn so với không bào, các kênh  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporters của không bào đóng lại và  $\text{Na}^+$  được giữ tạm thời trong không bào [71].

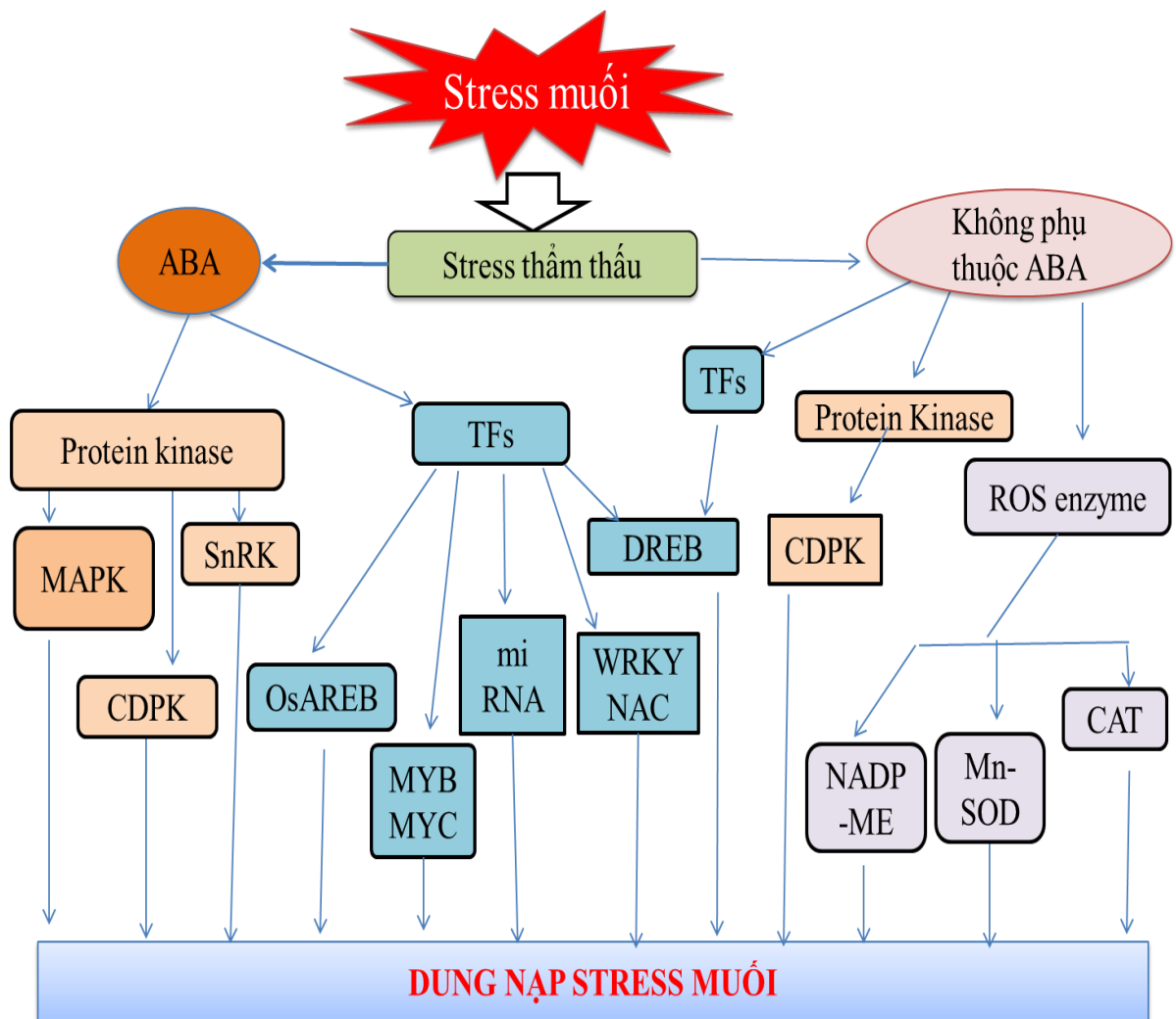


Hình 1.7. Sự đáp ứng với stress mặn ở cây lúa qua cân bằng nội môi ion [71]

Stress ion nhận tín hiệu thông qua con đường  $\text{Ca}^{2+}/\text{PLC}$  và con đường quá nhạy cảm với muối (SOS) và con đường calmodulin (CaM) kích hoạt các kênh vận chuyển HKT, SOS1, NHX làm giảm  $\text{Na}^+$  trong tế bào.

### 1.3.2.2. Cân bằng nội môi ion

Stress thẩm thấu do nồng độ muối cao làm tăng nhanh quá trình sinh tổng hợp axit abscisic (ABA), do đó điều chỉnh con đường phản ứng stress phụ thuộc ABA. Tuy nhiên, một số gen cảm ứng stress muối độc lập với ABA. Axit abscisic là một hormone tự nhiên do cây trồng tự sản xuất để ức chế quá trình sinh trưởng và phát triển ở cây trồng do các yếu tố stress phi sinh học như hạn hán và nhiễm mặn. Thực vật sử dụng hai con đường dung nạp muối dựa trên phản ứng với ABA là con đường phụ thuộc ABA và con đường không phụ thuộc ABA.



Hình 1.8. Sự đáp ứng với stress mặn ở lúa qua cân bằng thẩm thấu [72]

Tín hiệu stress thẩm thấu được truyền qua con đường phụ thuộc ABA hoặc không phụ thuộc ABA. Con đường phụ thuộc ABA bao gồm các protein kinase hoạt hóa mitogen (MAP Kinase), protein kinase phụ thuộc canxi (CDPK), kinase thụ thể (RLK), protein kinase liên quan đến SNF1 (SnRK), yếu tố phiên mã (DREB, MYC/MYB và OsNAC/SNAC) và các miRNA. Con đường không phụ thuộc ABA bao gồm các yếu tố phiên mã, kinase và các enzyme ROS.

(a) Dung nạp muối thông qua con đường phụ thuộc ABA

Trong trường hợp gặp hạn mặn, cây trồng chịu tác động của yếu tố stress thẩm thấu và tăng cường sinh tổng hợp ABA. Quá trình này thông qua con đường terpenoid bắt đầu từ isopentenyl pyrophosphate (IPP) đã được nghiên cứu trên cây lúa [72]. Trong số các gen liên quan đến con đường này, gen phytoene synthase, *OsPSY3* và các gen 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (*OsNCED3*, *OsNCED4* và *OsNCED5*) được tạo ra ngay sau khi gặp stress muối chỉ một giờ và mức độ biểu hiện của các protein này có mối tương quan chặt với hàm lượng ABA trong rễ lúa [73]. Một số gen liên quan đến quá trình dung nạp muối qua con đường phụ thuộc ABA đã được nghiên cứu như các protein kinase (Receptor-like kinases, RLKs; Mitogen activated protein kinases, MAPKs; NF1-related protein kinases, SnRKs; Ca<sup>2+</sup> dependent protein kinases, CDPKs), transcription factors (TFs), micro RNAs và reactive oxygen species (ROS)

Các protein kinase đóng vai trò quan trọng trong việc điều chỉnh các con đường truyền tín hiệu stress. Protein receptor-like kinases (RLKs) tham gia tích cực vào quá trình sinh trưởng phát triển và phản ứng stress ở thực vật. Các yếu tố stress như muối, hạn hán, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> và ABA đã kích hoạt sự biểu hiện của gen RLK giả định (*OsSIK1*). Cây lúa chuyển gen biểu hiện quá mức *OsSIK1* cho thấy khả năng chịu mặn và hạn hán cao hơn so với cây đối chứng không biểu hiện gen này [74]. Ngoài ra, sự tham gia của protein mitogen activated protein (MAP) kinase đối với đáp ứng stress mặn ở cây lúa cũng đã được báo cáo. Khi gặp các yếu tố stress như muối, lạnh và hạn chế nguồn glucose, quá trình điều hòa phiên mã của *OsMAPK4* ở cây lúa được tăng cường, mặc dù sự phụ thuộc của quá trình này vào nồng độ ABA không rõ ràng [75]. Gen *OsMAPK5* cảm ứng bởi stress sinh học và phi sinh học đã được khuếch đại và biểu hiện quá mức trên cây lúa, nhờ đó tăng cường khả năng chịu hạn mặn, hạn nóng và hạn lạnh [76]. Protein kinase phụ thuộc Ca<sup>2+</sup> và ABA (CDPK), *OsCPK21*, đã được nhân dòng và chuyển vào cây lúa giúp tăng khả năng chịu mặn so với cây đối chứng [77]. Protein kinase liên quan đến SNF1 (SnRK) cũng có vai trò trong đáp ứng chịu mặn ở cây lúa. Cụ thể, 10 gen thuộc họ SnRK2 đã được chứng minh có khả năng được kích hoạt bởi stress thẩm thấu thông qua quá trình phosphoryl hóa [78], trong đó gen *SAPK4* có vai trò rõ ràng nhất. Thực tế đã chứng minh, cây lúa chuyển gen *SAPK4-ox* có thể sống được trong môi trường nhiễm mặn bằng cách giảm nồng độ Na<sup>+</sup> trong tế bào chất [79].

Transcription factors (TFs): Các yếu tố phiên mã (TF) quy định khả năng biểu hiện các gen phản ứng với stress phi sinh học. Ví dụ, yếu tố OsAREB (ABA-responsive elements) như OsAREB1 là thành phần chính trong hệ thống phiên mã phụ thuộc ABA trên cây lúa. Yếu tố OsNAC/SNAC, đặc trưng bởi sự tham gia của OsNAC6, là các yếu tố điều chỉnh quá trình biểu hiện các gen quan trọng ở cây lúa khi phải đối mặt với các điều kiện bất lợi. Thêm vào đó, vùng promoter của các gen cảm ứng ABA với các thành phần bảo thủ cis-acting element, ABRE, bZIP-type TFs liên kết cũng ảnh hưởng không nhỏ đến khả năng chống chịu mặn ở cây trồng [80]. Hossain và cộng sự (2010) [81] đã chỉ ra việc tạo đột biến chèn T-DNA vào bZIP-TF, mức độ biểu hiện của OsABF2 được tăng cường, nhờ đó cây chuyển gen có khả năng tăng độ nhạy cảm với stress muối so với cây đối chứng. Kết quả này cho thấy OsABF2 là chất điều chỉnh tích cực đối với stress muối. Xiang và cộng sự (2008) [82] cho rằng biểu hiện quá mức của gen *OsbZIP23* đã tăng cường khả năng chống chịu với cây trồng đối với hạn mặn và hạn nóng.

Các gen MYCs đóng vai trò quan trọng trong việc phản ứng với các stress phi sinh học và sinh học. Ở cây lúa, sự tăng cường biểu hiện của các gen MYC2, MYC4 và MYC5 trong môi trường có nồng độ muối cao đã được ghi nhận [83]. Các nghiên cứu về phiên mã và sinh hóa ở loài *Arabidopsis* đã cho thấy MYC2 điều hòa âm của quá trình sinh tổng hợp proline. Proline cần thiết để tăng cường khả năng chống chịu đối với stress mặn, tuy nhiên, sự tích tụ quá mức của nó gây độc cho cây. Gen MYC2 cũng liên quan đến con đường truyền tín hiệu axit jasmonic, là hormone giúp điều hòa một loạt các quá trình trong thực vật từ quang hợp, sinh trưởng đến sinh sản [84].

Các yếu tố phiên mã NAC cũng tham gia điều hòa một số gen đáp ứng với stress muối thông qua con đường phụ thuộc ABA. Trong đất có độ mặn cao, một số gen NAC ở cây lúa được kích hoạt để tăng cường quá trình biểu hiện. Hu và cộng sự (2012) [85] nhận thấy gen *SNAC1* và *OsNAC6* được biểu hiện tăng cường giúp cây lúa có khả năng sinh trưởng và phát triển bình thường trong đất có nồng độ muối cao. Chung và cộng sự (2009) [86] đã chứng minh rằng gen *OsHDAC1*, mã hóa cho enzyme histone deacetylase, có khả năng ức chế quá trình biểu hiện *OsNAC6*, là nguyên nhân gây ra hiện tượng chậm phát triển ở rễ. OsNAC5, một yếu tố phiên mã khác thuộc nhóm NAC, liên kết với trình tự lõi nhận dạng NAC (CACG) của promoter OsLEA3 và OsNAC5, cũng được phát hiện biểu hiện ở mức độ cao ở cây lúa trong môi trường hạn mặn [87].

Yếu tố phiên mã IIIA (TFIIIA) cũng được xác nhận có liên quan đến khả năng chống chịu của cây trồng trong điều kiện bất lợi. Ví dụ, sự biểu hiện quá mức TFIIIA-type *ZFP252* được phát hiện ở cây lúa không chuyển gen dưới áp lực của hạn mặn và hạn nóng [88]. Sun và cộng sự (2010) [89] đã xác nhận, mức độ biểu hiện cao của gen *ZFP179* có liên quan với sự gia tăng hàm lượng proline tự do và đường hòa tan ở cây lúa trong điều kiện hạn mặn. Ngoài ra, mức độ biểu hiện với hàm lượng cao vượt ngưỡng của một số gen liên quan đến đáp ứng các yếu tố stress như *OsDREB2A*, *OsP5CS*, *OsProT* và *OsLEA3* cũng đã được quan sát thấy trên cây lúa chuyển gen.

Các yếu tố phiên mã WRKY cũng được kích hoạt khi cây trồng đối mặt với các yếu tố bất thuận. Cụ thể, nồng độ cao của protein OsWRKY13 có khả năng ức chế đối kháng với SNAC1 trên cây lúa chịu mặn. Kết quả này cho thấy OsWRKY13 là chất điều chỉnh tiêu cực của phản ứng với muối [90]. Tao và cộng sự (2011) [91] đã báo cáo OsWRKY45-2 làm tăng khả năng chịu mặn cho cây lúa trong trường hợp độ nhạy của ABA giảm.

Gần đây, nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng microRNA (miRNA) đóng vai trò chính trong quá trình điều hòa biểu hiện gen ở cấp độ sau phiên mã. Trong điều kiện hạn mặn, nồng độ của 02 microRNA (*osa-MIR394c* và *osa-MIR393*) đã suy giảm tuyến tính theo nồng độ ABA. Điều này đồng nghĩa với việc khi 02 miRNA biểu hiện ở mức độ cao, khả năng chịu stress muối của cây trồng sẽ giảm xuống [92].

*(b) Dung nạp muối thông qua con đường không phụ thuộc ABA*

Một số gen có khả năng cảm ứng bởi stress muối độc lập với ABA, như yếu tố phiên mã (DREB1 và DREB2), protein kinases và các enzyme phân hủy ROS.

Yếu tố phiên mã DREB: Bộ gen lúa chứa ít nhất 10 gen loại *DREB1*, trong đó *OsDREB1A* và *OsDREB1B* được gây ra bởi stress lạnh. Sự có mặt của protein OsDREB1A thúc đẩy quá trình biểu hiện các gen liên quan đến quá trình chống chịu với yếu tố stress ở cây *Arabidopsis* biến đổi gen [93]. Cây lúa có ít nhất 04 yếu tố phiên mã tương đồng DREB2, trong đó *OsDREB2A* và *OsDREB2B* được cảm ứng ở nhiệt độ cao, nhiệt độ thấp và nồng độ muối cao [94]. Kết quả phân tích cây lúa chuyển gen trong môi trường hạn nóng, lạnh, mặn cũng đã phát hiện được một hàm lượng lớn các protein OsDREB1A và OsDREB1B. Ngoài ra, cũng dưới tác động của các yếu tố stress này, gen *OsDREB1F* được kích hoạt để tăng cường biểu hiện [95].

Gen pathogenesis-related protein 1 (PR1) liên qua đến khả năng miễn dịch ở thực vật, một số loài vi sinh vật nội sinh hoặc ngoại sinh làm tăng cường biểu hiện của gen PR1 dẫn đến làm tăng khả năng miễn dịch (đặc biệt là khả năng kháng nấm bệnh) [96].

Các enzyme ROS cũng được ghi nhận có liên quan đến khả năng chịu mặn. Khi bị stress mặn, thực vật sẽ tổng hợp các chất oxi hoá (ROS), cụ thể là  $H_2O_2$ ,  $O_2^-$  và  $OH$  làm phá huỷ DNA, RNA và protein. Các hợp chất ROS cũng gây ra sự phá huỷ chất diệp lục và làm gián đoạn hoạt động của mô phân sinh rễ. Các enzyme chống oxy hóa như superoxide dismutase, catalase, ascorbate peroxidase, peroxidase, glutathione reductase và monohydroascorbate reductase có khả năng loại bỏ ROS và duy trì chúng ở mức thấp. Superoxide dismutase là một metalloenzyme đóng một vai trò quan trọng trong việc bảo vệ tế bào khỏi tác hại của quá trình oxy hóa, bằng cách xúc tác chuyển đổi gốc superoxide thành  $H_2O_2$ . Gen CAT mã hoá cho enzyme catalase làm giảm mức ROS bằng cách xúc tác sự phân hủy  $H_2O_2$  thành  $H_2O$  và  $O_2$ . Gen NADP-ME2 mã hoá cho enzyme NADP-malic2, là một trong những enzyme quan trọng tham gia vào các quá trình trao đổi chất ở thực vật, có mặt chủ yếu ở ty thể, lục lạp và tế bào chất, xúc tác quá trình khử carboxyl hóa của malate để tạo pyruvate,  $CO_2$  và NADPH dưới dạng ion kim loại ( $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ...). Vì vậy, enzyme này giữ vai trò trong việc tăng cường khả năng chống chịu của thực vật đối với stress muối và thâm thấu. Quan sát cây Arabidopsis được chuyển gen NADP-ME2 là chất cảm ứng với stress mặn ở cây lúa, các nhà nghiên cứu đã nhận thấy khả năng chống chịu lại stress mặn ở loại cây này tăng lên. Nguyên nhân có thể là do enzyme malic đã làm giảm số lượng các phân tử ROS [97]. Guan và cộng sự (2017) [98] cho thấy rằng sự biểu hiện quá mức của gen OsCu/Zn-SOD làm tăng khả năng giải độc của ROS và làm giảm tác hại của quá trình oxy hóa do muối gây ra.

#### **1.4. Tình hình nghiên cứu về PGPB hỗ trợ cây trồng chịu mặn**

##### ***1.4.1. Trên thế giới***

Nhiều nghiên cứu về vi sinh vật chịu mặn có khả năng sản xuất các chất kích thích sinh trưởng thực vật trên nhiều đối tượng cây trồng khác nhau trong điều kiện canh tác đất bị nhiễm mặn như lúa, ngô, đậu tương, hướng dương, đậu gà, đậu xanh, đậu hà lan, đậu răng ngựa và đậu lăng. Sự hiện diện của các vi sinh vật này trong

đất mang lại lợi ích trực tiếp cho cây trồng. Trên cơ sở đó, nhiều loại vi sinh vật được sử dụng để sản xuất các chế phẩm sinh học hỗ trợ kích thích sự sinh trưởng của thực vật, từ đó cải thiện năng suất cây trồng trên đất nhiễm mặn. Một số ví dụ về vai trò của các vi sinh vật kích thích tăng trưởng thực vật trong việc nâng cao năng suất của một số loại cây trồng khác nhau được tóm tắt trong Bảng 1.1.

*Bảng 1.1.* PGPB và cơ chế thúc đẩy sự phát triển của một số loại cây trồng

<b>Cây trồng</b>	<b>Vi sinh vật</b>	<b>Cơ chế tác dụng</b>	<b>Tài liệu tham khảo</b>
Cây lúa	<i>Enterobacter</i> sp. P23	IAA, ACC deaminase hoà tan phosphate	Sarkar và cs., 2018 [99]
	<i>Herbaspirillum</i> <i>Enterobacter</i>	ACC deaminase , IAA, hoà tan phosphate, proline	Andreozzi và cs., 2019 [100]
	<i>S. venezuelae</i>	ACC deaminase , IAA, hoà tan phosphate	Yoolong và cs., 2019 [101]
	<i>Achromobacter</i>	ACC deaminase , IAA, hoà tan phosphate	Shahid và cs., 2020 [102]
	<i>Enterobacter</i> sp. PR14	ACC deaminase antioxidant enzymes	Sagar và cs., 2020 [103]
	<i>B. aryabhatai</i> MS3	IAA, cố định nitơ Hoà tan phosphate siderophore	Sultana và cs.,2020 [104]
	<i>Bacillus</i> sp. <i>Exiguobacterium</i> sp. <i>Enterobacter</i> sp. <i>Lysinibacillus</i> sp. <i>Stenotrophomonas</i> sp. <i>Microbacterium</i> sp. <i>Achromobacter</i> sp.	ACC deaminase , IAA, hoà tan phosphate, proline	Prittesh và cs., 2021 [105]
	<i>Staphylococcus sciuri</i> ET101	ACC deaminase IAA, hoà tan phosphate	Taja và cs., 2021 [106]

<b>Cây trồng</b>	<b>Vi sinh vật</b>	<b>Cơ chế tác dụng</b>	<b>Tài liệu tham khảo</b>
	<i>Brevibacterium linens</i> RS16	ACC deaminase	Ahmed và cs., 2021 [107]
	<i>Klebsiella pasteurii</i> <i>Phytobacter</i> <i>diazotrophicus</i>	ACC deaminase , IAA, Cố định nitơ	Bianco và cs., 2021 [108]
	<i>Bacillus pumilus</i>	ACC deaminase , IAA, hoà tan phosphate, proline	Kumar và cs., 2021 [109]
Cà chua	<i>Dermacoccus (D.</i> <i>barathri</i> MT2.1T và <i>D. profundi</i> MT2.2T)	IAA Hoà tan phosphate siderophore	Rangseeaka và cs., 2021 [110]
	<i>Pseudomonas</i> <i>oryzihabitans</i>	ACC deaminase , IAA, hoà tan phosphate, siderophore	Mellidou và cs., 2021 [111]
	<i>Pseudomonas</i> <i>azotoformans</i>	ACC deaminase , IAA, hoà tan phosphate	Liu và cs., 2021 [112]
Lúa mỳ	<i>Bacillus aryabhatai</i> EWR29	ACC deaminase , IAA, hoà tan phosphate , EPS.	Mohamed và cs., 2020 [113]
	<i>Bacillus aryabhatai</i> PM34	ACC deaminase , IAA, hoà tan phosphate	Mehmood và cs., 2021 [114]
Ngô	<i>Bacillus aquimaris</i> DY-3	Điều hoà áp suất thẩm thấu, Enzyme chống oxy hóa,	Li và Jiang, 2017 [115]
	<i>A. brasilense</i> strains Ab-V5 và Ab-V6 <i>Rhizobium tropici</i> strain CIAT 899	Enzyme chống oxy hóa, proline	Fukami và cs., 2018 [116]



Cây trồng	Vi sinh vật	Cơ chế tác dụng	Tài liệu tham khảo
	<i>Gracilibacillus</i> , <i>Staphylococcus</i> <i>Virgibacillus</i> <i>Salinicoccus</i> <i>Bacillus</i> sp. <i>Zhihengliuell</i> <i>Brevibacterium</i> <i>Oceanobacillus</i> , <i>Exiguobacterium</i> <i>Pseudomonas</i> sp. <i>Halomonas</i> spp.	IAA, ACC deaminase, hoà tan phosphate, biofilm.	Aslam và Ali, 2018 [40]
	<i>Bacillus</i> spp.	ACC deaminase	Misra và cs., 2020 [117]
	<i>Pseudomonas</i> sp. P8, <i>Peribacillus</i> sp. P10, <i>Streptomyces</i> sp.	IAA, ACC deaminase, hoà tan phosphate,	Peng và cs., 2021 [118]
Đậu hà lan	<i>B. subtilis</i> <i>P. fluorescen</i>	IAA, ACC deaminase	Sofy và cs., 2021 [119]
Hoa hương dương	<i>F. pseudomona</i>	ACC deaminase	Tewari và cs, 2016 [120]
	<i>B.licheniformis</i> <i>P.plecoglossicida</i>	IAA, ACC deaminase	Yasmeen và cs, 2020 [121]
Đậu tương	<i>Bacillus firmus</i>	IAA, ACC deaminase	El-Esawi và cs., 2018 [122]
	<i>P. pseudoalcaligenes</i> <i>B. subtilis</i>	IAA, ACC deaminase	Yasmin và cs., 2020 [123]

Vi sinh vật kích thích sinh trưởng thực vật thông qua khả năng sinh chất kích thích sinh trưởng thực vật (IAA), sinh tổng hợp ACC deaminase, tăng khả năng hấp thu chất dinh dưỡng nhờ khả năng phân giải phosphate và tham gia vào quá trình cố định nitơ sinh học. Bên cạnh đó, các nghiên cứu ở mức độ phân tử cho thấy PGPB còn tác động làm thay đổi biểu hiện một số gen liên quan đến quá trình đáp ứng

mặn, nhờ đó cây trồng có khả năng tăng cường tính chống chịu với các điều kiện bất thuận của môi trường như hạn nóng, hạn lạnh hoặc hạn mặn.

Nautiyal và cộng sự (2013) [124] đã đánh giá tác dụng của chủng *B. amyloliquefaciens* NBRISN13 (SN13) có khả năng sinh ACC deaminase, sinh IAA và hòa tan phosphate đối với cây lúa trong điều kiện nhiễm mặn. Trong điều kiện nuôi thủy canh, nhiễm chủng SN13 làm tăng chiều dài rễ (3,2%), chiều dài thân (15,4%) và trọng lượng khô (11,7%), đồng thời làm tăng cường biểu hiện của một số gen gồm *GIG* gấp 3,04 lần, *SAPK4* gấp 1,34 lần so với đối chứng. Khi bị stress mặn 200 mM NaCl, nhiễm chủng SN13 làm trọng lượng khô tăng 5,8% và tăng biểu hiện của các gen *BADH*, *LYSO* và *CAT* từ 1,2-1,8 lần. Trong điều kiện nhà kính, cây lúa được trồng trên đất đã khử trùng để làm giảm sự tạp nhiễm vi sinh vật bên ngoài. Stress mặn làm giảm chiều dài thân (11,62%) và giảm trọng lượng khô (21,26%), cùng với nó làm giảm sự biểu hiện của các gene *NHX1*, *SOS1*, *BZ8*, *GIG*, *BADH*, *SAPK4*, *SNRK2*, *LYSO*, *CA*, *PBZI*, *SERK1* và *EREBP* từ 0,19- 0,80 lần, trong khi *MAPK5* được cảm ứng tăng gấp 1,21 lần. Cây lúa nhiễm chủng SN13 trong điều kiện stress mặn làm tăng chiều dài thân 27,43%, chiều dài rễ 73,17%, trọng lượng khô 55,74%, tuy nhiên không tìm thấy sự khác biệt trong biểu hiện của 13 gen (*NHX1*, *SOS1*, *BZ8*, *GIG*, *BADH*, *SAPK4*, *SNRK2*, *LYSO*, *CAT*, *PBZI*, *SERK1* và *EREBP*) trừ gen *MAPK5* bị giảm biểu hiện 0,28 lần so với đối chứng.

Jaemsaeng và cộng sự (2018) [41] nghiên cứu tác dụng kích thích sinh trưởng của chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. GMKU 336 nội sinh có khả năng sinh ACC deaminase, hòa tan phosphate và sinh siderophores trên cây lúa trong điều kiện nhiễm mặn. Kết quả cho thấy nhiễm chủng GMKU 336 làm tăng đáng kể sự sinh trưởng, hàm lượng chlorophyll, proline,  $K^+$ ,  $Ca^+$  và làm giảm ethylene, ROS và  $Na^+$  khi so sánh với cây không được nhiễm và những cây được nhiễm với chủng đột biến mất gen *acdS*. Sự biểu hiện của các gen đáp ứng với stress mặn ở cây lúa nhiễm chủng GMKU 336 có tương quan với các đặc điểm sinh lý của cây. Các gen liên quan đến con đường ethylene, *ACO1* và *EREBP1* được điều chỉnh giảm đáng kể trong khi các gen liên quan đến cân bằng thẩm thấu (*BADH1*), kênh vận chuyển  $Na^+$  (*NHX1* và *SOS1*), calmodulin (*Cam1-1*), và các enzym chống oxy hóa (*SOD1* và *CAT*) được điều chỉnh tăng. Như vậy, chủng GMKU 336 giúp tăng cường sinh trưởng của cây lúa và tăng khả năng chịu mặn bằng cách làm giảm ethylene thông

qua hoạt động của ACCD và hỗ trợ thêm cho cây trồng loại bỏ ROS, cân bằng hàm lượng ion và áp suất thẩm thấu.

Sultana và cộng sự (2020) [104] chủng vi sinh vật chịu mặn sinh chất kích thích sinh trưởng thực vật *B. aryabhatai* MS3 được phân lập từ vùng đất nhiễm mặn làm tăng khả năng sinh trưởng của cây lúa khi bị nhiễm mặn ở nồng độ 200 mM NaCl. Nghiên cứu sự biểu hiện của các gen liên quan đến đáp ứng với stress mặn cho thấy có sự tăng cường biểu hiện của 4 gen *BZ8*, *SOS1*, *GIG* và *NHX1*.

Sự biến đổi biểu hiện của các gen liên quan đến chống chịu với stress mặn nhờ PGPB cũng đã được nhiều tác giả nghiên cứu trên nhiều đối tượng khác ngoài cây lúa như trên cây ngô, cây cải và lúa mì. *Burkholderia phytofirmans* PsJN làm thay đổi biểu hiện của các gen (*KT1*, *HKT1*, *NHX2* và *SOS1*) liên quan đến cân bằng nội môi ion ở cây cải *Arabidopsis thaliana* [125]. Cây ngô nhiễm chủng *B. amyloliquefaciens* SQR9 [126] khi bị nhiễm mặn (100 mM NaCl) có hàm lượng chlorophyll, đường hòa tan tổng, hoạt tính peroxidase và catalase, hàm lượng glutathione và tỷ lệ  $K^+/Na^+$  tăng so với đối chứng. Nghiên cứu sự biểu hiện của một số gen liên quan cho thấy có sự tăng cường biểu hiện của các gen *RBCS*, *RBCL* (mã hóa tiểu đơn vị RuBisCo), H (+)-*Ppase* (mã hóa pyrophosphatase bơm  $H^+$ ), *HKT1*, *NHX1*, *NHX2* và *NHX3* và sự giảm của *NCED* so với đối chứng không được nhiễm chủng SQR9. Nhiễm chủng *Serratia liquefaciens* KM4 làm tăng khả năng chịu mặn ở cây ngô và làm tăng cường sự biểu hiện các gen *APX*, *CAT*, *SOD*, *RBCS*, *RBCL*, *H<sup>+</sup>-PPase*, *HKT1* và *NHX1* và giảm biểu hiện gen *NCED* [127]. Nhiễm chủng *Dietzia natronolimnaea* ở cây lúa mì khi bị stress mặn làm tăng sự biểu hiện các kênh vận chuyển ion (*NHX* và *HKT1*) và các *CAT*, *APX*, *MnSOD*, *POD*, *GPX*, và *GR* [128]. Nghiên cứu sự biểu hiện các gen liên quan đến đáp ứng mặn ở cây lúa mì nhiễm chủng *Arthrobacter nitroguajacolicus* cho thấy có sự tăng biểu hiện của các gen *P450s* (*CYP98A1*, *CYP734A5*, *CYP72A15* và *CYP710A1*) liên quan đến các phản ứng oxy hóa khử và phản ứng stress, *APX* và nicotianamine. Hơn nữa, có sự biểu hiện cao hơn của các kênh vận chuyển ion (*HKT* và *NHX*) làm tăng cường khả năng chống chịu với stress muối [129]. Trong điều kiện stress mặn, cây dưa hấu được nhiễm chủng *Funneliformis mosseae* có sự giảm biểu hiện của gen *RBCL* (tham gia vào quá trình quang hợp), tăng mức độ biểu hiện của *PPH* (chịu trách

nhiệm cho sự phân hủy chất diệp lục) và tăng cường sự biểu hiện các gen liên quan đến phản ứng bảo vệ chống oxy hóa (*APX*, *Cu-Zn SOD*, *CAT* và *GR*) [130].

#### **1.4.2. Tại Việt Nam**

Việc ứng dụng vi sinh vật hữu ích làm phân vi sinh có từ rất lâu, các nghiên cứu tập trung chủ yếu vào phân lập và đánh giá khả năng cố định nitơ, phân giải phosphate và sinh tổng hợp IAA từ nhiều nguồn khác nhau như từ đất hoặc nội sinh. Tuy nhiên, các nghiên cứu về vi sinh vật chịu mặn sinh IAA, ACC deaminase còn hạn chế. Các nghiên cứu về tương quan giữa PGPB ở mức độ biểu hiện của các gen chịu mặn ở thực vật còn chưa được thực hiện.

Nguyễn Anh Huy và cộng sự (2018) [131] đã phân lập và nhận diện được một số loài vi khuẩn *Bacillus megaterium*, *Acinetobacter* sp. và *Burkholderia cenocepacia* chịu mặn có khả năng cố định nitơ và tổng hợp IAA từ đất sản xuất lúa-tôm ở Bạc Liêu, Sóc Trăng và Kiên Giang. Ứng dụng hai chủng *Burkholderia* sp. PL9 và *Acinetobacter* sp. GH1-1 cho thấy cả 2 dòng vi khuẩn thử nghiệm đều có khả năng cung cấp đến 50% phân đạm hóa học khuyến cáo cho cây lúa trồng trên nền đất nhiễm mặn.

Văn Thị Phương Như và cộng sự [6, 13] phân lập tuyển chọn được các chủng vi sinh vật nội sinh (*A. amazonens*, *B. kururiensis*, *P. putida* và *B. subtilis*) có khả năng sinh IAA, cố định nitơ, phân giải phosphate từ cây lúa trồng trên đất tỉnh Phú Yên. Sử dụng hai chủng vi khuẩn phân giải lân *P. putida* và *B. subtilis* có thể thay thế 50% lân hữu dụng và sử dụng hai chủng cố định nitơ *A. amazonens*, *B. kururiensis* có thể thay thế 50% đạm cho cây lúa trồng trên đất thịt pha cát ở thành phố Tuy Hòa, tỉnh Phú Yên.

Nguyễn Văn Phương và cộng sự (2020) [132] đã sàng lọc các đặc điểm kích thích sinh trưởng thực vật từ 77 chủng vi sinh vật nội sinh phân lập từ giống lúa Bắc Thơm trên đất trồng lúa, tỉnh Hải Dương. Kết quả nghiên cứu xác nhận 64 chủng có khả năng tổng hợp IAA, 74 chủng có khả năng tổng hợp amoni và tất cả 77 chủng có khả năng phân giải phosphate vô cơ.

Nguyễn Phạm Anh Thi và cộng sự (2020) [133] đã phân lập và tuyển chọn dòng vi khuẩn có khả năng hòa tan lân từ đất trồng lúa bị nhiễm mặn tại tỉnh Sóc Trăng. Kết quả nghiên cứu tuyển chọn được 2 dòng vi khuẩn TD 3.1 và TD 4.3 có khả năng hòa tan P khó tan, duy trì mật độ vi khuẩn cao ở ngưỡng pH rộng trong

khoảng 3 đến 5 và ở nồng độ muối NaCl đạt đến 5%. Hai dòng vi khuẩn này có khả năng hỗ trợ sự nảy mầm của hạt lúa, hỗ trợ sinh trưởng, giúp tăng sinh khối cây lúa ở điều kiện phòng thí nghiệm.

Nguyễn Đức Thành và cộng sự (2020) [134] đã phân lập được 2 chủng vi khuẩn *P. oryzihabitans* T2917 và *Burkholderia* sp. T3602 từ vùng đất trồng bưởi Da xanh ở tỉnh Bến Tre có khả năng chịu nồng độ muối NaCl  $\geq 3\%$ , có hoạt tính phân giải lân vô cơ với đường kính vòng phân giải  $3,7 \pm 0,16$  và  $2,2 \pm 0,44$  cm). Hai chủng này có tiềm năng trong sản xuất chế phẩm vi sinh sử dụng trong nông nghiệp, đặc biệt ở vùng đất bị nhiễm mặn.

### **1.5. Phương pháp phân tích hệ gen bằng công nghệ giải trình tự gen thế hệ mới**

Giải trình tự hệ gen là kỹ thuật xác định trình tự các nucleotide trong toàn bộ hệ gen bao gồm cả các gen mã hoá và không mã hoá cho các protein chức năng. Phương pháp xác định trình tự gen đầu tiên đã được Sanger và nhóm nghiên cứu công bố năm 1977 đã thu được nhiều thành tựu quan trọng trong đó nổi bật nhất là việc hoàn thành dự án hệ gen người vào năm 2001. Tuy nhiên, phương pháp này cần chi phí cao và lượng thời gian lớn để hoàn thành. Sự ra đời của công nghệ giải trình tự gen thế hệ mới vào năm 2005 là một bước ngoặt lớn, mở ra một kỷ nguyên mới trong lĩnh vực giải trình tự gen. Với ưu thế về thời gian, dung lượng, độ chính xác, các công nghệ NGS ngày càng được sử dụng rộng rãi trong nghiên cứu tương quan toàn bộ hệ gen (genomewide association studies - GWAS), xác định trình tự toàn bộ hệ gen (whole genome sequencing - WGS), hệ gen biểu hiện (whole exome sequencing - WES) hay hệ gen phiên mã transcriptome (RNA-seq)...

Công nghệ giải trình tự gen thế hệ mới (NGS) còn được gọi là giải trình tự dung lượng cao hoặc giải trình tự song song, cho phép giải trình tự hàng nghìn đến hàng tỷ đoạn DNA đồng thời và độc lập với nhau. Cùng với các bước tiến của khoa học kỹ thuật, các công nghệ NGS không ngừng phát triển như tăng lưu lượng xử lý lên 100 - 1000 lần, tăng độ dài đoạn trình tự đọc, giảm giá thành. Đến nay, nhiều công nghệ NGS khác nhau đã được phát triển như: giải trình tự Roche 454 (pyrosequencing 454), giải trình tự Proton/PGM (Ion Torrent sequencing), giải trình tự Illumina (Solexa)...

Phương pháp giải trình tự gen thế hệ mới tuân theo hai nguyên lý chính: (1) Đọc trình tự bằng tổng hợp (sequencing by synthesis, SBS); (2) Đọc trình tự gắn nối

(sequencing by ligation, SBL). Nguyên lý thứ nhất thường được các thế hệ máy Roche 454, Ion Torrent và Illumina sử dụng. Nguyên lý này sử dụng một hỗn hợp các dNTP bổ sung tự nhiên và các dNTP bổ sung có đánh dấu huỳnh quang. Quá trình xác định trình tự sẽ diễn ra tương tự như phản ứng PCR thông thường. Đầu tiên một đoạn trình tự môi nằm trên đoạn adapter sẽ được gắn vào phần cuối của đoạn gDNA khuôn cần đọc trình tự. Sau đó, việc xác định trình tự được thực hiện bằng cách gắn lần lượt từng dNTP bổ sung có đánh dấu huỳnh quang vào phần cuối của trình tự môi. Nguyên lý thứ hai, đọc trình tự gắn nối (sequencing by ligation, SBL) được phát minh bởi George Church và áp dụng ở máy SOLiD. Nguyên lý này là một chu trình tuần hoàn gồm các bước: (1) Đưa vào các môi neo được thiết kế trình tự bổ sung với trình tự trên adapter; (2) Lai các nonamer ngẫu nhiên với nhau (Mỗi hỗn hợp nonamer gồm có 4 loại nonamer, mỗi loại có các base và vị trí đã được xác định. Các chất phát quang khác nhau được gắn ở cuối của mỗi loại nonamer cho phép xác định nucleotide trên nonamer); (3) Các nonamer lai với các môi neo (thiết bị ghi hình và phần mềm sẽ xác định nucleotide ở vị trí query); (4) Môi neo, phức hệ nonamer được đọc bằng phóng xạ và quá trình được lặp lại cho các vị trí query trong hỗn hợp nonamer.

Trong số các công nghệ giải trình tự gen thế hệ mới, công nghệ Illumina cho kết quả chính xác nhất, quy trình thao tác đơn giản và được sử dụng nhiều nhất, khoảng hơn 90% dữ liệu trình tự gen trên thế giới được tạo ra bởi công nghệ Illumina. Các bước chính trong giải trình tự Illumina gồm 4 bước như sau

*Bước 1. Chuẩn bị mẫu:* Các đoạn DNA và gắn lên các giá bám. Đầu tiên, sợi DNA được cắt nhỏ thành các đoạn DNA ngắn, sau đó 02 đầu các đoạn DNA ngắn này được gắn 02 đoạn adapter đặc hiệu. Tổ hợp DNA-adapter sẽ được gắn lên giá bám là các vi bản nhờ các đoạn dò đặc hiệu adapter đã gắn sẵn.

*Bước 2. Khuếch đại mẫu:* Sử dụng cặp môi đặc hiệu adapter để khuếch đại các đoạn DNA trên giá bám. Trong trường hợp giá bám là vi bản thì các thành phần tham gia phản ứng PCR được bơm trải lên vi bản, nhờ đó từng cụm sản phẩm khuếch đại được gắn trên những vị trí tách rời nhau. Các đoạn DNA gắn adapter được biến tính thành mạch đơn và được khuếch đại đẳng nhiệt thành 1 cụm (cluster) khoảng 1.000 bản sao giống hệt nhau.

*Bước 3. Giải trình tự:* Đo tín hiệu từng loại huỳnh quang gắn vào nucleotide

trong phản ứng tổng hợp chuỗi DNA. Sử dụng 4 loại màu huỳnh quang khác nhau để gắn vào 4 loại nucleotide để tìm trình tự đồng thời của hàng chục triệu cluster. Trong mỗi chu kỳ giải trình tự, một nucleotide gắn màu được gắn vào chuỗi DNA, đóng vai trò làm kết thúc quá trình tổng hợp chuỗi DNA. Sau mỗi lần gắn kết, màu huỳnh quang được ghi lại, sau đó được enzyme tách ra để cho các nucleotide tiếp theo gắn vào chuỗi DNA đang tổng hợp. Kết quả tìm được trình tự các DNA có độ chính xác cao, không xuất hiện lỗi ở các vùng trình tự lặp và các vùng trình tự tương đồng

*Bước 4. Phân tích số liệu:* Các đoạn trình tự được sắp xếp và lắp ráp *de novo* bằng các phần mềm tin sinh học. Sử dụng các phần mềm tin sinh học khác nhau để phân tích và chú thích hệ gen.

## CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 2.1. Nguyên vật liệu

#### 2.1.1 Nguyên liệu

Tổng số 66 mẫu gồm 36 mẫu đất trên quần đảo Trường Sa, 12 mẫu đất và nước ven biển, 9 mẫu rễ cây lúa, 9 mẫu rễ cây đước. Danh sách địa điểm lấy mẫu và ký hiệu mẫu được trình bày ở Phụ lục 1.

Giống lúa: Đài thơm 8

#### 2.1.2. Hóa chất, môi trường và thiết bị

##### a) Hóa chất

Các loại hóa chất glucose, D-mannitol, D-galactose, D-maltose, sucrose, tinh bột tan,  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ , L-tryptophan,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , axit indole-3-acetic (IAA), glycerol, cao nấm men, cao thịt, tryptone, peptone, glycine, L-proline, dung dịch  $H_2SO_4$ , NaCl, EDTA,  $NaNO_3$ ,  $(NH_4)_2SO_4$ ,  $FeCl_3 \cdot 3H_2O$ , axit ascorbic,  $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ .

Đệm tra mẫu, 1 kb DNA ladder, dNTP, Taq DNA polymerase PCR buffer (Thermo Fisher, Mỹ), Agarose (First Base, Singapore).

##### b) Môi trường nghiên cứu

Môi trường: Nutrient agar (NA), Luria Bertani (LB), Marine agar (MA), Dworkin và Foster salts (DF) (Ấn Độ).

Môi trường NBRIP (g/L): Glucose 10 g;  $Ca_3(PO_4)_2$  5 g;  $MgCl_2$  5 g;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,25 g; KCl 0,2 g;  $(NH_4)_2SO_4$ , 0,1 g;  $H_2O$  1 L.

Môi trường King B medium (g/L): peptone 2;  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  1.15;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 1.5 g; glycerol 10 mL.

Môi trường Burk's: Saccarozo 20 g/l;  $KH_2PO_4$  0,41 g/l;  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  0,68 g/l;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,1 g/l;  $Na_2SO_4$  0,05 g/l;  $CaCl_2$  0,2 g/l;  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0,005 g/l;  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  0,0025 g/l.

Môi trường CMC:  $(NH_4)_2SO_4$  1 g/l;  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  1,31 g/l;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,5 g/l; NaCl 20 g/l; CMC 5 g/l; Agar 20 g/l.

##### c) Thuốc thử:

❖ Dùng cho phân tích IAA

Thuốc thử Salkowski: 12 g  $FeCl_3$  trong 1 lít dung dịch  $H_2SO_4$  7,9 M.



Dung dịch IAA chuẩn: Hoà tan 1 mg IAA trong lượng nhỏ aceton thêm nước cất để được 10 mL được dung dịch IAA chuẩn có nồng độ 100  $\mu\text{g/mL}$

❖ Dùng cho định lượng phosphate

Dung dịch  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  5%: hoà tan 25 g  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  trong 500 mL nước cất

Dung dịch axit ascorbic: Hoà tan 10 g axit ascorbic trong 100 mL nước cất

Dung dịch  $\text{Mo}(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ :

(1) Hoà tan 13g  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  trong 100 mL nước cất

(2) Hoà tan 0,35g  $\text{K}(\text{SbO})\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$  trong 100 mL nước cất

(3) Pha loãng 150mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  98% bằng 150 mL nước cất

Dung dịch  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  chuẩn: Hoà tan 0,217 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  trong 5 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  98%, sau đó định mức lên 1000 mL bằng nước cất.

❖ Định lượng  $\text{NH}_4^+$

Thuốc thử Nessler hòa tan 100 g thủy ngân (II) iodua và 70 g kali iodua trong 100 ml nước. Hòa tan 224 g kali hydroxit trong 700 ml nước đựng trong bình định mức một vạch 1000 ml và để nguội đến nhiệt độ phòng. Thêm từ từ dung dịch thủy ngân (II) iodua/kali iodua vào dung dịch kali hydroxit trong khi vẫn khuấy liên tục. Pha loãng bằng nước cất đến vạch và trộn đều. Để ổn định tối thiểu 2 ngày trước khi sử dụng.

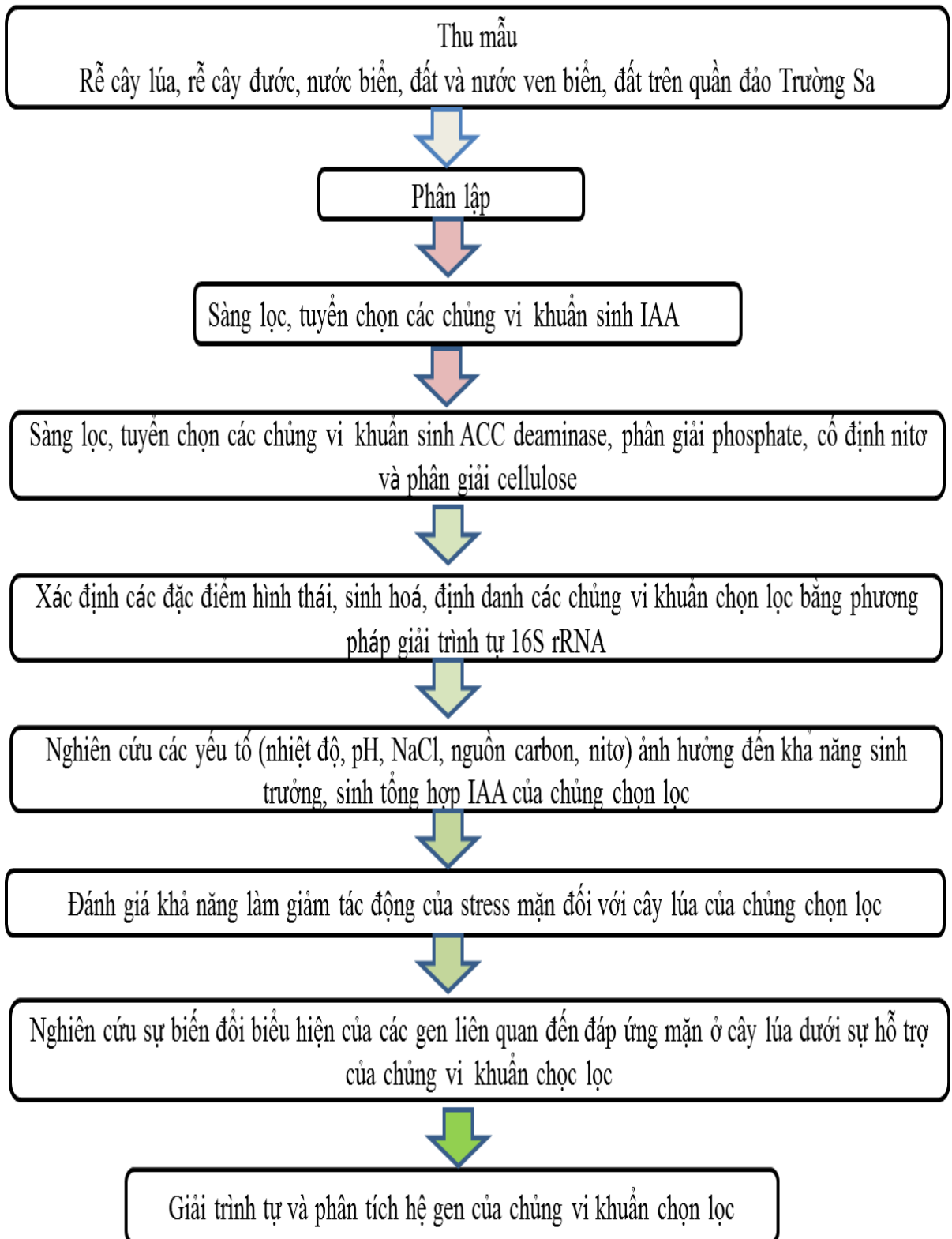
❖ Phân tích glucose: Thuốc thử DNS

*b) Thiết bị*

Máy vortex (Dragon, Trung Quốc), lò vi sóng (Sharp, Nhật Bản), cân kỹ thuật (Mettler Toledo, Thụy Sĩ), tủ lạnh  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  (Sanyo, Nhật Bản), pipet các loại (Gilson, Pháp), máy Realtime-PCR (Biorad/Mỹ), máy ly tâm (Eppendorf, Đức), máy quang phổ Biospectrometer (Eppendorf, Đức), máy PCR (Eppendorf AG, Đức); máy điện di (Bio-Rad), máy chụp ảnh gel (Amersham BioSciences), máy giải trình tự gen thế hệ mới (Illumina, Mỹ), máy Nanodrop spectrophotometer (Thermo Scientific/ Mỹ), nồi hấp tiệt trùng HVP-50 (Amerex Instrument/ Mỹ), tủ ấm  $20\text{-}50\text{ }^\circ\text{C}$  (Mettler / Đức), tủ sấy (Mettler / Đức), tủ cấy vô trùng (Esco/ Singapore).

## 2.2. Phương pháp nghiên cứu

Nội dung của luận án được thực hiện theo các bước mô tả trong Hình 2.1



Hình 2.1. Sơ đồ tóm tắt các nội dung nghiên cứu

### **2.2.1. Phương pháp lấy mẫu**

Nước biển được lấy bằng bathometer, sau đó chuyển vào ống Falcon 50 ml. Mẫu trầm tích được lấy bằng thiết bị lấy bùn chuyên dụng. Đất ven bờ được lấy bằng thìa inox đã khử trùng rồi chuyển vào túi đựng mẫu. Các mẫu thu thập được bảo quản lạnh trong hộp xốp có chứa đá trước khi mang về phòng thí nghiệm [135].

Các mẫu đất được lấy dựa theo tiêu chuẩn TCVN 7538-6:2010

Các mẫu rễ cây lúa và cây đước được lấy bằng cách dùng dao tách nhẹ nhàng phần rễ, hoặc thu thập toàn bộ phần gốc chuyển vào túi đựng mẫu, ghi nhãn và mang về phòng thí nghiệm phân lập. Các mẫu chưa phân tích được quản bảo ở 4 °C [136].

### **2.2.2. Phân lập các chủng vi khuẩn chịu mặn**

Phân lập các vi khuẩn đất và nước: Cân 10 gram mẫu đất hoặc 10 mL mẫu nước vào bình tam giác 250 ml chứa 90 ml nước muối 0,85% vô trùng. Lắc 120 vòng/phút trong 30 phút. Pha loãng mẫu dịch tới các nồng độ  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  và  $10^{-6}$ . Hút 100  $\mu$ L dịch mẫu ở các nồng độ pha loãng lên các môi trường đĩa petri (9 cm) chứa môi trường chọn lọc có bổ sung 3 % NaCl. Ủ đĩa trong 3-5 ngày ở 28 °C để quan sát sự hình thành các khuẩn lạc. Các vi khuẩn được chọn lọc thông qua hình thái bề mặt, màu sắc để phù hợp với chủng loại và mục đích nghiên cứu.

Phân lập các vi khuẩn nội sinh trong rễ lúa và đước [136]: Rễ được khử trùng bề mặt bằng cách ngâm trong ethanol 95% 1 phút sau đó ngâm vào dung dịch  $HgCl_2$  0,1% 1 phút. Sau đó rửa sạch (tối thiểu 10 lần) với nước cất vô trùng. Tiếp tục khử trùng bằng cách ngâm rễ trong ethanol 70% trong 5 phút, tiếp đến sodium hypochlorite 5,5% trong 10 phút. Rửa lại nhiều lần bằng nước vô trùng và sau đó súc rửa 3 lần với  $MgSO_4$  0,1M. Để kiểm tra khả năng các vi sinh vật còn sót lại trên bề mặt mẫu sau khi khử trùng, lấy 200 $\mu$ l nước cất vô trùng đã rửa mẫu ở lần thứ cuối cấy lên các đĩa môi trường NA và ủ ở 30 °C, nếu sau 24-48h ủ các đĩa môi trường này không có sự xuất hiện các khuẩn lạc thì các mẫu đã khử trùng đạt yêu cầu.

Rễ được nghiền bằng cối và chày vô trùng. Huyền phù được pha loãng bằng nước muối 0,85% hoặc không pha loãng sau đó cấy vào đĩa petri chứa môi trường NA bổ sung 3% NaCl. Quan sát sự hình thành khuẩn lạc sau 3-5 ngày nuôi cấy ở 28 °C.

Các khuẩn lạc được làm sạch và lưu giữ trong ống nghiệm bảo quản ở 4 °C và bảo quản lạnh sâu (-70 °C) trong glycerol 10%. Các khuẩn lạc hay các chủng vi sinh vật phân lập được sàng lọc, tiếp tục được đánh giá khả năng sinh tổng hợp IAA, ACC deaminase, phân giải phosphate khó tan, cố định đạm, phân giải cellulose.

### ***2.2.3. Sàng lọc các chủng vi khuẩn có khả năng sinh IAA***

Các chủng phân lập được đánh giá khả năng sinh IAA thông qua phương pháp Salkowski [137]. Các chủng phân lập được nuôi trong bình có chứa 5 ml môi trường King'B bổ sung thêm L- tryptophan 0,5 g/l, nuôi lắc 200 vòng/phút ở 30 °C trong 72 h. Dịch nuôi cấy sau 72 h được ly tâm ở 10.000 vòng/phút, thời gian 10 phút. Hút 1 ml dịch sau khi ly tâm trộn 1ml thuốc thử Salkowski. Ủ hỗn hợp 30 phút trong bóng tối, mẫu có chứa IAA chuyển sang màu đỏ. Sử dụng máy quang phổ ở bước sóng 535 nm để đo độ hấp thụ màu. Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Căn cứ vào đường chuẩn IAA ( $Y = aX + b$ ) để xác định hàm lượng IAA sinh ra ở từng chủng (Phụ lục 2a). Lựa chọn các chủng có khả năng sinh IAA cao để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo.

### ***2.2.4. Sàng lọc các chủng vi khuẩn có khả năng tổng hợp ACC deaminase***

Sàng lọc các chủng có khả năng sinh tổng hợp ACC deaminase từ các chủng sinh IAA. Hoạt độ ACC deaminase được xác định dựa trên khả năng tạo thành alpha- ketobutyrate từ quá trình thủy phân ACC. Các chủng chọn lọc được cấy trên môi trường DM agar có bổ sung 5 mM ACC (nguồn nitơ duy nhất) [138]. Sau 48 h nuôi cấy ở nhiệt độ 30 °C, lựa chọn các chủng có khả năng sinh trưởng mạnh cấy chuyển sang môi trường LB lỏng. Chủng vi sinh vật được nuôi cấy trên môi trường LB lỏng trong 24 h, lắc 200 vòng/phút, nhiệt độ 30 °C. Sinh khối tế bào được thu bằng phương pháp ly tâm bằng ly tâm 8000 vòng/phút, 5 phút, ở nhiệt độ 4 °C sau đó được rửa bằng môi trường DM. Hòa tan sinh khối vào 7,5 ml môi trường DM, có bổ sung 45 µl ACC 0,5 M để được nồng độ ACC cuối cùng là 0,3 mM. Sau khi ủ tiếp 24 h, lắc 200 vòng/phút, nhiệt độ 30 °C ly tâm thu sinh khối, rửa 3 lần bằng 5 ml of 0,1 M Tris-HCl pH 7,6. Tiếp theo, tế bào vi khuẩn hoà tan vào 600 µl 0,1 M Tris-HCl, pH 8,5 và bổ sung thêm 30 µl toluene, lắc mạnh trong 1 phút. Hỗn hợp tế bào được toluene hoá được chia làm hai phần, một phần để xác định protein theo

phương pháp Bradford và phần còn lại được sử dụng để xác định hoạt độ ACC deaminase.

Lấy 200  $\mu$ l hỗn hợp tế bào được toluene hoá, bổ sung 20  $\mu$ l dung dịch 0,5 mM ACC lắc đều, ủ 30 trong 15 phút, tiếp tục thêm 1 ml dung dịch 0,56 M HCl rồi ly tâm 10000 vòng/phút trong 5 phút ở nhiệt độ phòng và thu dịch trong. Hút 1 ml dịch trong trộn đều với 800  $\mu$ l dung dịch 0,56 M HCl. Tiếp theo, thêm 300  $\mu$ l thuốc thử 2,4-dinitrophenylhydrazine (0,1% 2,4- dinitrophenylhydrazine trong 2 M HCl. Sau khi ủ hỗn hợp này ở 30 °C trong 15 phút, bổ sung 2 ml NaOH 1N. Cuối cùng, xác định sự hấp thụ màu ở bước sóng 540 nm. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Hoạt độ ACC deaminase được xác định là lượng alpha- ketobutyrate được tạo ra trên mỗi g protein trong 1 giờ. Lượng alpha- ketobutyrate tạo ra được tính dựa trên phương trình đường chuẩn của alpha- ketobutyrate dạng  $Y = aX + b$  (Phụ lục 2b)

#### ***2.2.5. Sàng lọc các chủng vi khuẩn có khả năng phân giải phosphate***

Các chủng có khả năng sinh IAA được đánh giá khả năng phân giải phosphate không tan trên môi trường NBRIP agar [139]. Lựa chọn các chủng có vòng phân giải phosphate nuôi trên môi trường lỏng NBRIP, nuôi lắc 200 vòng/phút ở 30 °C. Sau 72 h nuôi dịch nuôi được sử dụng để xác định nồng độ phosphate hòa tan giải phóng vào môi trường nuôi cấy theo phương pháp so màu blue-molyphen ở bước sóng 880 nm. Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Dựa vào phương trình đường chuẩn ( $Y = aX + b$ ) để xác định hàm lượng phosphate hoà tan có trong mẫu (Phụ lục 2c).

#### ***2.2.6. Sàng lọc các chủng vi khuẩn có khả năng cố định nitơ***

Các chủng có khả năng sinh IAA tiếp tục được đánh giá khả năng cố định nitơ. Các chủng chọn lọc được cấy trên môi trường Burk's. Những chủng có khả năng mọc trên môi trường này là chủng có khả năng cố định nitơ. Chọn những chủng sinh trưởng mạnh (khuẩn lác to, rõ) trên môi trường thạch Burk's. Chuyển sang môi trường Burk's dịch thể nuôi lắc 120 vòng/phút, sau 72 h thu thập dịch nuôi để ly tâm lấy dịch trong để xác định hàm lượng  $\text{NH}_4^+$  sinh ra bằng phương pháp so màu với thuốc thử Nessler [140]. Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Đường chuẩn  $\text{NH}_4^+$  được dựng với các mẫu có nồng độ  $\text{NH}_4^+$  chuẩn khác nhau có dạng  $Y = aX + b$  để tính lượng  $\text{NH}_4^+$  có trong mẫu (Phụ lục 2d)

#### ***2.2.7. Sàng lọc các chủng vi khuẩn có khả năng phân hủy cellulose***

Các chủng có khả năng sinh IAA được cấy trên môi trường có CMC 1% (nguồn cacbon duy nhất). Những chủng có khả năng mọc trên môi trường này là chủng có khả năng phân hủy cellulose. Chọn những chủng sinh trưởng mạnh (mọc nhanh, sinh khối nhiều) trên môi trường thạch CMC. Chuyển sang môi trường CMC dịch thể nuôi lắc 120 vòng/phút, sau 72 h dịch nuôi đem ly tâm lấy dịch trong xác định khả năng sinh enzyme cellulase sinh ra, lấy dịch trong để xác định hoạt độ enzyme cellulase theo phương pháp Miller [141]. Khả năng phân hủy cellulose được xác định dựa vào lượng đường khử tạo thành sau phản ứng bằng phương pháp đo quang phổ. Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Đơn vị hoạt độ CMCase được định nghĩa là lượng enzyme cellulase cần thiết để giải phóng 1  $\mu\text{g}$  glucose trong 1 phút dưới điều kiện tiêu chuẩn. Dựa vào đường chuẩn glucose có dạng  $Y = aX + b$  để tính lượng glucose được giải phóng (Phụ lục 2e)

### **2.2.8. Khả năng sinh siderophores**

Khả năng sinh siderophore được đánh giá theo phương pháp của Schwyn và Neiland (1987) [142]. Vi khuẩn được nuôi lắc ở 200 vòng/phút trong môi trường lỏng Nutrient broth qua đêm ở 30 °C. Sau đó 20  $\mu\text{L}$  dịch vi khuẩn được nhỏ trên đĩa NA có bổ sung Chromo Azzurol S (CAS) và ủ ở 30 °C. Quan sát màu sắc xung quanh vùng khuẩn lạc sau 1 tuần nuôi cấy. Nếu màu cam sáng thì chứng tỏ vi khuẩn có khả năng sinh siderophores.

### **2.2.9. Phân loại vi sinh vật**

#### **2.2.9.1. Xác định một số đặc điểm về hình thái và sinh hoá**

Quan sát đặc điểm khuẩn lạc: Hình thái của khuẩn lạc dựa vào hình dạng, màu sắc, độ nổi và dạng bìa bằng kính lúp.

Quan sát đặc điểm tế bào vi khuẩn: Hình thái tế bào được quan sát dưới kính hiển vi quang học ở độ phóng đại 1000 lần.

Nhuộm Gram: Cố định tiêu bản bằng cách nhỏ 10  $\mu\text{l}$  nước cất vô trùng lên la men, sau đó dùng que cấy vô trùng lấy một lượng nhỏ sinh khối vi khuẩn trải lên kính, để khô tự nhiên. Nhuộm bằng dung dịch tím gentian trong 30 giây- 1 phút, sau đó rửa bằng nước. Nhuộm dung dịch lugol và giữ trong 1 phút, rửa bằng nước. Nhỏ dung dịch alcohol 90%, giữ khoảng 30 giây (cho đến khi vừa thấy mất màu), rửa bằng nước. Nhuộm tiếp bằng dung dịch Fuchsin trong 1 phút, rửa bằng nước và để khô. Quan sát ở vật kính 100 X. Vi khuẩn Gram dương: bắt màu tím, do vách tế bào

dày có khả năng giữ tím gentian. Vi khuẩn Gram âm bắt màu hồng là do vách tế bào mỏng hơn không thể giữ lại gentians (Màu hồng của fucshin)

Một số đặc điểm sinh hoá được xác định dựa theo Kit API 20E Biomerieux

#### 2.2.9.2. Phương pháp giải trình tự 16S rRNA

Các chủng vi sinh vật được định danh bằng phương pháp giải trình tự 16S rRNA. Chủng vi sinh được nuôi trong môi trường LB ở 30 °C sau 24 h nuôi lắc 200 vòng/phút. DNA được tách chiết theo kit tách DNA (Thermo Scientific). Hút 1ml dịch sinh khối ly tâm 10000 vòng/phút trong 5 phút. Cho 560 mL TE và 40 µL SDS 10%, đánh tan và trộn đều cặn sinh khối rồi cho tiếp 20 µL proteinase-K. Ủ ở nhiệt độ 56 °C trong 45 phút. Thêm 280 µL NaCl 5 M, trộn nhẹ rồi chuyển sang ống 2mL eppendorf. Rửa bằng hỗn hợp chloroform-isoamy (24:1) tỷ lệ 1:1, lắc 10 giây. Ly tâm ở 10000 vòng/phút trong 15 phút, thu dịch nổi (lặp lại 2 lần). Thu 500 µL dịch nổi, bổ sung tiếp 1 mL ethanol tuyệt đối để ủ qua đêm ở -20 °C. Ly tâm 12000 vòng/phút ở 4 °C trong 20 phút thu cặn. Sau khi thu cặn tiếp tục rửa bằng 650 µL cồn 70% bằng cách ly tâm 12000 vòng/phút ở 4 °C trong 20 phút (2 lần). Thu cặn DNA và làm khô để loại hết cồn. Hòa tan DNA trong 100 µL H<sub>2</sub>O và 10 µL Rnase (10 mg/mL), ủ ở 37 °C trong 30 phút.

Gen 16S rRNA được khuếch đại bằng phản ứng PCR sử dụng cặp mồi xuôi 27F, mồi ngược 1492R. Thành phần của phản ứng thể hiện trong Bảng 2.1. Chu trình nhiệt của phản ứng PCR với các giai đoạn: Biến tính DNA khuôn ở chu kỳ đầu ở 95 °C trong 5 phút. Các chu kỳ sau biến tính trong 30 giây; bắt cặp mồi ở 52 °C trong 1 phút; kéo dài ở 72 °C trong 1 phút 30 giây; thực hiện 35 chu kỳ; chu kỳ cuối ở 72 °C trong 5 phút; kết thúc phản ứng hạ nhiệt độ xuống 40 °C. Trình tự gen 16S rRNA của chủng vi khuẩn được xác định trên hệ thống máy giải trình tự tự động ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystem). Kết quả giải trình tự gen 6S rRNA của vi khuẩn được tham chiếu với các trình tự trên ngân hàng gen quốc tế NCBI bằng chương trình BLAST để định danh loài vi sinh vật.

*Bảng 2.1. Thành phần phản ứng PCR nhân gen 16S rRNA*

<b>Thành phần phản ứng</b>	<b>Nồng độ phản ứng</b>	<b>Thể tích (μL)</b>
Nước đã khử ion vô trùng		16,0
10X Buffer	1 X	2,5
10 mM dNTP	0,4 mM	1,0
Mồi xuôi (27F) 10 pmol/ul	0,4 pmol/μL	1,0
Mồi ngược (1492 R) 10 pmol/ul	0,4 pmol/μL	2,0
Taq DNA polymerase	2 U	0,5
DNA khuôn		2,0
<b>Tổng thể tích</b>		<b>25</b>

### ***2.2.10. Ảnh hưởng của một số yếu tố đến sinh trưởng và tổng hợp IAA của các chủng vi khuẩn chọn lọc***

#### ***2.2.10.1 Ảnh hưởng của pH và nhiệt độ đến sinh trưởng của các chủng vi khuẩn chọn lọc***

Các chủng vi khuẩn tuyển chọn được nuôi lỏng lác trong môi trường thích hợp, tốc độ 200 vòng/phút, tại các giá trị pH trong khoảng 5-8,5 và nhiệt độ 25, 27, 30, 34, 37 và 45 °C. Sau 48 h ngày tiến hành đo OD 600 nm để xác định khả năng sinh trưởng ở các dải pH và nhiệt độ nghiên cứu.

#### ***2.2.10.2. Ảnh hưởng nguồn nitơ đến sinh trưởng và sinh IAA của các chủng vi khuẩn chọn lọc***

Thay peptone trong môi trường King'B lần lượt là tryptone, cao nấm men, cao thịt nồng độ 20 g/l và NaNO<sub>3</sub> với nồng độ 5 g/l. Sau 120 h nuôi lác 200 vòng/phút ở các điều kiện nhiệt độ và pH thích hợp thu dịch lên men xác định khả năng sinh trưởng bằng phương pháp đo OD và ly tâm 10.000 vòng/phút trong 5 phút thu dịch trong để đo nồng độ IAA bằng phương pháp so màu với thuốc thử Salkowski.

#### ***2.2.10.3. Ảnh hưởng nồng độ L-tryptophan đến sinh trưởng và sinh IAA của các chủng vi khuẩn chọn lọc***

Sử dụng môi trường King'B với nguồn nitơ thích hợp và nồng độ tryptophan là 0; 0,1; 0,15; 0,2; 0,25 và 0,3%. Sau 120 h nuôi lác 200 vòng/phút ở điều kiện nhiệt độ và pH thích hợp thu dịch lên men xác định khả năng sinh trưởng



bằng phương pháp đo OD và ly tâm 10.000 vòng/phút trong 5 phút, thu dịch trong để xác định nồng độ IAA bằng phương pháp so màu với thuốc thử Salkowski.

#### *2.2.10.4. Ảnh hưởng nguồn carbon đến sinh trưởng và sinh IAA của các chủng vi khuẩn chọn lọc*

Sử dụng môi trường King'B với nguồn nitơ và hàm lượng tryptophan thích hợp. Nguồn carbon lần lượt là glucose, mannitol, maltodextrin, sucrose và tinh bột tan với nồng độ 10 g/l. Sau 120 h nuôi lắc 200 vòng/phút ở điều kiện nhiệt độ và pH thích hợp thu dịch lên men xác định khả năng sinh trưởng bằng phương pháp đo OD và ly tâm 10.000 vòng/phút, 5 phút lấy dịch trong nồng độ IAA bằng phương pháp so màu với thuốc thử Salkowski.

#### *2.2.10.5 Ảnh hưởng của nồng độ muối đến sinh trưởng và tổng hợp IAA của các chủng vi khuẩn chọn lọc*

Sử dụng môi trường King'B với nguồn nitơ, nguồn carbon và hàm lượng tryptophan thích hợp cho từng chủng và bổ sung NaCl từ 0 đến 27,5%. Vi khuẩn trên máy lắc với tốc độ 200 vòng/phút với các điều kiện nhiệt độ và pH thích hợp. Sau 48 h, tiến hành đo OD 600 nm để đánh giá khả năng sinh trưởng và ly tâm 10.000 vòng/phút trong 5 phút, lấy dịch trong nồng độ IAA bằng phương pháp so màu với thuốc thử Salkowski. Thí nghiệm lặp lại 3 lần.

#### **2.2.11. Phương pháp xác định chlorophyll trong lá lúa**

Hàm lượng chlorophyll (a, b và tổng số) trong lá được xác định theo phương pháp được mô tả bởi nhóm tác giả Moran [143]. Cắt 0,2 g lá thành các miếng nhỏ vào ống nghiệm, thêm 2 mL N, N-dimethylformamide, nghiền và ủ hỗn hợp ở 4 °C trong 48 h. Đo OD ở bước sóng 663 nm và 546 nm bằng UV-visible spectrophotometer (Genesys 10 UV, Thermo Fisher Scientific, USA) để xác định chlorophyll a và b. Hàm lượng chlorophyll tổng số, chlorophyll a và b được tính theo công thức:

$$\text{Chlorophyll a} = (0,0127 \times \text{OD}_{663} - 0,00269 \times \text{OD}_{645})$$

$$\text{Chlorophyll b} = (0,0229 \times \text{OD}_{645} - 0,0468 \times \text{OD}_{663})$$

$$\text{Total chlorophyll} = \text{chlorophyll a} + \text{chlorophyll b}$$

#### **2.2.12. Đánh giá khả năng làm giảm tác động của stress mặn đối với cây lúa của các chủng vi khuẩn chọn lọc**

Chuẩn bị hạt thóc vô trùng: Ngâm hạt thóc bằng dung dịch NaOCl 3% trong 5 phút, rửa với nước cất vô trùng 3 lần. Tiếp tục rửa bằng dung dịch ethanol 70% trong 30 giây và rửa lại bằng nước cất vô trùng 5 lần.

Các chủng vi khuẩn được nuôi trong môi trường lỏng LB ở 30 °C, lắc 200 vòng/phút, sau 24 h ly tâm 10000 vòng/phút trong 5 phút thu sinh khối. Sinh khối được rửa 2 lần với nước vô trùng. Phần cặn sinh khối sau khi rửa sạch thì hòa tan với nước vô trùng để đạt OD 600 nm là mật độ  $10^8$  CFU/ml.

Hạt giống vô trùng được ngâm với dịch vi khuẩn ( $10^8$  CFU/ml) hoặc nước vô trùng (Đối chứng) trong 48 h ở 30 °C. Ủ đến khi hạt giống nảy mầm và được gieo trên đất với mật độ 10 cây/chậu (mỗi một thử nghiệm lặp lại 3 chậu). Đất sử dụng làm giá thể được lấy từ ruộng trồng lúa đã được xác định một số chỉ tiêu dinh dưỡng (hàm lượng hữu cơ 4,9%; tổng N 1,3%; lân dễ tiêu 0,01%; kali dễ tiêu 0,02%, pH 5,85), sau đó xử lý vô trùng bằng phương pháp khử trùng ở 121 °C, 1 atm, 45 phút. Đất sau khi vô trùng được làm ẩm và bổ sung vi sinh vật chọn lọc để đạt mật độ  $10^3$  cfu/g. Với mẫu đối chứng dùng nước vô trùng.

Sau 21 ngày nuôi ở điều kiện chiếu sáng 10 h/ngày, cường độ sáng 1200lux, độ ẩm 60-80%, nhiệt độ trung bình 30 °C thì tiến hành xử lý các mẫu với NaCl 200 mM. Sau 7 ngày kiểm chỉ tiêu sinh trưởng, phát triển của cây lúa bao gồm chiều cao thân, chiều dài rễ, trọng lượng khô cả cây và hàm lượng chlorophyll (a, b và tổng số). Chiều cao cây được đo từ cổ rễ đến chóp lá dài nhất, chiều dài rễ được đo từ gốc rễ đến chóp rễ dài nhất bằng thước chia độ mm. Xác định khối lượng khô khối lượng khô toàn bộ cây bằng cách sấy ở 105 °C đến khi khối lượng không đổi, đem cân bằng cân phân tích. Xác định mật độ vi sinh vật trong đất và trong rễ bằng phương pháp phân lập vi sinh vật mô tả trong mục 2.2.2

Lựa chọn chủng có ảnh hưởng tốt nhất để thiết kế thí nghiệm nghiên cứu sự biểu hiện của các gen liên quan đến đáp ứng mặn ở cây lúa.

### ***2.2.13. Đánh giá sự biểu hiện của các gen liên quan đến đáp ứng mặn ở cây lúa dưới sự hỗ trợ của chủng vi khuẩn chọn lọc***

Thí nghiệm được bố trí gồm 4 nghiệm thức:

1. Đối chứng (C)
2. Đối chứng + NaCl (C+NaCl)
3. Nhiễm chủng vi khuẩn chọn lọc

#### 4. Nhiễm chủng vi khuẩn chọn lọc + NaCl

Hạt giống vô trùng được ngâm với dịch vi khuẩn ( $10^8$  CFU/ml) hoặc nước vô trùng (Đối chứng) trong 48 h ở  $30^\circ\text{C}$ . Ủ đến khi hạt giống nảy mầm và được gieo trên đất với mật độ 10 cây/chậu (mỗi một thử nghiệm lặp lại 3 chậu). Đất sử dụng làm giá thể được lấy từ ruộng trồng lúa đã được xác định một số chỉ tiêu dinh dưỡng (hàm lượng hữu cơ 4,9%; tổng N 1,3%; lân dễ tiêu 0,01%; kali dễ tiêu 0,02%, pH 5,85), sau đó xử lý vô trùng bằng phương pháp khử trùng ở  $121^\circ\text{C}$ , 1 atm, 45 phút. Đất sau khi vô trùng được làm ẩm và bổ sung vi sinh vật chọn lọc để đạt mật độ  $10^3$  cfu/g. Với mẫu đối chứng dùng nước vô trùng.

Cây lúa được 30 ngày tuổi tiến hành bổ sung NaCl 200 mM. Sau 7 ngày thu mẫu đánh giá các chỉ tiêu sinh trưởng, phát triển của cây lúa bao gồm chiều cao cây, chiều dài rễ, trọng lượng khô, hàm lượng chlorophyll (a,b và tổng số) và nghiên cứu sự biểu hiện các gen liên quan đến đáp ứng mặn bằng phương pháp RT-PCR.

##### 2.2.13.1. Tách chiết RNA và tổng hợp cDNA

Lá lúa sau khi thu được làm lạnh trong nitơ lỏng và bảo quản  $-80^\circ\text{C}$ . RNA tổng số được tách chiết từ các mẫu lá lúa sử dụng Kit Ribospin<sup>TM</sup> Plant (GeneAll). Chất lượng RNA tổng số được kiểm tra bằng tỉ lệ OD 260/OD 280 và điện di sản phẩm trên gel agarose 1%.

Tổng hợp cDNA: 1  $\mu\text{g}$  RNA tổng số được sử dụng làm khuôn tổng hợp cDNA bằng bộ Kit First strand cDNA synthesis Kit (NebEngland Biolabs).

Bảng 2.2. Thành phần của phản ứng cDNA

TT	Thành phần	
(I)	RNA 1 $\mu\text{g}$	Tổng thể tích của hỗn hợp: 12 $\mu\text{L}$ trong đó thể tích 1 $\mu\text{g}$ RNA và H <sub>2</sub> O: 11 $\mu\text{L}$ và Oligo dT: 1 $\mu\text{L}$
	H <sub>2</sub> O	
	Oligo dT	
Đề $65^\circ\text{C}$ trong thời gian 5 phút, làm lạnh ngay trong 5 phút		
(II)	5X buffer	4 $\mu\text{L}$
	RNase inhibitor	1 $\mu\text{L}$
	dNTP mix 10nM	2 $\mu\text{L}$
	RT 200U	1 $\mu\text{L}$
Phản ứng PCR được thực hiện với thể tích (I)+(II) = 20 $\mu\text{L}$ với chu trình như sau: $25^\circ\text{C}$ trong 10 phút, $45^\circ\text{C}$ trong 60 phút và $70^\circ\text{C}$ trong 5 phút. Sản phẩm sau PCR được bổ sung 20 $\mu\text{L}$ nước và bảo quản $-20^\circ\text{C}$ .		

##### 2.2.13.2. Kỹ thuật RT-PCR

Sự biểu hiện của các gen liên quan đến đáp ứng mặn của cây lúa (*NADPMe2*, *SOS1*, *PR1*, *MYC2*, *NHX1*, *SOD* và *CAT*) được phân tích bằng kỹ thuật RT-PCR với các cặp mồi trình bày trong Bảng 2.3, trong đó 02 gen *Actin* và *UBQ5* được lựa chọn làm gen nội kiểm. Trình tự các cặp mồi được thiết kế dựa trên phần mềm primer-blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) và được kiểm tra độ đặc hiệu bằng phản ứng PCR sử dụng mẫu cDNA từ lá lúa.

Bảng 2.3. Trình tự các đoạn mồi

Gen	Trình tự (5'-3')	Kích thước (bp)
Actin	Actin-F: GAGTATGATGAGTCGGGTCCAG Actin-R: ACACCAACAATCCCAAACAGAG	143
Ubiquitin 5/ <i>UBQ5</i>	UBQ5-F: ACCACTTCGACCGCCACTACT UBQ5-R: RACGCCTAAGCCTGCTGGTT	69
NADP-malic enzyme/ <i>NADP-Me2</i>	NADP-Me2-F: TGGTTCATTGTCGGAGCACA NADP-Me2-R: GCCCTTTGAATCGACAAGCC	151
Salt-overly-sensitive 1/ <i>SOS1</i>	SOS1-F: ATCAGGTGGAGGCTAGAGCA SOS1-R: TGACGCACTCCTTTGCAGAT	83
Superoxide dismutase/ <i>SOD</i>	SOD-F: TTGAATCGGACCGCCACTACT SOD-R: CGCACTGCCTGCTGGTTGCAGA	84
Catalase / <i>CAT</i>	CAT-F: TGCCCTTCTATTGTGGTTCC CAT-R: GATGAGCACACTTTGGAGGA	102
Pathogenesis related protein 1/ <i>PR1</i>	PR1-77F: CCTGCCTGCCTTCCTCATTC PR1-77R: GTGAAGATTTGGTTTCCATTGTA	77
Myelocytomatosis 2/ <i>MYC2</i>	MYC2-F: CTAGCGAGGAAACCCAATCG MYC2-R: TCGTCTCGTCGTCTTCTTGG	95
Sodium proton antiporter/ <i>NHX1</i>	NHX1-82F: GGCCATCTCGCTTGAATCTG NHX1-82R: CTCCCAAATCCAGCCCCATC	82

Phản ứng RT-PCR được thực hiện với nồng độ cDNA đã được tối ưu là 150 ng/ $\mu$ L. Thành phần được thể hiện trong Bảng 2.4. Chu trình phản ứng RT-PCR được thực hiện như sau: 95 °C trong 12 phút, tiếp theo 40 chu kỳ ở 95 °C trong 15 giây, 58 °C trong 40 giây.

Bảng 2.4. Thành phần phản ứng RT-PCR

TT	Thành phần	
1	H <sub>2</sub> O	3 $\mu$ L
2	qPCR master mix	5 $\mu$ L
3	Primer F	0,5 $\mu$ L
4	Primer R	0,5 $\mu$ L
5	cDNA	150 ng
Tổng		10 $\mu$ L

Kết quả được phân tích theo phương pháp của Livak [144], cụ thể như sau:

Trong điều kiện lượng mẫu đầu vào là như nhau, mẫu có Ct nhỏ hơn thì sẽ có hàm lượng trình tự đích cao hơn. Tuy nhiên trong thực tế thì không có bằng chứng nào để khẳng định lượng mẫu đầu vào là như nhau, vì vậy cần phải có giá trị Ct tham chiếu của gene chứng nội (C), việc so sánh sẽ diễn ra gián tiếp thông qua việc so sánh với C

Đây là phương pháp đánh giá sự biểu hiện của một gen trong trường hợp xác định với mẫu tế bào thường. Trong phương pháp này, định lượng gen cần nghiên cứu (Tg) và một gen tham chiếu (là gen đã được xác định là có biểu hiện như nhau giữa các tế bào-Rf) giữa hai mẫu tế bào (mẫu thí nghiệm gọi là T và mẫu đối chứng gọi là C).

Như vậy ứng với mẫu T và mẫu C sẽ có kết quả định lượng cho cả gen Tg và gen Rf qua các thông số

Ct (T/Tg) là ngưỡng chu kỳ của gen cần nghiên cứu trong mẫu thí nghiệm (T)

Ct (T/Rf) là ngưỡng chu kỳ của gen tham chiếu trong mẫu thí nghiệm (T)

Ct (C/Tg) là ngưỡng chu kỳ của gen cần nghiên cứu trong mẫu đối chứng (C)

Ct (T/Rf) là ngưỡng chu kỳ của gen tham chiếu trong mẫu thí nghiệm (C)

Dựa trên các thông số này, chu kỳ ngưỡng của gen đích trên mẫu thí nghiệm (T) và mẫu đối chứng (C) được thường hoá bằng cách tính hiệu số chênh lệch Ct của gen đích với gen tham chiếu trên các mẫu:

$$\text{Mẫu thí nghiệm: } \Delta Ct (T) = Ct (T/Tg) - Ct (T/Rf)$$

$$\text{Mẫu thí nghiệm: } \Delta Ct (C) = Ct (C/Tg) - Ct (C/Rf)$$

Sau đó, thường hoá  $\Delta Ct$  mẫu thử bằng hiệu số chênh lệch  $\Delta Ct (T)$  và  $\Delta Ct (C)$

$$\Delta \Delta Ct = \Delta Ct (T) - \Delta Ct (C)$$

Từ đó tính ra tỷ lệ biểu hiện của gen đích trên mẫu thí nghiệm so với đối chứng bằng  $2^{-\Delta \Delta Ct}$

#### ***2.2.14. Phân tích hệ gen của chủng vi khuẩn chọn lọc bằng phương pháp giải trình tự gen thế hệ mới***

##### ***2.2.14.1. Tách chiết, tinh sạch và tạo thư viện DNA***

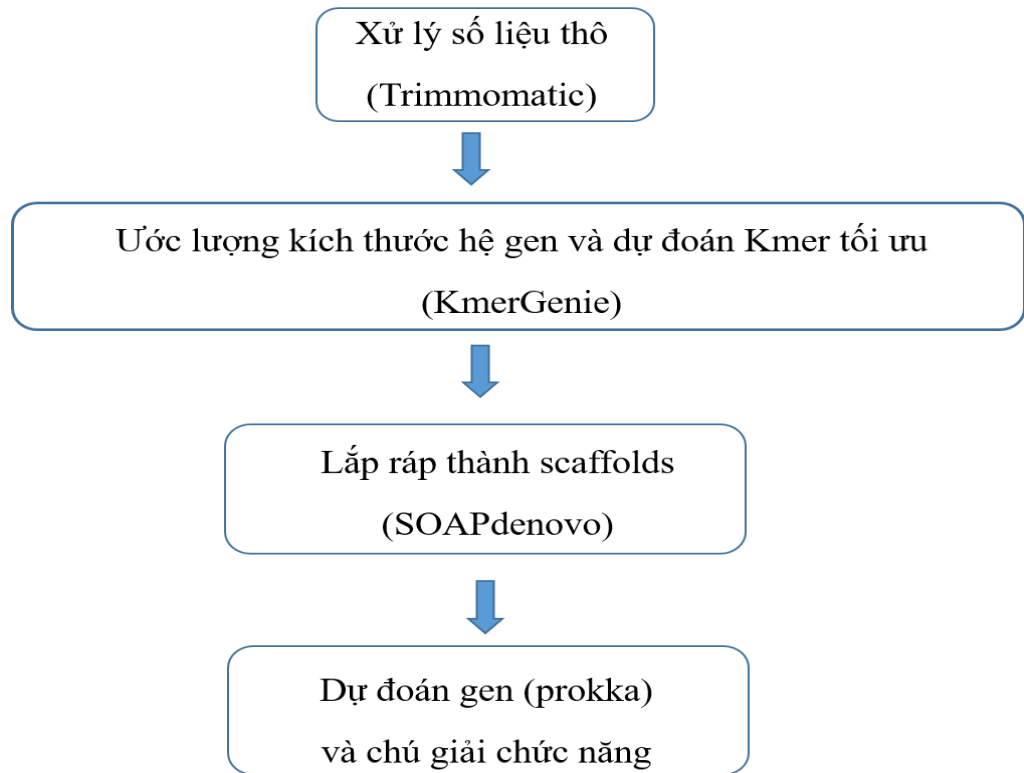
DNA tổng số được tách chiết theo Qiagen Dneasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, USA) quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất. Các mẫu DNA tổng số được đo nồng độ và chất lượng trên máy NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer và kiểm

tra chất lượng bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1,5%, nhuộm bằng ethidium bromide và chụp ảnh gel bằng Quantity One Program (Gel Doc EQ; Bio-Rad, Hercules, CA).

Quá trình tạo thư viện DNA được thực hiện theo hướng dẫn của bộ Kit NEBNext<sup>®</sup> Ultra<sup>™</sup> DNA Library Prep Kit Illumina<sup>®</sup>. Đối với mỗi mẫu, 1 µg DNA bộ gen được phân mảnh ngẫu nhiên đến <500 bp bằng máy cắt siêu âm (Covaris S220). Các phân mảnh DNA được xử lý để gắn với adaptor. Việc lựa chọn kích thước của Adaptor-ligated DNA được thực hiện bằng AxyPrep Mag PCR Clean-up (Axygen, USA) với các đoạn của khoảng 410 bp. Sau đó, mỗi mẫu được khuếch đại bằng phản ứng PCR trong 8 chu kỳ sử dụng môi P5 và P7. Các sản phẩm PCR được làm sạch bằng cách sử dụng AxyPrep Mag PCR Clean-up (Axygen, USA). Chất lượng thư viện DNA được kiểm tra trên thiết bị Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, PaloAlto, CA, USA) và được định lượng bằng Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Sau đó, các thư viện gen được ghép lại và chạy trên thiết bị Illumina HiSeq theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Illumina, San Diego, CA, USA).

#### *2.2.14.2 Phân tích hệ gen vi khuẩn*

Trình tự bộ gen được xử lý qua phần mềm Trimmomatic để xác định độ dài và chất lượng các đoạn trình tự [145]. Độ dài k-mer tốt nhất và kích thước bộ gen được ước tính bởi KmerGenie [146]. Việc lắp ráp các trình tự được thực hiện bằng phần mềm SOAPdenovo2 [147]. Dự đoán và chú thích gen được thực hiện bằng cách sử dụng phần mềm Prokaryotic Genome Annotation Pipeline [148]. Việc chú thích trình tự mã hóa protein cũng được thực hiện bằng cách sử dụng tìm kiếm BLAST dựa trên cơ sở dữ liệu protein của GenBank, cơ sở dữ liệu (COG) và cơ sở dữ liệu KEGG [149]. Chỉ số nhận dạng nucleotide trung bình (ANI) đã được phân tích bằng máy tính trên hệ thống máy chủ Eztaxon [150]. Để phân tích so sánh, trình tự bộ gen của các chủng được tham chiếu trên cơ sở dữ liệu NCBI



Hình 2.2. Sơ đồ các bước phân tích hệ gene

#### 2.2.15. Phân tích thống kê

Phân tích số liệu thu được từ máy giải trình tự bằng hệ thống máy tính hiệu năng cao. Xử lý số liệu sinh học bằng phương pháp thống kê trên phần mềm Excel và chương trình IRRISTAT 5.0

#### 2.2.16. Địa điểm nghiên cứu

Các thí nghiệm của luận án được tiến hành tại Phòng Hệ gen học chức năng và Phòng Hoá Sinh, Viện Hoá học-Vật liệu, Viện Khoa học và Công nghệ quân sự, Bộ Quốc phòng.

### CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn có khả năng chịu mặn sinh chất kích thích sinh trưởng thực vật

##### 3.1.1. Phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn sinh IAA

Tùy thuộc vào vị trí lấy mẫu, các chủng vi khuẩn được phân lập trên các môi trường khác nhau. Các chủng vi khuẩn từ đất quần đảo Trường Sa, rễ cây lúa và đước được phân lập trên môi trường NA bổ sung 3% NaCl. Các chủng vi khuẩn từ mẫu đất và nước biển được phân lập trên môi trường MA bổ sung 5% NaCl. Sau đó, các chủng vi khuẩn có khả năng sinh IAA được sàng lọc trên môi trường King'B bổ sung 0,5 (g/l) L-tryptophan.

Kết quả phân lập và sàng lọc các chủng vi khuẩn có khả năng sinh IAA được trình bày trong Bảng 3.1 và Bảng 3.2. Đã phân lập được 423 chủng vi khuẩn trong đó 175 chủng vi khuẩn từ 36 mẫu đất quần đảo Trường Sa, 21 chủng vi khuẩn từ 9 mẫu rễ cây lúa, 25 chủng từ 9 mẫu rễ cây đước và 202 chủng từ 12 mẫu đất và nước biển. Sàng lọc khả năng sinh IAA từ 423 chủng phân lập, kết quả thu được 65 chủng vi khuẩn có khả năng sinh IAA, trong đó 39 chủng từ các mẫu đất Trường Sa, 7 chủng từ các mẫu rễ lúa, 9 chủng từ các mẫu rễ cây đước và 10 chủng từ các mẫu đất và nước biển.

Các chủng vi khuẩn được đánh giá khả năng sinh IAA trên môi trường King'B không và có bổ sung 0,5 (g/l) L-tryptophan. L-tryptophan đóng vai trò là tiền chất của IAA do vậy nồng độ L-tryptophan ảnh hưởng trực tiếp đến khả năng sinh IAA. Tất cả 65 chủng đều không có khả năng sinh IAA trong môi trường không bổ sung tryptophan. Trong môi trường có bổ sung tryptophan, các chủng phân lập từ các nguồn khác nhau có khả năng sinh IAA với hàm lượng tương đối giống nhau. Mười chủng phân lập từ các mẫu đất và nước biển có hàm lượng IAA trong khoảng từ 19 đến 44  $\mu\text{g/mL}$ , một số chủng có khả năng sinh tổng hợp IAA cao như chủng C7 (44,17  $\mu\text{g/mL}$ ), B7 (36,53  $\mu\text{g/mL}$ ) và B9 (40,43  $\mu\text{g/mL}$ ). Chín chủng phân lập từ rễ cây đước có khả năng sinh IAA với hàm lượng trong khoảng từ 14 đến 38  $\mu\text{g/mL}$  trong đó có chủng DM10 cho hàm lượng IAA cao (38,78  $\mu\text{g/mL}$ ). Các chủng có khả năng sinh IAA phân lập từ mẫu đất trên quần đảo Trường Sa có hàm lượng trong khoảng từ 11 đến 38  $\mu\text{g/mL}$ , trong đó một số chủng có khả năng sinh IAA cao như STĐ2.1.3 (35,54  $\mu\text{g/mL}$ ), STT1.1.2 (35,71  $\mu\text{g/mL}$ ), D1.2.2 (38,71  $\mu\text{g/mL}$ ), D3.2.3 (32,33  $\mu\text{g/mL}$ ), NY4.2.3 (30,17  $\mu\text{g/mL}$ ), NY4.3.1



(33,34  $\mu\text{g/mL}$ ) và STT3.2.3 (28,50  $\mu\text{g/mL}$ ). Bầy chủng sinh IAA từ rễ lúa có hàm lượng khoảng từ 23 đến 46  $\mu\text{g/mL}$ , trong đó 3 chủng RL5, RL6 và RL7 có hàm lượng IAA cao lần lượt là 44,83; 35,95 và 46,50  $\mu\text{g/mL}$ .

*Bảng 3.1.* Kết quả phân lập, sàng lọc các chủng có khả năng sinh IAA

<b>Mẫu phân lập</b>	<b>Số mẫu</b>	<b>Địa điểm lấy mẫu</b>	<b>Môi trường</b>	<b>Số chủng phân lập</b>	<b>Số chủng sinh IAA</b>
Mẫu đất	36	Trường Sa	NA	175	39
Rễ cây lúa	9	Nam Hải, Tiền Hải, Thái Bình	NA	21	7
Rễ cây đước	9	Cồn Vành, Tiền Hải, Thái Bình	NA	25	9
Đất và nước biển	12	Cồn Bưng, Trà Vinh và Ba Động, Bến Tre	MA	202	10
<b>Tổng mẫu</b>	<b>66</b>			<b>423</b>	<b>65</b>

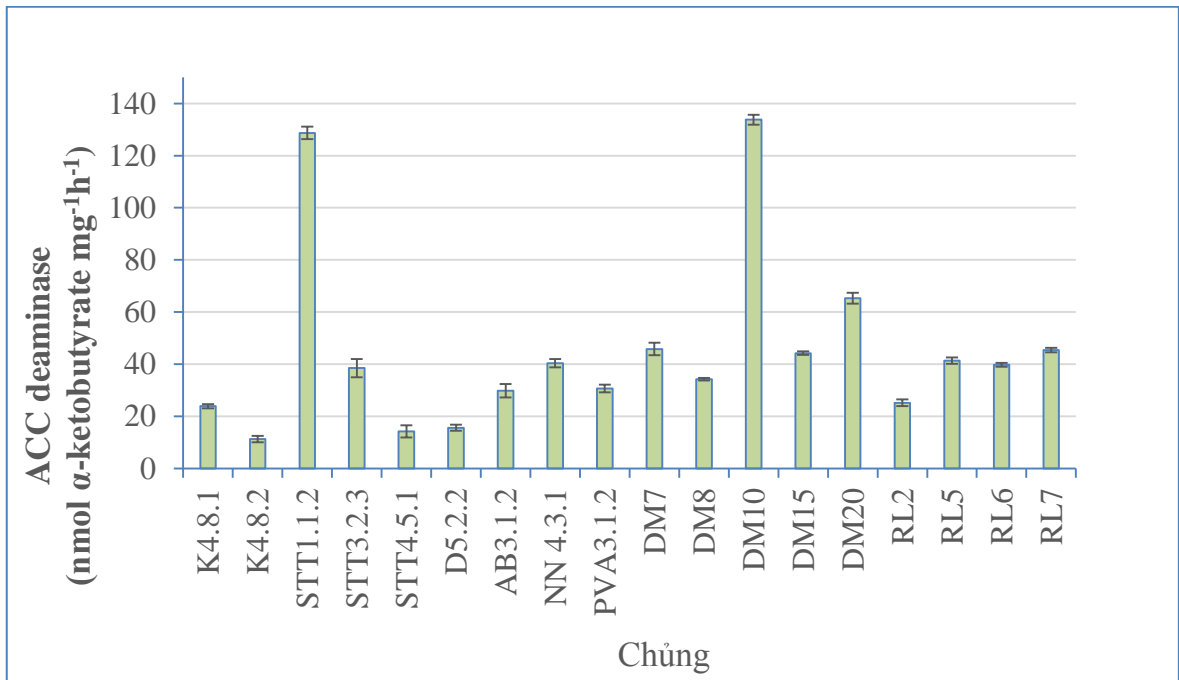
Vi sinh vật kích thích tăng trưởng thực vật có khả năng sinh IAA được phân lập từ nhiều nguồn khác nhau như trong đất, đất vùng rễ, nước và nội sinh trong rễ thân lá các loài thực vật. Trong đó, tỷ lệ PGPB có khả năng sinh IAA thường chiếm tỷ lệ cao hơn trong các mẫu phân lập từ rễ hoặc vùng đất xung quanh rễ [1]. Ở nghiên cứu này, tỉ lệ PGPB sinh IAA chiếm tỷ lệ cao ở mẫu rễ cây đước (36%), mẫu rễ lúa (33%), trung bình ở các mẫu đất vườn trên quần đảo Trường Sa (21%) và thấp ở mẫu đất và nước biển (4,9%). Vi sinh vật sinh IAA đã được phân lập bởi một số tác giả từ nhiều nguồn khác nhau. Cao Ngọc Diệp và cộng sự (2015) [151] đã phân lập các chủng vi sinh vật nội sinh từ cây khóm (dứa) với khả năng tổng hợp IAA từ 2,35  $\mu\text{g/mL}$  đến 5,74  $\mu\text{g/mL}$ . Chủng KL39a cho nồng độ IAA cao nhất là 5,74  $\text{mg/L}$ . Chủng RL7 phân lập từ rễ lúa có khả năng tổng hợp IAA lên tới 48,8  $\text{mg/L}$  cao gấp khoảng 10 lần chủng KL39a. Nguyễn Khởi Nghĩa và cộng sự (2017) [152] đã phân lập được các chủng vi sinh vật chịu mặn sinh IAA với hàm lượng từ 10,44  $\mu\text{g/mL}$  đến 33,13  $\mu\text{g/mL}$  từ các vùng đất nhiễm mặn nuôi tôm kết hợp trồng lúa khu vực các tỉnh Bạc Liêu, Bến Tre, Cà Mau, Kiên Giang và Sóc Trăng. Nguyễn Thị Minh và cộng sự (2017) [153] phân lập được các chủng vi sinh vật nội sinh từ 13 loại cây mọc trên đất nhiễm mặn huyện Giao Thủy, tỉnh Nam Định có

khả năng sinh IAA trong khoảng từ 8,6  $\mu\text{g/mL}$  đến 278,55  $\mu\text{g/mL}$ . Nguyễn Văn Giang và cộng sự (2017) [154] đã phân lập được chủng CF9 từ đất trồng cà phê khu vực Tây Nguyên có khả năng chịu mặn đến nồng độ muối 10% và sinh IAA đạt 68,79 mg/L. Nguyễn Anh Huy và cộng sự (2018) [131] đã phân lập được 116 chủng có khả năng tổng hợp ammoni và IAA trên môi trường Burk's có bổ sung 1% NaCl từ các mẫu đất vùng trồng lúa-tôm. Trong đó chủng PL2 và PL9 có khả năng cố định nitơ và tổng hợp IAA đạt lần lượt là 45,31 và 46,46 mg/mL.

Như vậy, từ tổng số 66 mẫu gồm các mẫu đất Trường Sa, rễ cây lúa, cây đước, mẫu đất và nước biển đã phân lập được 423 chủng vi sinh vật. Đã sàng lọc và đánh giá được khả năng sinh IAA của 65 chủng. Từ 65 chủng sinh IAA này, luận án tiếp tục sàng lọc khả năng sinh ACC deaminase, phân giải phosphate, cố định nitơ, phân huỷ cellulose và sinh siderophores

### ***3.1.2. Sàng lọc các chủng vi khuẩn sinh ACC deaminase***

Sàng lọc, tuyển chọn các chủng có khả năng sinh ACC deaminase từ 65 chủng chọn lọc có khả năng sinh IAA gồm 39 chủng vi sinh vật phân lập từ đất Trường Sa, 10 chủng từ các mẫu đất và nước biển, 9 chủng từ rễ cây đước và 7 chủng từ rễ lúa. Các chủng này được cấy trên môi trường thạch DF với nguồn nitơ duy nhất là ACC nồng độ 3 mM. Lựa chọn các chủng có khả năng mọc trên môi trường thạch DF để xác định hoạt độ ACC deaminase. Trong số 39 chủng phân lập từ đất Trường Sa có 9 chủng sinh ACC deaminase với 3 chủng STT1.1.2, STT3.2.3 và NY4.3.1 có hoạt tính cao lần lượt là 128,70; 38,45 và 40,37 nmol  $\alpha$ -ketobutyrate/mg/h. Có 5/9 chủng phân lập từ rễ cây đước có khả năng sinh ACC deaminase, hai chủng có hoạt tính là DM10 (133,80 nmol  $\alpha$ -ketobutyrate/mg/h) và DM20 (65,45 nmol  $\alpha$ -ketobutyrate/mg/h). Có 4/7 chủng từ rễ cây lúa có khả năng sinh ACC deaminase, trong đó 3 chủng RL5, RL6 và RL7 có hoạt tính cao lần lượt là 44,83; 35,95 và 45,40 nmol  $\alpha$ -ketobutyrate/mg/h. Tất cả 10 chủng sinh IAA từ các đất và nước biển không sinh ACC deaminase (Bảng 3.2, Hình 3.1)



Hình 3.1. Kết quả đo hoạt độ ACC deaminase của các chủng vi khuẩn chọn lọc

Khả năng sinh ACC deaminase là một đặc điểm quan trọng của vi sinh vật kích thích tăng trưởng thực vật, đặc biệt trong điều kiện môi trường chịu tác động của các yếu tố stress phi sinh học như hạn hán, nhiễm mặn... Khi bị stress, thực vật sản sinh một lượng lớn ethylene từ tiền chất ACC, làm giảm sự nảy mầm của hạt, sự phát triển của rễ và làm giảm sự phát triển của cây trồng. Vi sinh vật tổng hợp ACC deaminase có thể phân cắt ACC thành  $\alpha$ -ketobutyrate và amoniac do đó làm giảm lượng ethylene ở thực vật. PGPB có khả năng sinh ACC deaminase thường phân lập được từ mô thực vật (rễ và thân) hoặc đất vùng rễ, thuộc nhiều chi khác nhau như *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Agrobacterium*, *Phyllobacterium*, *Mesorhizobium*, *Azospirillum*, *Aneurinibacillus*, *Paenibacillus*, *Arthrobacter*, *Achromobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Burkholderia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Leclercia*, *Micrococcus*, *Ochrobactrum*, *Parastrephia*, *Pseudomonas*, *Ralstonia* và *Serratia*. Ở Việt Nam, các nghiên cứu ứng dụng vi sinh vật hữu ích như vi sinh vật sinh IAA, cố định nitơ, phân giải phosphate và phân giải cellulose...trong nông nghiệp dưới dạng chế phẩm vi sinh khá phổ biến, tuy nhiên các nghiên cứu này chưa đề cập đến khả năng sinh ACC deaminase và khả năng hỗ trợ cây trồng trong điều kiện nhiễm mặn. Trên thế giới, khi nghiên cứu tác dụng hỗ trợ của vi sinh vật đến sự sinh trưởng của cây trồng trong điều kiện nhiễm mặn hoặc hạn hán, bên cạnh nghiên cứu khả năng sinh IAA, cố định nitơ và phân giải phosphate, các tác giả đặc

biệt quan tâm đến khả năng sinh ACC deaminase. Khả năng sinh ACC deaminase của các chủng phân lập trong luận án cũng tương tự như một số nghiên cứu đã công bố trước đây. Bal và cộng sự (2013) [156] đã phân lập được 17 chủng có khả năng sinh ACC deaminase từ các mẫu đất vùng rẫy lúa ở Ấn Độ có hoạt độ từ 61,29 đến 2664,08 nmol  $\alpha$ -ketobutyrate/mg/h. Trong đó những chủng có khả năng sinh ACC deaminase và IAA cao như SB1.ACC2, SB1.ACC3 và SB2.ACC2 với hàm lượng IAA lần lượt là 49,56; 45,91 và 152,37  $\mu$ g/mL. Pourbabaee và cộng sự (2016) [156] đã sàng lọc được 6 chủng sinh ACC deaminase từ 167 chủng phân lập từ đất vùng rẫy cây lúa mỳ có hoạt độ ACC deaminase từ 47 đến 275 nmol  $\alpha$ -ketobutyrate/mg/h. Pandey và cộng sự (2021) [157] đã phân lập được 28 chủng có khả năng sinh ACC deaminase với hoạt độ từ 198 đến 1069 nmol  $\alpha$ -ketobutyrate/mg/h. Các chủng này cũng có khả năng sinh IAA từ 10 đến 80  $\mu$ g/mL.

Như vậy, kết thúc quá trình sàng lọc các chủng có khả năng sinh ACC deaminase đã lựa chọn được 6 chủng gồm DM10, RL5, RL6, RL7, STT 1.1.2 và NY4.3.1 có hoạt độ ACC deaminase cao, đây cũng là những chủng có khả năng sinh IAA cao.

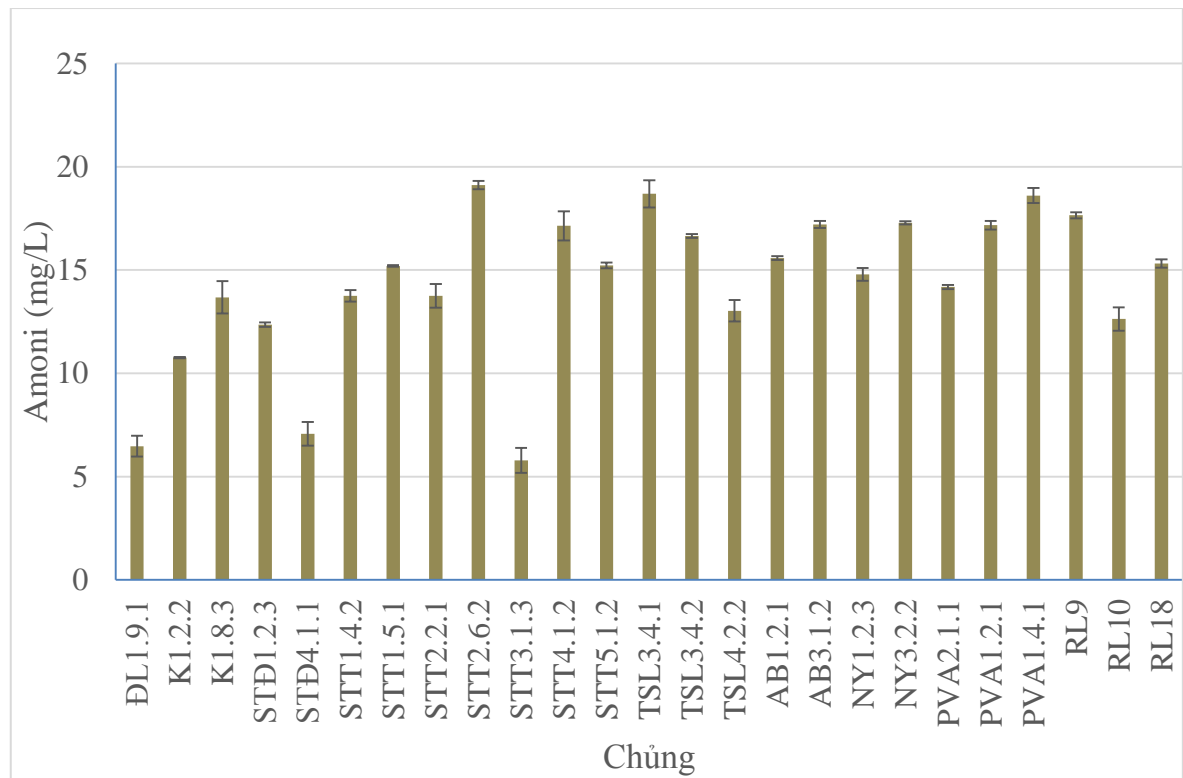
### ***3.1.3. Sàng lọc các chủng vi khuẩn có hoạt tính cố định nitơ***

Khả năng cố định nitơ là một trong những tiêu chí quan trọng để chọn lựa vi sinh vật làm phân bón vi sinh. Vi sinh vật cố định đạm có thể tồn tại tự do trong đất, nước, không khí, hoặc cộng sinh và nội sinh với sinh vật khác. Sàng lọc khả năng cố định nitơ được thực hiện từ 65 chủng sinh IAA. Các chủng vi sinh vật được cấy trên môi trường Burk's agar không có nguồn nitơ. Những chủng sinh trưởng và phát triển được trên môi trường này là những chủng có khả năng cố định nitơ. Kết quả sàng lọc các chủng cố định nitơ cho thấy có 25/65 chủng có khả năng cố định nitơ trong đó 22 chủng phân lập từ đất trên quần đảo Trường Sa và 3 chủng nội sinh rễ cây lúa. Chủng sinh phân lập đất và nước biển và chủng nội sinh rễ cây được không có khả năng cố định nitơ.

Các chủng có khả năng cố định nitơ được nuôi cấy trên môi trường lỏng Burk's không đạm ở 30 °C, lắc 200 vòng/phút, sau 72 h nuôi cấy đánh giá khả năng cố định nitơ dựa trên hàm lượng amoni sinh ra trong dịch nuôi cấy. Kết quả trình bày trong Bảng 3.2 và Hình 3.2. Ba chủng nội sinh từ rễ lúa RL9, RL10 và RL18 có khả năng cố định nitơ với hàm lượng amoni lần lượt 17,65, 12,63 và 15,32 mg/L. Các chủng

phân lập từ đất trên quần đảo Trường Sa có khả năng tổng hợp nitơ tương đối cao với hàm lượng amoni khoảng từ 5,78 đến 19,11 mg/L. Trong đó, chủng STT2.6.2 cho hàm lượng amoni cao nhất là 19,11 mg/L. Kết quả này cao hơn nhiều so với các chủng trong nghiên cứu của Nguyễn Anh Huy và cộng sự (2018) [131] hàm lượng amoni cao nhất là 3,73mg/L hay các chủng vi sinh vật nội sinh trong cây lúa được nhóm tác giả Văn Thị Phương Như (2014) [6] phân lập có hàm lượng amoni cao nhất là 6,26 mg/L. Phạm Thị Ngọc Lan và cộng sự (2017) [158] đã phân lập được các chủng có khả năng cố định nitơ từ đất vùng rễ cây xà lách, rau thơm, hành lá, rau dền, cải, rau má, ngô với hàm lượng amoni cao nhất đạt 43,41 mg/L. Nguyễn Văn Phương (2020) [132] ] đã phân lập được các chủng vi sinh vật nội sinh từ rễ lúa có khả năng cố định nitơ với hàm lượng amoni cao từ chủng cao nhất đạt 205,36 mg/L.

Kết quả sàng lọc khả năng cố định nitơ cho thấy tất các chủng có khả năng cố định đạm không có khả năng sinh ACC deaminase. Các chủng có khả năng sinh ACC deaminase và IAA cao như DM10, RL5, RL6, RL7, STT 1.1.2 và NY4.3.1 cũng không có khả năng cố định nitơ.

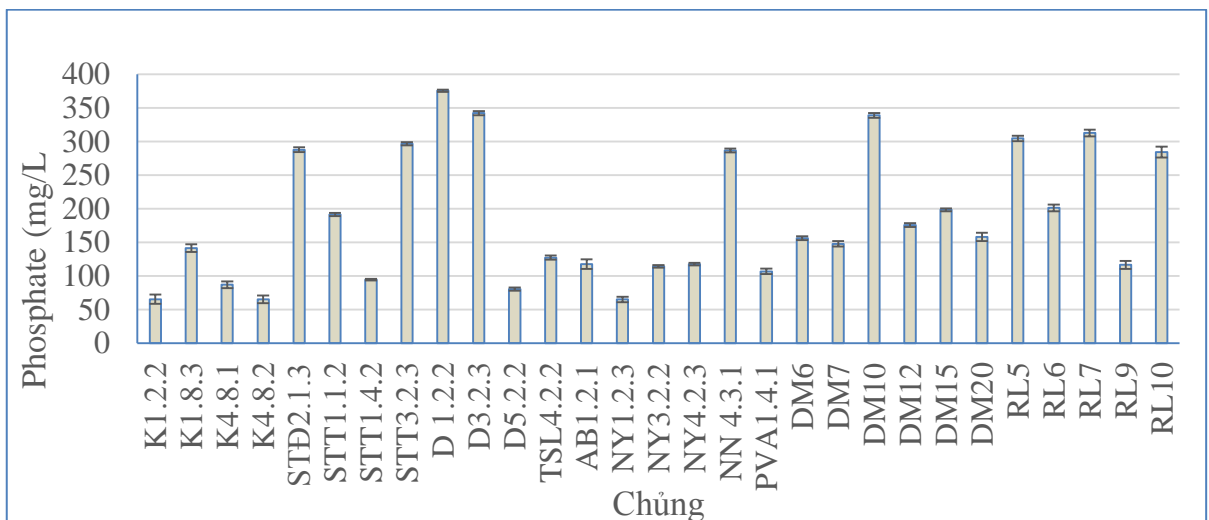


Hình 3.2. Hàm lượng amoni sinh ra từ các chủng vi khuẩn chọn lọc

### 3.1.4. Sàng lọc các chủng vi khuẩn hoà tan phosphate

Khả năng hoà tan phosphate được sàng lọc từ 65 chủng sinh IAA. Kết quả sàng lọc được 29/65 có khả năng mọc và cho vòng phân giải  $\text{CaCO}_3$  trên môi

trường NBRIP agar. Các chủng vi khuẩn có khả năng phân giải phosphate được nuôi cấy trong môi trường NBRIP lỏng để xác định hàm lượng phosphate giải phóng ra môi trường. Kết quả được trình bày trong Bảng 3.2 và Hình 3.3. Mười tám chủng phân lập từ đất Trường Sa có khả năng phân giải phosphate với hàm lượng  $\text{PO}_4^{3-}$  trong khoảng từ 65 đến 342 mg/L, đặc biệt có các chủng có hàm lượng  $\text{PO}_4^{3-}$  giải phóng ra khá cao như STT1.1.2 (191,16 mg/L), STĐ2.1.3 (287,69 mg/L), STT3.5.2 (309,37 mg/L), D3.2.3 (342,06 mg/L), D1.2.2 (375,39 mg/L) và NY4.3.1 (286,45 mg/L). Sáu chủng phân lập từ rễ cây đước  $\text{PO}_4^{3-}$  trong khoảng từ 147 đến 338 mg/L, trong đó có chủng DM10 cho hàm lượng  $\text{PO}_4^{3-}$  cao nhất là 338,71 mg/L. Năm chủng phân giải phosphate từ rễ cây lúa có hàm lượng  $\text{PO}_4^{3-}$  trong khoảng từ 116 đến 312 mg/L, trong đó 3 chủng RL5, RL6 và RL7 cho hàm lượng  $\text{PO}_4^{3-}$  cao nhất lần lượt là 304,53; 201,14 và 312,64 mg/L. Các chủng phân lập từ đất và nước biển không có khả năng hoà tan phosphate. Nhiều nghiên cứu trong và ngoài nước đã ghi nhận các vi sinh vật vùng rễ có khả năng phân giải phosphate. Văn Thị Phương Như và cộng sự (2015) [16] đã phân lập các chủng nội sinh từ cây lúa có khả năng phân giải cao với hàm lượng  $\text{PO}_4^{3-}$  là 371,31 mg/L. Nguyễn Văn Giang và cộng sự (2017) [133] đã phân lập được chủng CF9 từ đất trồng cà phê khu vực Tây Nguyên có khả năng chịu mặn đến nồng độ muối 10% với hoạt tính phân giải phosphate cao nhất là 145,96 mg/L. Nguyễn Thị Minh và cộng sự (2017) [153] phân lập được các chủng vi sinh vật nội sinh từ 13 loại cây mọc trên đất nhiễm mặn Giao Thủy, Nam Định có khả năng sinh phân giải phosphate với vòng phân giải từ 4-15mm. Nguyễn Đức Thành và cộng sự (2020) [134] phân lập được 02 chủng từ đất trồng Bưởi ở Bến Tre các chủng có khả năng phân giải phosphate với vòng phân giải là 11 và 15 mm.



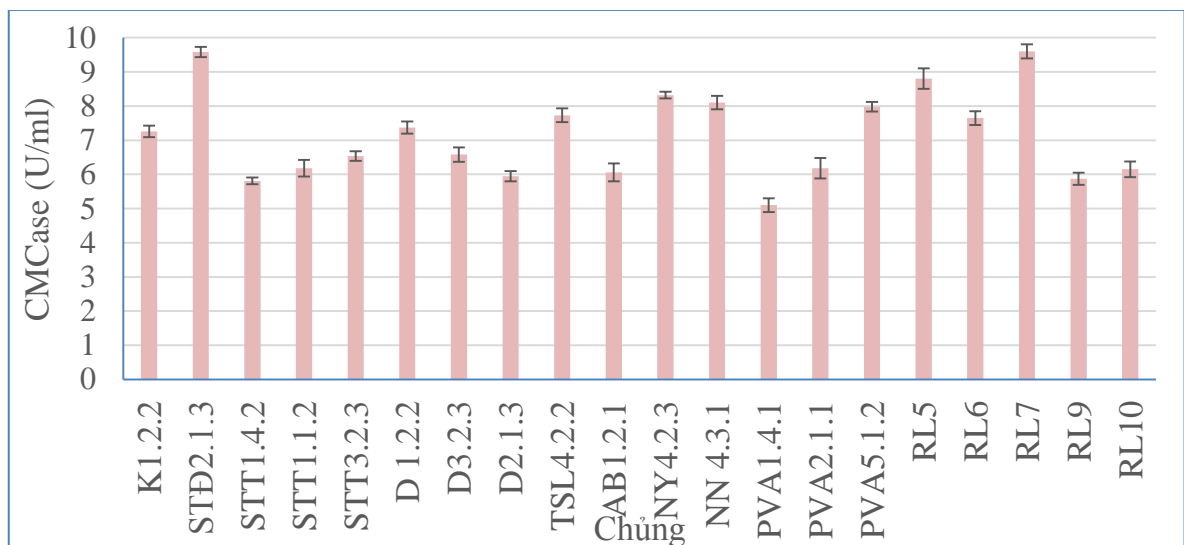
Hình 3.3. Hàm lượng phosphate giải phóng ra môi trường của các chủng chọn lọc

Chủng RL5, RL7, NY4.3.1, STT3.2.3 và DM10 vừa có khả năng phân giải phosphate, vừa có khả năng sinh IAA và ACC deaminase. Ba chủng STT3.5.2, D3.2.3 và D1.2.2 có khả năng phân giải phosphate cao và sinh IAA tuy nhiên lại không có khả năng tổng hợp ACC deaminase.

### 3.1.5. Sàng lọc các chủng vi khuẩn phân giải cellulose

Sàng lọc khả năng phân giải cellulose được thực hiện trên 65 chủng sinh IAA. Kết quả 20/65 chủng có khả năng sinh trưởng và tạo vòng phân giải CMC trên trường CMC agar.

Hai mươi chủng có khả năng phân giải cellulose được nuôi cấy trong môi trường CMC lỏng để đánh giá khả năng phân giải cellulose thông qua xác định hoạt độ cellulase sinh ra trong môi trường nuôi cấy. Kết quả thể hiện trong Bảng 3.2 và Hình 3.4. Mười lăm chủng phân lập từ đất Trường Sa có hoạt độ cellulase trong khoảng từ 5 đến 9 U/ml, trong đó chủng STĐ2.1.3 có hoạt độ cellulase cao nhất là 9,25 U/ml. Năm chủng phân lập từ rễ cây lúa có hoạt độ cellulase khá cao, trong đó hai chủng RL5 và RL7 cao nhất lần lượt là 8,80 U/mL và 9,60 U/mL. Các chủng từ rễ cây đước và các mẫu đất và nước biển không có khả năng phân huỷ cellulose. Hoạt độ cellulase của nhóm vi sinh vật phân lập trong đất trồng lúa và dạ cỏ bò được Võ Văn Phước Quê và cộng sự (2011) [159] xác định trong khoảng từ 19,44 đến 25,43 U/ml. Hoạt độ cellulase của nhóm vi sinh vật phân lập từ đất rừng nhiệt đới Malaysia được Tang và cộng sự (2020) [160] xác định trong khoảng từ 4 đến 10 U/ml.



Hình 3.4. Hoạt độ cellulase của các chủng chọn lọc

Bảng 3.2. Kết quả sàng lọc khả năng sinh IAA, ACC deaminase, cố định nitơ, hoà tan phosphate và phân giải cellulose

TT	Chủng	Nguồn phân lập	IAA (mg/L)	ACCD (nmol $\alpha$ -ketobutyrate/mg/h)	Amoni (mg/L)	Phosphate (mg/L)	Cellulase (U/ml)
1	ĐL1.9.1	Đảo Đá Lát	11,21	-	6,47	-	-
2	K1.2.2	Đảo Sơn Ca	23,32	-	10,76	65,20	7,26
3	K1.8.3		15,27	-	13,68	141,30	-
4	K4.8.1		29,21	23,87	-	86,80	-
5	K4.8.2		22,15	11,23	-	65,21	-
6	STD1.2.3		24,74	-	12,36	-	-
7	STD2.1.3	Đảo Sinh Tôn Đông	<b>33,54</b>	-	-	<b>287,69</b>	<b>9,58</b>
8	STD4.1.1		17,61	-	7,07	-	-
9	STT1.1.2	Đảo Song Tử Tây	<b>35,71</b>	<b>128,70</b>	-	<b>191,16</b>	-
10	STT1.4.2		23,30	-	13,75	94,29	5,81
11	STT1.5.1		15,66	-	15,20	-	-
12	STT2.2.1		18,62	-	13,75	-	6,18
13	STT2.6.2		14,51	-	19,18	-	-
14	STT3.1.3		18,31	-	5,78	-	-
15	STT3.2.3		<b>28,50</b>	<b>38,45</b>	-	<b>296,45</b>	<b>6,54</b>
16	STT4.1.2		13,66	-	17,14	-	-
17	STT4.5.1		16,61	14,21	-	-	-
18	STT5.1.2		12,52	-	15,23	-	-
19	STT5.3.1		13,66	-	-	-	-
20	STT5.4.1		17,81	-	-	-	-
21	D 1.2.2		Đảo Sinh Tôn	<b>38,97</b>	-	-	<b>275,39</b>
22	D3.2.3	<b>32,33</b>		-	-	<b>342,06</b>	<b>6,58</b>
23	D2.1.3	17,54		-	-	-	5,95
24	D5.2.2	16,21		15,56	-	80,34	-
25	TSL3.4.1	Đảo Trường Sa Lớn	22,25	-	18,69	-	-
26	TSL3.4.2		16,27	-	16,65	-	-
27	TSL4.2.2		14,66	-	13,03	127,21	7,73
28	AB1.2.1	Đảo An Bang	17,94	-	15,58	117,47	6,06
29	AB3.1.2		18,25	29,78	17,21	-	-
30	NY1.2.3	Đảo	16,21	-	14,79	65,01	-
31	NY3.2.2		14,26	-	17,28	114,12	-



TT	Chủng	Nguồn phân lập	IAA (mg/L)	ACCD (nmol $\alpha$ -ketobutyrate/mg/h)	Amoni (mg/L)	Phosphate (mg/L)	Cellulase (U/ml)
32	NY4.2.3	Nam Yết	<b>30,17</b>	-	-	<b>117,47</b>	<b>8,32</b>
33	NY4.3.1		<b>33,34</b>	<b>40,37</b>	-	<b>286,45</b>	<b>8,10</b>
34	PVA1.2.1	Đảo Phan Vinh A	19,04	-	17,17	-	-
35	PVA1.4.1		18,62	-	18,61	106,76	5,10
36	PVA2.1.1		21,25	-	14,18	-	6,18
37	PVA5.1.2		26,15	-	-	-	7,98
38	PVA3.1.1		19,21	-	-	-	-
39	PVA3.1.2		17,41	30,65	-	-	-
40	DM2	Rễ cây đước	14,06	-	-	-	-
41	DM6		17,81	-	-	155,96	-
42	DM7		22,15	45,78	-	147,65	-
43	DM8		23,36	34,21	-	-	-
44	DM10		<b>38,78</b>	<b>133,80</b>	-	<b>338,71</b>	-
45	DM12		26,58	-	-	275,21	-
46	DM15		34,66	44,21	-	198,24	-
47	DM20		30,14	65,45	-	157,14	-
48	DM25		28,24	-	-	-	-
49	RL2	Rễ cây lúa	23,54	25,18	-	-	-
50	RL5		<b>44,83</b>	41,35	-	304,53	8,80
51	RL6		<b>35,95</b>	39,78	-	201,14	7,65
52	RL7		<b>46,50</b>	45,40	-	312,64	9,60
53	RL9		27,36	-	17,65	116,45	5,87
54	RL10		31,25	-	12,63	284,25	6,15
55	RL18		33,74	-	15,32	-	-
56	BDS1.2.2	Đất Ba Động	23,51	-	-	-	-
57	BDW1.1.1	Nước Ba Động	27,81	-	-	-	-
58	BDW1.1.2		28,16	-	-	-	-
59	BDW1.1.3		25,39	-	-	-	-
60	B7		36,53	-	-	-	-
61	B9		40,43	-	-	-	-
62	CBW1.1.1	Nước Cồn Búng	24,55	-	-	-	-
63	CBW1.1.3		21,37	-	-	-	-
64	CBW2.2.3		19,75	-	-	-	-
65	C7		<b>44,17</b>	-	-	-	-

Kết thúc quá trình phân lập và sàng lọc các chủng vi sinh vật chịu mặn sinh chất kích thích sinh trưởng thực vật, luận án đã lựa chọn được 12 chủng vi khuẩn chịu mặn có khả năng sinh IAA cao, đây là tiêu chí ưu tiên để chọn lựa chủng, tiếp theo là khả năng sinh tổng hợp ACC deaminase, cố định đạm, khả năng hoà tan phosphate, phân giải cellulose và sinh siderophores (Bảng 3.3). Xác định khả năng sinh siderophores của 12 chủng chọn lọc cho thấy tất cả 12 chủng đều có khả năng sinh siderophores.

*Bảng 3.3. Bảng tổng hợp 12 chủng chọn lọc*

TT	Chủng	IAA	ACC deaminase	Cố định nitơ	Phân giải phosphate	Phân giải cellulose	Siderophores
1	DM10	+	+	-	+	-	+
2	C7	+	-	-	-	-	+
3	RL5	+	+	-	+	+	+
4	RL6	+	+	-	+	+	+
5	RL7	+	+	-	+	+	+
6	STT3.2.3	+	+	-	+	+	+
7	STT1.1.2	+	+	-	+	+	+
8	NY4.2.3	+	-	-	+	+	+
9	NN4.3.1	+	+	-	+	+	+
10	STĐ2.1.3	+	-	-	+	+	+
11	D 1.2.2	+	-	-	+	+	+
12	D3.2.3	+	-	-	+	+	+

Trong phần tiếp theo của luận án, 12 chủng vi khuẩn chọn lọc được nghiên cứu đặc điểm hình thái, sinh hoá và giải trình tự gen 16S rRNA để phân loại.

### **3.2. Nghiên cứu một số đặc điểm hình thái, sinh hoá và giải trình tự 16S rRNA**

#### **3.2.1. Nghiên cứu một số đặc điểm hình thái của các chủng vi khuẩn chọn lọc**

Hình thái tế bào được quan sát trên tiêu bản sống và tiêu bản nhuộm gram trên kính hiển vi quang học vật ở độ phóng đại X100. Chủng DM10 được quan sát và ghi hình dưới kính hiển vi điện tử SEM. Hình thái khuẩn lạc được quan sát trên môi trường NA có bổ sung 3% NaCl, nuôi cấy ở 30<sup>0</sup> C trong 48h. Kết quả được trình bày trong Bảng 3.4.

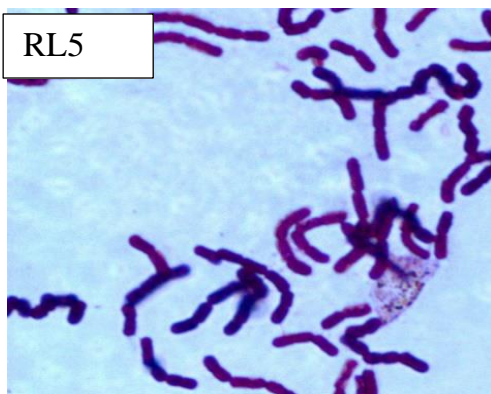
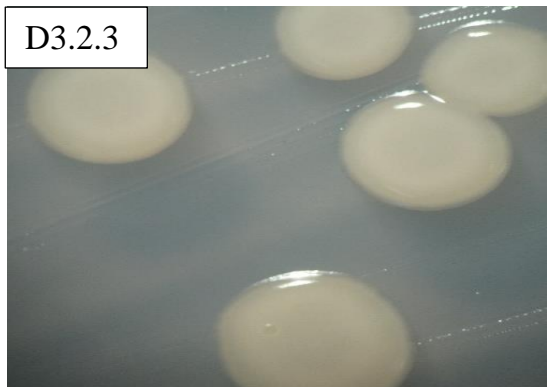
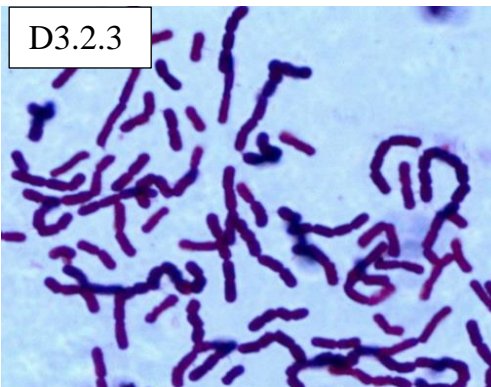
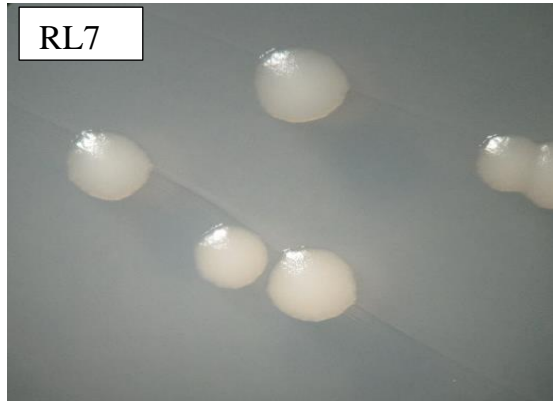
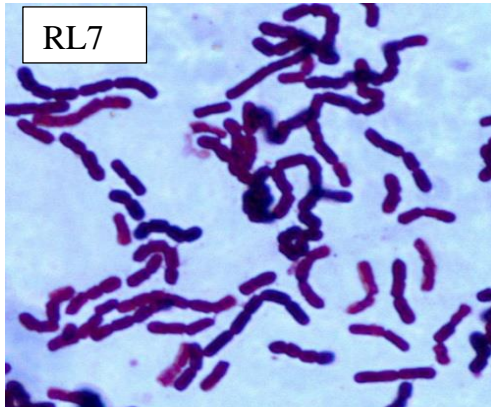
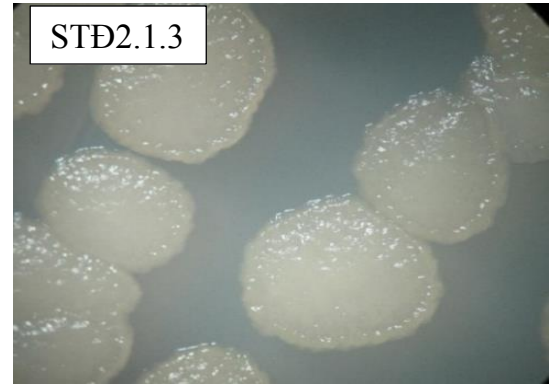
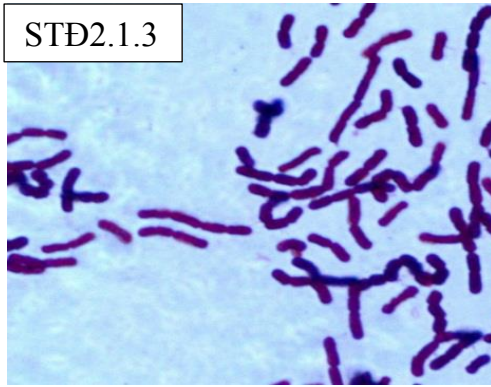
Chủng vi sinh vật chịu mặn phân lập từ đất và nước biển (C7), từ rễ cây đước (DM10), chủng RL2 phân lập từ rễ cây lúa, và chủng STT1.1.2 từ đất Trường Sa

thuộc nhóm Gram âm và có dạng hình que. Ba chủng phân lập từ rễ lúa (RL5, RL6 và RL7) và sáu chủng (NY4.3.1, D3.2.3, D1.2.2, STT3.2.3, STĐ2.1.3 và NY4.2.3) phân lập từ đất trên quần đảo Trường Sa thuộc nhóm Gram dương, là trực khuẩn, sinh bào tử.

*Bảng 3.4. Hình thái tế bào và khuẩn lạc của các chủng chọn lọc*

TT	Chủng	Gram	Tế bào	Hình thái khuẩn lạc	
				Hình dạng	Màu sắc
1	C7	(-)	Trực khuẩn, xếp đơn, đôi hoặc chuỗi	Tròn, bóng, mép trơn	Trắng đục
2	DM10	(-)	Trực khuẩn, xếp đơn, đôi hoặc chuỗi	Tròn, bóng, mép trơn	Trắng đục
3	RL5	(+)	Trực khuẩn, xếp đơn, đôi hoặc chuỗi, mang bào tử	Tròn, bề mặt nhẵn, mép nhẵn	Trắng đục
4	RL6	(+)	Trực khuẩn, xếp đơn, đôi hoặc chuỗi, mang bào tử	Tròn, bề mặt nhẵn, mép nhẵn	Trắng đục
5	RL7	(+)	Trực khuẩn, xếp đơn, đôi hoặc chuỗi, mang bào tử	Tròn, bề mặt nhẵn, mép nhẵn	Trắng đục
6	STT3.2.3	(+)	Trực khuẩn, xếp đơn, đôi hoặc chuỗi, mang bào tử	Tròn, bề mặt nhẵn, mép nhẵn	Trắng đục
7	STT1.1.2	(-)	Trực khuẩn, xếp đơn, đôi hoặc chuỗi, mang bào tử	Tròn, bề mặt nhẵn, mép nhẵn	Trắng đục

TT	Chủng	Gram	Tế bào	Hình thái khuẩn lạc	
				Hình dạng	Màu sắc
8	STĐ2.1.3	(+)	Trực khuẩn, xếp đơn, đôi hoặc chuỗi, mang bào tử	Tròn, bề mặt nhẵn, mép nhẵn	Trắng đục
9	NY4.2.3	(+)	Trực khuẩn, xếp đơn, đôi hoặc chuỗi, mang bào tử	Tròn, bề mặt nhẵn, mép nhẵn	Trắng đục
10	NN4.3.1	(+)	Trực khuẩn, xếp đơn, đôi hoặc chuỗi, mang bào tử	Tròn, bề mặt nhẵn, mép nhẵn	Trắng đục
11	D3.2.3	(+)	Trực khuẩn, xếp đơn, đôi hoặc chuỗi, mang bào tử	Tròn, bề mặt nhẵn, mép nhẵn	Trắng đục
12	D 1.2.2	(+)	Trực khuẩn, xếp đơn, đôi hoặc chuỗi, mang bào tử	Tròn, bề mặt nhẵn, mép nhẵn	Trắng đục



Hình 3.5. Hình thái tế bào và khuẩn lạc của một số chủng chọn lọc

### 3.2.2. Xác định một số đặc điểm sinh hóa của các chủng vi khuẩn chọn lọc

Mười hai chủng chọn lọc được xác định một số điểm sinh hoá dựa trên Kit API 20E. Kết quả được trình bày trong Bảng 3.5

Bảng 3.5. Đặc điểm sinh hóa Kit API 20 E

Đặc điểm	DM10	C7	RL5	RL6	RL7	STT3.2.3	STT1.1.2	STD2.1.3	NY4.2.3	NN4.3.1	D3.2.3	D 1.2.2
$\beta$ -galactosidase	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-
Arginine dihydrolase	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lysine decarboxylase	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ornithine decarboxylase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Chuyển hoá citrate	W	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sinh H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urease	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
Tryptophane deaminase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sinh indole	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sinh acetoin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gelatinase	-	-	+	-	+	+	-	-	W	+	W	W
Lên men/oxi hóa												
D-Glucose	+	-	+	+	+	+	+	W	W	+	W	W
D-Mannitol	+	-	+	W	+	+	W	+	+	+	+	+
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	W	W	-	W	W
D-Sorbitol	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-
L-Rhamnose	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
D-Sucrose	+	-	+	+	+	+	+	W	W	+	W	W
D-Melibiose	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amygdalin	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+
L-Arabinose	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-

(+, dương tính; w, dương tính yếu; -, âm tính)

Chủng C7: Hoạt tính sinh hydro sulfide, galactosidase, arginine dihydrolase, lysine decarboxylase, ornithine decarboxylase, urease, tryptophan deaminase và gelatinase đều âm tính; có khả năng sử dụng citrat; không sinh axit từ các loại đường glucose, mannose, inositol, sorbitol, rhamnose, sucrose, melibiose, amygdalin và arabinose.

Chủng DM10: có hoạt tính  $\beta$ -galactosidase, gelatinase, không có hoạt tính ornithine decarboxylase, urease, tryptophanedeaminase, arginine dihydrolase và lysine decarboxylase; không sử dụng citrate, không sinh  $H_2S$ , indole và acetoin; không sinh axit từ inositol, có khả năng sinh axit từ glucose, mannitol, sorbitol, rhamnose, sucrose, melibiose, amygdalin, arabinose.

Chủng RL5, RL7, STT3.2.3 và NY4.3.1: có hoạt tính arginine dihydrolase và lysine decarboxylase, không có hoạt tính  $\beta$ -galactosidase, ornithine decarboxylase, urease, tryptophanedeaminase, gelatinase; không sử dụng citrate, không sinh  $H_2S$ , indole và acetoin; không sinh axit từ inositol, melibiose, amygdalin.

Chủng STT1.1.2: Chỉ có hoạt tính urease. Sinh axit từ glucose, sucrose, amygdalin và arabinose.

Chủng STĐ2.1.3, NY4.2.3, D1.2.2 và D3.2.3: Chỉ có hoạt tính gelatinase yếu. Sinh axit từ mannitol, rhamnose, amygdalin, arabinose.

### ***3.2.3. Giải trình tự 16S rRNA của các chủng chọn lọc và xây dựng cây phát sinh chủng loài***

Tất cả các trình tự 16S rRNA của 12 chủng vi khuẩn chọn lọc đã được phân tích và so sánh với các trình tự đã công bố trên ngân hàng gen (NCBI) bằng công cụ BLAST nucleotide. Kết quả phân tích được so sánh với nhau và xây dựng sơ đồ mối quan hệ di truyền giữa các chủng vi sinh vật. Theo Rowland và Taber (1996) [161] khi so sánh trình tự chuỗi 16S rRNA với nhau, nếu tỷ lệ tương đồng  $> 99\%$  có thể kết luận 2 chủng vi khuẩn thuộc cùng 1 loài, từ 97 đến 99% thì 2 chủng so sánh cùng 1 chi, nếu mức độ tương đồng  $< 97\%$  thì 2 chủng được so sánh thuộc về 2 chi khác nhau.

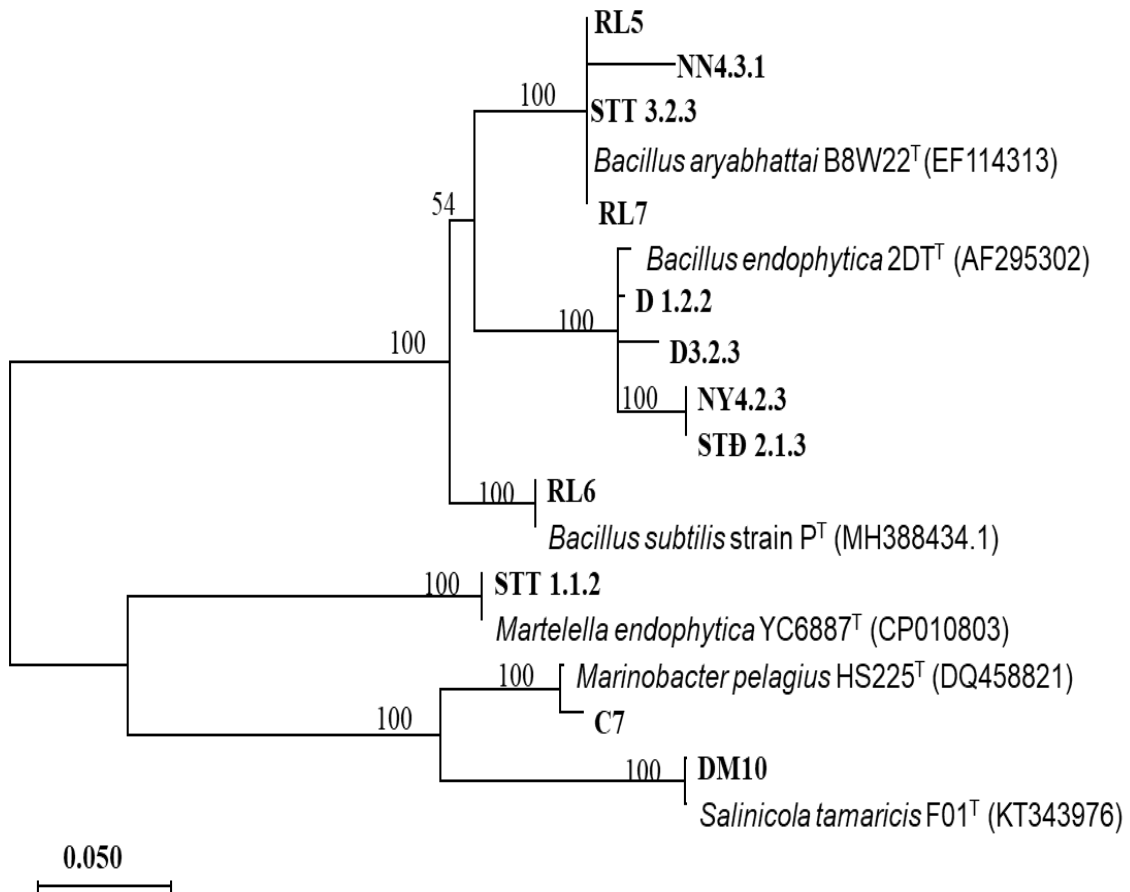
Những trình tự 16S rRNA hoàn chỉnh được tham chiếu với các trình tự 16S rRNA đã được công bố trên ngân hàng dữ liệu GenBank, để xác định tỷ lệ tương đồng. Kết quả so sánh 16S rRNA được trình bày trong Bảng 3.6

**Bảng 3.6.** Mối tương quan di truyền giữa các chủng phân lập với các chủng vi khuẩn có trong ngân hàng gen dựa vào trình tự 16S rRNA

<b>TT</b>	<b>Chủng</b>	<b>Loài gần nhất</b>	<b>Tên chủng gần nhất</b>	<b>Mã số trên GenBank</b>	<b>Sự tương đồng (%)</b>
1	C7	<i>Marinobacter pelagius</i>	HS225	DQ458821	99,09
2	DM10	<i>Salinicola tamaricis</i>	F01	KT343976	99,86
3	RL5	<i>Bacillus aryabhatai</i>	B8W22	EF114313	100
4	RL6	<i>Bacillus subtilis</i>	Strain P	MH388434.1	99,96
5	RL7	<i>Bacillus aryabhatai</i>	B8W22	EF114313	100
6	STT3. 2.3	<i>Bacillus aryabhatai</i>	B8W22	EF114313	99,74
7	STT1.1.2	<i>Marteella endophytica</i>	YC6887	CP010803	100
8	NY4.2.3	<i>Bacillus endophyticus</i>	2DT	AF295302	99,51
9	NN4.3.1	<i>Bacillus aryabhatai</i>	B8W22	EF114313	97,58
10	STĐ2.1.3	<i>Bacillus endophyticus</i>	IAM 13418	NR 043401.1	99,51
11	D3.2.3	<i>Bacillus endophyticus</i>	2DT	AF295302	98,81
12	D 1.2.2	<i>Bacillus endophyticus</i>	2DT	AF295302	99,03

Cây phát sinh chủng loại được thực hiện trên chương trình MEGA7. Khoảng cách tiến hóa được tính toán dựa theo thông số của Tamura-Nei. Phương pháp tiến hóa được sử dụng xây dựng cây phát sinh loài là Neighbor-joining. Phân tích bootstrap với 1000 sự lặp lại được thực hiện nhằm kiểm tra tính chính xác và độ tin cậy cho từng nhánh trong cây phát sinh loài. Cây phát sinh chủng loại được trình bày trong Hình 3.6





Hình 3.6. Cây phát sinh chủng loại các chủng vi khuẩn chọn lọc.

Dựa trên trình tự gen 16S rRNA, chủng C7 tương đồng 99% với loài *Marinobacter pelagius*. Chi *Marinobacter* tồn tại phổ biến trong nước biển, loài *M. pelagius* là nhóm vi khuẩn gram âm, hiếu khí và chịu mặn trung bình [162]. Các nghiên cứu về khả năng sinh chất kích thích sinh trưởng thực vật (IAA) từ các loài trong chi này còn hạn chế, có một số nghiên cứu đề cập đến khả năng sinh siderophores như petrobactin monosulfonate được sản xuất bởi *M. hydrocarbonoclasticus* [163], petrobactin và petrobactin monosulfonate từ chủng *M. aquaeolei* VT8 [164]. Chủng C7 phân lập từ nước biển Cồng Búng, tỉnh Bến Tre bước đầu đã được xác định có khả năng sinh tổng hợp IAA và sinh siderophores. Chủng C7 được lựa chọn để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo trong luận án.

Chủng DM10 có trình tự gen 16S rRNA tương đồng 99,86% với loài *Salinicola tamaricis*. Chi *Salinicola* được phân lập từ các môi trường khác nhau như nước biển mở muối, trầm tích biển sâu và đất vùng rẫy hoặc nội sinh từ các cây vùng ngập mặn. Các loài *Salinicola spp.* được mô tả là Gram âm, hiếu khí, hình que, di động và chịu mặn trung bình [165]. Zhao và cộng sự (2017) [166] đã phân lập được

chủng *S. tamaricis* sp. nov. trong lá cây chịu mặn *Tamarix chinensis*. Fidalgo và cộng sự (2019) [167] đã phân lập được 5 chủng mới thuộc chi *Salinicola* từ cây chịu mặn *Halimione portulacoides* ở một đầm nước mặn thuộc Bồ Đào Nha gồm *S. halimionae* sp. nov., *S. aestuarinus* sp. nov., *S. endophyticus* sp. nov., *S. halophyticus* sp. nov., và *S. lusitanus* sp. nov. Các chủng này đều có khả năng sinh tổng hợp IAA và hòa tan phosphate. Chủng DM10 được phân lập từ rễ cây đước vùng rừng ngập mặn thuộc hệ sinh thái Cồn Vành, huyện Tiền Hải, tỉnh Thái Bình có khả năng sinh tổng hợp IAA, phân giải phosphate, sinh tổng hợp ACC deaminase và sinh siderophores. Chủng DM10 được lựa chọn để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo trong luận án.

Chủng RL6 có trình tự gen 16S rRNA tương đồng 99,93% với loài *Bacillus subtilis*, đây là một loài khá phổ biến, phân bố trong đất hoặc nội sinh trong mô thực vật và được ứng dụng rộng rãi trong nông nghiệp và y dược. Trong nông nghiệp, *B. subtilis* được sử dụng dưới dạng các chế phẩm vi sinh chức năng như phân giải phosphate, sinh IAA, siderophores và sinh các chất kháng sinh phòng trừ bệnh ở thực vật. Wagi và cộng sự (2019) [169] phân lập được chủng *B. subtilis* (Mt3b) có khả năng sinh IAA, ACC deaminase, siderophores và phân giải phosphate. Koua và cộng sự (2020) [170] đã phân lập được 40 chủng *B. subtilis* từ các mẫu đất vùng rễ cây dừa có khả năng sinh IAA và phân giải phosphate. Mehmood và cộng sự (2021) [171] phân lập được chủng *B. subtilis* PM32 từ đất trồng khoai tây với các đặc điểm thúc đẩy tăng trưởng thực vật bao gồm khả năng hòa tan kẽm và kali, cố định nitơ sinh học, sinh IAA, ACC deaminase, siderophores và EPS. Ngoài ra chủng PM32 còn có khả năng sinh nhiều enzyme ngoại bào (cellulase, catalase, amylase, protease, pectinase và chitinase). Chủng RL6 phân lập từ rễ lúa chi *B. subtilis* có khả năng chịu mặn, sinh IAA, ACC deaminase, siderophores, phân giải phosphate, và phân giải cellulose. Chủng RL6 được lựa chọn để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo trong luận án.

Chủng STT1.1.2 có trình tự gen 16S rRNA tương đồng 100% với loài *Martelella endophytica*. Các nghiên cứu ứng dụng trong nông nghiệp *M. endophytica* còn khá hạn chế. Bibi và cộng sự (2013) [172] đã phân lập được chủng *M. endophytica* YC6887(T) từ rễ một loại cây hoa hồng chịu mặn (*Rosa rugose*) mọc ở vùng ven biển Hàn Quốc có khả năng kháng nấm bệnh oomycete. Gần đây,

chủng *M. endophytica* YC6887(T) được xác định là có khả năng sinh axit phenylacetic [173] và phân huỷ cellulose [174]. Chủng STT1.1.2 được phân lập từ đất vùng rễ cây bàng vuông trên đảo Song Tử Tây là chủng có khả năng sinh IAA, ACC deaminase, phân giải phosphate và phân huỷ cellulose, được lựa chọn để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo trong luận án.

Bốn chủng D1.2.2, D3.2.3, NY4.2.3 và STĐ2.1.3 có trình tự gen 16S rRNA tương đồng với loài *Bacillus endophyticus* lần lượt là 99,51; 99,51; 98,81 và 99,03%. Loài *B. endophyticus* phân bố phổ biến trong môi trường đất và nội sinh trong rễ thực vật. Reva và cộng sự (2002) [175] phân lập được chủng *B. endophyticus* 2DT từ thân cây bông. Kuma và cộng sự (2014) [176] phân lập được chủng *B. endophyticus* AVP9 từ đất vùng rễ cây ớt có khả năng sinh IAA, siderophores và phân giải phosphate. Chauhan và cộng sự (2016) [177] phân lập được chủng *B. endophyticus* TSH42 từ tổ ong có khả năng phân giải phosphate và sinh siderophores. Bốn chủng D1.2.2, D3.2.3, NY4.2.3 và STĐ2.1.3 được phân lập từ đất trên quần đảo Trường Sa đã được xác định có khả năng sinh IAA, siderophores, phân giải phosphate và phân giải cellulose, trong đó chủng D1.2.2 thể hiện các hoạt tính nổi trội hơn được lựa chọn để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo trong luận án.

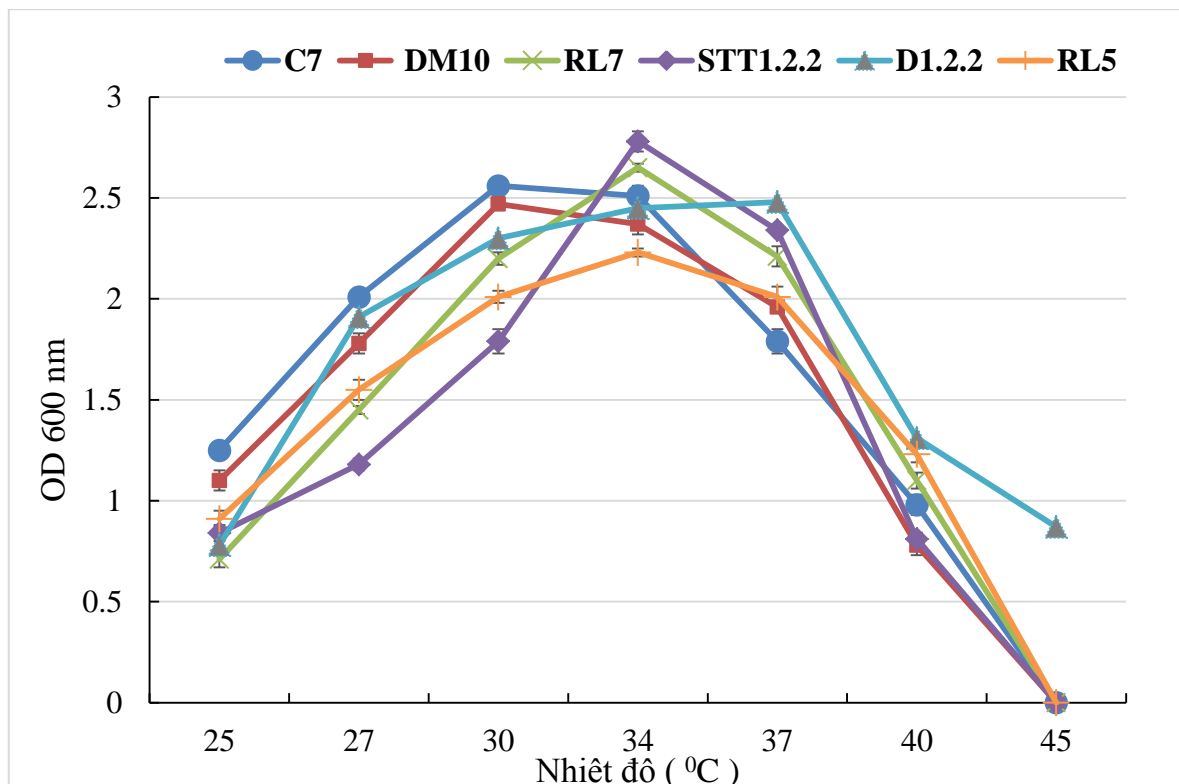
Như vậy, kết quả giải trình tự 16S rRNA cho thấy các chủng RL5, RL7, STT3.3.1 và NN4.1 gần với loài *B. aryabhatai*. Bốn chủng D1.2.2, D3.2.3, NY4.2.3 và STĐ2.1.3 gần với loài *B. endophyticus*. Để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo, đã lựa chọn các chủng có khả năng sinh chất kích thích sinh trưởng ưu việt hơn và đại diện cho các chi vi khuẩn khác nhau gồm 6 chủng đại diện cho 6 loài là C7, DM10, RL5, RL7, STT1.1.2 và D1.2.2. Trong 6 loài này, ba loài thuộc chi *Bacillus* gồm *B. subtilis*, *B. aryabhatai* và *B. endophyticus* đây là các loài được ứng dụng phổ biến trong nông nghiệp dưới hình thức các chế phẩm vi sinh hoặc trong các chế phẩm phân hữu cơ vi sinh được chứng minh có tính an toàn cao, không gây độc hại với thực vật. Phần tiếp theo của luận án sẽ tiến hành nghiên cứu một số yếu tố ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và sinh tổng hợp IAA của 6 chủng chọn lọc.

### 3.3. Nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến sinh trưởng và tổng hợp IAA của một số chủng vi khuẩn chọn lọc

Khả năng sinh IAA là một đặc điểm quan trọng của vi sinh vật PGPB, phụ thuộc vào nhiều yếu tố như nồng độ NaCl, tiền chất L-tryptophan, nguồn dinh dưỡng carbon và nitơ.

#### 3.3.1. Ảnh hưởng nhiệt độ, pH đến khả năng sinh trưởng của các chủng vi khuẩn chọn lọc

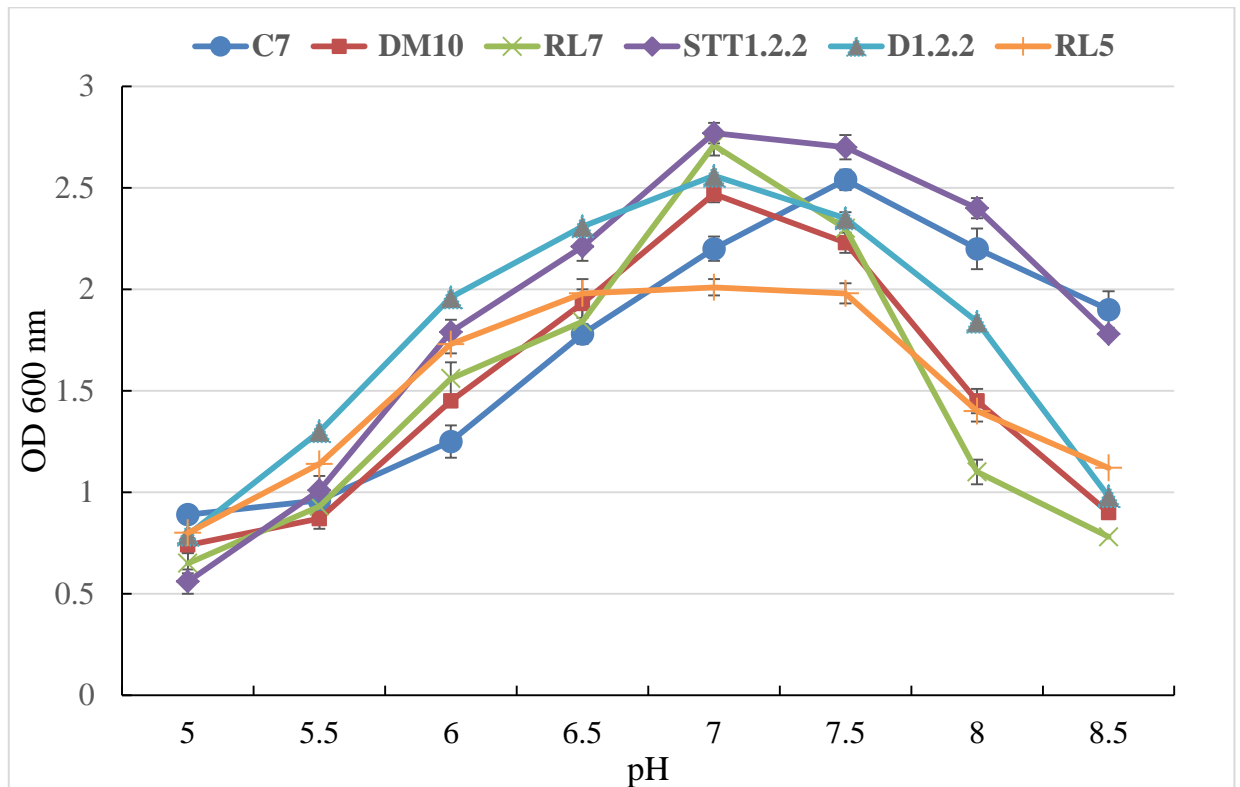
Nhiệt độ ảnh hưởng đến quá trình sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật, nhiệt độ quá nóng hoặc quá lạnh sẽ ức chế quá trình trao đổi chất do đó vi sinh vật ngừng phát triển hoặc bị chết. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ (Hình 3.7) cho thấy chỉ có chủng D1.2.2 sinh trưởng ở dải nhiệt độ 25-45 °C, các chủng còn lại chỉ có khả năng sinh trưởng trong khoảng nhiệt độ 25-40 °C. Nhiệt độ thích hợp cho sự sinh trưởng và phát triển của chủng C7 và DM10 là 30-34 °C, của chủng RL7, STT1.1.2 và RL5 là 34 °C, của chủng D1.2.2 là 34-37 °C.



Hình 3.7. Ảnh hưởng nhiệt độ đến khả năng sinh trưởng của các chủng chọn lọc

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của pH đến khả năng sinh trưởng của các chủng chọn lọc được thể hiện trong Hình 3.8. Cả 6 chủng đều có khả năng sinh trưởng

trong dải pH 5-8,5. pH thích hợp cho sự sinh trưởng và phát triển của chủng RL7, D1.2.2, STT1.1.2 và DM10 là 7, của chủng RL5 là 6,5-7,5, của chủng C7 là 7,5.

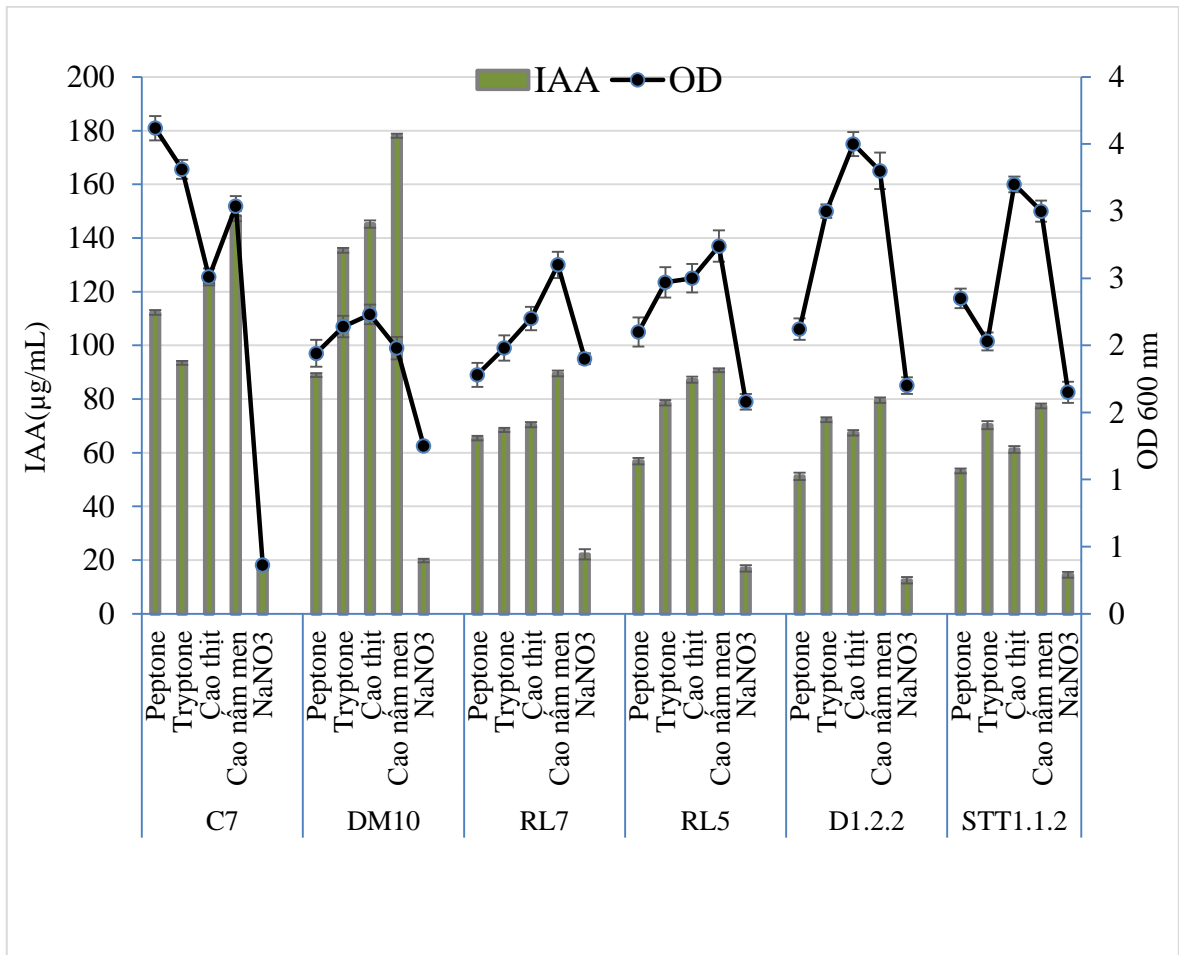


Hình 3.8. Ảnh hưởng pH đến khả năng sinh trưởng của các chủng chọn lọc

### 3.3.2. Ảnh hưởng của nguồn nitơ đến khả năng sinh trưởng và tổng hợp IAA của các chủng vi khuẩn chọn lọc

Kết quả đánh giá ảnh hưởng nguồn nitơ (cao nấm men, tryptone, cao thịt, peptone và  $\text{NaNO}_3$ ) đến khả năng sinh trưởng và tổng hợp IAA của 6 chủng vi khuẩn chọn lọc được thể hiện ở Hình 3.9. Trong các môi trường có nguồn nitơ hữu cơ (cao nấm men, tryptone, cao thịt và peptone) khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp IAA của các chủng cao hơn nhiều trong môi trường có nguồn nitơ vô cơ ( $\text{NaNO}_3$ ).

Chủng C7: môi trường có nguồn nitơ như cao nấm men, cao thịt, peptone và tryptone có hàm lượng IAA tạo ra khá cao tương ứng đạt  $148,16 \pm 0,31$ ;  $124,38 \pm 0,37$ ;  $112,24 \pm 0,46$  và  $93,46 \pm 0,71$   $\mu\text{g/mL}$ . Mặc dù chủng C7 có khả năng sinh trưởng tốt nhất trên môi trường peptone nhưng lượng IAA cao nhất là trong môi trường cao nấm men. Khả năng sinh trưởng của chủng C7 trên môi trường  $\text{NaNO}_3$  thấp nên khả năng sinh IAA cũng thấp.



Hình 3.9. Ảnh hưởng của nguồn nitơ đến khả năng sinh trưởng và tổng hợp IAA

Chủng DM10: môi trường có các nguồn nitơ như cao nấm men, tryptone và cao thịt có hàm lượng IAA tạo ra khá cao (tương ứng đạt  $178,07 \pm 0,78$ ;  $135,40 \pm 0,45$  và  $145,11 \pm 0,65$   $\mu\text{g/mL}$ ), cao hơn so với peptone ( $88,21 \pm 0,85$   $\mu\text{g/mL}$ ) và  $\text{NaNO}_3$  ( $19,81 \pm 0,34$   $\mu\text{g/mL}$ ).

Bốn chủng RL5, RL7, D1.2.2 và STT1.1.2 đều cho hàm lượng IAA cao nhất khi nguồn nitơ là cao nấm men (lần lượt là  $89,12 \pm 1,10$ ;  $90,20 \pm 0,94$ ;  $77,65 \pm 1,13$  và  $77,91 \pm 2,45$   $\mu\text{g/mL}$ ), mặc dù khả năng sinh trưởng của chủng D1.2.2 và STT1.1.2 khi nguồn nitơ là cao thịt. Khả năng sinh trưởng của cả 4 chủng này khi nguồn nitơ là  $\text{NaNO}_3$  thấp nhất nên lượng IAA sinh ra cũng thấp nhất.

Có thể thấy nguồn nitơ hữu cơ (đặc biệt là cao nấm men) thích hợp cho sự sinh trưởng và sinh tổng hợp IAA của cả 6 chủng nghiên cứu. Vì vậy, cao nấm men được chọn làm nguồn nitơ để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo. Kết quả nghiên cứu này cũng tương tự với các nghiên cứu trước đó. Bhutani và cộng sự (2018) [163] cũng chỉ ra rằng nguồn nitơ thích hợp nhất với ba chủng *B. aryabhatai* MJHN1, *B. megaterium* MBN3 và *B. cereu* MJHN10 là cao nấm men

với hàm lượng IAA sinh ra lần lượt là 146,75, 114,11 và 99,33  $\mu\text{g/ml}$ . Khi nguồn nitơ là  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  cả ba chủng này cũng cho hàm lượng IAA thấp nhất.

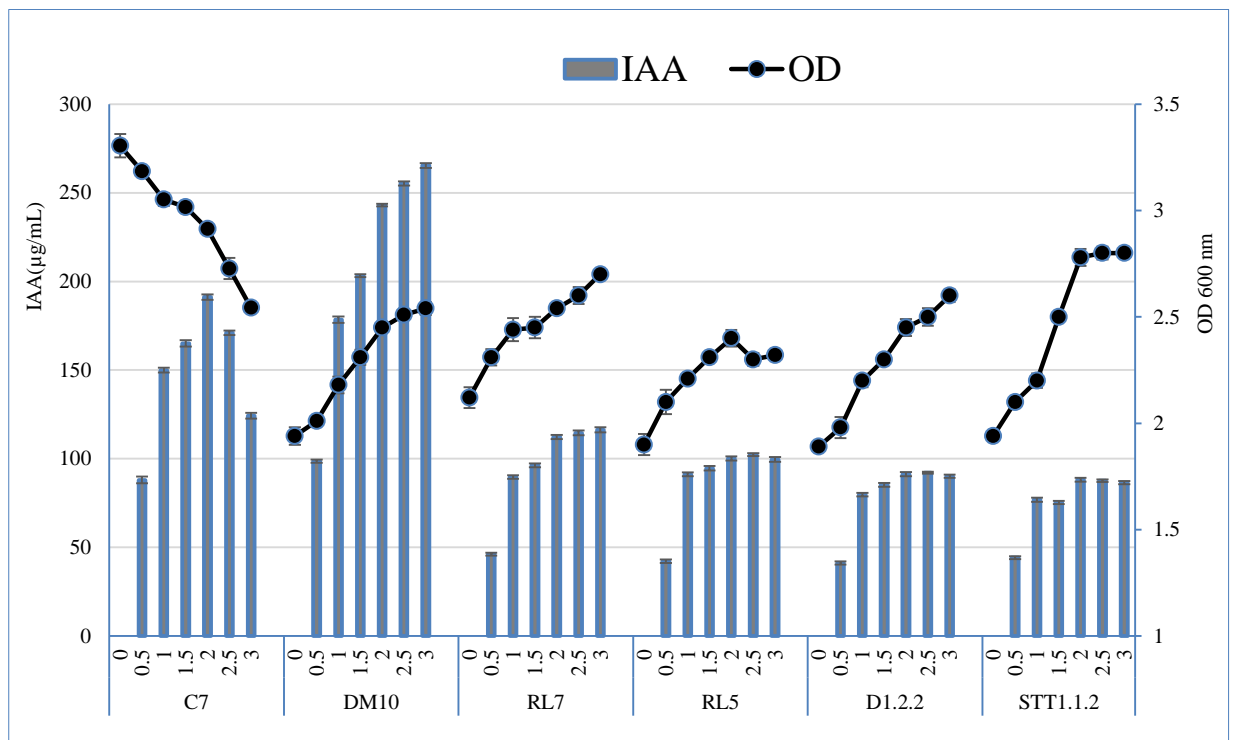
### 3.3.3. Ảnh hưởng của *L-tryptophan* đến đến khả năng sinh tổng hợp IAA của các chủng vi khuẩn chọn lọc

Kết quả ảnh hưởng nồng độ tryptophan đến khả năng sinh trưởng và tổng hợp IAA của các chủng thể hiện trên hình 3.10.

Kết quả cho thấy khả năng sinh trưởng của 6 chủng tăng dần khi hàm lượng tryptophan bổ sung tăng từ 0 đến 3 g/L, điều này có thể là do việc bổ sung tryptophan đã cung cấp nguồn dinh dưỡng nitơ.

Với chủng C7: Hàm lượng IAA sinh ra tăng dần khi bổ sung tryptophan từ 0,5 đến 2 g/L lần lượt là  $88,01 \pm 1,45$ ;  $149,97 \pm 1,56$ ;  $165,030 \pm 1,78$  và  $191,19 \pm 1,62$   $\mu\text{g/mL}$ . Khi hàm lượng tryptophan tăng lên 2,5 và 3g/L thì lượng IAA sinh ra giảm dần, lần lượt là  $171,06 \pm 1,12$  và  $124,27 \pm 1,56$   $\mu\text{g/mL}$ . Đáng chú ý là khả năng sinh trưởng giảm dần khi hàm lượng tryptophan tăng từ 0 đến 3 g/L.

Với chủng DM10: Hàm lượng IAA sinh ra tăng dần khi bổ sung lượng tryptophan tăng từ 0,5 đến 3%. Hàm lượng IAA sinh ra cao nhất khi lượng tryptophan 3 g/L là  $256,4 \pm 1,41$   $\mu\text{g/mL}$ . Khả năng sinh trưởng tăng dần tỷ lệ thuận với hàm lượng tryptophan.



Hình 3.10. Ảnh hưởng của *L-tryptophan* đến đến khả năng sinh trưởng và tổng hợp IAA

Với chủng RL7: Hàm lượng IAA sinh ra tăng dần tương ứng với lượng tryptophan từ 0,5 đến 2 g/L lần lượt là:  $46,21 \pm 0,54$ ;  $89,70 \pm 1,08$ ;  $96,31 \pm 0,71$  và  $112,23 \pm 0,87$   $\mu\text{g/mL}$ . Khi hàm lượng tryptophan tăng từ 2 đến 3 g/L, hàm lượng IAA sinh ra tăng không đáng kể.

Với ba chủng RL5, D1.2.2 và STT1.1.2: Khả năng sinh trưởng tăng khi tăng hàm lượng tryptophan từ 0 đến 3 g/L, tuy nhiên lượng IAA sinh ra tăng không đáng kể khi tăng lượng tryptophan từ 2 lên 3 g/L. Khi lượng tryptophan bổ sung là 2 g/L lượng IAA sinh ra ở ba chủng RL5, D1.2.2 và STT1.1.2 lần lượt là  $102,30 \pm 1,12$ ;  $91,30 \pm 1,3$  và  $88,20 \pm 0,92$   $\mu\text{g/mL}$ .

Tryptophan là tiền chất của IAA, do đó việc bổ sung tryptophan vào môi trường nuôi cấy không chỉ cung cấp dinh dưỡng cho quá trình sinh trưởng mà còn tăng cường quá trình sinh tổng hợp IAA ở vi sinh vật [19]. Mohite và cộng sự (2013) [178] đã xác định hàm lượng tryptophan thích hợp nhất cho các chủng *B. megaterium* br1, *B. subtilis* br2 và *B. cereus* wr2 lần lượt là 1; 1,5 và 0,5 g/L. Wagi và Ahmed (2019) [169] khảo sát ảnh hưởng nồng độ tryptophan lên khả năng sinh IAA của *Bacillus* sp. ở dải nồng độ 0-4 g/L, kết quả cho thấy hàm lượng tryptophan thích hợp là 2-4 g/L. Hàm IAA cao nhất được ghi nhận khi nồng độ tryptophan 2 và 3 g/L ở hai chủng *B. subtilis* Mt3b và *B. cereus* So3II lần lượt là 37; 54; 44 và 64  $\mu\text{g/mL}$ . Bhutani và cộng sự (2018) [179] đã nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ tryptophan lên khả năng sinh IAA của 3 chủng *B. aryabhatai* MJHN1, *B. megaterium* MBN3 và *B. cereu* MJHN10 cho thấy hàm lượng IAA sinh ra đạt cực đại ở nồng độ tryptophan 0,5 g/L ở 2 chủng MBN3 và MJHN1 với hàm lượng IAA lần lượt là 114,10 và 79,88  $\mu\text{g/mL}$ , trong khi chủng MJHN10 đạt hàm lượng IAA cực đại 79,60  $\mu\text{g/mL}$  ở nồng độ tryptophan 0,3 g/L.

Như vậy với hàm lượng tryptophan thích hợp được lựa chọn để làm thí nghiệm tiếp theo cho 5 chủng C7, RL7, STT1.1.2, D1.2.2 và RL5 là 2 g/L, cho chủng DM10 là 3 g/L.

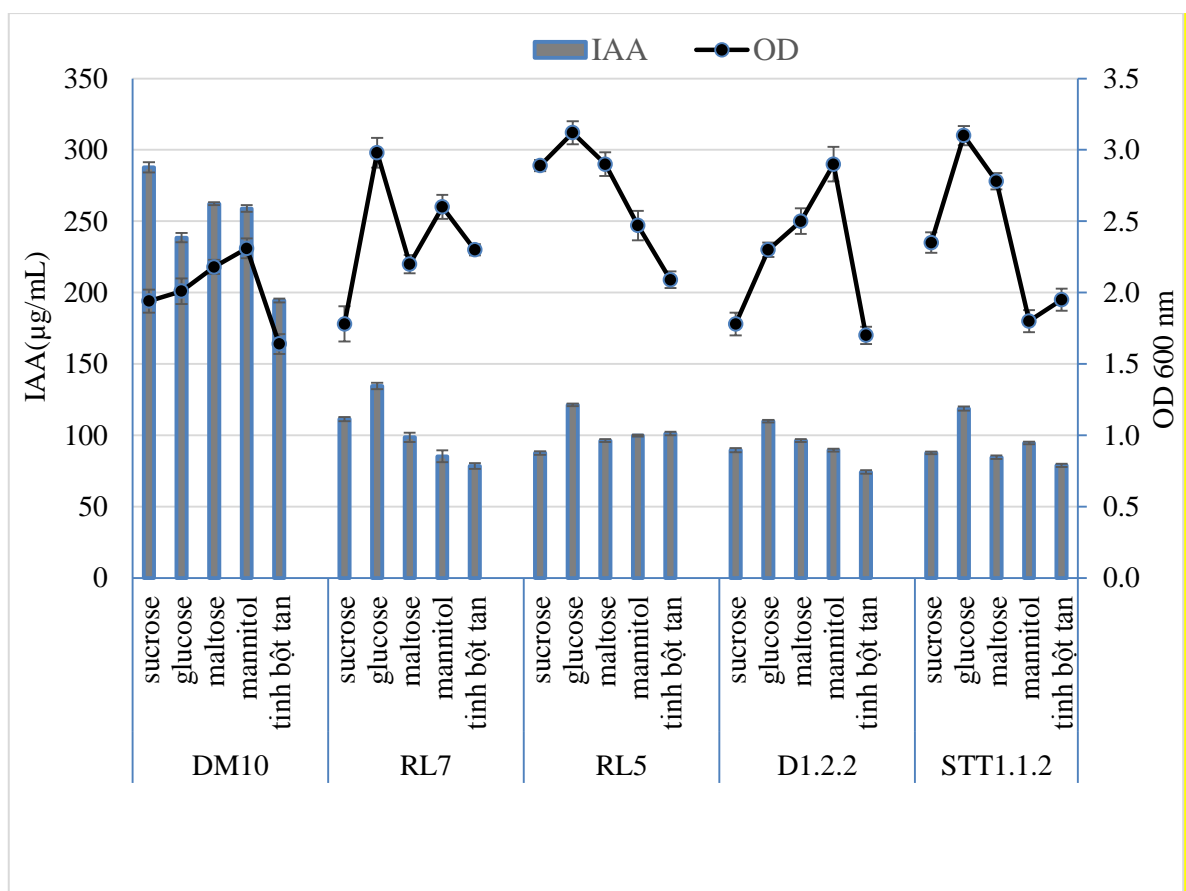
### **3.3.4. Ảnh hưởng của nguồn carbon đến khả năng sinh trưởng và tổng hợp IAA của các chủng vi khuẩn chọn lọc**

Để đánh giá ảnh hưởng nguồn carbon đến khả năng sinh trưởng và tổng hợp IAA, 5 nguồn carbon gồm sucrose, D-mannitol, D-maltose, D- glucose, và tinh bột tan được sử dụng. Kết quả xác định một số đặc điểm sinh hoá cho thấy chủng C7



không sử dụng các nguồn carbon trên. Do vậy, ở thí nghiệm này chỉ khảo sát ảnh hưởng của nguồn carbon đến khả năng sinh IAA của 5 chủng DM10, RL5, RL7, STT1.1.2 và D1.2.2. Kết quả thu được thể hiện ở Hình 3.11.

Với chủng DM10: Hàm lượng IAA sinh ra khi nguồn carbon là glucose, maltose, mannitol và tinh bột tan lần lượt là  $238,50 \pm 1,12$ ;  $262,31 \pm 0,91$ ;  $258,91 \pm 2,12$  và  $194,51 \pm 0,98$   $\mu\text{g/mL}$ . Mặc dù chủng DM10 sinh trưởng tốt nhất khi nguồn carbon là mannitol nhưng hàm lượng IAA cao nhất khi nguồn carbon là sucrose ( $287,74 \pm 2,92$   $\mu\text{g/mL}$ ).



Hình 3.11. Ảnh hưởng nguồn của carbon đến khả năng sinh trưởng và tổng hợp IAA

Với chủng RL5, RL7 và STT1.1.2 khả năng sinh trưởng và sinh IAA cao nhất khi nguồn carbon là glucose với hàm lượng IAA sinh ra lần lượt là  $134,60 \pm 3,32$ ;  $121,37 \pm 2,21$ ;  $118,20 \pm 0,97$   $\mu\text{g/mL}$ .

Chủng D1.2.2 sinh trưởng mạnh hơn khi nguồn carbon là mannitol nhưng hàm lượng IAA sinh ra nhiều hơn ở môi trường có nguồn carbon là glucose ( $109,80 \pm 0,97$   $\mu\text{g/mL}$ ).

Khả năng sinh trưởng của các chủng RL7, RL5 và D1.2.2 mạnh nhất với nguồn carbon là glucose và sinh IAA cao nhất (trung ứng là  $78,95 \pm 1,24$ ;  $63,52 \pm 0,94$  và  $65,81 \pm 2,01$   $\mu\text{g/mL}$ ). Glucose cũng là nguồn carbon thích hợp nhất cho các *B. aryabhatai*, *B. megaterium*, *B. cereu* và *B. subtilis* sinh IAA của [169, 178, 179].

Như vậy, nguồn carbon thích hợp làm môi trường sinh IAA của 4 chủng RL5, RL7, D1.2.2 và STT1.1.2 là glucose, với chủng DM10 là sucrose.

### 3.3.5. Ảnh hưởng nồng độ NaCl đến khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp IAA của các chủng vi khuẩn chọn lọc

Dựa trên kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của nguồn nitơ, hàm lượng tryptophan và carbon đến khả năng sinh trưởng và sinh IAA ở trên đã lựa chọn được môi trường và các điều kiện nuôi cấy thích hợp cho 6 chủng sinh tổng hợp IAA (Bảng 3.7).

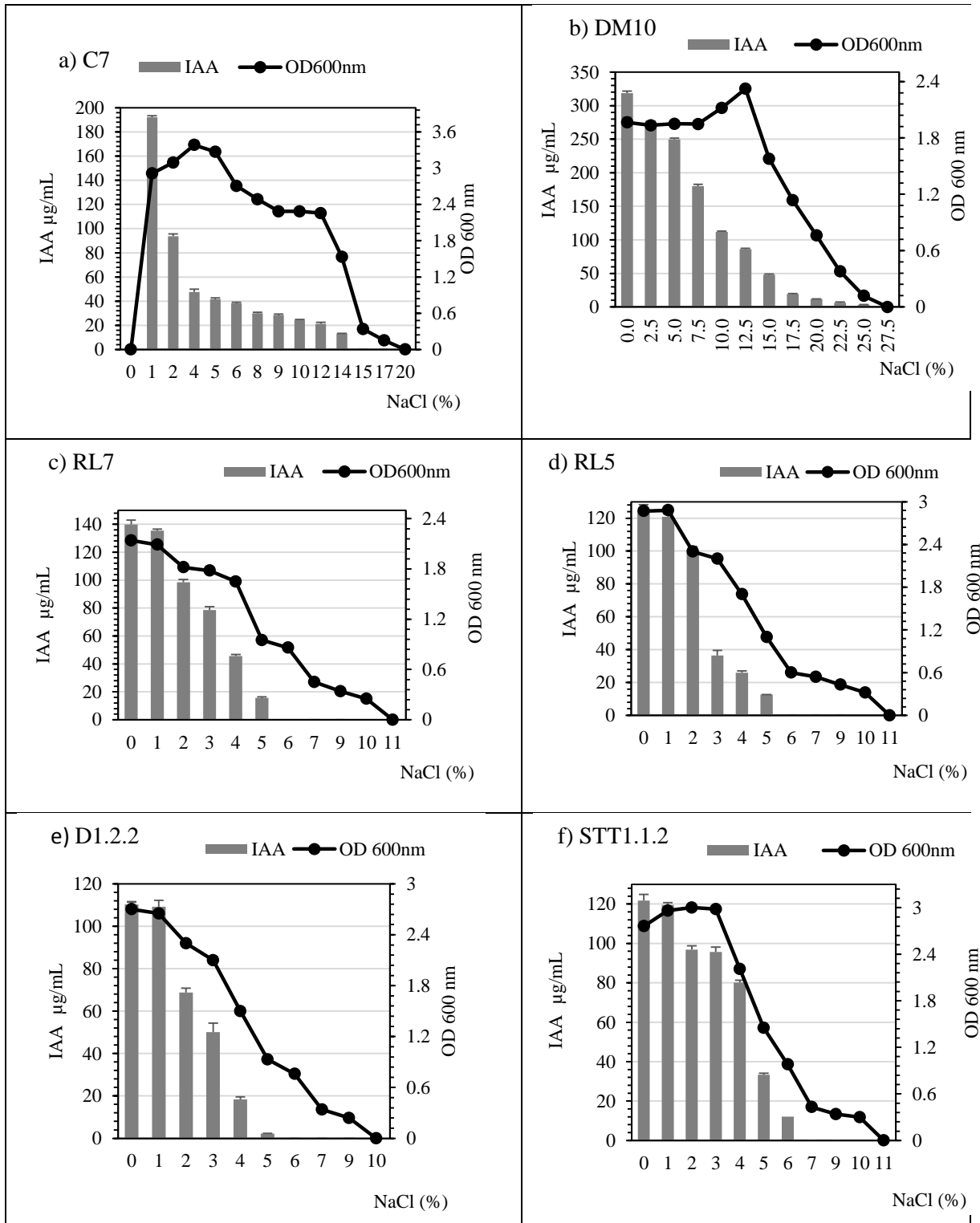
Bảng 3.7. Bảng tổng hợp môi trường sinh IAA của các chủng chọn lọc

Thành phần	C7	DM10	RL5	RL7	STT1.1.2	D1.2.2
Cao nấm men (g/L)	20	20	20	20	20	20
Glucose (g/L)	-	-	10	10	10	10
Sucrose (g/L)	-	10	-	-	-	-
Tryptophan (g/L)	2	3	2	2	2	2
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (g/L)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (g/L)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
pH	7,5	7	7	7	7	7
Nhiệt độ ( $^{\circ}\text{C}$ )	30	30	34	34	34	37

Ảnh hưởng NaCl đến khả năng sinh trưởng và tổng hợp IAA của các chủng chọn lọc được thể hiện trong Hình 3.12. Kết quả cho thấy NaCl có ảnh hưởng lớn đến khả năng sinh trưởng và sinh IAA của cả 6 chủng chọn lọc. Lượng IAA sinh ra giảm dần khi tăng nồng độ muối.

Chủng C7 (Hình 3.12 a): Chủng C7 có sự sinh trưởng tăng dần khi nồng độ NaCl tăng từ 1 đến 5%, nồng độ NaCl tối ưu là 4% và sự sinh trưởng giảm dần khi nồng độ NaCl tăng từ 6 đến 20%. Không sinh trưởng khi nồng độ NaCl là 0% và lớn hơn 20%. Hàm lượng IAA cao nhất là  $192,17 \pm 1,14$   $\mu\text{g/mL}$  ở 1% NaCl, giảm dần khi tăng nồng độ NaCl và không sinh IAA khi nồng độ NaCl lớn hơn 15%.

Chủng C7 có khả năng chịu mặn, nhiệt độ và pH thích hợp tương tự với loài *M. pelagius* [162].



Hình 3.12. Ảnh hưởng nồng độ NaCl đến khả năng sinh trưởng và tổng hợp IAA của các chủng chọn lọc

Chủng DM10 (Hình 3.12 b): Nồng độ NaCl có ảnh hưởng lớn đến khả năng sinh IAA của chủng DM10. Lượng IAA sinh ra tỷ lệ nghịch với nồng độ muối. Chủng DM10 sinh trưởng và phát triển tăng dần khi nồng độ NaCl tăng từ 0 đến 12,5% sau đó giảm dần. Mặc dù chủng DM10 sinh trưởng cao nhất ở nồng độ muối 12,5% nhưng lượng IAA ( $318,18 \pm 3,14 \mu\text{g/mL}$ ) cao nhất khi không có mặt của NaCl. Tuy nhiên ở nồng độ muối cao (15%) thì khả năng sinh IAA của chủng DM10 vẫn khá cao (48,07%). Zhao và cộng sự (2017) [166] đã chỉ ra rằng loài *S. tamaricis* là loài ưa mặn có khả năng sống ở nồng độ NaCl lên tới 25%, chủng *S. tamaricis* F01<sup>T</sup> sinh trưởng tốt nhất ở 5% NaCl, pH 7 và nhiệt độ 30 °C trong khi chủng DM10 sinh trưởng tốt nhất ở 12,5% NaCl, pH 7 và nhiệt độ 30-34 °C.

Chủng RL7 (Hình 3.12 c): Sự sinh trưởng tối ưu khi nồng độ muối từ 0 đến 1%, giảm dần khi nồng độ muối tăng từ 1 đến 10%, không sinh trưởng ở nồng độ NaCl lớn hơn 11%. Hàm lượng IAA sinh ra cao nhất khi nồng độ muối là 0 và 1% lần lượt là  $139,22 \pm 3,10$  và  $135,81 \pm 1,05 \mu\text{g/mL}$ . Khi nồng độ muối lớn hơn 5% chủng RL7 không có khả năng sinh IAA. Khả năng chịu mặn của chủng RL7 cũng tương tự một số chủng trong loài *B. aryabhatai* công bố trước đó. Chủng *B. aryabhatai* MS3 có khả năng chịu mặn đến 10% NaCl [104], chủng *B. aryabhatai* EWR29 có khả năng chịu mặn đến 12% NaCl [113] và *B. aryabhatai* UPMRE6 có khả năng chịu mặn đến 11% NaCl [168].

Chủng RL5 (Hình 3.12 d): Ảnh hưởng của muối lên sự sinh trưởng và tổng hợp IAA của chủng RL5 tương tự chủng RL7. Sự sinh trưởng tối ưu khi nồng độ muối từ 0 đến 1%, giảm dần khi nồng độ muối tăng từ 1 đến 10%, không sinh trưởng ở nồng độ NaCl lớn hơn 11%. Hàm lượng IAA sinh ra cao nhất khi nồng độ muối là 0 và 1% lần lượt là  $124,21 \pm 2,40$  và  $120,1 \pm 1,70 \mu\text{g/mL}$ . Khi nồng độ muối lớn hơn 5% chủng RL5 không có khả năng sinh IAA. Một số các nghiên cứu chỉ ra rằng loài *B. subtilis* có khả năng chịu mặn cao. Chủng *B. subtilis* SRM3 phân lập từ rễ lúa có khả năng sinh trưởng ở nồng độ muối 20% [123]. Trong môi trường tối ưu (không có NaCl) chủng *B. subtilis* (Mt3b) sinh tổng hợp IAA cao với hàm lượng  $322,60 \mu\text{g/mL}$  [169]. Chủng *B. subtilis* PM32 phân lập từ đất trồng khoai tây có khả năng sinh IAA với hàm lượng  $102,6 \mu\text{g/mL}$  [171].

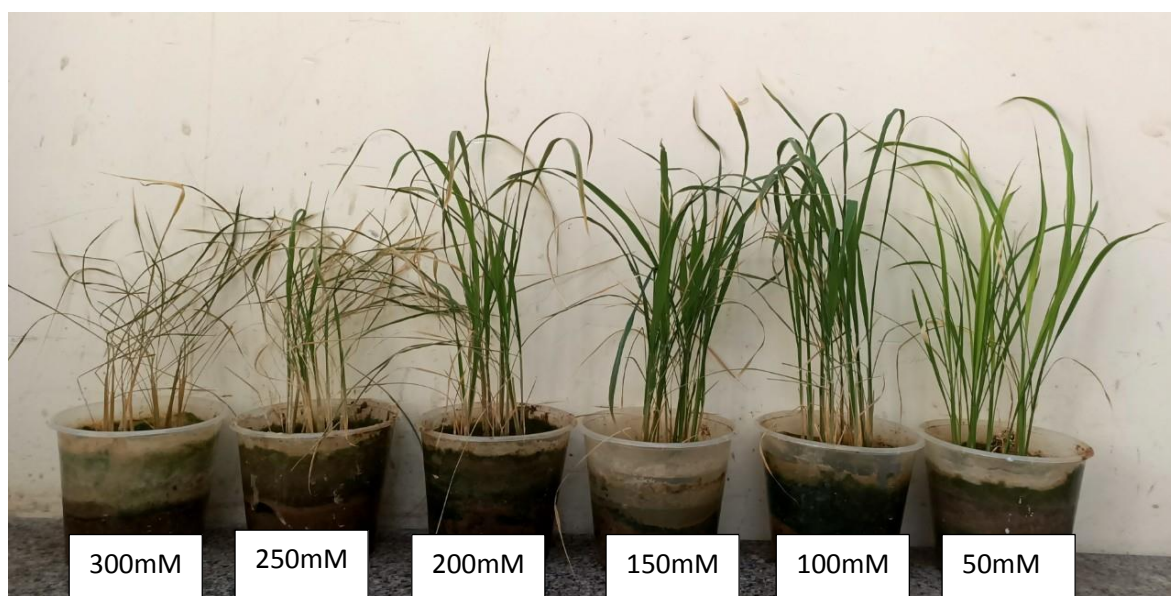
Chủng D1.2.2 (Hình 3.12 e): Ảnh hưởng của muối lên sự sinh trưởng và tổng hợp IAA của chủng D1.2.2 tương tự chủng RL7 và RL5. Sự sinh trưởng tối ưu khi nồng độ NaCl từ 0 đến 1%, sau đó giảm dần khi nồng độ muối tăng từ 1 đến 10%, không sinh trưởng ở nồng độ NaCl lớn hơn 10%. Hàm lượng IAA sinh ra cao nhất khi nồng độ muối là 0 và 1% lần lượt là  $110,31 \pm 1,12$  và  $109,20 \pm 2,30$   $\mu\text{g/mL}$ . Khi nồng độ muối lớn hơn 5% chủng D1.2.2 không có khả năng sinh IAA. Nghiên cứu của Kumar và cộng sự (2014) [176] cho thấy chủng *B. endophyticus* sinh trưởng ở nồng độ muối từ 0 đến 5% và sinh trưởng tối ưu ở 3%, hàm lượng IAA sinh ra 80  $\mu\text{g/mL}$ .

Chủng STT1.1.2 (Hình 3.12 f): Sự sinh trưởng tăng dần khi nồng độ muối tăng từ 0 đến 4%, thích hợp từ 2 đến 3%, sau đó giảm dần khi nồng độ muối tăng đến 10%, không sinh trưởng khi nồng độ muối lớn hơn 10%. Mặc dù, sự sinh trưởng kém hơn khi không có NaCl, nhưng khả năng sinh IAA lại cao nhất ( $121,81 \pm 2,70$   $\mu\text{g/mL}$ ). Khi nồng độ muối tăng từ 2 đến 3%, sự sinh trưởng tăng lên nhưng khả năng sinh IAA lại giảm và khi nồng độ NaCl tăng trên 6% thì không có khả năng sinh IAA.

### **3.4. Đánh giá khả năng hỗ trợ cây lúa chịu mặn của một số chủng vi khuẩn chọn lọc**

#### **3.4.1. Lựa chọn nồng độ muối để gây stress mặn ở cây lúa**

Cây lúa được trồng trong chậu, sau 21 ngày tuổi tiến hành gây stress mặn với các nồng độ muối 50, 100, 150, 200, 250 và 300 mM. Tiến hành quan sát sự phát triển của cây lúa ở các nồng độ muối khác nhau. Kết quả cho thấy ở dải nồng độ 0-50 mM cây lúa phát triển bình thường với các đặc điểm hình thái không có sự khác biệt đáng kể. Ở nồng độ 100 mM đầu lá lúa bắt đầu có dấu hiệu héo lá và thân. Sự khác biệt về hình thái bắt đầu biểu hiện rõ rệt khi nồng độ muối tăng từ 150-200 mM. Cây lúa bị chết ở 250 và 300 mM NaCl (Hình 3.13). Như vậy, nồng độ NaCl 200 mM là nồng độ trung gian giữa trạng thái khỏe mạnh và stress tăng trưởng. Để đánh giá khả năng hỗ trợ cây lúa chịu mặn của các chủng vi sinh vật, nồng độ NaCl 200 mM được lựa chọn là nồng độ để gây stress cho cây lúa. Nồng độ NaCl 200 mM cũng được một số tác giả sử dụng để gây stress cho cây lúa [41,104, 124].



Hình 3.13. Ảnh hưởng nồng độ muối lên sự sinh trưởng cây lúa

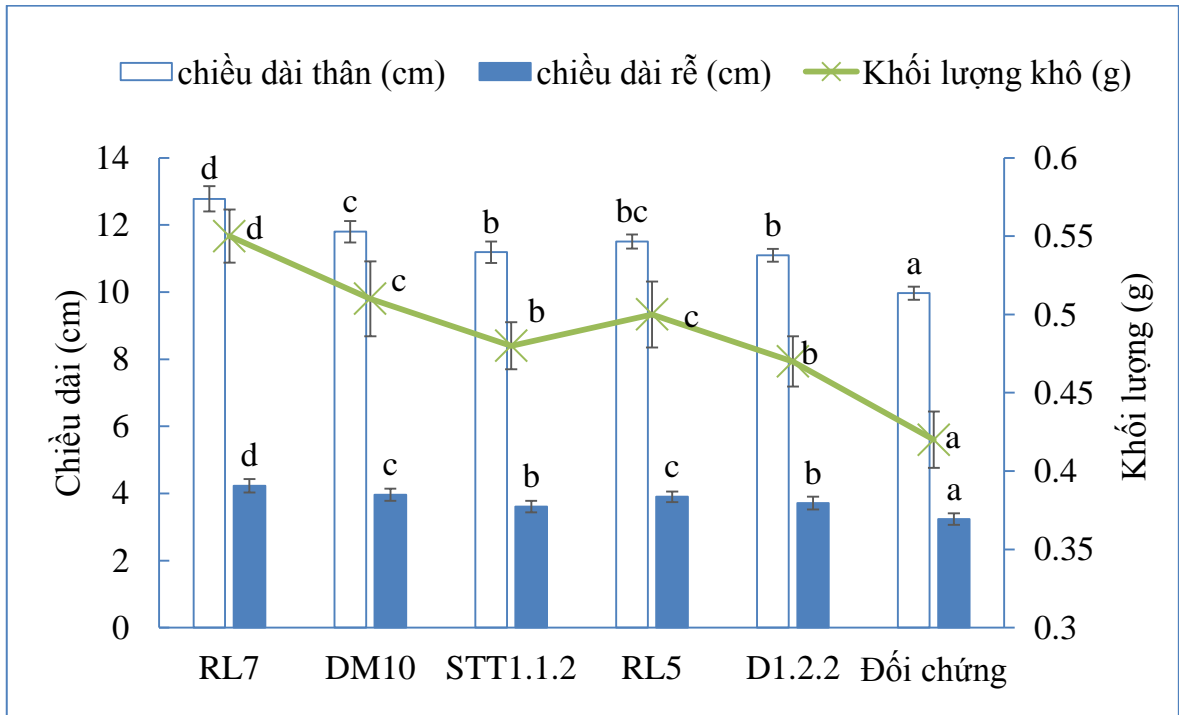
### 3.4.2. Đánh giá khả năng hỗ trợ cây lúa chịu mặn của một số chủng vi khuẩn chọn lọc

Quá trình sàng lọc đã lựa chọn được 6 chủng có khả năng sinh chất kích thích sinh trưởng nổi trội như sinh IAA, ACC deaminase, phân giải phosphate, phân giải cellulose và sinh siderophores thuộc 6 loài khác nhau là *M. pelagius*, *S. tamaricis*, *B. aryabhatai*, *M. endophytica*, *B. subtilis* và *B. endophyticus*. Mặc dù chủng *M. pelagius* C7 là chủng chịu mặn có khả năng sinh IAA cao nhưng lại không sinh trưởng trong điều kiện không có NaCl nên không phù hợp để tiến hành các thí nghiệm stress muối trong luận án. Kết quả đánh giá khả năng hỗ trợ cây lúa chịu mặn của các chủng chọn lọc qua các chỉ tiêu như chiều dài thân, chiều dài rễ, khối lượng khô (thân và rễ) và hàm lượng chlorophyll (a,b và tổng số) được trình bày trong Bảng 3.8, Hình 3.14 và Hình 3.15.

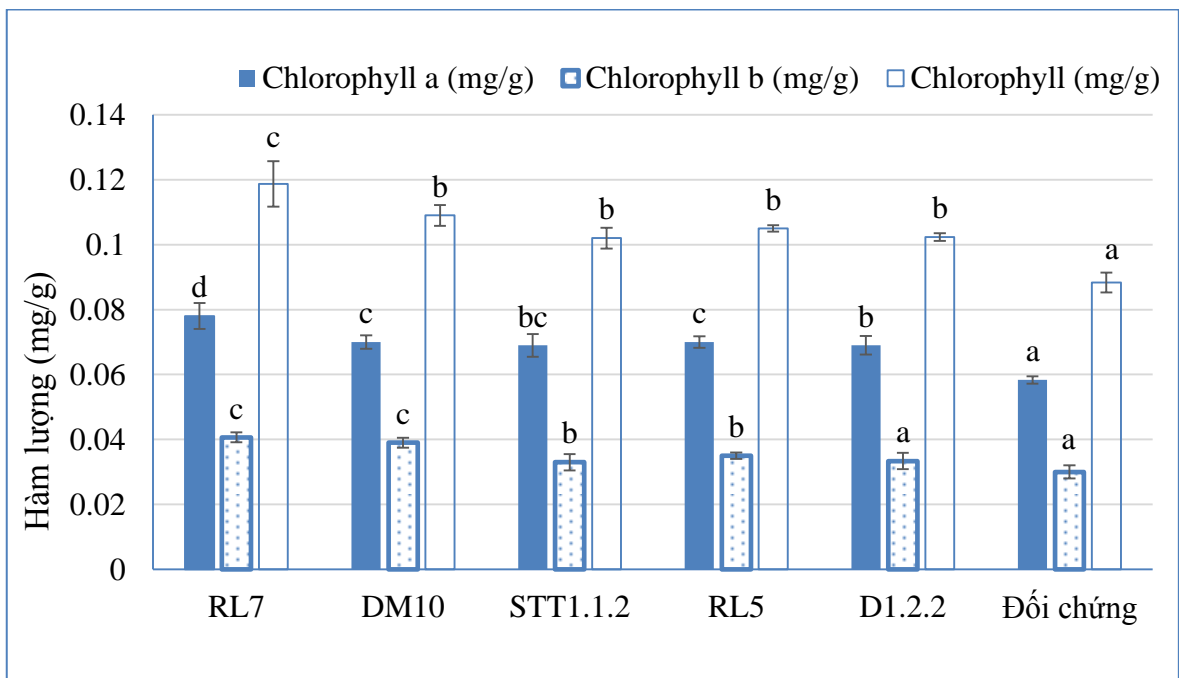
Bảng 3.8. Ảnh hưởng của các chủng vi sinh vật chọn lọc lên sự phát triển của cây lúa khi bị nhiễm mặn

Chủng	RL7	DM10	STT1.1.2	RL5	D1.2.2	Đối chứng
Chiều dài thân (cm)	12,76 <sup>d</sup>	11,97 <sup>c</sup>	11,19 <sup>b</sup>	11,51 <sup>bc</sup>	10,94 <sup>b</sup>	9,96 <sup>a</sup>
Chiều dài rễ (cm)	4,03 <sup>d</sup>	3,76 <sup>c</sup>	3,53 <sup>b</sup>	3,70 <sup>c</sup>	3,46 <sup>b</sup>	3,23 <sup>a</sup>
Khối lượng khô (g)	0,557 <sup>d</sup>	0,510 <sup>c</sup>	0,480 <sup>b</sup>	0,503 <sup>c</sup>	0,470 <sup>b</sup>	0,419 <sup>a</sup>
Chlorophyll a (mg/g)	0,076 <sup>d</sup>	0,072 <sup>c</sup>	0,068 <sup>bc</sup>	0,074 <sup>c</sup>	0,066 <sup>b</sup>	0,058 <sup>a</sup>
Chlorophyll b (mg/g)	0,038 <sup>c</sup>	0,036 <sup>c</sup>	0,033 <sup>b</sup>	0,035 <sup>b</sup>	0,032 <sup>a</sup>	0,030 <sup>a</sup>
Chlorophyll tổng(mg/g)	0,114 <sup>c</sup>	0,108 <sup>b</sup>	0,101 <sup>a</sup>	0,109 <sup>b</sup>	0,098 <sup>a</sup>	0,088 <sup>a</sup>

(Các chữ cái thường trong cùng 1 hàng giống nhau chỉ sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 95%)



Hình 3.14. Ảnh hưởng của các chủng vi sinh vật chọn lọc lên sự phát triển của cây lúa khi bị nhiễm mặn



Hình 3.15. Ảnh hưởng của các chủng vi sinh vật chọn lọc lên hàm lượng chlorophyll trong lá lúa khi bị nhiễm mặn

Kết quả cho thấy, cây lúa được nhiễm các chủng RL7, DM10, STT1.1.2, RL5 và D1.2.2 đều làm tăng chiều dài thân, chiều dài rễ, trọng lượng khô và hàm lượng chlorophyll so với mẫu đối chứng.

Cây lúa nhiễm chủng RL7: Chiều dài thân dài hơn mẫu nhiễm các chủng DM10, STT1.1.2, RL5, D1.2.2 và đối chứng lần lượt là 8,30%; 14,20%; 11,03%; 15,13% và 28,22%. Chiều dài rễ dài hơn mẫu nhiễm các chủng DM10, STT 1.1.2, RL5, D1.2.2 và đối chứng lần lượt là 6,81%; 17,17%; 8,46%; 14,13% và 30,82%. Trọng lượng khô lớn hơn các chủng DM10, STT1.1.2, RL5 và D1.2.2 và đối chứng lần lượt là 7,84%; 14,58%; 10%; 17,02% và 30,95%. Hàm lượng chlorophyll tổng số lớn hơn mẫu nhiễm các chủng DM10, STT 1.1.2, RL5 và D1.2.2 và đối chứng lần lượt là 5,50%; 12,87%; 4,50%; 14% và 35,55%. Cây lúa nhiễm chủng RL7 có sự khác biệt về chiều dài thân, chiều dài rễ, trọng lượng khô và hàm lượng chlorophyll so với mẫu nhiễm các chủng DM10, STT1.1.2, RL5, D1.2.2 và đối chứng có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 95%. Như vậy, chủng RL7 tác dụng hỗ trợ cây lúa chịu mặn mạnh hơn các chủng còn lại.

Cây lúa nhiễm chủng DM10: Chiều dài thân dài hơn mẫu nhiễm các chủng STT1.1.2, RL5, D1.2.2 và đối chứng lần lượt là 5,51%; 2,52%; 6,30% và 18,39%. Chiều dài rễ dài hơn mẫu nhiễm các chủng STT1.1.2, RL5, D1.2.2 và đối chứng lần lượt là 9,71%; 1,50%; 6,70% và 22,50%. Trọng lượng khô lớn hơn mẫu nhiễm các chủng STT1.1.2, RL5, D1.2.2 và đối chứng lần lượt là 6,25%; 2%; 8,51% và 21,42%. Hàm lượng chlorophyll tổng số lớn hơn mẫu nhiễm các chủng STT1.1.2 và D1.2.2 và đối chứng lần lượt là 6,93%; 8% và 25,58%. Cây lúa nhiễm chủng DM10 có sự khác biệt về chiều dài thân, chiều dài rễ, trọng lượng khô và hàm lượng chlorophyll so với mẫu nhiễm các chủng STT1.1.2 và D1.2.2 có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 95%. Như vậy, chủng DM10 tác dụng hỗ trợ cây lúa chịu mặn tốt hơn hai chủng STT1.1.2 và D1.2.2.

Cây lúa nhiễm chủng RL5: Chiều dài thân dài hơn mẫu nhiễm các chủng STT1.1.2, D1.2.2 và đối chứng lần lượt là 2,85%; 3,69% và 15,48%. Chiều dài rễ dài hơn mẫu nhiễm các chủng STT1.1.2, D1.2.2 và đối chứng lần lượt là 8%; 5,10% và 20,61%. Trọng lượng khô nhiều hơn mẫu nhiễm các chủng STT1.1.2, D1.2.2 và đối chứng lần lượt là 4,16%; 6,38% và 19,04%. Hàm lượng chlorophyll tổng số nhiều hơn mẫu nhiễm các chủng STT1.1.2, D1.2.2 và đối chứng lần lượt là 7,93%; 9% và 26,74%. Cây lúa nhiễm chủng RL5 có sự khác biệt về chiều dài thân, chiều dài rễ, trọng lượng khô và hàm lượng chlorophyll so với mẫu nhiễm chủng DM10 và sự khác biệt về chiều dài thân, hàm lượng chlorophyll so với mẫu nhiễm chủng hai chủng STT1.1.2 và D1.2.2 không có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 95%. Sự



khác biệt về chiều dài rễ, trọng lượng khô và chlorophyll ở cây lúa nhiễm chủng RL5 so với mẫu nhiễm chủng hai chủng STT1.1.2 và D1.2.2 có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 95%. Như vậy, chủng RL5 có khả năng làm tăng sự phát triển rễ và sinh khối cây lúa tốt hơn hai chủng STT1.1.2 và D1.2.2.

Cây lúa nhiễm chủng STT1.1.2 và D1.2.2 có chiều dài thân dài hơn mẫu đối chứng lần lượt là 12,27% và 11,38%. Chiều dài rễ dài dài hơn mẫu đối chứng lần lượt là 11,65% và 14,74%. Khối lượng khô lớn hơn mẫu đối chứng lần lượt là 14,24% và 11,94%. Hàm lượng chlorophyll tổng số lớn hơn mẫu đối chứng lần lượt là 17,44% và 16,28%. Cây lúa nhiễm chủng STT1.1.2 và D1.2.2 không có sự khác biệt về chiều dài thân, chiều dài rễ, trọng lượng khô và hàm lượng chlorophyll.

Kết quả xác định mật độ vi sinh vật trong rễ và trong đất (Bảng 3.9) cho thấy mật độ các vi sinh vật trong đất bổ sung ban đầu khoảng  $10^3$  cfu/g, kết thúc quá trình thí nghiệm mật độ tăng lên  $10^5$  cfu/g. Mật độ các chủng RL7, DM10 và RL5 trong rễ cao hơn hai chủng STT1.1.2 và D1.2.2 đây có thể là nguyên nhân làm hiệu quả hỗ trợ cây lúa chịu mặn ở ba chủng RL7, DM10 và RL5 tốt hơn các chủng còn lại. Chủng RL7 và RL5 phân lập từ rễ lúa nên khả năng xâm nhập vào rễ lúa có thể cao hơn các chủng còn lại. Kết quả này cũng chỉ ra rằng, các chủng DM10, STT 1.1.2 và D1.2.2 đều có khả năng nội sinh. Nautiyal và cộng sự (2013) [124] đã cho thấy rằng chủng *B. amyloliquefaciens* SN13 có khả năng nội sinh trong rễ cây lúa (mật độ  $9 \times 10^4$  cfu/g rễ), khi bị nhiễm mặn (200mM) mật độ tăng lên  $3 \times 10^7$  cfu/g rễ.

Bảng 3.9. Mật độ vi sinh vật trong đất và rễ

Chủng	Mật độ vi sinh vật trong đất (cfu/g)		Mật độ vi sinh vật trong rễ (cfu/g)
	Ban đầu	Kết thúc	
RL7	$2,3 \times 10^3$	$2,9 \times 10^5$	$3,5 \times 10^4$
DM10	$1,7 \times 10^3$	$5,1 \times 10^5$	$2,5 \times 10^4$
STT1.1.2	$1,4 \times 10^3$	$3,7 \times 10^5$	$1,8 \times 10^3$
RL5	$2,1 \times 10^3$	$4,3 \times 10^5$	$2,1 \times 10^4$
D1.2.2	$1,8 \times 10^3$	$3,5 \times 10^5$	$1,4 \times 10^3$

Vi sinh vật kích thích sinh trưởng thực vật sinh IAA, ACC deaminase, siderophores và phân giải phosphate được chứng minh có khả năng hỗ trợ cây trồng sinh trưởng và phát triển trong điều kiện stress mặn. *Enterobacter* sp. [99, 103, 106], *H. huttiense* RCA24 và *E. cloacae* RCA25 [100], *S. venezuelae* ATCC 10712 [101], *Achromobacter* [102, 104, 105], *B. subtilis* [105], *B. aryabhattai* [104,

105], *S. sciuri* ET101 [106], *B. linens* RS16 [107], *K. pasteurii* và *P. diazotrophicus* [108], *B. pumilus* [109] và *B. amyloliquefaciens* [124] làm tăng khả năng chịu mặn ở cây lúa. *Dermaococcus* [110], *P. oryzihabitans* [111] và *P. azotoformans* [112] làm tăng khả năng chịu mặn ở cây cà chua. *B. aryabhatai* EWR29 [115] và *B. aryabhatai* PM34 [116] làm tăng khả năng chịu mặn ở cây lúa mì. *B. subtilis* [117], *Pseudomonas* sp. P8, *Peribacillus* sp. P10 và *Streptomyces* sp. X52 [118] làm tăng khả năng chịu mặn ở cây ngô. *B. subtilis* và *P. fluorescen* làm tăng khả năng chịu mặn ở cây đậu hà lan [119]. *B. firmus* [122], *P. pseudoalcaligenes* và *B. subtilis* [123] làm tăng khả năng chịu mặn ở cây đậu tương.

Như vậy, qua phân tích ảnh hưởng của các chủng vi sinh vật lên sự phát triển của cây lúa dưới điều kiện stress mặn cho thấy các chủng RL7, DM10 và RL5 có tác dụng làm tăng rõ rệt các chỉ số chiều dài thân, chiều dài rễ, trọng lượng khô và hàm lượng chlorophyll (a, b và tổng số). Chủng RL7 phân lập nội sinh từ rễ lúa, thuộc loài *B. aryabhatai* được xác định là có các đặc điểm nổi bật của PGPB như sinh IAA, sinh ACC deaminase, siderophores, phân giải phosphate và phân giải cellulose có tác dụng hỗ trợ cây lúa chịu stress mặn tốt nhất so với các chủng còn lại. Chủng DM10, RL5, STT1.1.2 và D1.1.2 có nhiều đặc điểm như chủng RL7 nhưng có khả năng hỗ trợ cây lúa sinh trưởng trong điều kiện stress mặn thấp hơn. Nguyên nhân của sự khác biệt này có thể là do khả năng sinh chất kích thích sinh trưởng cũng như khả năng xâm nhập nội sinh vào rễ của các chủng mạnh hay yếu khác nhau. Chủng *B. endophyticus* D1.2.2 không có khả năng tổng hợp ACC deaminase, đây có thể là nguyên nhân làm chủng này có khả năng hỗ trợ cây lúa chịu mặn kém hơn các chủng còn lại.

Chủng RL7 và DM10 với hiệu quả cao nhất được lựa chọn để tiến hành đánh giá khả năng làm giảm tác động stress mặn và nghiên cứu sự biểu hiện của các gen liên quan đến khả năng chịu mặn của cây lúa.

### 3.5. Nghiên cứu sự biểu hiện các gen liên quan đến đáp ứng mặn của cây lúa dưới sự hỗ trợ của chủng RL7 và DM10

#### 3.5.1. Ảnh hưởng của chủng RL7 và DM10 đến sự sinh trưởng cây lúa khi bị nhiễm mặn

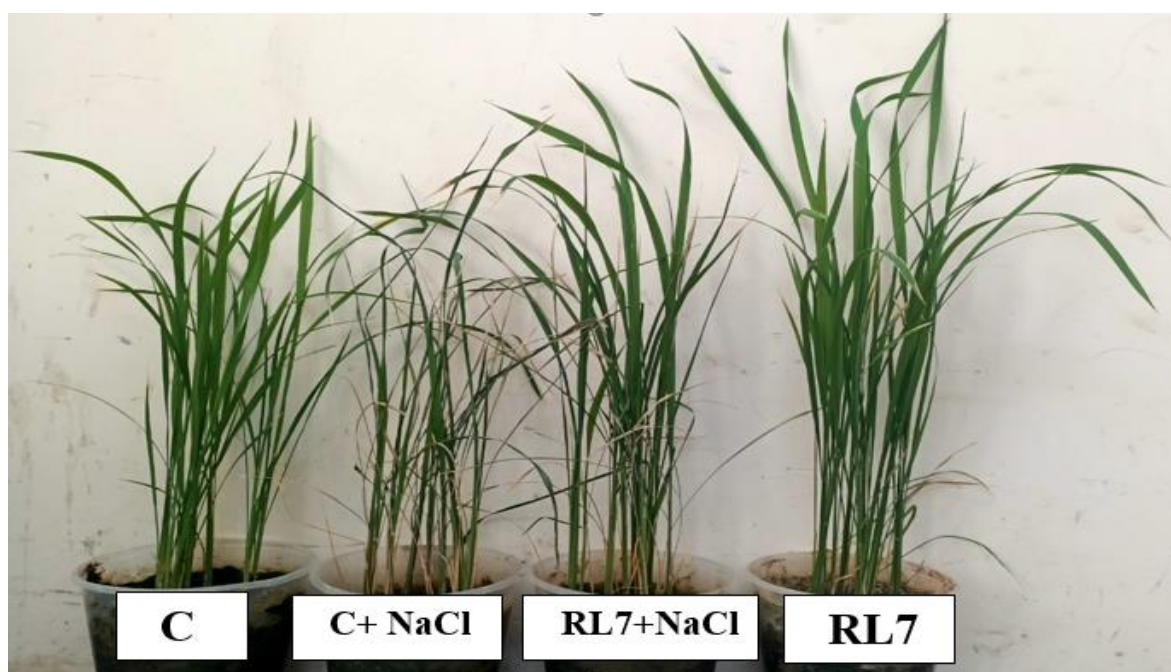
##### 3.5.1.1. Ảnh hưởng của chủng RL7

Kết quả khảo sát các chỉ tiêu về sinh trưởng và phát triển của cây lúa bao gồm chiều cao cây, chiều dài rễ, trọng lượng khô (cả thân và rễ) và hàm lượng chlorophyll (a, b và tổng số) được thể hiện ở Bảng 3.10.

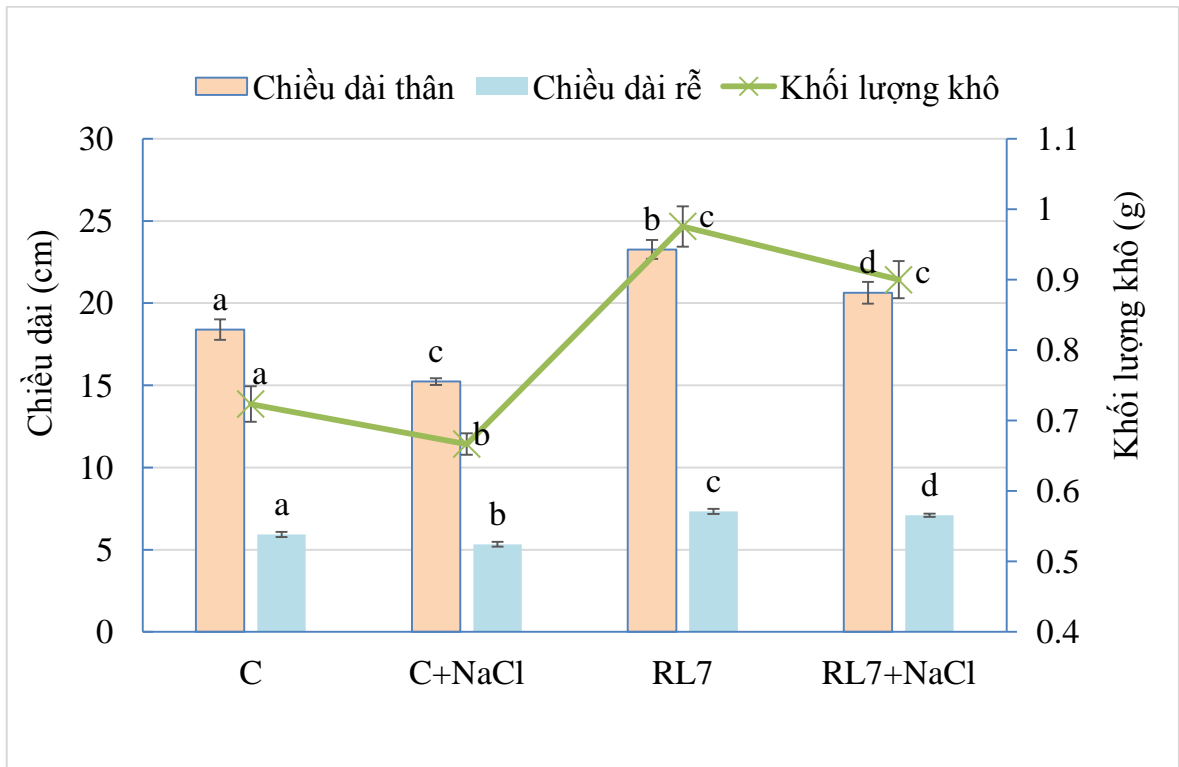
Bảng 3.10. Ảnh hưởng của chủng RL7 đến khả năng sinh trưởng cây lúa khi bị nhiễm mặn

Chỉ tiêu	C	C +NaCl	RL7	RL7+ NaCl
Thân (cm)	18,40±0,36 <sup>b</sup>	16,23±0,42 <sup>a</sup>	23,26±0,41 <sup>c</sup>	20,63±0,57 <sup>d</sup>
Rễ (cm)	5,72±0,21 <sup>b</sup>	5,43±0,33 <sup>a</sup>	7,43±0,40 <sup>c</sup>	7,1±0,34 <sup>d</sup>
Khối lượng khô (g)	0,74±0,06 <sup>b</sup>	0,68±0,04 <sup>a</sup>	0,97±0,05 <sup>c</sup>	0,90±0,08 <sup>d</sup>
Chlorophyll a (mg/g)	0,082±0,005 <sup>b</sup>	0,070±0,004 <sup>a</sup>	0,096±0,006 <sup>c</sup>	0,089±0,005 <sup>b</sup>
Chlorophyll b (mg/g)	0,033±0,006 <sup>b</sup>	0,025±0,004 <sup>a</sup>	0,042±0,004 <sup>b</sup>	0,038±0,003 <sup>b</sup>
Chlorophyll (mg/g)	0,115±0,016 <sup>b</sup>	0,095±0,005 <sup>a</sup>	0,138±0,018 <sup>d</sup>	0,128±0,021 <sup>c</sup>

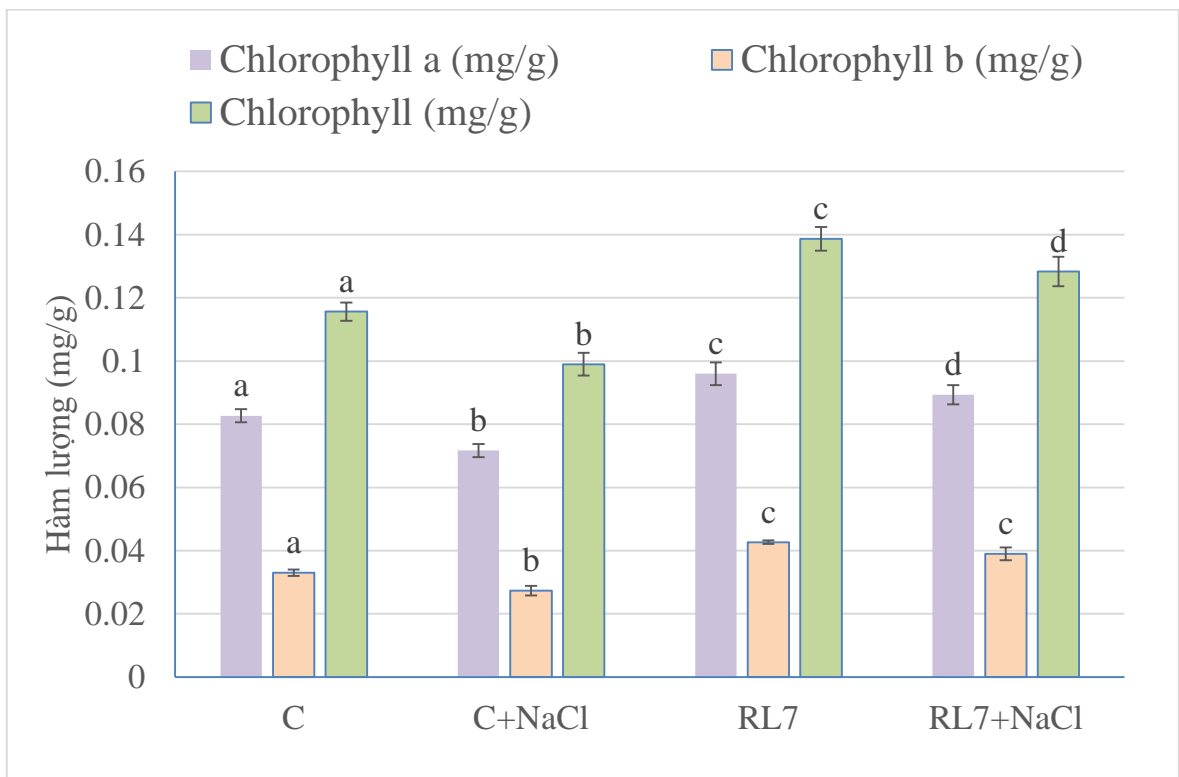
(Giá trị trung bình ± SD, các chữ cái thường trong cùng 1 hàng giống nhau chỉ sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 95%)



Hình 3.16. Ảnh hưởng chủng RL7 lên sự sinh trưởng cây lúa khi bị nhiễm mặn



Hình 3.17. Ảnh hưởng của chủng RL7 lên chiều cao cây, chiều dài rễ và trọng lượng khô khi bị nhiễm mặn



Hình 3.18. Ảnh hưởng của chủng RL7 lên hàm lượng chlorophyll trong lá lúa khi bị nhiễm mặn

Cây lúa được nhiễm chủng RL7 có chiều dài thân, chiều dài rễ, trọng lượng khô và hàm lượng chlorophyll tổng số tăng lần lượt là 26,45%; 29,89 %; 31,08% và 19,99% so với đối chứng (C). Khi bị stress mặn, cây lúa được nhiễm chủng RL7 có chiều dài thân, chiều dài rễ, trọng lượng khô tăng và hàm lượng chlorophyll tổng số tăng lần lượt là 27,10%; 30,67%; 31,06% và 34,73% so với đối chứng (C+ NaCl). Sự khác biệt về chiều dài thân, chiều dài rễ, trọng lượng khô, hàm lượng chlorophyll giữa các nghiệm thức có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 95%. Mật độ chủng RL7 trong đất ban đầu là  $2,1 \times 10^3$  cfu/g kết thúc thí nghiệm mật độ khoảng  $10^5$  cfu/g, trong rễ là  $1,1 \times 10^4$  cfu/g và tăng nhẹ khi bị nhiễm mặn lên  $5,9 \times 10^4$  cfu/g.

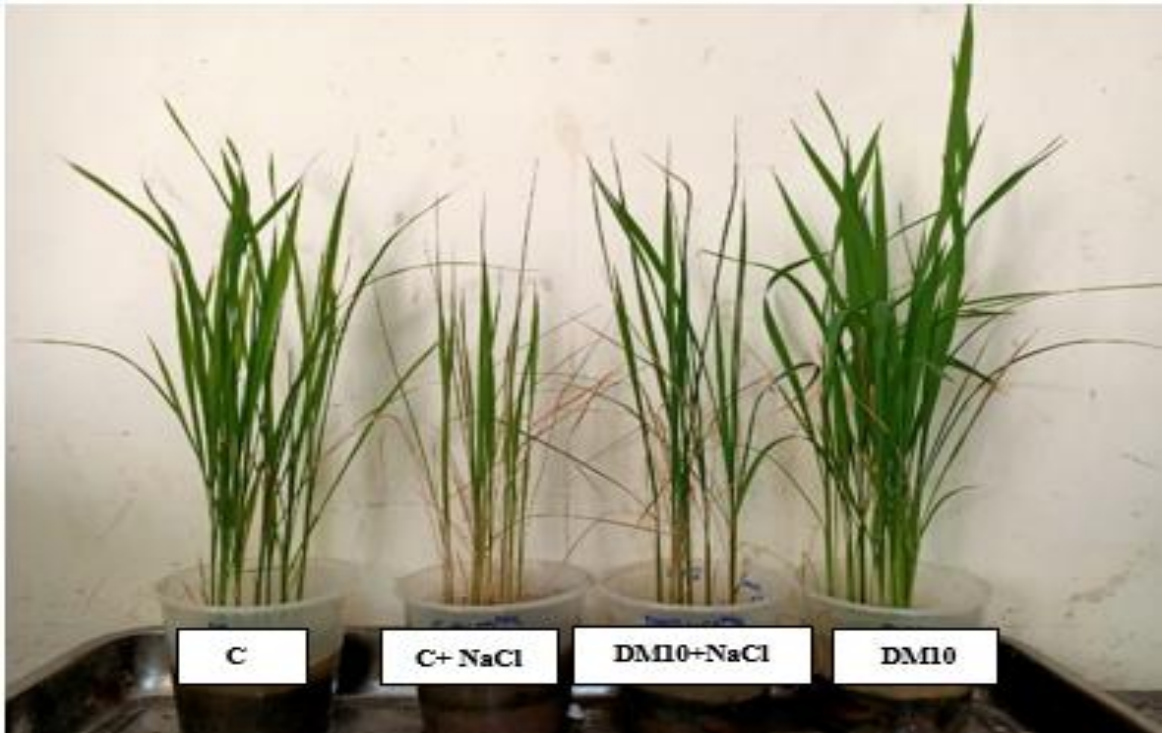
### 3.5.1.2. Ảnh hưởng của chủng DM10

Tương tự chủng RL7 kết quả khảo sát ảnh hưởng của chủng DM10 lên các khả năng sinh trưởng của cây lúa trong điều kiện stress mặn qua các thông số như chỉ tiêu sinh trưởng và phát triển của cây lúa bao gồm chiều cao cây, chiều dài rễ, trọng lượng khô (cả thân và rễ) và hàm lượng chlorophyll (a, b và tổng số) được thể hiện ở Bảng 3.11

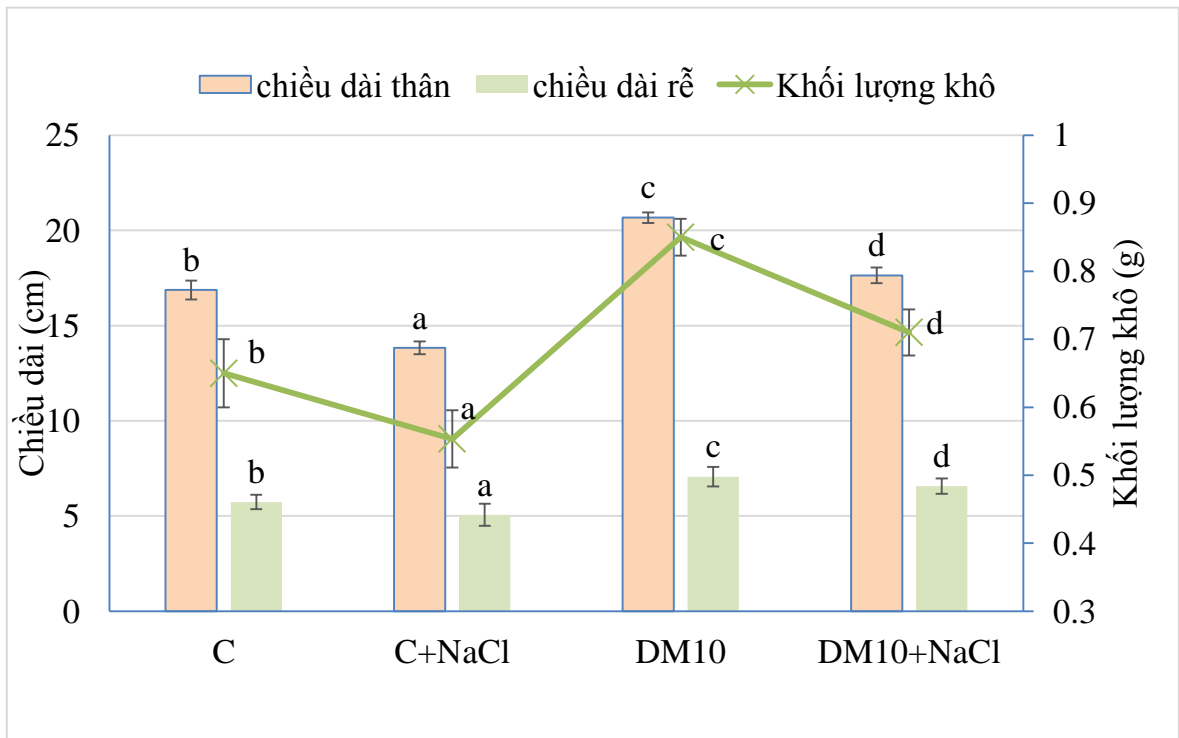
*Bảng 3.11. Ảnh hưởng của chủng DM10 đến khả năng sinh trưởng cây lúa khi bị nhiễm mặn*

Chỉ tiêu	C	C +NaCl	DM10	DM10 + NaCl
Thân (cm)	16,86±0,54 <sup>b</sup>	14,83±0,36 <sup>a</sup>	19,67±0,28 <sup>c</sup>	17,73±0,31 <sup>d</sup>
Rễ (cm)	5,83±0,37 <sup>b</sup>	5,06±0,21 <sup>a</sup>	7,06±0,51 <sup>c</sup>	6,56±0,40 <sup>d</sup>
Khối lượng khô (g)	0,67±0,03 <sup>b</sup>	0,58±0,04 <sup>a</sup>	0,82±0,03 <sup>c</sup>	0,71±0,02 <sup>d</sup>
Chlorophyll a (mg/g)	0,058±0,004 <sup>b</sup>	0,049±0,003 <sup>a</sup>	0,070±0,003 <sup>c</sup>	0,064±0,005 <sup>b</sup>
Chlorophyll b (mg/g)	0,032±0,005 <sup>b</sup>	0,030±0,003 <sup>a</sup>	0,040±0,004 <sup>b</sup>	0,035±0,002 <sup>b</sup>
Chlorophyll tổng số (mg/g)	0,090±0,012 <sup>b</sup>	0,079±0,008 <sup>a</sup>	0,110±0,013 <sup>d</sup>	0,099±0,017 <sup>c</sup>

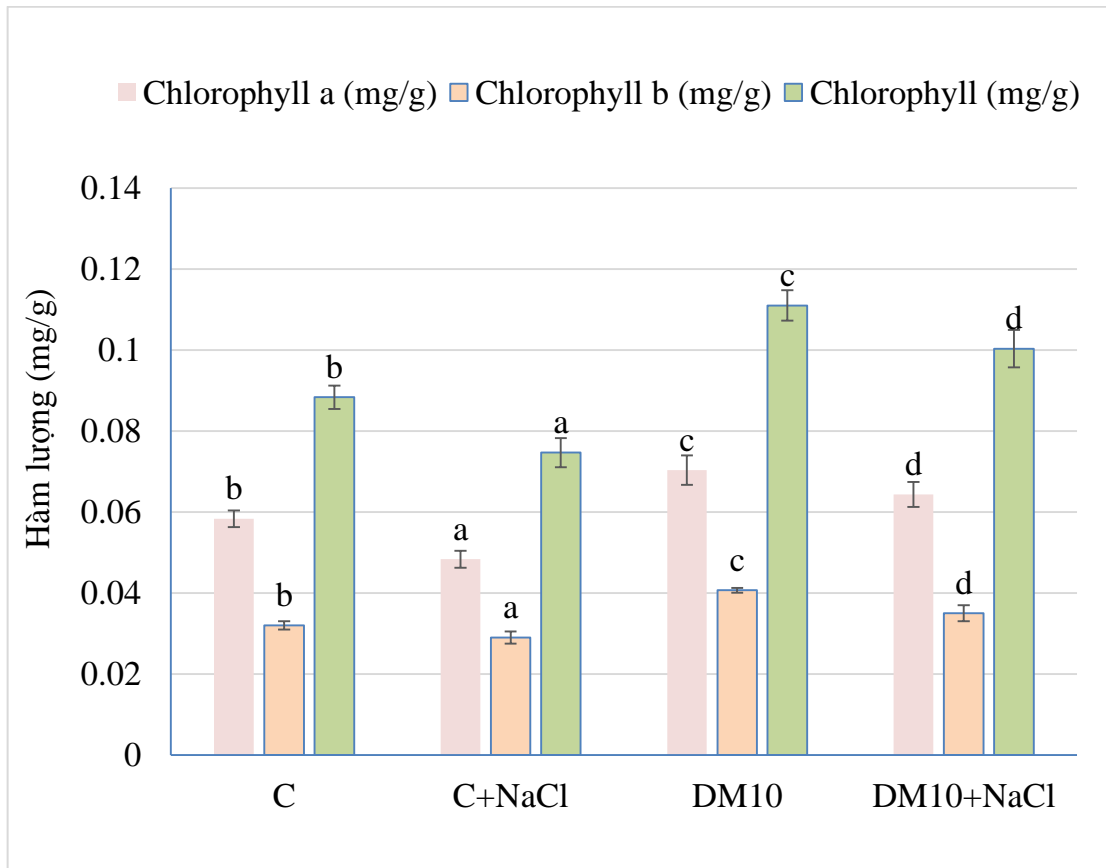
(Giá trị trung bình ± SD, các chữ cái thường trong cùng 1 hàng giống nhau chỉ sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 95%)



Hình 3.19. Ảnh hưởng chủng DM10 lên sự sinh trưởng cây lúa khi bị nhiễm mặn



Hình 3.20. Ảnh hưởng của chủng DM10 lên chiều cao cây, chiều dài rễ và trọng lượng khô khi bị nhiễm mặn



Hình 3.21. Ảnh hưởng của chủng DM10 lên hàm lượng chlorophyll trong lá lúa khi bị nhiễm mặn

Cây lúa nhiễm chủng DM10 có chiều dài thân, chiều dài rễ, trọng lượng khô và hàm lượng chlorophyll tổng số tăng lần lượt là 16,60%; 21,14%; 21,38% và 22,87% so với đối chứng (C). Khi bị nhiễm mặn, cây lúa nhiễm chủng DM10 có chiều dài thân, chiều dài rễ, trọng lượng khô tăng và hàm lượng chlorophyll tổng số tăng lần lượt là 19,55%; 29,6%; 21,71% và 25,73% so với đối chứng (C+NaCl). Sự khác biệt về chiều dài thân, chiều dài rễ, trọng lượng khô và hàm lượng chlorophyll giữa các nghiệm thức có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 95%. Mật độ chủng DM10 trong đất ban đầu là  $2,5 \times 10^3$  cfu/g kết thúc thí nghiệm mật độ khoảng  $10^5$  cfu/g, trong rễ là  $7,9 \times 10^3$  cfu/g và khi bị nhiễm mặn là  $1,9 \times 10^4$  cfu/g.

Như vậy, chủng DM10 và RL7 có khả năng sinh ACC deaminase, phân giải phosphate, sinh IAA và siderophores giúp tăng khả năng chịu mặn ở cây lúa. Khi bị stress mặn, thực vật sản sinh một lượng lớn hormone ethylene làm giảm sự nảy mầm của hạt và sự phát triển của rễ và cuối cùng cản trở sự phát triển của cây. Vi sinh vật tổng hợp ACC deaminase có thể phân cắt ACC thành  $\alpha$ -ketobutyrate và amoniac, do đó làm giảm lượng ethylene sinh ra khi bị stress ở thực vật. Việc bổ

sung vi sinh vật có khả năng sinh IAA giúp kích thích thực vật phát triển, bên cạnh đó phân giải phosphate giúp bổ sung dinh dưỡng cho cây sinh trưởng và phát triển. Khả năng sinh siderophores giúp chống lại một số bệnh cho cây trồng và giúp cây trồng hấp thu nguyên tố vi lượng Fe. Ảnh hưởng của chủng RL7 và DM10 lên khả năng sinh trưởng của cây lúa trong điều kiện stress mặn cũng tương tự như các nghiên cứu trước đó. Các chủng *B. amyloliquefaciens* SN13 [124], *B. aryabhatai* MS3 [104] đã được chứng minh khả năng hỗ trợ cây lúa chịu được stress muối như là làm tăng chiều dài thân, chiều dài rễ, trọng lượng khô và hàm lượng chlorophyll.

### **3.5.2 Nghiên cứu sự biểu hiện của các gen liên quan đến đáp ứng mặn của cây lúa dưới sự hỗ trợ của chủng RL7 và DM10**

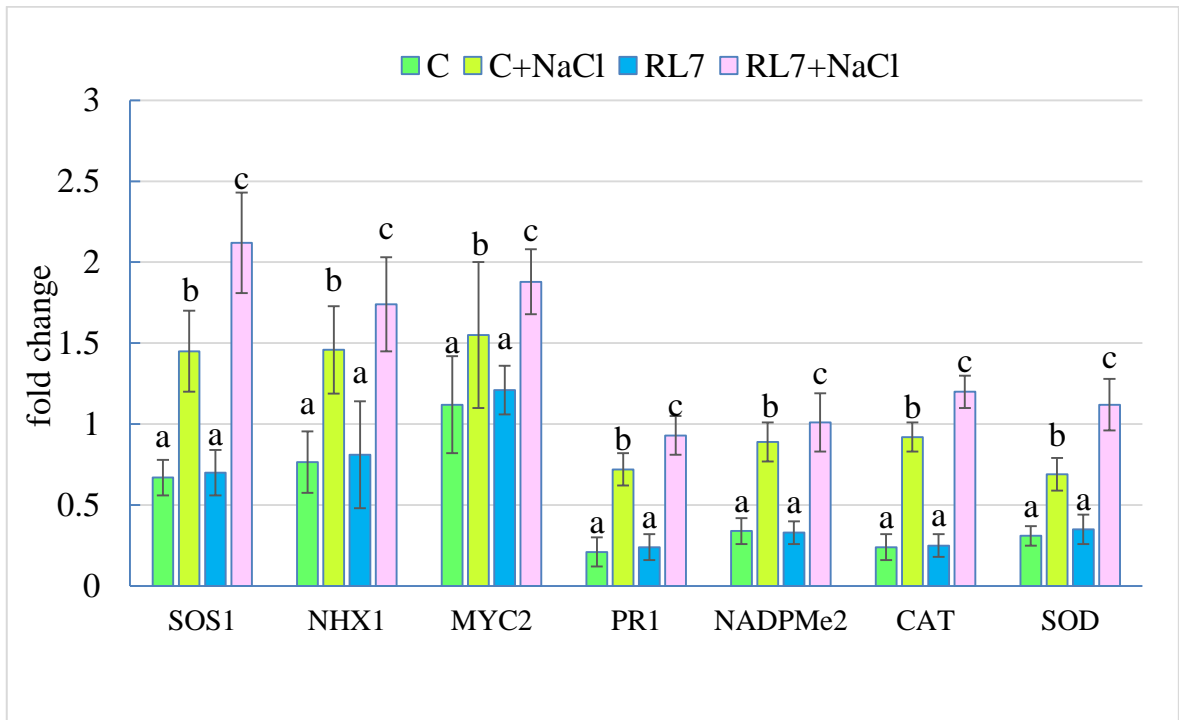
Song song với việc khảo sát các chỉ tiêu về sinh trưởng và phát triển của cây lúa như chiều cao cây, chiều dài rễ, trọng lượng khô (cả thân và rễ và hàm lượng chlorophyll (a, b và tổng số), lá lúa được thu để nghiên cứu sự biểu hiện của các gen liên quan đến đáp ứng với mặn.

Các mẫu lá lúa được tách RNA, mỗi một nghiệm thức lặp lại 4 lần, nồng độ RNA tổng số được trình bày trong Phụ lục 11. Kết quả cho thấy các mẫu RNA có nồng độ và độ tinh sạch đạt chất lượng để sử dụng là khuôn tổng hợp cDNA.

#### **3.5.2.1. Sự biểu hiện của các gen liên quan đến đáp ứng mặn của cây lúa dưới sự hỗ trợ của chủng RL7**

Sự biểu hiện của các gen bao gồm *SOS1*, *NHX1*, *MYC2*, *PR1*, *NADPMe2*, *CAT* và *SOD* ở bốn nghiệm thức được xác định bằng kỹ thuật RT-PCR. Kết quả được thể hiện trong Hình 3.22. Nhiễm mặn làm tăng cường sự biểu hiện của các gen *MYC2*, *NHX1*, *NADP-Me2*, *SOS1*, *SOD*, *PR1* và *CAT* lần lượt là 1,34; 1,66; 1,89; 2,16; 2,23; 2,57 và 3,07 lần so với đối chứng (C). Ở điều kiện không bị nhiễm mặn, chủng RL7 không làm thay đổi sự biểu hiện các gen so với đối chứng (C). Khi bị nhiễm mặn, chủng RL7 làm tăng cường sự biểu hiện của các gen *MYC2*, *SOD*, *NADP-Me2*, *SOS1*, *PR1*, *CAT* và *NHX1* lần lượt là 1,29; 1,35; 1,38; 1,46; 1,53; 1,55 và 1,59 lần so với mẫu (C+NaCl). Sự khác biệt về mức độ biểu hiện của các gen giữa các nghiệm thức có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 95%.

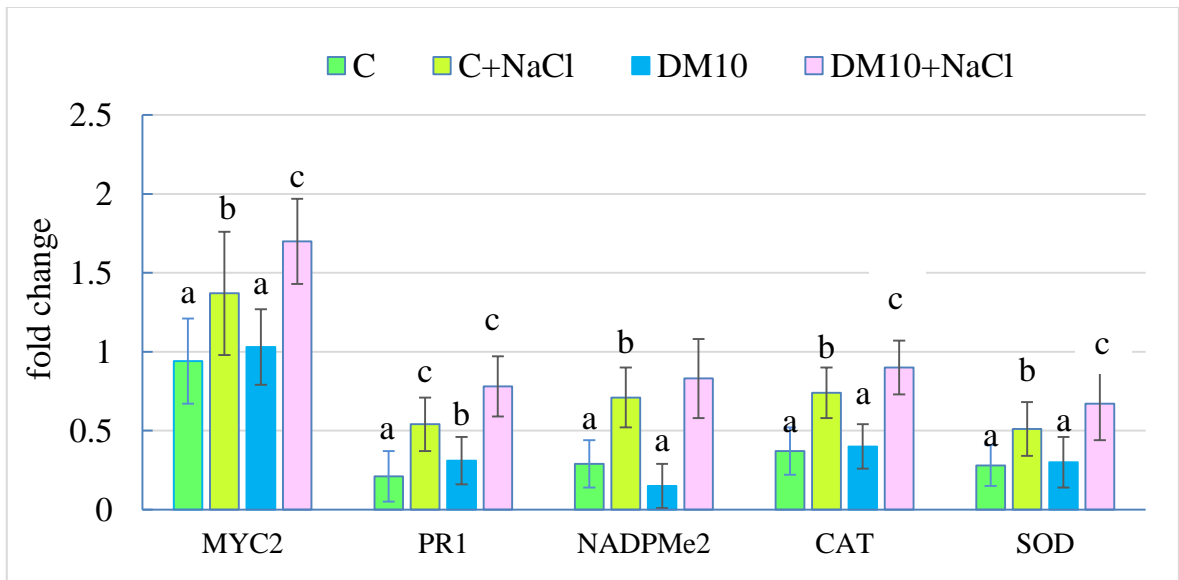




Hình 3.22. Sự biểu hiện của các gen liên quan đến đáp ứng mặn ở cây lúa dưới sự hỗ trợ của chủng RL7

### 3.5.2.2 Sự biểu hiện của các gen liên quan đến đáp ứng mặn của cây lúa dưới sự hỗ trợ của chủng DM10

Với chủng DM10, các gen được đánh giá sự biểu hiện gồm MYC2, CAT, NADPMe2, SOD và PR, kết quả được thể hiện trong Hình 3.23.

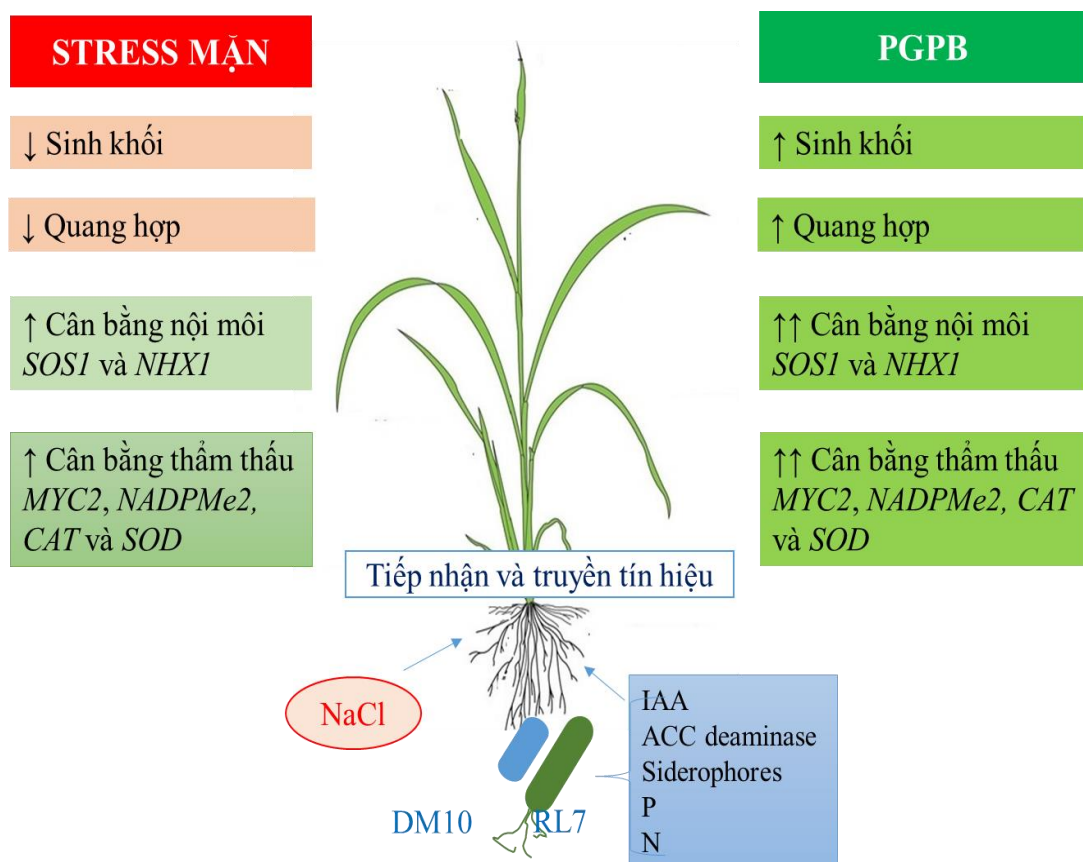


Hình 3.23. Sự biểu hiện của các gen liên quan đến đáp ứng mặn ở cây lúa dưới sự hỗ trợ của chủng DM10

Kết quả cho thấy, nhiễm mặn làm tăng cường sự biểu hiện của các gen MYC2, CAT, NADPMe2, SOD và PR1 lần lượt à 1,45; 1,82; 2,18; 2,42 và 2,57 lần

so với đối chứng (C). Ở điều kiện không bị nhiễm mặn, chủng DM10 làm tăng cường biểu hiện gen *PR1* 1,24 lần và không làm thay đổi sự biểu hiện các gen còn lại so với đối chứng (C). Khi bị nhiễm mặn, chủng DM10 làm tăng cường sự biểu hiện của các gen *MYC2*, *SOD*, *NADPMe2*, *CAT* và *PR1* lần lượt là 1,19; 1,46; 1,47; 1,50 và 1,51 lần so với mẫu (C+NaCl). Sự khác biệt về mức độ biểu hiện của các gen giữa các nghiệm thức có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 95%.

Qua các kết quả nghiên cứu ở trên, các cơ chế có thể làm tăng khả năng chịu mặn ở cây lúa qua trung gian của chủng RL7 và DM10 được tóm tắt trong Hình 2.24 dưới đây.



Hình 3.24. Tóm tắt một số con đường có thể làm tăng khả năng chịu mặn ở cây lúa với sự hỗ trợ của chủng RL7 và DM10

Cây lúa chịu được mặn thông qua hai cơ chế chính là cân bằng ion nội môi và cân bằng áp suất thẩm thấu. Khi bị nhiễm mặn các gen liên quan đến hai con đường này được tăng cường biểu hiện [56]. Nhiễm chủng RL7 và DM10 làm tăng cường sự biểu hiện các gen liên quan đến cả hai cơ chế trên giúp cây lúa chống chịu với mặn.

Các gen *MYCs* đóng vai trò quan trọng trong việc phản ứng với các stress phi sinh học và sinh học. Ở cây lúa, sự tăng cường biểu hiện của các gen *MYC2*, *MYC4* và *MYC5* trong môi trường có nồng độ muối cao đã được ghi nhận [83]. Các nghiên cứu về phiên mã và sinh hóa ở loài *Arabidopsis* đã cho thấy *MYC2* điều hòa âm của quá trình sinh tổng hợp proline. Proline cần thiết để tăng cường khả năng chống chịu đối với stress mặn, tuy nhiên, sự tích tụ quá mức của nó gây độc cho cây. Gen *MYC2* cũng liên quan đến con đường truyền tín hiệu axit jasmonic, là hormone giúp điều hòa một loạt các quá trình trong thực vật từ quang hợp, sinh trưởng đến sinh sản [84]. Khi bị stress mặn, nhiễm chủng RL7 và DM10 làm tăng cường biểu hiện của gen *MYC2* hỗ trợ cây lúa chịu stress mặn.

Một số loài vi sinh vật nội sinh hoặc ngoại sinh làm tăng cường biểu hiện của gen pathogenesis-related protein 1 (*PR1*) dẫn đến làm tăng khả năng miễn dịch (đặc biệt là khả năng kháng nấm bệnh) [96]. Ở điều kiện mặn, nhiễm chủng RL7 và DM10 làm tăng cường sự biểu hiện của gen *PR1* lần lượt là 2,2 và 2,75 lần so với đối chứng tương ứng. Điều này cho thấy vai trò của chủng vi sinh nội sinh RL7 và DM10 trong việc làm giảm tác động của mặn lên sự sinh trưởng của cây lúa. Những kết quả nghiên cứu về sự biểu hiện của gen *MYC2* và *PR1* trong luận án là những minh chứng đầu tiên về vai trò của các gen *MYC2* và *PR1* ở cây lúa khi bị stress mặn.

Khi bị stress mặn, thực vật sẽ tổng hợp các chất oxy hóa (ROS), cụ thể là  $H_2O_2$ ,  $O_2^-$  và  $OH^-$  làm phá hủy DNA, RNA và protein. Các hợp chất ROS cũng gây ra sự phá hủy chất diệp lục và làm gián đoạn hoạt động của mô phân sinh rễ. Các enzyme chống oxy hóa như superoxide dismutase, catalase, ascorbate peroxidase, peroxidase, glutathione reductase và monohydroascorbate reductase có khả năng loại bỏ ROS và duy trì chúng ở mức thấp. Superoxide dismutase là một metalloenzyme đóng một vai trò quan trọng trong việc bảo vệ tế bào khỏi tác hại của quá trình oxy hóa, bằng cách xúc tác chuyển đổi gốc superoxide thành  $H_2O_2$  [180]. Catalase làm giảm mức ROS bằng cách xúc tác sự phân hủy  $H_2O_2$  thành  $H_2O$  và  $O_2$ . Khi bị stress mặn, nhiễm chủng RL7 và DM10 làm tăng cường biểu hiện của các gen SOD và CAT so với đối chứng tương ứng. Như vậy bằng cách loại bỏ ROS thông qua hoạt động của hai enzyme CAT và SOD, cây lúa nhiễm chủng RL7 và DM10 có thể tăng cường khả năng chịu mặn. Sự thích nghi với mặn nhờ tăng cường

sự biểu hiện của các enzyme ROS như CAT và SOD dưới sự hỗ trợ của các vi sinh vật sinh chất kích thích sinh trưởng thực vật cũng được chứng minh ở cây lúa [41, 124], đậu bắp [181] và khoai tây [182].

Sự biểu hiện tăng cường của các gen *NHX1* và *SOS1* trong điều kiện nhiễm mặn và nhiễm chủng RL7 và DM0 đã được chứng minh trong luận án. Thực vật chống lại stress mặn bằng cách cô lập và tích tụ muối vào trong không bào, kiểm soát nồng độ muối cũng như duy trì tỉ lệ  $K^+/Na^+$  cao trong tế bào chất từ đó làm giảm tác động có hại của muối. *NHX1* và *SOS1* tham gia vào trao đổi  $Na^+/H^+$  và giảm  $Na^+$  trong tế bào [56]. Như vậy, sự tăng cường biểu hiện của hai gen *SOS1* và *NHX1* đã hỗ trợ cây lúa chịu mặn. Enzyme NADP-malic 2 (NADP-ME2) là một trong những enzyme quan trọng tham gia vào các quá trình trao đổi chất ở thực vật, có mặt chủ yếu ở ty thể, lục lạp và tế bào chất, xúc tác quá trình khử carboxyl hóa của malate để tạo pyruvate,  $CO_2$  và NADPH dưới dạng ion kim loại ( $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ...). Vì vậy, enzyme này giữ vai trò trong việc tăng cường khả năng chống chịu của thực vật đối với stress muối và thâm thấu [97]. Nhiễm mặn làm gen *NADP-Me2* biểu hiện mức độ phiên mã cao gấp 1,98 lần, khi nhiễm chủng RL7 và DM10 mức độ phiên mã cao gấp lần lượt 2,73 và 1,46 lần so với đối chứng tương ứng, điều này cho thấy chủng RL7 và DM10 có vai trò hỗ trợ cây lúa chịu mặn. Kết quả nghiên cứu sự biểu hiện của các gen liên quan đến đáp ứng mặn ở cây lúa trong luận án cũng tương tự với kết quả của các nghiên cứu trước đó. Nautiyal và cộng sự (2013) [124] đã xác định sự biểu hiện của các gen *NHX1*, *SOS1*, *NADPMe2*, cây lúa khi bị stress mặn và nhiễm chủng *B. amyloliquefaciens* NBRISN13. Theo Sultana và cộng sự (2020) [104] chủng *B. aryabhatai* MS3 chịu mặn phân lập từ rễ lúa làm tăng cường sự biểu hiện của các gen *SOS1* và *NHX1* lần lượt là 419% và 770% ở cây lúa khi bị nhiễm mặn 200 mM NaCl. Chủng xạ khuẩn *Streptomyces sp.* GMKU36 cũng làm tăng cường sự biểu hiện của các gen *NHX1*, *SOS1*, *CAT*, *SOD* ở lá lúa trong điều kiện nhiễm mặn [41].

### 3.6. Giải trình tự hệ gen của một số chủng chọn lọc

Chủng RL7 và DM10 là hai chủng có hiệu quả cao trong việc hỗ trợ cây lúa chịu mặn, chủng C7 có khả năng chịu mặn và tổng hợp IAA cao. Trong khuôn khổ luận án, chủng DM10 và C7 được chọn để giải trình tự hệ gen trên cơ sở đó phân tích các gen liên quan đến khả năng kích thích sinh trưởng, khả năng chịu mặn.

#### 3.6.1. Lắp ráp các đoạn trình tự và chú giải chức năng

Kết quả giải trình tự hệ gen cho thấy kích thước hệ gen của chủng DM10 và C7 lần lượt là khoảng 4,2 Mbp và 4,0 Mbp (Bảng 3.12). Số lượng các scaffolds sau khi lắp ráp của chủng DM10 và C7 lần lượt là 743 và 1360. Hàm lượng GC lần lượt là 65,91% và 59,21%. Tổng số gen được dự đoán lần lượt là 3.635 gen và 3.797 gen, tổng số gen được dự đoán chức năng lần lượt là 2.270 gen (chiếm 62,44%) và 2.239 gen (chiếm 58,96%). Chủng DM10 47 gen RNA gồm 45 gen tRNA, 1 gen rRNA và 1 gen tmRNA. Chủng C7 có 46 gen tRNA, 5 gen rRNA và 1 gen tmRNA. Các gen thuộc cơ sở dữ liệu COGs của chủng DM10 và C7 lần lượt là 1.786 và 1.603

Bảng 3.12. Đặc điểm genome chủng DM10 và C7

Đặc điểm	DM10	C7
Kích thước hệ gen (bp)	4.203.784	4.057.300
Hàm lượng (G+ C) (%)	65,91	59,21
Scaffolds	743	1,360
Tổng số gen dự đoán (CDS)	3.635	3.797
Tổng số gen được dự đoán chức năng	2.270	2.239
Các gen rRNA	1	5
Các gen tRNA genes	45	46
Các gen tmRNA	1	1
Các gen thuộc cơ sở dữ liệu COGs	1.786	1.602

#### 3.6.2. Phân loại dựa trên chỉ số tương đồng toàn bộ hệ gen

Nhận dạng nucleotide trung bình (ANI) giữa các cặp genome nhất định đã được coi là một tiêu chuẩn vàng cho việc phân loại các loài sinh vật nhân sơ. Giữa các loài thuộc cùng 1 chi có chỉ số ANI >95% thì coi là giống nhau [183].

Trình tự bộ gen của chủng C7 và DM10 đã được so sánh với các loài gần nhất của chúng trong các chi *Marinobacter* và *Salanicola*. Chỉ số ANI giữa chủng C7 và *Marinobacter pelagius* là 86,33%, giữa chủng DM10 và *Salanicola tamaricis*

là 92.89% (Bảng 15). Như vậy, chủng C7 và DM10 có chỉ số ANI <95% nên được phân loại là 1 loài lần lượt thuộc chi *Marinobacter* và *Salinicola*.

### 3.6.3. Phân loại các nhóm gen chức năng

Định danh các nhóm gen chức năng đối với các contig của chủng vi khuẩn DM10 sử dụng công cụ Prokka cho kết quả 1786 gen tương đồng với các trình tự protein đã biết chức năng, lưu trữ trên cơ sở dữ liệu COG (Bảng 3.13). Các gen này được phân loại thành 22 nhóm chức năng. Nhóm chức năng tham gia quá trình chuyển hóa chiếm phần lớn nhất bao gồm vận chuyển và chuyển hóa amino acid (12,71%), bảo toàn và chuyển hóa năng lượng (8,51%), chuyển hóa và vận chuyển carbohydrate (9,41%), chuyển hóa và vận chuyển ion vô cơ (6,44%), chuyển hóa và vận chuyển coenzyme (5,66%)..... Ngoài ra có số lượng lớn gen tham gia quá trình dịch mã, thuyết phát sinh và cấu trúc ribosome (10,58%). Khi so sánh các chủng với nhau thì thấy có sự phân bố không đồng đều giữa các nhóm chức năng.

Bảng 3.13. Phân loại nhóm gen chức năng protein trực giao COGs

Các nhóm chức năng		DM10		C7	
		SL.	%	SL.	%
Lưu trữ và xử lý thông tin	[A] Sửa đổi và xử lý RNA	1	0,06	1	0,06
	[B] Chức năng và cấu trúc sợi nhiễm sắc	2	0,11	3	0,19
	[J] Dịch mã, thuyết phát sinh và cấu trúc ribosome	189	10,58	<b>191</b>	<b>11,92</b>
	[K] Phiên mã	114	6,38	69	4,31
	[L] Nhân đôi, tái tổ hợp và sửa chữa	77	4,31	83	5,18
Tín hiệu và các quá trình của tế bào	[D] Kiểm soát chu kỳ tế bào, phân chia tế bào, phân vùng nhiễm sắc,	24	1,34	29	1,81
	[M] Sự phát sinh màng/thành tế bào	136	7,61	114	7,12
	[N] Sự di động của tế bào	43	2,41	14	0,87
	[O] Điều chỉnh sau dịch	78	4,37	98	6,12

Các nhóm chức năng		DM10		C7	
		SL.	%	SL.	%
	mã, sự chuyển đổi protein, chaperones				
	[T] Cơ chế truyền tín hiệu	47	2,63	60	3,75
	[U] Vận chuyển túi bào, bài tiết, và vận chuyển nội bào	16	0,90	21	1,31
	[V] Cơ chế phòng vệ	32	1,79	26	1,62
Chuyển hóa	[C] Bảo toàn và chuyển hóa năng lượng	152	8,51	<b>152</b>	<b>9,49</b>
	[E] Chuyển hóa và vận chuyển amino acid	227	12,71	<b>197</b>	<b>12,30</b>
	[F] Chuyển hóa và vận chuyển nucleotide	60	3,36	43	2,68
	[G] Chuyển hóa và vận chuyển carbohydrate	168	9,41	<b>72</b>	<b>4,49</b>
	[H] Chuyển hóa và vận chuyển coenzyme	101	5,66	108	6,74
	[I] Chuyển hóa và vận chuyển lipid	94	5,26	130	8,11
	[P] Chuyển hóa và vận chuyển ion vô cơ	115	6,44	75	4,68
	[Q] Dị hóa, vận chuyển và sinh tổng hợp các chất chuyển hóa thứ cấp	23	1,29	35	2,18
	Khó phân loại	[R] Dự đoán chức năng chung	64	3,58	22
[S] Chưa biết chức năng		20	1,12	2	0,12

### 3.6.4. Gen liên quan đến khả năng kích thích sinh trưởng thực vật

Kết quả giải trình tự hệ gen của chủng DM10 và C7 đã xác định các gen có liên quan đến khả năng kích thích sinh trưởng thực vật như sinh IAA, phân giải phosphate, sinh ACC deaminase và sinh siderophores.

*Bảng 3.14.* Danh sách một số gen có liên quan đến khả năng kích thích sinh trưởng thực vật trong hệ gen của chủng DM10 và C7

Đặc điểm	Gen	EC	Chú giải	DM10	C7
Hòa tan phosphate	<i>gcd</i>	1.1.5.2	Quinoprotein glucose dehydrogenase	+	-
	<i>pstA</i>		Phosphate transport system permease protein PstA	+	-
	<i>pstB</i>	3.6.3.27	Phosphate import ATP-binding protein PstB	+	+
	<i>pstC</i>		Phosphate transport system permease protein PstC	+	-
	<i>pstS</i>		Phosphate-binding protein PstS	+	-
	<i>pqqA</i>		Coenzyme PQQ synthesis protein A	+	-
	<i>pqqB</i>		Coenzyme PQQ synthesis protein B	+	+
	<i>pqqCD</i>		Bifunctional coenzyme PQQ synthesis protein C/D	+	-
Sản xuất IAA	<i>trpA</i>	4.2.1.20	Tryptophan synthase alpha chain	+	+
	<i>trpB</i>	4.2.1.20	Tryptophan synthase beta chain	+	+
	<i>trpC</i>	4.1.1.48	Indole-3-glycerol phosphate synthase	+	+
	<i>trpD</i>	2.4.2.18	Anthranilate phosphoribosyltransferase	+	+
	<i>trpE</i>	4.1.3.27	Anthranilate synthase component 1	+	+
	<i>trpF</i>	5.3.1.24	N-(5'-phosphoribosyl)anthranilate isomerase	+	+
	<i>trpG</i>	4.1.3.27	Anthranilate synthase component 2	+	+
	<i>trpS</i>	6.1.1.2	Tryptophan-tRNA ligase	+	-
	<i>trpI</i>		HTH-type transcriptional regulator TrpI	+	-
Hoạt tính ACC	<i>acdS</i>		1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase	+	-



Đặc điểm	Gen	EC	Chú giải	DM10	C7
deaminase					
Chuyển hóa trehalose	<i>sugA</i>		Trehalose transport system permease protein SugA	+	+
	<i>sugB</i>		Trehalose transport system permease protein SugB	+	+
	<i>treF</i>	3.2.1.28	Cytoplasmic trehalase	+	-
	<i>treY</i>	5.4.99.15	Maltooligosyl trehalose synthase	+	-
	<i>treZ</i>	3.2.1.141	Malto-oligosyltrehalose trehalohydrolase	+	-
Sản xuất glycine-betaine	<i>betA</i>	1.1.99.1	Oxygen-dependent choline dehydrogenase	+	+
	<i>betB</i>	1.2.1.8	NAD/NADP-dependent betaine aldehyde dehydrogenase	+	+
	<i>betC</i>	3.1.6.6	Choline-sulfatase	+	+
	<i>betI</i>		HTH-type transcriptional regulator BetI	+	+
	<i>betL</i>		Glycine betaine transporter BetL	+	+
	<i>betT</i>		High-affinity choline transport protein	+	+
	<i>ectA</i>	2.3.1.178	L-2,4-diaminobutyric acid acetyltransferase	+	+
	<i>ectB</i>	2.6.1.76	Diaminobutyrate--2-oxoglutarate transaminase	+	+
	<i>ectC</i>	4.2.1.108	L-ectoine synthase	+	+
	<i>ectD</i>	1.14.11.55	Ectoine dioxygenase	+	+
	<i>ectT</i>		Ectoine/hydroxyectoine transporter	+	+
	<i>gbsA</i>	1.2.1.8	Betaine aldehyde dehydrogenase	+	+
	<i>proP</i>		Proline/betaine transporter	+	+
	<i>proS</i>	6.1.1.15	Proline--tRNA ligase	+	+
<i>yehZ</i>		Glycine betaine-binding protein YehZ	+	+	

Đặc điểm	Gen	EC	Chú giải	DM10	C7
	<i>yehY</i>		Glycine betaine uptake system permease protein YehY	+	+
	<i>yehX</i>	3.6.3.-	Glycine betaine uptake system ATP-binding protein YehX	+	+
	<i>yehW</i>		Glycine betaine uptake system permease protein YehW	+	+
	<i>yehY</i>		Glycine betaine uptake system permease protein YehY	+	+
	<i>yehX</i>	3.6.3.-	Glycine betaine uptake system ATP-binding protein YehX	+	+
	<i>yehW</i>		Glycine betaine uptake system permease protein YehW	+	+
	<i>opuAA</i>	3.6.3.32	Glycine betaine transport ATP-binding protein OpuAA	+	-
	<i>opuAB</i>		Glycine betaine transport system permease protein OpuAB	+	-
	<i>opuAA</i>	3.6.3.32	Glycine betaine transport ATP-binding protein OpuAA	+	+
	<i>opuCA</i>		Glycine betaine/carnitine/choline transport ATP-binding protein OpuCA	+	+
	<i>opuE</i>		Osmoregulated proline transporter OpuE	+	+

Axit indole-3-acetic (IAA) là phytohormone tham gia vào nhiều quá trình sinh trưởng và phát triển quan trọng ở thực vật như kích thích quá trình giãn, phân chia tế bào, biệt hóa mô, phản ứng với ánh sáng và trọng lực [18]. Khả năng tổng hợp IAA là một đặc điểm đặc trưng ở nhiều vi khuẩn kích thích sinh trưởng thực vật [20]. Chúng DM10 và C7 thể hiện khả năng sinh IAA (Hình 3.25 A, A1). Tuy nhiên, các gen liên quan đến con đường sinh tổng hợp IAA hoàn thiện không được tìm thấy trong hệ gen của chủng DM10 và C7 mà chỉ thấy sự có mặt của gen aldehyde dehydrogenase (*aldA*). Đáng chú ý, kết quả phân tích ghi nhận nhóm gen

sinh tổng hợp tryptophan *trp*ABCDEFGGIPS có mặt trong hệ gen của chủng DM10 cà C7. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với kết luận của các nghiên cứu trước đây, cụ thể, các gen liên quan đến sinh tổng hợp tryptophan có mối quan hệ mật thiết với con đường sinh tổng hợp IAA cũng như các chức năng sinh học liên quan [184].

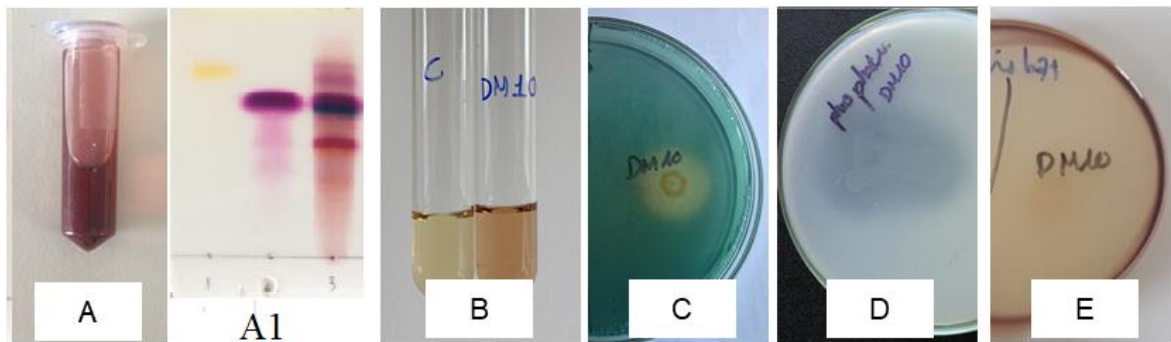
Ethylene là một phytohormone đa chức năng, có khả năng điều chỉnh cả sự phát triển và sự lão hóa ở cây trồng thông qua các cơ chế thúc đẩy hoặc ức chế hai quá trình này, tùy thuộc vào nồng độ, thời điểm áp dụng và loài thực vật [24]. Dưới tác dụng của ACC deaminase, ACC (tiền chất của ethylen) bị phân huỷ tạo thành amoniac và  $\alpha$ -ketobutyrate. Vi khuẩn sản xuất ACC deaminase có thể làm giảm nồng độ ethylene trong thực vật, thúc đẩy sự tăng trưởng và phát triển của thực vật cũng như tăng khả năng chống chịu của thực vật với các điều kiện bất lợi khác như lũ lụt, khô hạn, hạn mặn và mầm bệnh [25]. Chủng DM10 có khả năng sinh ACC deaminase (Hình 3.25B), kết quả giải trình tự cho thấy chủng DM10 mang gen *acdS* mã hóa cho ACC deaminase. Kết quả xác định hoạt độ enzyme cho thấy chủng DM10 có hoạt độ khoảng 133,80 nmol  $\alpha$ -ketobutyrate/mg/h.

Chủng DM10 có khả năng sinh siderophores (Hình 3.25 C), kết quả giải trình tự cho thấy chủng DM10 mang vùng gen mã hoá (CDS) mã hóa cho protein PhuCDB, là những protein cần thiết cho việc vận chuyển ferrichrome và các hợp chất  $\text{Fe}^{3+}$ -hydroxamate ( $\text{Fe}^{3+}$ -aerobactin,  $\text{Fe}^{3+}$ -coprogen) và các CDS mã hóa cho hệ thống vận chuyển sắt fecAE phụ thuộc citrate. Protein ExbD cung cấp năng lượng cho quá trình này cũng tìm thấy trong hệ gen chủng DM10. Hơn nữa, bộ gen DM10 chứa CDS mã hoá cho protein hấp thụ sắt efeOU. Sự hiện diện của các gen mã hóa các protein này cho thấy tồn tại một phức hợp vận chuyển sắt ở chủng DM10.

Sự hòa tan photphate bởi vi khuẩn là một cách khác để tăng cường khả năng thúc đẩy sự phát triển của cây trồng bằng cách cung cấp nguồn dinh dưỡng cho cây trồng. Các hợp chất phosphate khó tan có thể được hòa tan thông qua các axit hữu cơ do các vi sinh vật sản sinh và tiết ra ngoài môi trường. Trong đó, axit quan trọng nhất là axit gluconic được chuyển hóa bởi quinoprotein glucose dehydrogenase (EC1.1.5.2). Enzyme này được mã hóa bởi gen *gcd*, xúc tác quá trình oxy hóa chuyển glucose thành axit gluconic và pyrroloquinoline quinone (pqq) [8]. Chủng DM10 có khả năng hoà tan phosphate (Hình 3.25D), kết quả giải trình tự xác định chủng DM10 mang gen *gcd*. Sự hấp thu photphate vô cơ ở chủng DM10 có thể

được tăng cường bởi các protein điều hòa (*phoB*) và protein cảm biến (*phoR*) với sự tham gia của hai hệ thống vận chuyển photphate ái lực cao khác là *pstSCAB* và *phnD1U*. Kết quả giải trình tự hệ gen cũng xác định chủng DM10 có gen *PhoD* mã hoá cho enzyme phosphatase, đây là một trong những gen quan trọng trong chu trình chuyển hóa lân hữu cơ trong đất. *PhoD* là một enzyme đơn phân có thể thủy phân cả phosphomonoester và phosphodiester [184], con đường này cũng tìm thấy trong bộ gen DM10. Như vậy, chủng DM10 có thể giải phóng phosphate từ dạng phosphate khoáng và các hợp chất hữu cơ.

Amylase là enzyme phân giải tinh bột và có thể đóng một vai trò trong việc thúc đẩy sự phát triển của thực vật bằng cách phân hủy chất hữu cơ trong đất [185]. Chủng DM10 mang gen *amy1* mã hoá cho  $\alpha$ -amylase.



*Hình 3.25.* Định tính các đặc điểm kích thích sinh trưởng thực vật của chủng DM10. (A- IAA tạo màu đỏ với thuốc thử, A1- dịch IAA thô sau lên men được chạy sắc ký bản mỏng) tổng hợp IAA, (B) ACC deaminase, (C) siderophoree, (D) hòa tan phosphate, (E) amylase.

### 3.6.5. Gen liên quan đến khả năng chịu mặn.

Chủng DM10 và C7 là một chủng chịu mặn (halophyte), có khả năng sinh trưởng trong dải nồng độ NaCl từ 0-22%, nồng độ NaCl tối ưu với chủng DM10 và C7 lần lượt là 12,5% và 4% . Các loài chịu mặn thích nghi với sự có mặt của muối bằng cách duy trì sự cân bằng thẩm thấu giữa tế bào chất và môi trường xung quanh thông qua chiến lược “salt- in” (tích tụ nồng độ của kali và clorua) hoặc và chiến lược “salt-out” (các chất hữu cơ hoà tan tương thích) như đã mô tả bởi Ruppel [26].

Chiến lược “salt-in” đòi hỏi sự thích nghi rộng rãi của bộ máy enzyme nội bào với sự có mặt của muối. Trong chiến lược “salt-out” tổng hợp các chất hòa tan tương thích hoạt. Các chất hữu cơ hoà tan tương thích từ các loài ưa mặn bao gồm proline, glycine betaine, trehalose, ectoine/5-hydroxyectoine, glucosylglycerol và

dimethylsulfoniopropionate [26]. Phân tích bộ gen cho thấy chủng DM10 và C7 mang các gen liên quan đến cả hai chiến lược. Hệ thống vận chuyển  $K^+$  được mã hoá bởi các gen *trkAHI*, *ktrAB* và *kdpABC*. Các gen *mnhC*, *mrpDEF* và *nhaP* mã hoá  $Na^+/H^+$  antiporter và gen *nhaP2* mã hoá  $K^+/H^+$  antiporter để bơm  $H^+$  vào và bơm  $Na^+$ ,  $K^+$  ra để chống lại stress thẩm thấu được tìm thấy trong bộ gen của chủng DM10 và C7. Glycine betaine và proline là các chất thẩm thấu hữu cơ chính tích tụ trong nhiều loại vi khuẩn để đối phó với các stress của môi trường như hạn hán, nhiễm mặn và sốc nhiệt [186]. Các gen chính *betA* và *betB/gbsA* tổng hợp glycine-betaine mã hóa tương ứng choline dehydrogenase và betaine aldehyde dehydrogenase được tìm thấy trong chủng DM10 và C7. Ngoài ra, chủng DM10 và C7 bao gồm các gen *opuAA*, *opuAB*, *opuCA* và *opuE* mã hóa các hợp chất vận chuyển glycine betaine/proline/choline. Một chất bảo vệ thẩm thấu khác là trehalose. Cho đến nay, có năm con đường sinh tổng hợp trehalose đã được tìm thấy trong vi khuẩn bao gồm *treS*, *otsA/otsB*, *treP*, *treT* và *treY/treZ* [187]. Ở đây, con đường *treY/treZ* đã được tìm thấy trong bộ gen của chủng DM10. Maltosedextrin được chuyển thành maltooligosyl-trehalose bởi maltooligosyl trehalose synthase (*treY*). Maltooligosyl-trehalose sau đó được thủy phân thành trehalose được xúc tác bởi hoạt tính malto-oligosyl-trehalose trehalohydrolase (*treZ*). Cuối cùng, trehalose có thể bị thủy phân bởi trehalase tế bào chất (*treF*). Gen tổng hợp ectoine cũng được tìm thấy trong hệ gen chủng DM10 và C7. Tổng hợp ectoine thu được từ L-aspartate- $\beta$ -semialdehyde và bao gồm ba bước được xúc tác bởi L-2,4-diaminobutyric axit acetyltransferase (*EctA*), Diaminobutyrate-2-oxoglutarate transaminase (*EctB*) và L-ectoine synthase (*EctC*) để tạo ra phân tử ectoine mạch vòng [189]. Chủng DM10 và C7 cũng có thể tổng hợp một dẫn xuất hydroxyl hóa của ectoine-5-hydroxyectoine bằng cách xúc tác bởi ectoine dioxygenase (*EctD*) [190].

### 3.6.6. Các gen liên quan đến hệ thống bài tiết

Hệ thống bài tiết của vi khuẩn là các phức hợp protein có trên màng tế bào, cũng là hệ thống giúp chúng dễ xâm nhập vào tế bào vật chủ. Chủng DM10 có 6 hệ thống tiết protein bao gồm các loại I, II, IV, VI, Tat và Sec. Chủng DM10 có cả hai hệ thống tiết Sec và Tat, là hai hệ thống vận chuyển rộng rãi qua màng tế bào chất

[191]. Trong bộ gen của chủng DM10, hệ Tat bao gồm tatABC, hệ Sec chứa secABDEFY, thường được tìm thấy ở vi khuẩn gram âm [192].

### ***3.6.7. Các gen liên quan đến quá trình nội sinh***

Vi sinh vật nội sinh (endophyte) là những loài vi sinh vật cư trú trong mô thực vật trong phần lớn vòng đời của chúng mà không có bất kỳ tác động bất lợi nào đối với cây chủ. Việc sử dụng các loài vi sinh vật tự nhiên này mang lại cơ hội để tối đa hóa năng suất cây trồng đồng thời giảm tác động bất lợi của nông nghiệp với môi trường. Endophyte thúc đẩy sự phát triển của thực vật thông qua quá trình cố định nitơ, sản xuất phytohormone, thu nhận chất dinh dưỡng và bằng cách tạo ra khả năng chống chịu với các stress phi sinh học và sinh học. Sự xâm nhập của endophytes là rất quan trọng để cung cấp những lợi ích này cho cây chủ [197].

Theo mô tả của Taghawi và cộng sự (2010) [193] qua trình nội sinh bao gồm bốn bước, đầu tiên là sự di chuyển về phía rễ cây bằng chuyển động hoặc hóa hướng động, bước 2 và 3 là bám dính và xâm lấn bề mặt rễ, bước 4 là xâm chiếm vào trong mô thực vật. Bộ gen DM10 chứa các gen liên quan đến sự chuyển động qua lông roi và type IV pili, cũng như các gen liên quan đến các chất hoá hướng động (chemotaxis) hỗ trợ quá trình xâm nhập vào mô thực vật.

## KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

### KẾT LUẬN

1. Tuyển chọn được 65 chủng vi khuẩn chịu mặn sinh IAA từ 423 chủng phân lập từ 66 mẫu. Sàng lọc được 18/65 chủng sinh ACC deaminase, 25/65 chủng phân giải phosphate, 29/65 chủng cố định nitơ và 20/65 chủng phân giải cellulose. Đã xác định các đặc điểm hình thái, sinh hoá và giải trình tự 16S rRNA để định danh 12 chủng vi khuẩn chọn lọc. Căn cứ vào khả năng sinh chất kích thích sinh trưởng thực vật, nguồn gốc phân lập và phân loại đã lựa chọn được 6 chủng gồm *M. pelagius* C7, *S. tamaricis* DM10, *B. aryabhatai* RL7, *M. endophytica* STT1.1.2, *B. endophyticus* D1.2.2 và *B. subtilis* RL5. Đã nghiên cứu ảnh hưởng của một số yếu tố (nhiệt độ, pH, NaCl, nguồn carbon, nitơ và tryptophan) đến khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp IAA của chủng 6 chủng chọn lọc C7, DM10, RL5, RL7, STT1.1.2 và D1.2.2.

2. Đánh giá khả năng hỗ trợ cây lúa sinh trưởng và phát triển trong điều kiện stress mặn của các chủng vi khuẩn DM10, RL5, RL7, STT1.1.2 và D1.2.2. Lựa chọn được hai chủng RL7 và DM10 có khả năng hỗ trợ cây lúa chịu mặn tốt nhất. Chủng RL7 và DM10 hỗ trợ cây lúa chịu mặn và làm tăng cường sự biểu hiện của 7 gen liên quan đến đáp ứng mặn ở cây lúa gồm *NADPMe2*, *SOS1*, *PRI*, *MYC2*, *NHX1*, *CAT* và *SOD*.

3. Giải trình tự toàn bộ hệ gen của chủng *S. tamaricis* DM10 và *M. pelagius* C7 trên cơ sở đó đã xác định được các gen liên quan đến khả năng kích thích sinh trưởng (khả năng phân giải phosphate, tổng hợp ACC deaminase và sinh siderophores), khả năng chịu mặn và khả năng nội sinh.

### KIẾN NGHỊ

Chủng *B. aryabhatai* RL7 và *S. tamaricis* DM10 là các chủng có nhiều tiềm năng ứng dụng để sản xuất chế phẩm sinh học sử dụng cho các vùng trồng lúa có nguy cơ bị nhiễm mặn. Vì vậy, cần xây dựng quy trình sản xuất chế phẩm cũng như thử nghiệm trên quy mô ruộng đồng để đánh giá hiệu quả chủng RL7 và DM10.

## DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH

1. Vũ Văn Dũng, Nguyễn Ngọc Lan, Nguyễn Huy Hoàng, Nguyễn Thị Kim Liên, Nguyễn Thị Thanh Ngân, Nguyễn Thu Hiền, Đỗ Hữu Nghi, Nguyễn Huy Chung. *Đánh giá khả năng sinh chất kích thích sinh trưởng thực vật của vi khuẩn nội sinh chịu mặn từ thân rễ lúa trồng ở Thái Bình*. Hội nghị Khoa học Công nghệ sinh học toàn quốc, Hà Nội, 2018, 810-816.

2. Nguyen Ngoc Lan, Vu Van Dung, Nguyen Thi Kim Lien, Nguyen Kim Thoa, Do Huu Nghi, Nguyen Huy Hoang. *Isolation and characterization of indole acetic acid producing bacteria from coasts of Ben Tre and Tra Vinh provinces*. Tạp chí Sinh học, 2019, 41 (4), 55-67.

3. Vũ Duy Nhân, Vũ Văn Dũng, Trần Thị Nguyệt, Lê Đức Anh, Nguyễn Thị Nhân, Nguyễn Huy Hoàng, Đỗ Hữu Nghi, Lê Thị Yên, Nguyễn Thị Lý. *Phân lập và đánh giá khả năng phân giải phosphate khó tan của các chủng vi sinh vật chịu mặn phân lập từ đất trên quần đảo Trường Sa*. Tạp chí Nghiên cứu Khoa học và Công nghệ quân sự, 2020, số đặc san Hội thảo Quốc gia FEE, 248-254.

4. Vũ Văn Dũng, Nguyễn Ngọc Lan, Lê Đức Anh, Nguyễn Thị Nhân, Đỗ Hữu Nghi, Nguyễn Huy Hoàng. *Nghiên cứu sự biểu hiện của một số gen liên quan đến đáp ứng mặn của cây lúa dưới sự hỗ trợ của chủng vi sinh vật *Bacillus aryabhatai* RL7*. Tạp chí Nghiên cứu Khoa học và Công nghệ quân sự, 2021, số đặc san HNKH dành cho NCS và CBNC trẻ, 534-538.

5. Vũ Văn Dũng, Vũ Duy Nhân, Trần Thị Nguyệt, Lê Đức Anh, Nguyễn Thị Nhân, Nguyễn Huy Hoàng, Đỗ Hữu Nghi, Lê Thị Yên, Nguyễn Thị Lý. *Sàng lọc và đánh giá khả năng phân giải cellulose của các chủng vi sinh vật chịu mặn phân lập từ đất trên quần đảo Trường Sa*. Tạp chí Nghiên cứu Khoa học và Công nghệ quân sự, 2022, Số 81, 185-190.

6. Ngoc-Lan Nguyen, Vu Van Dung, Nguyen Van Tung, Huy-Hoang Nguyen. *Draft Genome Sequence of *Marinobacter* sp. Strain C7 Isolated from Seawater in Con Bung Coast, Vietnam*. Microbiol Resour Announc., 2022, 11(7):e0040422.



## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. A. Chauhan, R. Saini, C.J. Sharma, *Plant growth promoting rhizobacteria and their biological properties for soil enrichment and growth promotion*. J. Plant Nutr., 2021, 46, 1-27.
2. C.M. Orozco-Mosqueda, A. Flores, B. Rojas-Sánchez, et al., *Plant Growth-Promoting Bacteria as Bioinoculants: Attributes and Challenges for Sustainable Crop Improvement*. Agron., 2021, 11, 1167.
3. S.D. Nachiket, S. Dhirendra, K.S. Ramesh, et al., *Nitrogenase Enzyme*. Der Pharmacia Sinica, 2010, 1(2), 77-84.
4. W. Arnold, A. Rump, W. Klipp, et al., *Nucleotide sequence of a 24,206-base-pair DNA fragment carrying the entire nitrogen fixation gene cluster of Klebsiella pneumoniae*. J. Mol. Biol., 1988, 203, 715-738.
5. Y. Jesmi, T. Jabir, R. Mujeeb, et al., *Nitrogen fixing potential of various heterotrophic Bacillus strains from a tropical estuary and adjacent coastal regions*. J. Basic Microbiol., 2017, (11), 922-932.
6. Văn Thị Phương Như, Cao Ngọc Điệp, *Ảnh hưởng của vi sinh vật Azospirillum amazonense và Burkholderia kururiensis lên sự sinh trưởng và năng suất của lúa cao sản (Giống lúa Ma Lâm 213) trồng trên đất thịt pha cát ở thành phố Tuy Hòa, tỉnh Phú Yên*. Tạp chí khoa học trường Đại học Cần Thơ, 2014, 33b, 85-96.
7. S.B. Sharma, R.Z. Sayyed, M.H. Trivedi, et al., *Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils*. Springer Plus, 2013, 2, 587-565.
8. M. Satyaprakash, T. Nikitha, U.B. Reddi et al., *A review on phosphorous and phosphate solubilising bacteria and their role in plant nutrition*. Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci., 2017, 6, 2133-2144.
9. Y. Li, J. Zhang, Z. Gong, W. Xu, et al., *Gcd gene diversity of quinoprotein glucose dehydrogenase in the sediment of Sancha Lake and its response to the environment*. Int. J. Environ. Res. Public Health, 2018, 16(1), 1.
10. A. Kumar, H. Patel, *Role of microbes in phosphorus availability and acquisition by plants*. Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci., 2018, 7 (5), 1344-1347.

11. P.N. Bhattacharyya, D.K. Jha, *Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture*. World J. Microbiol. Biotechnol., 2012, 28, 1327-1350.
12. F. Zhu, L. Qu, X. Hong, et al., *Isolation and characterization of a phosphate solubilizing halophilic bacterium Kushneria sp. YCWA18 from Daqiao Saltern on the coast of yellow sea of China*. Evid. Based Complement Alternat. Med., 2011, 615032
13. Văn Thị Phương Như, Cao Ngọc Điệp, *Ảnh hưởng của vi sinh vật Pseudomonas putida và Bacillus subtilis đến sinh trưởng và năng suất của giống lúa cao sản Ma Lâm 23 trên đất thịt pha cát thành phố Tuy Hòa, tỉnh Phú Yên*. Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, 2014, 23, 65-72.
14. Y. Zhao, *Auxin biosynthesis and its role in plant development*. Annu. Rev. Plant Biol., 2010, 61, 49-64.
15. P. Zhang, T. Jin, S.S. Kumar, et al., *The distribution of tryptophan-dependent indole-3-acetic acid synthesis pathways in bacteria unraveled by Large-Scale Genomic Analysis*. Molecules. 2019, 24(7),1411.
16. S. Spaepen, J. Vanderleyden, R. Remans, *Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling*. FEMS Microbiol. Rev., 2007, 31, 425–448.
17. D. Duca, J. Lorv, C.L.Patten, et al., *Indole-3-acetic acid in plant–microbe interactions*. Antonie Van Leeuwenhoek, 2014,106,85–125
18. T. Oberhänsli, G. Défago, D. Haas, *Indole-3-acetic acid (IAA) synthesis in the biocontrol strain CHA0 of Pseudomonas fluorescens: Role of tryptophan side chain oxidase*. Microbiology, 1991,137, 2273-2279.
19. S. Spaepen, J.Vanderleyden, *Auxin and plant-microbe interactions*. Cold Spring Harb. Perspect. Biol., 2010, 3, a001438.
20. R. Raghuwanshi, J.K. Prasad, *Perspectives of rhizobacteria with ACC deaminase activity in plant growth under abiotic stress*. In Root Biology, 2018, 303–321.
21. J. Saikia, R.K. Sarma, R. Dhandia, et al., *Alleviation of drought stress in pulse crops with ACC deaminase producing rhizobacteria isolated from acidic soil of Northeast India*. Sci. Rep., 2018, 8, 3560.

22. M. Miethke, M.A. Marahiel, *Siderophore-Based Iron Acquisition and Pathogen Control*. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 2007, 71(3), 413-51.
23. J. Isabelle, R. Coraline, G. Julien, *An overview of siderophore biosynthesis among fluorescent Pseudomonads and new insights into their complex cellular organization*. Environ. Microbiol., 2020, 22 (4), 1447-1466.
24. S. Rungin, C. Indananda, P. Suttiviriya, et al., *Plant growth enhancing effects by a siderophore-producing endophytic streptomycete isolated from a Thai jasmine rice plant (Oryza sativa L. cv. KDML105)*. Antonie Van Leeuwenhoek, 2012, 102(3), 463–472.
25. H. Larsen, *Halophilic and halotolerant microorganisms-an overview and historical perspective*. FEMS Microbiol. Lett., 1986, 39, 3–7.
26. S. Ruppel, P. Franken, *Properties of the halophyte microbiome and their implications for plant salt tolerance*. Funct.Plant Biol., 2013, 40, 940–951.
27. Y. Qin, I.S. Druzhinina, X. Pan, et al., *Microbially mediated plant salt tolerance and microbiome-based solutions for saline agriculture*. Biotechnol. Adv., 2016, 34, 1245–1259.
28. S. Tiwari, P. Singh, R. Tiwari, et al., *Salt-tolerant rhizobacteria-mediated induced tolerance in wheat (Triticum aestivum) and chemical diversity in rhizosphere enhance plant growth*. Biol. Fertil. Soils, 2011, 47, 907.
29. S. Zhang, C. Fan, Y. Wang, et al., *Salt-tolerant and plant-growth-promoting bacteria isolated from high-yield paddy soil*. Can. J. Microbiol., 2018, 64, 968–978.
30. E.V. Zelm, Y. Zhang, C. Testerink, *Salt tolerance mechanisms of plants*. Annu. Rev. Plant Biol., 2020, 71, 403-433.
31. Z.V. Sandhya, S.Z. Ali, M. Grover, et al., *Effect of plant growth promoting Pseudomonas spp. on compatible solutes, antioxidant status and plant growth of maize under drought stress*. Plant Growth Regul., 2010, 62, 21–30.
32. J. Mishra, T.Fatima, N.K. Arora, *Role of secondary metabolites from plant growth-promoting rhizobacteria in combating salinity stress in Plant*. Microbiome: Stress Response, 127–163.

33. S. Vardharajula, S.Z. Ali, M. Grover, et al., *Drought-tolerant plant growth promoting Bacillus spp.: effect on growth, osmolytes, and antioxidant status of maize under drought stress*. J. Plant Interact., 2011, 6, 1-14.
34. C. Santi, D. Bogusz, C. Franche, *Biological nitrogen fixation in non-legume plants*. Ann. Bot., 2013, 111, 743–767.
35. N. Vasanthi, L. Saleena, S. Raj, *Silica solubilization potential of certain bacterial species in the presence of different silicate minerals*. Silicon, 2018, 10, 267–275.
36. W.J. Kloepper, J. Leon, M. Teintze, et al., *Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria*. Nature, 1980, 286, 885–886.
37. D. Saghaf, M. Ghorbanpour, B.L. Asgari, *Efficiency of Rhizobium strains as plant growth promoting rhizobacteria on morpho-physiological properties of Brassica napus L. under salinity stress*. J. Soil Sci. Plant Nutr., 2018, 18(1), 253–268
38. D. Barnawal, R. Singh, *Role of plant growth promoting rhizobacteria in drought tolerance: regulating growth hormones and osmolytes*. In: Singh AK, Kumar A, Singh PK (eds) *PGPR amelioration in sustainable agriculture*. Woodhead Publishing, 2019, 107–128.
39. B.R. Glick, B. Todorovic, J. Czarny, et al., *Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase*. Crit. Rev. Plant. Sci., 2007, 26, 227–242.
40. F. Aslam, B. Ali, *Halotolerant bacterial diversity associated with Suaeda fruticosa (L.) forssk. improved growth of maize under salinity stress*. Agronomy, 2018, 8, 131.
41. R. Jaemsaeng, C. Jantasuriyarat, A. Thamchaipenet, *Molecular interaction of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase (ACCD)-producing endophytic Streptomyces sp. GMKU 336 towards salt-stress resistance of Oryza sativa L. cv. KDML105*. Sci. Rep., 2018, 8, 1950.
42. D. Bingbing, L. Lin, C. Guoqiao, et al., *ACC Deaminase-producing PGPRs Improve Drought Stress Tolerance in Grapevine (Vitis vinifera L.)*. Front. Plant Sci., 2021, 12, 1849.

43. C.P. Bogino, M.M. Oliva, G.F. Sorroche, et al., *The Role of Bacterial Biofilms and Surface Components in Plant-Bacterial Associations*. *Int. J. Mol. Sci.*, 2013, 14, 15838–15859.
44. T.M. Atouei, A. Pourbabae, M. Shorafa, *Alleviation of salinity stress on some growth parameters of wheat by exopolysaccharide-producing bacteria*. *Ir. J. Sci. Technol.*, 2019, 43, 2725–2733.
45. N.T. Chu, T.H.T. Tran, L.V. Bao, *Plant growth-promoting rhizobacterium Pseudomonas PS01 induces salt tolerance in Arabidopsis thaliana*. *BMC Res. Notes*, 2019, 12, 11.
46. F. Islam, T. Yasmeen, S.M. Arif, et al., *Plant growth promoting bacteria confer salt tolerance in Vigna radiata by up-regulating antioxidant defense and biological soil fertility*. *Plant Growth Regul.*, 2016, 80, 23–36.
47. A.M. El-Esawi, A.A. Al-Ghamdi, M.H. Ali, et al., *Azospirillum lipoferum FK1 confers improved salt tolerance in chickpea (Cicer arietinum L.) by modulating osmolytes, antioxidant machinery and stress related genes expression*. *Environ. Exp. Bot.*, 2019, 159, 55–65.
48. D. Patel, M. Saraf, *Influence of soil ameliorants and microflora on induction of antioxidant enzymes and growth promotion of (Jatropha curcas L.) under saline condition*. *Eur. J. Soil Biol.*, 2013, 55, 47–54.
49. J. Sukweenadhi, Y.J. Kim, E.S. Choi, et al., *Paenibacillus yonginensis DCY84T induces changes in Arabidopsis thaliana gene expression against aluminum, drought, and salt stress*. *Microbiol. Res.*, 2015, 172, 7–1.
50. K. Kim, Y.J. Jang, S.M. Lee, et al., *Alleviation of salt stress by Enterobacter sp. EJ01 in tomato and Arabidopsis is accompanied by up-regulation of conserved salinity responsive factors in plants*. *Mol. Cells*, 2014, 37, 109–117.
51. Q.S. Niu, H.R. Li, P. Pare, et al., *Induced growth promotion and higher salt tolerance in the halophyte grass Puccinellia tenuiflora by beneficial rhizobacteria*. *Plant Soil*, 2016, 407, 217–230.
52. A.M. Khan, S. Asaf, A.L. Khan, et al., *Rhizobacteria AK1 remediates the toxic effects of salinity stress via regulation of endogenous phytohormones and gene expression in soybean*. *Biochem. J.*, 2019, 476, 2393–2409.

53. A. Razzaq, A. Ali, L.B. Safdar, et al., *Salt stress induces physiochemical alterations in rice grain composition and quality*. J. Food Sci., 2020, 85, 14-20.
54. J.K. Zhu, *Abiotic stress signaling and responses in plants*. Cell, 2016, 167, 313-324.
55. M. Hakim, A.S. Juraimi, M.M. Hanafi, et al., *The effect of salinity on growth, ion accumulation and yield of rice varieties*. J. Anim Plant Sci., 2014, 24, 874-885.
56. C. Zhao, H. Zhang, C. Song, et al., *Mechanisms of plant responses and adaptation to soil salinity*. Innovation, 2020, 1, 100017.
57. H. Wu, X. Zhang, J.P. Giraldo, et al., *It is not all about sodium: revealing tissue specificity and signalling roles of potassium in plant responses to salt stress*. Plant Soil, 2018, 431, 1-17.
58. M. Seifikalhor, S. Aliniaiefard, A. Shomali, et al., *Calcium signaling and salt tolerance are diversely entwined in plants*. Plant Signal Behav., 2019, 14, 1665455.
59. M.A. Ahanger, N.S. Tomar, M. Tittal, et al., *Plant growth under water/salt stress: ROS production; antioxidants and significance of added potassium under such conditions*. Physiol. Mol. Biol. Plants., 2017, 23, 731-744.
60. H.H. Fu, S. Luan, *AtKUP1: a dual-affinity K<sup>+</sup> transporter from Arabidopsis*. Plant Cell, 1998, 10, 63-73.
61. M. Ashraf, P. Harris, *Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants*. Plant Sci., 2004, 166, 3-16.
62. M. Tester, R. Davenport, *Na<sup>+</sup> tolerance and Na<sup>+</sup> transport in higher plants*. Ann. Bot., 2003, 91, 503-527.
63. Y. Yang, Y. Guo, *Unraveling salt stress signaling in plants*. J. Integr. Plant Biol., 2018, 60, 796-804.
64. H.E Mahi, J. Pérez-Hormaeche, A. De Luca, et al., *A critical role of sodium flux via the plasma membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger SOS1 in the salt tolerance of rice*. Plant Physiol., 2019, 180, 1046-1065.

65. H. Shi, F.J. Quintero, J.M. Pardo, et al., *The putative plasma membrane Na(+)/H(+) antiporter SOS1 controls long-distance Na(+) transport in plants.* Plant Cell, 2002, 14(2), 465-477.
66. H. Shi, B.H. Lee, S.J. Wu, et al., *Overexpression of a plasma membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene improves salt tolerance in Arabidopsis thaliana.* Nat Biotechnol., 2003, 21(1), 81-85.
67. A. Fukuda, A. Nakamura, N. Hara, et al., *Molecular and functional analyses of rice NHX-type Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter genes.* Planta, 2011, 233, 175-188.
68. S. Liu, L. Zheng, Y. Xue, et al., *Overexpression of OsVP1 and OsNHX1 increases tolerance to drought and salinity in rice.* J. Plant Biol., 2010, 53, 444-452.
69. U. Halfter, M. Ishitani, J.K. Zhu, *The Arabidopsis SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium-binding protein SOS3.* Proc. Natl. Acad. Sci., 2000, 97 (7), 3735-3740.
70. Y. Guo, Q.S. Qiu, F.J. Quintero, et al., *Transgenic evaluation of activated mutant alleles of SOS2 reveals a critical requirement for its kinase activity and C-terminal regulatory domain for salt tolerance in Arabidopsis thaliana.* Plant Cell, 2004, 16 (2), 435-449.
71. E. Blumwald, *Sodium transport and salt tolerance in plants.* Curr. Opin Cell Biol., 2000, 12 (4), 431-434.
72. N. Ye, L. Jia, J. Zhang, *ABA signal in rice under stress conditions.* Rice, 2012, 5, 1-9.
73. R. Welsch, F. Wust, C. Bar, et al., *A third phytoene synthase is devoted to abiotic stress-induced abscisic acid formation in rice and defines functional diversification of phytoene synthase genes.* Plant Physiol., 2008, 147, 367-380.
74. Q.S. Ouyang, F.Y. Liu, P. Liu, et al., *Receptor-like kinase OsSIK1 improves drought and salt stress tolerance in rice (Oryza sativa) plants.* Plant J., 2010, 62, 316-329.
75. F.S. Fu, C.W. Chou, D. D. Huang, et al., *Transcriptional regulation of a rice mitogen-activated protein kinase gene, OsMAPK4, in response to environmental stresses.* Plant Cell Physiol., 2002, 43, 958-963.

76. L. Xiong, Y. Yang, *Disease resistance and abiotic stress tolerance in rice are inversely modulated by an abscisic acid-inducible mitogen-activated protein kinase*. *Plant Cell*, 2003, 15, 745–759.
77. T. Asano, M. Hakata, H. Nakamura, et al., *Functional characterisation of OsCPK21, a calcium-dependent protein kinase that confers salt tolerance in rice*. *Plant Mol Biol.*, 2011, 75, 179-91.
78. Y. Kobayashi, S. Yamamoto, H. Minami, et al., *Differential activation of the rice sucrose nonfermenting1-related protein kinase2 family by hyperosmotic stress and abscisic acid*. *Plant Cell*, 2004, 16, 1163–1177.
79. C. J. Diedhiou, V. O. Popova, J. K. Dietz, et al., *The SNF1-type serine-threonine protein kinase SAPK4 regulates stress-responsive gene expression in rice*. *BMC Plant Biol.*, 2008, 8, 49.
80. D. Todaka, K. Nakashima, K. Shinozaki, et al., *Towards understanding transcriptional regulatory networks in abiotic stress responses and tolerance in rice*. *Rice*, 2012, 5, 6.
81. A. M. Hossain, I. J. Cho, M. Han, et al., *The ABRE binding bZIP transcription factor OsABF2 is a positive regulator of abiotic stress and ABA signaling in rice*. *J. Plant Physiol.*, 2010, 167, 1512–1520.
82. Y. Xiang, N. Tang, H. Du, et al., *Characterization of OsbZIP23 as a key player of the basic leucine zipper transcription factor family for conferring abscisic acid sensitivity and salinity and drought tolerance in rice*. *Plant Physiol.*, 2008, 148,1938-1952.
83. S. Ogawa, R. Kawahara-Miki, K. Miyamoto, et al., *OsMYC2 mediates numerous defence-related transcriptional changes via jasmonic acid signalling in rice*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2017, 486(3), 796-803.
84. V. Deepanjali, K.J. Siddhi, B.K. Prakash, et al., *A bHLH transcription factor, MYC2, imparts salt intolerance by regulating proline biosynthesis in Arabidopsis*. *The EFBS Journal*, 2020, 287(12), 2560-2576.
85. H. Hu, M. Dai, J. Yao, et al., *Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006, 103, 12987–12992.



86. J.P.Chung, Y.S. Kim, J. Jeong, et al., *The histone deacetylase OsHDAC1 epigenetically regulates the OsNAC6 gene that controls seedling root growth in rice*. Plant J., 2009, 59, 764–776.
87. H. Takasaki, K. Maruyama, S. Kidokoro, et al., *The abiotic stress-responsive NAC-type transcription factor OsNAC5 regulates stress-inducible genes and stress tolerance in rice*. Mol. Genet. Genom., 2010, 284, 173–183.
88. Q. D. Xu, J. Huang, S.Q. Guo, et al., *Overexpression of a TFIIIA-type zinc finger protein gene ZFP252 enhances drought and salt tolerance in rice (Oryza sativa L.)*. FEBS Lett., 2008, 582, 1037–1043.
89. J. S. Sun, Q.S. Guo, X. Yang, et al., *Functional analysis of a novel Cys2/His2-type zinc finger protein involved in salt tolerance in rice*. J. Exp. Bot., 2010, 61, 2807–2818.
90. D. Qiu, J. Xiao, W. Xie, et al., *Rice gene network inferred from expression profiling of plants overexpressing OsWRKY13, a positive regulator of disease resistance*. Mol. Plant, 2008, 1, 538–551.
91. Z. Tao, Y. Kou, H. Liu, et al., *OsWRKY45 alleles play different roles in abscisic acid signalling and salt stress tolerance but similar roles in drought and cold tolerance in rice*. J. Exp. Bot., 2011, 62, 4863–4874.
92. P. Gao, X. Bai, L. Yang, et al., *Osa-MIR393: a salinity and alkaline stress-related microRNA gene*. Mol. Biol. Rep., 2011, 38, 237–242.
93. G. J. Dubouzet, Y. Sakuma, Y. Ito, et al., *OsDREB genes in rice, Oryza sativa L. encode transcription activators that function in drought, high salt and cold-responsive gene expression*. Plant J., 2003, 33, 751–763.
94. Q. Wang, Y. Guan, Y. Wu, et al., *Overexpression of a rice OsDREB1F gene increases salt, drought, and low temperature tolerance in both Arabidopsis and rice*. Plant Mol. Biol., 2008, 67, 589–602.
95. G. Mallikarjuna, K. Mallikarjuna, *Expression of OsDREB2A transcription factor confers enhanced dehydration and salt stress tolerance in rice (Oryza sativa L.)*. Biotechnol. Lett., 2011, 33, 1689–1697.
96. S. Breen, S.J. Williams, M. Outram, et al., *Emerging Insights into the Functions of Pathogenesis-Related Protein 1*. Trends Plant Sci., 2017, 22(10), 871–879.

97. S. Liu, Y. Cheng, X. Zhang, et al., *Expression of an NADP-malic enzyme gene in rice (Oryza sativa. L.) is induced by environmental stresses; over-expression of the gene in Arabidopsis confers salt and osmotic stress tolerance*. Plant Mol. Biol., 2007, 64, 49–58.
98. Q. Guan, X. Liao, M. He, et al., *Tolerance analysis of chloroplast OsCu/Zn-SOD overexpressing rice under NaCl and NaHCO<sub>3</sub> stress*. PLoS ONE, 2017, 12, e0186052.
99. A. Sarkar, K. P. Ghosh, K. Pramanik, et al., *A halotolerant Enterobacter sp. displaying ACC deaminase activity promotes rice seedling growth under salt stress*. Microbiol. Res., 2018, 169, 20–32.
100. A. Andreozzi, P. Prieto, J. Mercado-Blanco, et al., *Efficient colonization of the endophytes Herbaspirillum huttiense RCA24 and Enterobacter cloacae RCA25 influences the physiological parameters of Oryza sativa L. cv. Baldo rice*. Environ. Microbiol., 2019, 21(9), 3489-3504.
101. S. Yoolong, W. Kruasuwan, T.H.P. Thanh, et al., *Modulation of salt tolerance in Thai jasmine rice (Oryza sativa L. cv. KDML105) by Streptomyces venezuelae ATCC 10712 expressing ACC deaminase*. Sci. Rep., 2019, 9, 1275.
102. M. Shahid, A.A. Shah, F. Basit, et al. *Achromobacter sp. FB-14 harboring ACC deaminase activity augmented rice growth by upregulating the expression of stress-responsive CIPK genes under salinity stress*. Braz. J. Microbiol., 2020, 51(2), 719-728.
103. A. Sagar, Z.R. Sayyed, W.P. Ramteke, et al., *ACC deaminase and antioxidant enzymes producing halophilic Enterobacter sp. PR14 promotes the growth of rice and millets under salinity stress*. Physiol. Mol. Biol. Plants, 2020, 26(9), 1847-1854.
104. S. Sultana, C. S. Paul, S. Parveen, et al., *Isolation and identification of salt-tolerant plant-growth-promoting rhizobacteria and their application for rice cultivation under salt stress*. Can. J. Microbiol., 2020, 66(2),144-160.
105. P. Pritesh, P. Avnika, P. Kinjal, et al., *Amelioration effect of salt-tolerant plant growth-promoting bacteria on growth and physiological properties of rice (Oryza sativa) under salt-stressed conditions*. Arch. Microbiol., 2020, 202(9), 2419-2428.

106. Z. Taja, D. Challabathula, *Protection of Photosynthesis by Halotolerant Staphylococcus sciuri ET101 in Tomato (Lycopersicon esculentum) and Rice (Oryza sativa) Plants During Salinity Stress: Possible Interplay Between Carboxylation and Oxygenation in Stress Mitigation*. *Front. Microbiol.*, 2021, 11, 547750.
107. S. Ahmed, T.Y. Heo, C. Roy, et al., *Accumulation of compatible solutes in rice (Oryza sativa L.) cultivars by inoculation of endophytic plant growth promoting bacteria to alleviate salt stress*. *Appl. Biol. Chem.*, 2021, 64, 68.
108. C. Bianco, A. Andreozzi, S. Romano, et al., *Endophytes from African Rice (Oryza glaberrima L.) Efficiently Colonize Asian Rice (Oryza sativa L.) Stimulating the Activity of Its Antioxidant Enzymes and Increasing the Content of Nitrogen, Carbon, and Chlorophyll*. *Microorganisms*. 2021, 9(8), 1714.
109. A. Kumar, S. Singh, M. Arpan, et al., *Salt-tolerant plant growth-promoting Bacillus pumilus strain JPVS11 to enhance plant growth attributes of rice and improve soil health under salinity stress*. *Microbiol. Res.*, 2021, 242, 126616.
110. P. Rangseekeaw, A. Barros-Rodríguez, W. Manzanera, *Deep-Sea Actinobacteria Mitigate Salinity Stress in Tomato Seedlings and Their Biosafety Testing*. *Plants*, 2021, 10, 1687.
111. I. Mellidou, A. Ainalidou, A. Papadopoulou, et al., *Comparative Transcriptomics and Metabolomics Reveal an Intricate Priming Mechanism Involved in PGPR-Mediated Salt Tolerance in Tomato*. *Front. Plant Sci.*, 2021, 12, 713984.
112. H.C. Liu, Y.T. Hung, Y.T. Jiang, et al., *1-Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) Deaminase Gene in Pseudomonas azotoformans Is Associated with the Amelioration of Salinity Stress in Tomato*. *J. Agric. Food Chem.*, 2021, 69(3), 913-921.
113. M.G. Farahat, M.K. Mahmoud, S.H. Youseif, et al., *Alleviation of salinity stress in wheat by ACC deaminase-producing Bacillus aryabhatai EWR29 with multifarious plant growth-promoting attributes*. *Plant Archives*, 2020, 20(1), 417-429.

114. S. Mehmood, A.A. Khan, F. Shi, et al., *Alleviation of Salt Stress in Wheat Seedlings via Multifunctional Bacillus aryabhatai PM34: An In-Vitro Study*. Sustainability, 2021, 13, 8030.
115. Q.H. Li, W.X. Jiang, *Inoculation with plant growth-promoting bacteria (PGPB) improves salt tolerance of maize seedling*. Russ. J. Plant Physl., 2017, 64, 235–241.
116. J. Fukami, C. De La Osa, J. F. Ollero, et al., *Co-inoculation of maize with Azospirillum brasilense and Rhizobium tropici as a strategy to mitigate salinity stress*. Funct. Plant Biol., 2018, 45, 328–339.
117. S. Misra, S.P. Chauhan, *ACC deaminase-producing rhizosphere competent Bacillus spp. mitigate salt stress and promote Zea mays growth by modulating ethylene metabolism*. Biotech., 2020, 10, 119.
118. J. Peng, J. Ma, *Accumulation of beneficial bacteria in the rhizosphere of maize (Zea mays L.) grown in a saline soil in responding to a consortium of plant growth promoting rhizobacteria*. Ann. Microbiol., 2021, 71, 40.
119. R.M. Sofy, A.A. Aboseidah, A.S. Heneidak, et al., *ACC deaminase containing endophytic bacteria ameliorate salt stress in Pisum sativum through reduced oxidative damage and induction of antioxidative defense systems*. Environ. Sci. Pollut. Res. Int., 2021, 28(30), 40971-40991.
120. S. Tewari, K. N. Arora, *Fluorescent pseudomonas sp. PF17 as an efficient plant growth regulator and biocontrol agent for sunflower crop under saline conditions*. Symbiosis, 2016, 68, 99–108.
121. T. Yasmeen, A. Ahmad, M.S.Arif, et al., *Biofilm forming rhizobacteria enhance growth and salt tolerance in sunflower plants by stimulating antioxidant enzymes activity*. Plant Physiol. Biochem., 2020, 156, 242-256.
122. A. M. El-Esawi, A. I. Alaraidh, A. A. Alsahli, et al., *Bacillus firmus (SW5) augments salt tolerance in soybean (Glycine max L.) by modulating root system architecture, antioxidant defense systems and stress-responsive genes expression*. Plant Physiol. Biochem., 2018, 132, 375–384.
123. H. Yasmin, S. Naeem, M. Bakhtawar, et al., *Halotolerant rhizobacteria Pseudomonas pseudoalcaligenes and Bacillus subtilis mediate systemic*

- tolerance in hydroponically grown soybean (Glycine max L.) against salinity stress.* PLoS ONE, 2020, 5(4), e0231348.
124. C. Nautiyal, S. Srivastava, S. P. Chauhan, et al., *Plant growth-promoting bacteria Bacillus amyloliquefaciens NBRISN13 modulates gene expression profile of leaf and rhizosphere community in rice during salt stress.* Plant Physiol. Biochem., 2013, 66, 1–9.
  125. I. Pinedo, T. Ledger, M. Greve, et al., *Burkholderia phytofirmans PsJN induces long-term metabolic and transcriptional changes involved in Arabidopsis thaliana salt tolerance.* Front. Plant Sci., 2015, 6, 466.
  126. L. Chen, Y. Liu, G. Wu, et al., *Induced maize salt tolerance by rhizosphere inoculation of Bacillus amyloliquefaciens SQR9.* Physiol. Plant, 2016, 158, 34–44.
  127. A.M. El-Esawi, A.I. Alaraidh, A.A. Alsahli, et al., *Serratia liquefaciens KM4 Improves Salt Stress Tolerance in Maize by Regulating Redox Potential, Ion Homeostasis, Leaf Gas Exchange and Stress-Related Gene Expression.* Int. J. Mol. Sci., 2018, 19(11), 3310.
  128. N. Bharti, S. Pandey, D. Barnawal, et al., *Plant growth promoting rhizobacteria Dietzia natronolimnaea modulates the expression of stress responsive genes providing protection of wheat from salinity stress.* Sci. Rep., 2016, 6, 34768.
  129. M. Safdarian, H. Askari, V. Shariati, et al., *Transcriptional responses of wheat roots inoculated with Arthrobacter nitroguajacolicus to salt stress.* Sci. Rep., 2019, 9, 1792.
  130. L. Ye, X. Zhao, E. Bao, et al., *Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on watermelon growth, elemental uptake, antioxidant, and photosystem II activities and stress-response gene expressions under salinity-alkalinity stresses.* Front. Plant Sci., 2019, 10, 863.
  131. Nguyễn Anh Huy, Nguyễn Hữu Hiệp, *Phân lập và nhận diện các dòng vi khuẩn chịu mặn có khả năng cố định đạm và tổng hợp IAA từ đất sản xuất lúa - tôm ở Bạc Liêu, Sóc Trăng và Kiên Giang.* Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ, 2018, 54(1B), 7-12.

132. Nguyễn Văn Phương, Mai Thị Phương Nga, Tô Thị Mai Hương và cộng sự, *Sàng lọc in vitro vi khuẩn nội sinh rễ lúa nước có khả năng kích thích sinh trưởng và kháng nấm đạo ôn Magnaporthe oryzae*. Kỷ yếu Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc, 2020, 568-574.
133. Nguyễn Phạm Anh Thi và cộng sự, *Phân lập và tuyển chọn dòng vi khuẩn có khả năng hòa tan lân từ đất trồng lúa bị nhiễm mặn tại tỉnh Sóc Trăng*. Hội nghị công nghệ sinh học toàn quốc, 2020.
134. N.Đ Thành, N.T. Quyết, H.V. Cường, P.X. Hội, *Phân lập, định danh chủng vi khuẩn chịu mặn, có hoạt tính phân giải lân vô cơ cho vùng Đồng bằng sông Cửu Long*. Tạp chí KH và CN Việt Nam, 2020, 62(2).
135. Đỗ Mạnh Hào, Phan Thế Thư, *Một số kết quả nghiên cứu về vi sinh vật tại vùng ven biển hải phòng*. Vietnam J. Sci. Technol., 2012, 10(1), 51–65.
136. T. F. Shen, H. J. Yen, S. C. Liao, et al., *Screening of Rice Endophytic Biofertilizers with Fungicide Tolerance and Plant Growth-Promoting Characteristics*. Sustainability, 2019, 11, 1133.
137. E. Glickmann, Y. Dessaux, *A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria*. Appl. Environ. Microbiol., 1995, 61(2), 793.
138. D. M. Penrose, R. B. Glick, *Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria*. Physiol. Plant., 2003, 118(1), 10–15.
139. A. E. Mohamed, G. M. Nessim, M.G., Abou-el-seoud, et al., *Isolation and selection of highly effective phosphate solubilizing bacterial strains to promote wheat growth in Egyptian calcareous soils*. Bull. Natl. Res. Cent., 2019, 43, 203.
140. A. Ambrosini, L.M.P. Passaglia, *Plant growth-promoting bacteria (PGPB): Isolation and screening of PGP activities*. Curr. Protoc. Plant Biol., 2017, 2, 190–209.
141. J.E. McDonald, D.J. Rooks, A.J. McCarthy, et al., *Methods for the isolation of cellulose-degrading microorganisms*. Methods Enzymol., 2012, 510, 349-374.
142. B. Schwyn, J. B. Neilands, *Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores*. Anal. Biochem., 1987, 160(1), 47-56.

143. R. Moran, D. Porath, *Chlorophyll determination in intact tissues using N,N-dimethylformamide*. *Plant Physiology*, 1980, 65(3), 478–480.
144. K.J. Livak, D. Thomas, *Schmittgen, Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  Method*. *Methods*, 2001, 25(4), 402-408.
145. M.A. Bolger, M. Lohse, B. Usadel, *Trimmomatic: A flexible trimmer for illumina sequence data*. *Bioinformatics*, 2014, 13, 266–267.
146. R. Chikhi, P. Medvedev, *Informed and automated k-mer size selection for genome assembly*. *Bioinformatics*, 2014, 30(1), 31-37.
147. R. Luo, B. Liu, Y. Xie, et al., *SOAPdenovo2: an empirically improved memory-efficient short-read de novo assembler*. *GigaSci.*, 2012, 1(1), 18.
148. T. Seemann, *Prokka: rapid prokaryotic genome annotation*. *Bioinformatics*, 2014, 30(14), 2068-9.
149. M. Kanehisa, Y. Sato, K. Morishima, *BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG tools for functional characterization of genome and metagenome sequences*. *J. Mol. Biol.*, 2016, 428(4), 726-731.
150. H.S. Yoon, M.S. Ha, M.J. Lim, et al., *A large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2017, 110, 1281–1286.
151. Cao Ngọc Điệp, Nguyễn Thành Dũng, *Đặc tính vi khuẩn nội sinh phân lập trong cây khóm trồng trên đất phèn Vĩnh Thuận tỉnh Kiên Giang*. *Tạp chí Khoa học*, Trường Đại Học Cần Thơ, 2015, 15a, 54-63.
152. Nguyen Khoi Nghia, Tran Thi My Tien, Nguyen Thi Kieu Oanh, et al., *Isolation and characterization of indole acetic acid producing halophilic bacteria from salt affected soil of rice–shrimp farming system in the Mekong Delta, Vietnam*. *Agriculture, Forestry and Fisheries*, 2017, 6 (3), 69–77.
153. Nguyễn Thị Minh, Đỗ Thị Thu, *Nghiên cứu phân lập và tuyển chọn vi sinh vật nội sinh từ vùng đất sinh thái nhiễm mặn huyện Giao Thủy, tỉnh Nam Định*. *Tạp chí Khoa học Nông Nghiệp Việt Nam*, 2017, 15(8), 1022-1032.
154. Nguyễn Văn Giang và cộng sự, *Phân lập, tuyển chọn vi khuẩn phân giải lân, kali khó tan từ đất trồng cà phê tại khu vực Tây Nguyên*. *Tạp Chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, 2018, 60(5), 5-10.

155. B.H. Bal, L. Nayak, S. Das, et al., *Isolation of ACC deaminase producing PGPR from rice rhizosphere and evaluating their plant growth promoting activity under salt stress*. Plant Soil, 2013, 366, 93–105.
156. A.A. Pourbabaee, E. Bahmani, H.A. Alikhani, et al., *Promotion of Wheat Growth under Salt Stress by Halotolerant Bacteria Containing ACC deaminase*. J. Agr. Sci. Tech., 2016, 18, 855-864.
157. S. Pandey, S. Gupta, *Diversity analysis of ACC deaminase producing bacteria associated with rhizosphere of coconut tree (Cocos nucifera L.) grown in Lakshadweep islands of India and their ability to promote plant growth under saline conditions*. J. Biotechnol., 2021, 324,183-197.
158. Phạm Thị Ngọc Lan, Nguyễn Thị Việt, Lê Thị Hoa Sen, *Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn cố định nitrogen từ đất chuyên canh rau ở tỉnh Thừa Thiên Huế. Hội Nghị Khoa Học Toàn Quốc Về Sinh Thái Và Tài Nguyên Sinh Vật Lần Thứ 7*, 2017.
159. Võ Văn Phước Quê, Cao Ngọc Điệp, *Phân lập và nhận diện vi khuẩn phân giải cellulose*. Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ, 2011, 18a, 177-184.
160. A.O. Tang, N. Haruna, M.B. Majid, *Potential PGPR Properties of Cellulolytic, Nitrogen-Fixing, Phosphate-Solubilizing Bacteria in Rehabilitated Tropical Forest Soil*. Microorganisms, 2020, 8(3), 442.
161. M.B. Rowland, H.W. Taber, *Duplicate Isochorismate Synthase Genes of Bacillus subtilis: Regulation and Involvement in the Biosynthesis of Menaquinone and 2,3-dihydroxybenzoate*. J.Bacteriol., 1996, 178, 854-861.
162. W.X. Xu, Y.H. Wu, C.S. Wang, et al., *Marinobacter pelagius sp. nov., a moderately halophilic bacterium*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 2008, 58, 637-640.
163. H.J.S. Hickford, F.C. Küpper, G. Zhang, et al., *Petrobactin sulfonate, a new siderophore produced by the marine bacterium Marinobacter hydrocarbonoclasticus*. J. Nat. Prod., 2004, 67, 1897-1899.
164. V.V. Homann, J.K. Edwards, A.E. Webb, et al., *Siderophores of Marinobacter aquaeolei: petrobactin and its sulfonated derivatives*. Biometals, 2009, 22(4), 565-571.



165. N. Shang, Q. Zhu, M. Dai, et al., *Complete Genome Sequence of the Heavy-Metal-Tolerant Endophytic Type Strain of Salinicola tamaricis*. *Genome Announ.*, 2018, 6(16), 358-18.
166. Y.G. Zhao, L.Y. Zhao, Z.J. Xia, et al., *Salinicola tamaricis* sp. nov., a heavy-metal-tolerant, endophytic bacterium isolated from the halophyte tamarix chinensis Lour. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2017, 67, 1813–1819.
167. C. Fidalgo, D.N. Proença, P.V. Morais, et al., *The endosphere of the salt marsh plant Halimione portulacoides is a diversity hotspot for the genus Salinicola: description of five novel species Salinicola halimionae* sp. nov., *Salinicola aestuarinus* sp. nov., *Salinicola endophyticus* sp. nov., *Salinicola halophyticus* sp. nov. and *Salinicola lusitanus* sp. Nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*, 2019, 69(1), 46-62.
168. R. Shultana, T.A. Kee Zuan, M.R. Yusop, et al., *Characterization of salt-tolerant plant growth-promoting rhizobacteria and the effect on growth and yield of saline-affected rice*. *PLoS One*, 2020, 15(9), e0238537.
169. S. Wagi, A. Ahmed, *Bacillus spp.: potent microfactories of bacterial IAA*. *Peer J.*, 2019, 7, 7258.
170. H.S. Koua, D.C. N'golo, W.M. Alloue-Boraud, et al., *Bacillus subtilis Strains Isolated from Cocoa Trees (Theobroma cacao L.) Rhizosphere for their use as Potential Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Côte d'Ivoire*. *Curr. Microbiol.*, 2020, 77(9), 2258-2264.
171. S. Mehmood, A.M. Muneer, M. Tahir, et al., *Deciphering distinct biological control and growth promoting potential of multi-stress tolerant Bacillus subtilis PM32 for potato stem canker*. *Physiol. Mol. Biol. Plants*, 2021, 27(9), 2101-2114.
172. F. Bibi, J.E. Chung, A. Khan, et al., *Martellella endophytica* sp. nov., an antifungal bacterium associated with a halophyte. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2013, 63(8), 2914-2919.
173. A. Khan, T.M. Hossain, C.H. Park, et al., *Development of root system architecture of Arabidopsis thaliana in response to colonization by Martellella endophytica YC6887 depends on auxin signaling*. *Plant Soil*, 2016, 81–96

174. A. Khan, M. Faheem, A. Zeb, et al., *Isolation and Characterization of an Acidic, Salt-Tolerant Endoglucanase Cel5A from a Bacterial Strain Martellella endophytica YC6887 Genome*. Mol. Biotechnol., 2021, 63(4), 305-315.
175. N.O. Reva, V.V. Smirnov, B. Pettersson, et al., *Bacillus endophyticus sp. nov., isolated from the inner tissues of cotton plants (Gossypium sp.)*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 2002, 52(1), 101-107.
176. N.P. Kumar, A.V. Audipudi, *Fluorescent Bacillus endophyticus AVP9- Multiple potential for phosphate solubilization, plant growth promotion and bio control*. Int. J. Eng. Res, 2014, 5(12), 1400-1412.
177. A.K. Chauhan, D.K. Maheshwari, K. Kim, et al., *Termitarium inhabiting Bacillus endophyticus TSH42 and Bacillus cereus TSH77 colonizing Curcuma longa L.: Isolation, characterization and evaluation of their biocontrol and plant growth promoting activities*. Can. J. Microbiol., 2016, 62(10).
178. B. Mohite, *Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth*. J. Soil. Sci. Plant Nutr., 2013, 13(3), 638–649.
179. N. Bhutani, R. Maheshwari, M. Negi, et al., *Optimization of IAA production by endophytic Bacillus spp. from Vigna radiata for their potential use as plant growth promoters*. Isr. J. Plant Sci., 2018, 65(1), 83-96.
180. K. Apel, H. Hirt, *Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction*. Annu. Rev. Plant Biol., 2004, 55, 373–399.
181. H.H. Sheikh, H. Kausar, H.M. Saud, et al., *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Enhance Salinity Stress Tolerance in Okra through ROS-Scavenging Enzymes*. Biomed Res. Int., 2016, 2016:6284547.
182. M.A. Gururani, C.P. Upadhyaya, V. Baskar, et al., *plant growth-promoting rhizobacteria enhance abiotic stress tolerance in Solanum tuberosum through inducing changes in the expression of ROS-scavenging enzymes and improved photosynthetic performance*. J. Plant Growth Regul., 2013, 32(2), 245–258.
183. R. Rosselló-Móra, R. Amann, *Past and future species definitions for Bacteria and Archaea*. Syst. Appl. Microbiol., 2015, 38, 209–216.
184. S.A. Ragot, M.A. Kertesz, K.E. Bünemann, *phoD Alkaline Phosphatase Gene Diversity in Soil*. Appl. Environ. Microbiol., 2015, 81:7281–7289.

185. S. Choubane, A.B. Cheba, A. Benourrad, *Screening and Phenotypic Diversity of Amylase Producing Rhizospheric Bacteria from Some North African Plants*. Proc. Techno., 2016, 22, 1197-204.
186. N. Teixidó, P.T. Cañamás, J. Usall, et al., *Accumulation of the compatible solutes, glycine–betaine and ectoine, in osmotic stress adaptation and heat shock cross-protection in the biocontrol agent Pantoea agglomerans CPA-2*. Lett. Appl. Microbiol., 2005, 41, 248–252.
187. G. Iturriaga, R. Suárez, B. Nova-Franco, *Trehalose Metabolism: From Osmoprotection to Signaling*. Int. J. Mol. Sci., 2009, 10, 3793–3810.
188. H. Ono, K. Sawada, N. Khunajakr, et al., *Characterization of biosynthetic enzymes for ectoine as a compatible solute in a moderately halophilic eubacterium, Halomonas elongata*. J. Bacteriol., 1999, 181, 91–99.
189. N. Widderich, C. Laura, F.J. Elling, et al., *Strangers in the archaeal world: osmostress-responsive biosynthesis of ectoine and hydroxyectoine by the marine thaumarchaeon Nitrosopumilus maritimus*. Environ. Microbiol., 2016, 18, 1227-1248.
190. P. Natale, T. Brüser, M.J.A. Driessen, *Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane-Distinct translocases and mechanisms*. Biochim. Biophys. Acta., 2008, 1778, 1735–1756.
191. H.J. Chang, D. Desveaux, L.A. Creason, *The ABCs and 123s of bacterial secretion systems in plant pathogenesis*. Annu. Rev. Phytopathol., 2014, 52, 317-345.
192. L.S Kandel, M.P. Joubert, L.S. Doty, *Bacterial Endophyte Colonization and Distribution within Plants*. Microorganisms, 2017, 5, 77.
193. S. Taghavi, D. Van Der Lelie, A. Hoffman, et al., *Genome sequence of the plant growth promoting endophytic bacterium Enterobacter sp. 638*. Plos Genet., 2010, 6(5), e1000943.