

LÊ VĂN MẠNH

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC THỰC NGHIỆM

NĂM 2023

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



LÊ VĂN MẠNH

**ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG KÍCH THÍCH SINH TRƯỞNG VÀ
NÂNG CAO TÍNH CHỊU MẶN TRÊN LÚA CỦA CÁC CHỦNG VI
SINH VẬT NỘI SINH PHÂN LẬP TẠI VÙNG ĐẤT BỊ NHIỄM
MẶN KHU VỰC ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG**

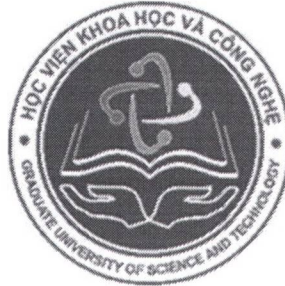
LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC THỰC NGHIỆM

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



LÊ VĂN MẠNH

**ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG KÍCH THÍCH SINH TRƯỞNG VÀ
NÂNG CAO TÍNH CHỊU MẶN TRÊN LÚA CỦA CÁC CHỦNG VI
SINH VẬT NỘI SINH PHÂN LẬP TẠI VÙNG ĐẤT BỊ NHIỄM
MẶN KHU VỰC ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC THỰC NGHIỆM

Mã số: 8420114

XÁC NHẬN NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

TS. ĐỖ TIẾN PHÁT

TS. NGUYỄN XUÂN CƯỜNG

Hà Nội – 2023

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đề tài nghiên cứu trong luận văn này là công trình nghiên cứu của tôi dựa trên những tài liệu, số liệu do chính tôi tự tìm hiểu và nghiên cứu. Chính vì vậy, các kết quả nghiên cứu đảm bảo trung thực và khách quan nhất. Đồng thời, kết quả này chưa từng xuất hiện trong bất cứ một nghiên cứu nào. Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực nếu sai tôi hoàn toàn chịu trách nhiệm trước pháp luật.

Tác giả luận văn



Lê Văn Mạnh

LỜI CẢM ƠN

Sau một thời gian tiến hành triển khai nghiên cứu, tôi đã hoàn thành nội dung luận văn “Đánh giá khả năng kích thích sinh trưởng và chống chịu mặn trên cây lúa của các chủng vi sinh vật nội sinh phân tại vùng đất bị nhiễm mặn khu vực đồng bằng sông Cửu Long”. Luận văn được hoàn thành không chỉ là công sức của bản thân tác giả mà còn có sự giúp đỡ, hỗ trợ tích cực của nhiều cá nhân và tập thể.

Trước hết, tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành và sâu sắc đến TS. Đỗ Tiến Phát và TS. Nguyễn Xuân Cường, những người trực tiếp hướng dẫn cho luận văn. Các thầy đã dành cho tôi nhiều thời gian, tâm sức, nhiều ý kiến, nhận xét quý báu, để hoàn thiện luận văn. Các thầy cũng đã luôn quan tâm, động viên, nhắc nhở kịp thời để tôi có thể hoàn thành luận văn đúng tiến độ.

Đặc biệt tôi xin gửi lời cảm ơn đến Ths. Hồ Mạnh Tường là người đã giúp đỡ tôi, những ý kiến đóng góp quý báu cùng sự quan tâm, động viên và chỉ bảo tận tình của thầy vừa giúp tôi có được sự khích lệ, tin tưởng vào bản thân, vừa tạo động lực nhắc nhở tôi có trách nhiệm với đề tài của mình, và hoàn chỉnh luận văn tốt hơn.

Tôi xin gửi lời cảm ơn đến đơn vị chuyên môn thực hiện luận văn là Viện Công nghệ Sinh học, ban Lãnh đạo, phòng Đào tạo, các phòng chức năng của Học viện Khoa học và Công nghệ nói chung, cũng như cảm ơn chân thành thành tới tập thể lớp BIO21B nói riêng đã quan tâm, tạo điều kiện thuận lợi, nhiệt tình giúp đỡ em trong quá trình thực hiện nội dung nghiên cứu trong luận văn của mình.

MỤC LỤC

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ CÁI VIẾT TẮT.....	1
DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ.....	2
MỞ ĐẦU	4
MỤC ĐÍCH NGHIÊN CỨU:	5
NỘI DUNG NGHIÊN CỨU:.....	5
NỘI DUNG.....	7
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	7
1.1. GIỚI THIỆU VỀ CÂY LÚA	7
1.1.1. Nguồn gốc, phân loại và phân bố.....	7
1.1.2. Giá trị kinh tế.....	8
1.1.3 Giá trị dinh dưỡng.....	10
1.2. XÂM NHẬP MẶN ẢNH HƯỞNG TỚI CÂY TRỒNG.....	10
1.2.1. Ảnh hưởng của mặn lên cây trồng.....	10
1.2.2. Ảnh hưởng của mặn lên cây lúa	11
1.3. CÁC BIỆN PHÁP HẠN CHẾ TÁC HẠI CỦA STRESS MẶN.....	12
1.3.1 Chọn tạo giống chống chịu.....	12
1.3.2 Chuyển gen.....	13
1.3.3 Đột biến	13
1.3.4 Sử dụng vi sinh vật	14
1.4. VI SINH VẬT KÍCH THÍCH SINH TRƯỞNG - PGPR.....	14
1.4.1 PGPR	14
1.4.2 PGPR giảm thiểu tác hại của các điều kiện bất lợi phi sinh học...	15
1.4.3 PGPR giảm thiểu tác hại stress mặn	15
1.5. ỨNG DỤNG PGPR ĐỂ GIẢM TÁC HẠI CỦA MẶN TRÊN CÂY LÚA	16
1.5.1 Nghiên cứu trên thế giới.....	16
1.5.2 Một số nghiên cứu ở Việt Nam	16
CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	17
2.1. VẬT LIỆU	17
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	17
2.2.1. Thu mẫu đất và rễ cây lúa tại Kiên Giang	17
2.2.2. Bẫy vi sinh vật nội sinh rễ cây lúa có nguồn gốc từ đất.....	17
2.2.3. Xử lý mẫu rễ cây lúa.....	18
2.2.4 Phân lập vi sinh vật nội sinh rễ cây lúa có khả năng sản sinh ACC deaminases tại vùng nhiễm mặn.....	18
2.2.5 Phương pháp tách chiết DNA tổng số.....	18
2.2.6 Phân tích trình tự và khuếch đại DNA	18

2.2.7. Đánh giá các chỉ tiêu hóa sinh của hai chủng vi sinh vật	19
2.2.8 Đánh giá khả năng khả năng kích thích sinh trưởng và nâng cao tính chịu mặn ở lúa trong điều kiện in vitro.....	22
2.2.9 Đánh giá khả năng khả năng kích thích sinh trưởng và nâng cao tính chịu mặn ở cây lúa ở nhà lưới.....	22
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	24
3.1. KẾT QUẢ KHẢO SÁT ĐỊA ĐIỂM THU MẪU	24
3.1.1. Thu mẫu đất tại vùng nhiễm mặn.....	24
3.1.2. Thu thập mẫu cây lúa sinh trưởng tốt và kém.....	24
3.2. PHÂN LẬP VI SINH VẬT NỘI SINH RỄ CÂY LÚA CÓ KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP ACC DEMINASES TẠI VÙNG NHIỄM MẶN	25
3.3. ĐỊNH DANH CÁC CHỦNG VI SINH VẬT	28
3.3.1 Khuếch đại vùng 16S rRNA.....	28
3.3.2 Định danh vi khuẩn bằng phân tích trình tự gen 16S rRNA.....	29
3.4. ĐÁNH GIÁ CÁC CHỈ TIÊU HÓA SINH.....	31
3.4.1 Xác định đặc tính Gram của các chủng vi sinh vật phân lập	31
3.4.2 Đánh giá khả năng phân giải kali của các chủng vi sinh vật phân lập.....	31
3.4.3 Đánh giá khả năng phân giải canxi của các chủng vi sinh vật phân lập.....	32
3.4.4 Đánh giá khả năng phân giải phosphate của các chủng vi sinh vật phân lập	33
3.4.5 Đánh giá khả năng sản sinh IAA của các chủng vi sinh vật phân lập	34
3.4.6 Đánh giá khả năng kháng NaCl của các chủng vi sinh vật phân lập	36
3.4.7 Khả năng hình thành màng sinh học của các chủng vi sinh vật phân lập.....	36
3.4.8 Đánh giá khả năng sản sinh EPS của các chủng vi sinh vật phân lập.....	38
3.4.9 Đánh giá khả năng sản sinh Amoni của các chủng vi sinh vật phân lập.....	39
3.5 ĐÁNH GIÁ CHỦNG KHUẨN CÓ KHẢ NĂNG KÍCH THÍCH SINH TRƯỞNG VÀ TĂNG CƯỜNG TÍNH CHỐNG CHỊU MẶN CỦA CÂY LÚA	41
3.5.1 Đánh giá khả năng khả năng kích thích sinh trưởng và nâng cao tính chịu mặn trong điều kiện in vitro.....	41
3.5.2 Đánh giá khả năng khả năng kích thích sinh trưởng và nâng cao tính chịu mặn trong điều kiện nhà lưới.....	43

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	45
KẾT LUẬN	45
KIẾN NGHỊ.....	45
DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	46
PHỤ LỤC	54

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ CÁI VIẾT TẮT

ACC	Acid 1-aminocyclopropane-1-carboxylic
DNA	Acid deoxyribonucleic
EPS	Exopolysaccharide
IAA	Indole-3-acetic acid
PGP	Plant growth promoting
PGPR	Plant growth promoting rhizobacteria
PKO	Pikovskaya's medium
ROS	Reactive oxygen species
SI	Solubilizing index

DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ

Hình 1.1. Sản lượng tiêu xuất lúa gạo của 10 nước nhiều nhất trong năm 2020 – 2021	8
Hình 1.2. Lượng gạo và trị giá xuất khẩu gạo giai đoạn 2001-2020	9
Hình 1.3. Hình thái cây lúa trước các áp lực của muối khác nhau.....	11
Hình 3.1. Mẫu đất (A) và địa điểm thu tại ruộng (B) tại xã Sơn Bình, Hòn Đất, Kiên Giang.....	24
Hình 3.2. Mẫu cây lúa sinh trưởng tốt (A), sinh trưởng kém (B) và địa điểm thu tại ruộng với mẫu sinh trưởng tốt (màu vàng) và sinh trưởng kém (màu xanh đen) (B) tại xã Sơn Bình, Hòn Đất, Kiên Giang.....	25
Bảng 3.1. Hình thái khuẩn lạc 32 chủng vi khuẩn nội sinh được phân lập từ rễ cây lúa sinh trưởng trên vùng đất nhiễm mặn tại Kiên Giang.....	27
Hình 3.3. Hình thái các chủng vi sinh vật nội sinh vùng rễ tại vùng đất nhiễm mặn Kiên Giang và đường kính khuẩn lạc sau 7 ngày nuôi cấy trên môi trường ACC	28
Hình 3.4: Kết quả điện di sản phẩm PCR của hai chủng RS2 và REN3 với cặp mồi 27F/1492R	29
Hình 3.5. Cây phân loại di truyền dựa trên trình tự 16S rRNA của chủng RS2 và REN3 với các chủng vi khuẩn khác cùng loài trên NCBI.....	30
Hình 3.6. Kết quả nhuộm gram của 2 chủng vi khuẩn RS2 và REN3 với thuốc nhuộm crystal violet	31
Hình 3.7. Chỉ số phân giải (SI) sau 7 ngày nuôi cấy trên môi trường Alexandrov	32
Hình 3.8. Chỉ số phân giải (SI) sau 7 ngày nuôi cấy trên môi trường CDB... ..	33
Hình 3.9. Đường kính khuẩn lạc sau 7 ngày nuôi cấy trên môi trường ACC	34
Hình 3.10. Kết quả xác định hàm lượng IAA của chủng RS2 và REN3 bằng thuốc thử Salkowski trên đĩa 96 giếng và ở bước g 550nm.....	35
Hình 3.11. Kết quả đánh giá khả năng sinh trưởng của chủng RS2 và REN3 ở các nồng độ NaCl từ 0 đến 11%.	36
Hình 3.12. Kết quả đánh giá khả năng hình thành màng sinh học của chủng RS2 và REN3 trên đĩa 96 giếng và xác định hàm lượng ở bước sóng 550nm.....	37
Hình 3.13. Biểu đồ cột định lượng EPS sản sinh bởi 02 chủng khuẩn sau 2 ngày nuôi trong môi trường EPS.....	39

Hình 3.14. Kết quả đánh giá khả năng sản sinh ammonia của hai chủng RS2 và REN3 trên đĩa 96 giếng và ở bước sóng 450nm	40
Hình 3.15. Kết quả đánh giá khả năng sinh trưởng của cây lúa sau 7 ngày tuổi không được và được lây nhiễm với RS2 và REN3 và khối lượng của chúng trong điều kiện in vitro ở các nồng độ NaCl 0, 50, 100 mM.	42
Hình 3.16. Kết quả đánh giá khả năng sinh trưởng của cây lúa sau 35 ngày tuổi không được và được lây nhiễm với RS2 và REN3 và khối lượng của chúng trong điều kiện nhà lưới ở các nồng độ NaCl 0, 100 mM.	44

MỞ ĐẦU

Lúa (*Oryza sativa* L.) là cây lương thực chiếm vị trí quan trọng hàng đầu ở Việt Nam và trên thế giới. Hiện nay, hơn 110 nước trên thế giới đang sản xuất lúa gạo, trong số đó, Châu Á là vùng sản xuất lúa gạo chủ yếu chiếm 90% về sản lượng cũng như về diện tích. Lúa là nguồn lương thực nuôi sống trên 3,5 tỷ người (chủ yếu ở châu Á và châu Mỹ La tinh), chiếm 50% dân số thế giới [1]. Tại Việt Nam, đa số người Việt đều sử dụng lúa gạo làm nguồn lương thực chính.

Tuy nhiên, cây lúa là cây mẫn cảm với mặn, việc nhiễm mặn làm cho cây lúa trở nên dễ bị tổn thương, đồng thời ức chế sinh trưởng và phát triển của cây [2]. Ước tính diện tích đất bị nhiễm mặn trên toàn thế giới lên tới 1 tỷ ha, trong đó Châu Á chiếm khoảng 21,5 triệu ha [3]. Ở Việt Nam, diện tích đất canh tác bị ngập mặn đạt khoảng 200000 ha. Mặt khác, do tập quán và nhu cầu mở rộng canh tác, đổi mới ngành nghề như nuôi trồng thủy sản đã làm tăng thêm diện tích đất ngập mặn cũng như độ mặn của đất. Theo kết quả nghiên cứu và dự báo của Ủy ban liên chính phủ về biến đổi khí hậu của Liên hiệp quốc (IPPC) và Ngân hàng thế giới thì trong vòng 100 năm tới, nước biển sẽ dâng 1 m, nhiệt độ sẽ tăng thêm 2°C [4]. Nếu nước biển dâng cao 1m thì vùng đồng bằng sông Cửu Long sẽ có 1,5 - 2 triệu ha đất nông nghiệp bị ngập nước. Cùng với diện tích ngập nước của đất trồng lúa thì diện tích đất nhiễm mặn cũng ngày một gia tăng, đứng trước những biến đổi nghiêm trọng đó, việc nâng cao khả năng sinh trưởng phát triển, tính chịu mặn của các giống lúa tại các vùng trồng, đặc biệt là vùng đất nhiễm mặn có ý nghĩa quan trọng và cấp thiết.

Cây lúa có thể giảm sinh trưởng và phát triển hoặc chết trong điều kiện hàm lượng muối cao do bị ức chế quang hợp, hô hấp, và rối loạn các cơ chế trao đổi chất khác [5]. Tăng cường khả năng chịu mặn cho lúa bằng biện pháp kỹ thuật như: bón phân qua lá, phân hữu cơ, các loại phân đạm hóa học trong giai đoạn đầu của cây lúa hoặc có thể tháo cạn nước ruộng, sau đó bơm nước trở lại ruộng đồng cũng là một phương pháp hữu hiệu tạm thời để giảm nồng độ muối có trong ruộng đồng. Ngoài ra, các phương pháp như chọn giống, chuyển gen ngoại lai kháng mặn, sử dụng phân vi sinh, chỉnh sửa gen, gây đột biến, ... cũng là những lựa chọn bền vững, lâu dài. Trong đó, sử dụng vi sinh vật có khả năng kích thích sinh trưởng (plant growth-promoting rhizobacteria -

PGPR) là biện pháp có hiệu quả, chi phí thấp, cũng như không gây tác động tiêu cực cho môi trường. Các chủng vi khuẩn thuộc nhóm PGPR có khả năng cố định đạm cũng như tổng hợp chất kích thích sinh trưởng đang được nghiên cứu và ứng dụng vào sản xuất các loại phân bón vi sinh. Ưu điểm của các loại phân bón vi sinh này là không gây ô nhiễm môi trường, phục hồi đạm trong đất thông qua quá trình cố định đạm sinh học, giúp tiết kiệm chi phí nhưng vẫn đảm bảo năng suất và chất lượng cây trồng [6]. Thêm vào đó, các nghiên cứu gần đây cũng cho thấy một số chủng vi khuẩn hữu hiệu có tiềm năng nâng cao tính chống chịu của cây trồng với các điều kiện ngoại cảnh bất lợi như hạn, lạnh, mặn, v.v... Đặc biệt tại các vùng đất đã và có khả năng nhiễm mặn như vùng đồng bằng sông Cửu Long, đề tài chúng tôi áp dụng thực tiễn tại đây đều được đưa ra với các kết quả mang tính thực tiễn và tính mới, nhằm tạo ra môi trường phát triển nông nghiệp bền vững hơn.

Xuất phát từ cơ sở khoa học và yêu cầu thực tiễn nêu trên, chúng tôi tiến hành đề tài “*Đánh giá khả năng kích thích sinh trưởng và nâng cao tính chịu mặn trên lúa của các chủng vi sinh vật nội sinh phân lập tại vùng đất bị nhiễm mặn khu vực Đồng bằng sông Cửu Long*” nhằm lựa chọn được các chủng vi khuẩn tiềm năng và định hướng ứng dụng trong hạn chế ảnh hưởng của mặn xâm thực tới việc sản xuất lúa tại các vùng nhiễm mặn ở nước ta.

Mục đích nghiên cứu:

- Phân lập được các chủng vi khuẩn nội sinh rễ cây lúa trồng tại vùng nhiễm mặn
- Sàng lọc, đánh giá và lựa chọn được một số chủng vi khuẩn tiềm năng có khả năng kích thích sinh trưởng và nâng cao tính chịu mặn của cây lúa.

Nội dung nghiên cứu:

Nội dung 1: Phân lập vi sinh vật nội sinh rễ cây lúa tại vùng nhiễm mặn có khả năng sản sinh ACC deminases.

Công việc 1: Phân lập các dòng vi sinh vật nội sinh rễ cây lúa có khả năng sản sinh ACC deminases

Công việc 2: Định danh một số chủng vi sinh vật có khả năng sản sinh ACC deminases

Nội dung 2: Sàng lọc, đánh giá và tuyển chọn các chủng vi sinh vật có khả năng kích thích sinh trưởng và nâng cao tính chịu mặn của cây lúa.

Công việc 3: Đánh giá các hoạt tính hóa sinh của các chủng vi sinh vật thu được

Công việc 4: Đánh giá khả năng kích thích sinh trưởng, phát triển cây lúa được lây nhiễm các chủng vi khuẩn tiềm năng.

Công việc 5: Đánh giá khả năng tăng cường tính chống chịu mặn của cây lúa được lây nhiễm các chủng vi khuẩn tiềm năng.

NỘI DUNG

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. GIỚI THIỆU VỀ CÂY LÚA

1.1.1. Nguồn gốc, phân loại và phân bố

1.1.1.1 Nguồn gốc

Các nhà khoa học tin rằng loài *Oryza sativa* nguyên thủy có nguồn gốc liên quan tới những vùng khí hậu ẩm ướt, mặc dù nó không phải là cây nhiệt đới. Chúng có thể chính là hậu duệ của cỏ dại được trồng ở các vùng trũng, chân đồi tại các sườn dốc dãy Himalaya. Một quan điểm khác cho rằng lúa gạo có thể có nguồn gốc từ miền nam Ấn Độ, sau đó lan rộng ra phía bắc của đất nước và sau đó xuất hiện trải dài khắp Trung Quốc trở đi. Lúa gạo tiếp tục xuất hiện tại Hàn Quốc, Philippines (khoảng 2000 TCN) và sau đó là Nhật Bản và Indonesia (khoảng 1000 TCN). Những du khách Ả Rập đã mang lúa gạo đến Ai Cập, Ma-rốc và Tây Ban Nha và lan rộng khắp cả vùng đất châu Âu. Bồ Đào Nha và Hà Lan đã mang lúa gạo đến các thuộc địa của họ ở Tây Phi và sau đó đến Châu Mỹ. Hành trình của giống loài này tiếp tục được những Tây Ban Nha mang lúa gạo đến Nam Mỹ vào đầu thế kỷ 17 [7].

Hiện nay, hai giống lúa chính được trồng trên toàn thế giới là *Oryza sativa indica* và *Oryza sativa japonica*. Hai loài lúa này và *Oryza sativa L.*, *O. glaberrima Steud.* đều thuộc nhóm loài *Oryza sativa complex* cùng với 5 loài hoang dã là *O. rufipogon (sensu lato)*, *O. longistaminata Chev. et Roehr.*, *O. barthii A. Chev.*, *O. glumaepatula Steud.*, và *O. meridionalis Ng.* Trong số đó, chỉ có *O. rufipogon* tạo ra con lai F1 với *O. sativa*, do đó hai loài này được coi là thuộc về một loài sinh học duy nhất. Cùng với tất cả các bằng chứng gián tiếp, điều này gợi ý cho rằng *O. rufipogon* là tổ tiên của *O. sativa*. Tương tự, với các bằng chứng thuyết phục trên, *O. barthii* chính là tổ tiên của lúa gạo châu Phi *O. glaberrima* [8].

1.1.1.2 Phân loại

Các giống *O. sativa* được phân thành sáu nhóm trên dựa trên mã di truyền. Trong đó, lúa *indica* được biết đến rộng rãi thuộc nhóm I và lúa *japonica* thuộc nhóm VI, những giống được gọi là lúa *javanica* cũng thuộc nhóm VI và được chỉ định là giống *japonica* nhiệt đới trái ngược với giống *japonica* ôn đới được

trồng ở khí hậu ôn đới. Căn cứ vào nguồn gốc đa phát sinh của *indica* và *japonica*, *indica* có lẽ đã được thuần hóa ở chân đồi của dãy Himalaya, Đông Ấn Độ và *japonicas* ở phía Nam Trung Quốc [9].

1.1.1.3 Phân bố

Ngoài trừ Nam Cực, hai giống lúa gạo *O. sativa* phổ biến được rộng rãi như Bắc và Nam Mỹ, các vùng đồng bằng thuộc Châu Âu, Trung Đông và Châu Phi, đặc biệt nằm rải rác cả vùng đất Châu Á. Tuy nhiên việc trồng trọt *O. glaberrima* chỉ giới hạn ở Châu Phi, nơi giống này sẽ bị nhanh chóng thay thế bởi *O. sativa* [10].

Các giống lúa *indica* phân tán khắp vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới từ Ấn Độ, còn *japonica* di chuyển về phía bắc từ Nam Trung Quốc và trở thành kiểu sinh thái ôn đới. Chúng cũng di chuyển về phía nam đến Đông Nam Á và từ đó đến Tây Phi và Brazil và trở thành kiểu sinh thái nhiệt đới. Lúa hiện được trồng ở các vùng nằm trong vĩ độ 55°N và 36°S do thích hợp với yếu tố thời tiết thích hợp, đó là nhờ những vùng đất thấp và vùng đất cao dễ trữ nước sau thời gian có mưa, dễ tưới tiêu. Do sự chọn lọc cho những mục đích sử dụng của con người và sự thích nghi với các môi trường đa dạng đã dẫn đến nhiều giống cây trồng mới được phát sinh, các nhà khoa học ước tính có khoảng 120000 giống lúa tồn tại trên thế giới. Sau khi thành lập Viện Nghiên cứu Lúa gạo Quốc tế vào năm 1960, việc cải tiến giống lúa cho năng suất cao đã được phát triển, những giống này hiện được trồng ở 70% diện tích đất lúa trên thế giới [11].

Trên 100 quốc gia, hàng nghìn giống *O. sativa* được trồng rộng rãi và phân thành ba giống sinh thái: giống *indica* hạt dài được trồng ở vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới châu Á; giống *japonica* hạt ngắn/trung bình được trồng ở các vùng ôn đới như Nhật Bản và miền bắc Trung Quốc; và giống *japonica* hạt với độ dài trung bình được trồng ở Philippines và các khu vực miền núi của Madagascar và Indonesia [12].

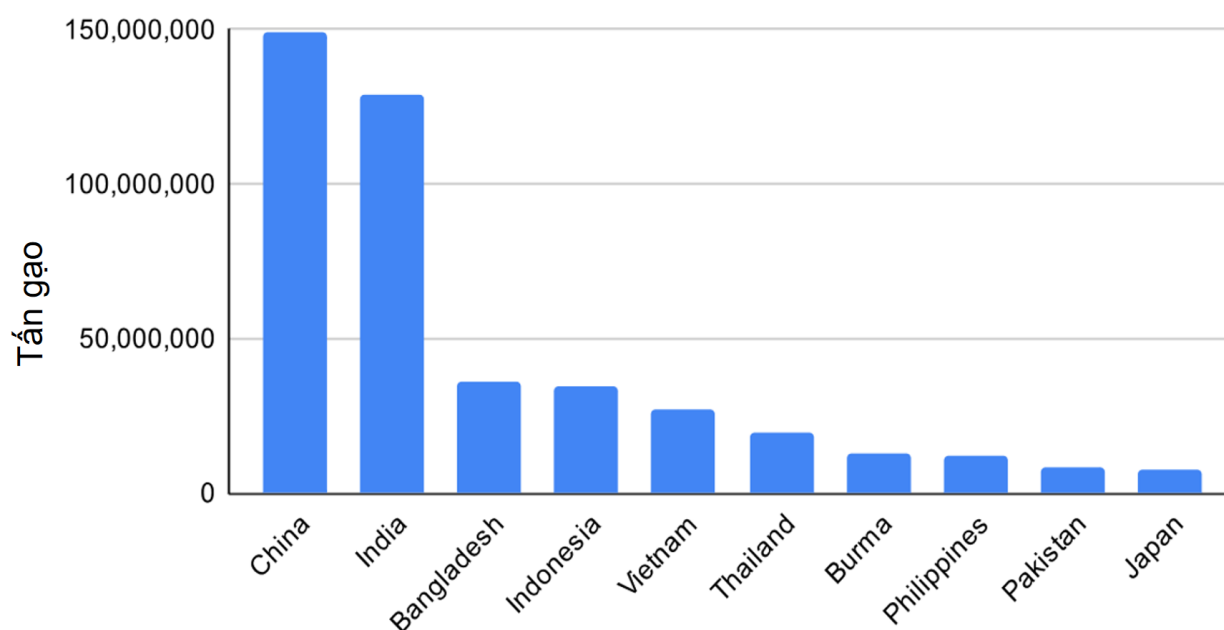
1.1.2. Giá trị kinh tế

Cây lúa là cây trồng lâu đời và là lương thực chính tại châu Á, cũng như ngô tại Nam Mỹ, hạt kê tại châu Phi hay lúa mì của châu Âu và Bắc Mỹ. Tuy nhiên, trên toàn thế giới, khoảng 50% dân số thế giới sử dụng vào gạo làm nguồn lương thực chính, trong đó có hơn 110 quốc gia sản xuất và tiêu thụ lúa gạo với mức độ khác nhau, trong đó sản xuất lúa gạo và tiêu thụ lúa gạo cao

tập trung chủ yếu ở khu vực châu Á.

1.1.2.1 Trên thị trường thế giới

Lúa là loại cây trồng cung cấp lương thực cho khoảng một nửa dân số thế giới. Lúa là cây trồng quan trọng trên toàn cầu, chiếm hơn 21% nhu cầu năng lượng của con người và lên đến 76% lượng calo của cư dân Đông Nam Á [13].

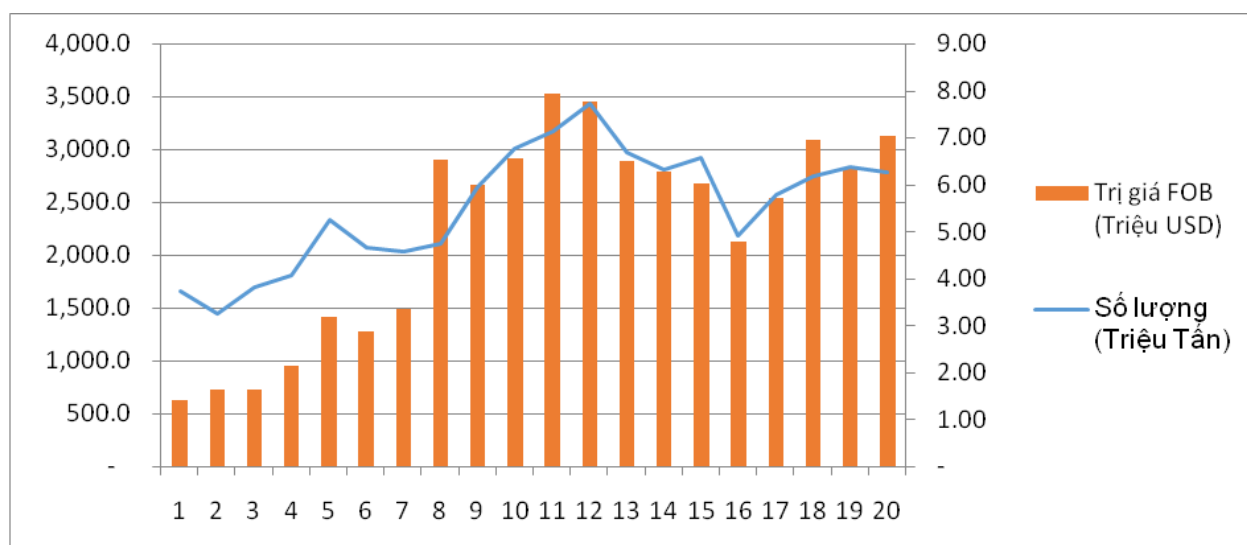


Hình 1.1. Sản lượng sản xuất lúa gạo của 10 nước nhiều nhất trong năm 2020 – 2021 [14].

Theo Bộ Nông nghiệp Hoa Kỳ (USDA), sản lượng gạo toàn cầu trong niên vụ 2020/2021 là 148,30 triệu tấn ở Trung Quốc, tiếp theo là 120,00 triệu tấn ở Ấn Độ, 35,30 triệu tấn ở Bangladesh, 34,90 triệu tấn ở Indonesia, và 27,10 triệu tấn tại Việt Nam. Hơn nữa, Thái Lan sản xuất 18,6 triệu tấn, Philippines sản xuất 12 triệu tấn, Nhật Bản sản xuất 7,62 triệu tấn (Xem hình 1.1.) [14].

1.1.2.2 Ở Việt Nam hiện nay

Trong giai đoạn 20 năm (2001-2020), ngành sản xuất và xuất khẩu gạo Việt Nam đã ghi nhiều dấu ấn và sản lượng. Diện tích gieo cấy lúa năm 2020 đạt 7,278 triệu ha, giảm khoảng 215.000ha so với năm 2001. Năng suất lúa năm 2020 đạt 58,7 tạ/ha, tăng 1,1 tạ/ha/năm; sản lượng lúa tăng bình quân tăng 0,5 triệu tấn/năm (Xem hình 1.2) [15].



Hình 1.2. Lượng gạo và trị giá xuất khẩu gạo giai đoạn 2001-2020 [15].

Gạo xuất khẩu của Việt Nam tăng bình quân 130.000 tấn/năm; giá gạo xuất khẩu tăng khoảng 17 USD/tấn/năm. Năm 2020 lượng gạo xuất khẩu đạt 6,25 triệu tấn, giá bình quân 499,3 USD/tấn, giá trị xuất khẩu gạo đạt 3,12 tỷ USD, tăng 2,52 triệu tấn về lượng và 2,8 tỷ USD về giá trị so với năm 2001 [15].

1.1.3 Giá trị dinh dưỡng

Gạo là loại lương thực dinh dưỡng cung cấp nhiều năng lượng cho các hoạt động của con người do thành phần chiếm đa số trong gạo là carbohydrate (tinh bột). Mặt khác, gạo chứa hàm lượng các chất đạm ở mức trung bình chỉ chiếm 8% và hàm lượng chất béo ở mức 1% không đáng kể [16]. Bột gạo rất giàu tinh bột và được sử dụng để làm nguyên liệu thực phẩm khác nhau. Gạo lứt rất giàu một số vitamin, đặc biệt là B1 hoặc thiamine (0,34 mg), B2 hoặc riboflavin (0,05 mg), niacin hoặc axit nicotinic (4,7 mg). Ngược lại, gạo trắng nghèo vitamin (0,09 mg vitamin B1, 0,03 mg vitamin B2 và 1,4 mg niacin) và khoáng chất vì chúng chủ yếu được tìm thấy ở các lớp bên ngoài của hạt, được loại bỏ bằng quá trình đánh bóng, hoặc "tẩy trắng" trong khi gạo đỏ rất giàu các vitamin này do quá trình đặc biệt của chúng [17].

1.2. XÂM NHẬP MẶN ẢNH HƯỞNG TỚI CÂY TRỒNG

1.2.1. Ảnh hưởng của mặn lên cây trồng

Thực vật phát triển trong môi trường luôn biến đổi và thường xuyên phải đối mặt với các yếu tố bất lợi phi sinh học khác nhau, chẳng hạn như hạn hán, độ mặn cao, ngập lụt và nắng nóng. Mặn là một trong những yếu tố bất lợi phi

sinh học quan trọng nhất, ảnh hưởng đến hơn 20% diện tích đất canh tác, trong đó bao gồm một nửa diện tích là tưới tiêu và tỷ lệ này dự kiến sẽ tăng lên trong tương lai [18].

Sự tiếp xúc của thực vật với điều kiện môi trường bất lợi trong quá trình phát triển ảnh hưởng xấu đến sinh lý và thay đổi phát triển. Độ mặn của đất, do nồng độ muối cao, có thể được coi là stress phổ biến nhất mà cây trồng phải đối mặt hiện nay. Tác động tiêu cực của stress mặn là làm giảm sự nảy mầm hạt, sự phát triển của cây con, và sự phát triển của lá, cũng như giảm diện tích quang hợp đã được ghi nhận ở các nghiên cứu trước. Ngoài ra, nồng độ K^+ trong tế bào thực vật giảm mạnh khi thực vật bị stress mặn, dẫn đến mất cân bằng ion [19]. Sự chuyển dịch của muối vào rễ và chồi là kết quả thông lượng thoát hơi nước để duy trì nước trạng thái của cây và sự thoát hơi nước không được kiểm soát này có thể gây ra mức độ tích tụ ion độc hại trong chồi [19]. Phản ứng của thực vật với nồng độ muối rất phức tạp và dẫn đến những thay đổi về hình thái, sinh lý của chúng và trao đổi chất.

1.2.2. Ảnh hưởng của mặn lên cây lúa

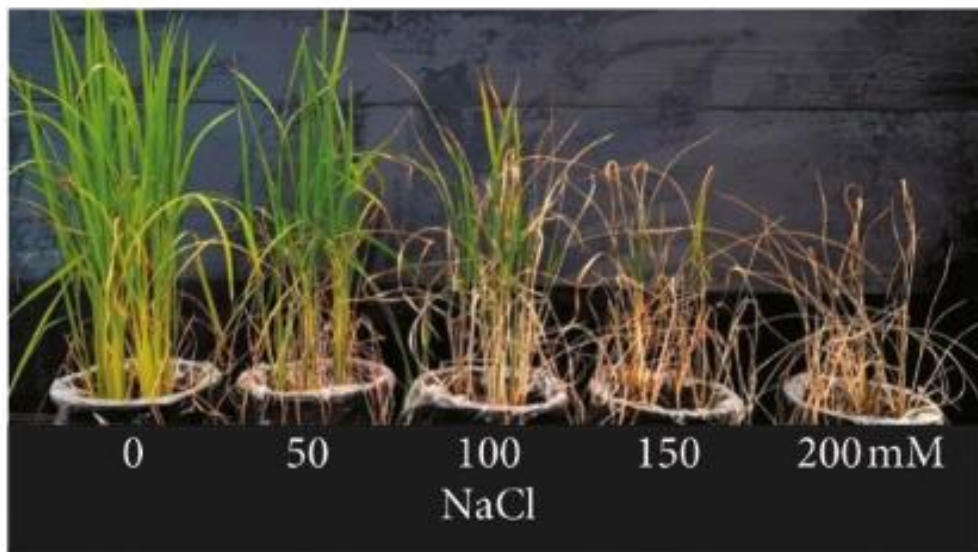
1.2.2.1 Ảnh hưởng của mặn đến sinh lý cây lúa

Nguyên nhân chính gây hại cho cây lúa trong môi trường mặn là do sự hấp thụ ion Na^+ quá mức dẫn đến độc tố ion và stress thẩm thấu. Sự thiếu hụt K^+ và Ca^{2+} có thể dẫn đến tỷ lệ Na^+/K^+ cao, từ đó giảm xút sự hấp thu chất dinh dưỡng [20]. Sự ức chế hấp thu Ca^{2+} do Na^+ gây ra làm giảm tốc độ tăng trưởng của chồi. Trong nghiên cứu của Cha-um và cộng sự (2007), Alamgir và cộng sự (1999) đã báo cáo rằng stress mặn làm giảm các sắc tố quang hợp, bao gồm sự giảm nồng độ chất diệp lục, kèm theo các triệu chứng nhiễm độc Cl^- và đó là những đặc điểm hình thái và sinh lý phổ biến của thực vật với stress mặn [21, 22].

Các gốc oxy hóa tự do (ROS) được tạo ra từ những phản ứng tkhi cây trồng đối mặt với stress mặn. Khi ROS được sản sinh quá mức, chúng sẽ phản ứng với các thành phần khác nhau của tế bào dẫn đến các tổn thương oxy hóa (tức là peroxy hóa lipid, oxy hóa protein, phân mảnh DNA, v.v.) trong tế bào. Thông thường, nếu hàm lượng ROS quá cao thì nên được loại bỏ một cách hiệu quả để duy trì tăng trưởng tối ưu. Do đó thực vật được trang bị một loạt các hợp chất hoặc enzyme chống oxy hóa để loại bỏ các gốc ROS có hại [23].

1.2.2.2 Ảnh hưởng của stress mặn đến hình thái cây lúa

Chiều cao cây là một thông số hình thái cơ bản mà trong bất kỳ điều kiện căng thẳng phi sinh học và/hoặc sinh học nào cũng trải qua những thay đổi, điều này cho thấy sự chuyển biến hình thái trong quá trình sinh trưởng và phát triển của cây trồng (Xem hình 1.3). Việc đóng khí khổng do stress mặn dẫn đến tăng nhiệt độ và giảm độ dài của lá. Khi cây lúa tiếp xúc với các nồng độ giảm mặn của NaCl, sự kéo dài và phân chia tế bào bị ảnh hưởng, điều này gây ra sự giảm tăng trưởng năng suất của rễ và lá ở mức đáng kể [24].



Hình 1.3: Hình thái cây lúa trước các áp lực của muối khác nhau [24].

1.3. CÁC BIỆN PHÁP HẠN CHẾ TÁC HẠI CỦA STRESS MẶN

1.3.1 Chọn tạo giống chống chịu

Những năm gần đây cho thấy stress mặn của cây lúa vẫn đang là một thách thức đối với các nhà chọn tạo giống vì điều này ảnh hưởng trực tiếp đến sản lượng lúa gạo. Các nhà khoa học hy vọng rằng việc nhân giống các giống lúa chịu mặn sẽ được đẩy nhanh bằng cách mở xé các yếu tố di truyền làm cơ sở cho khả năng chịu mặn và sử dụng công nghệ sinh học để tạo ra các cây trồng chịu mặn. Theo Nguyễn Thị Lang và cộng sự (2002), đã có nghiên cứu so sánh đánh giá tính kháng mặn tại khu vực đồng bằng Sông Cửu Long 62 giống lúa cổ truyền với giống Pokkali là giống chuẩn kháng và giống IR29 là giống chuẩn nhiễm để tìm ra các giống có khả năng kháng mặn điển hình như *Nếp Áo Già*, *Trắng Điệp*, *Móng Chim*, *Móng Chim Roi* và *Nếp Bờ Giếng* [25]. Ngoài sự lựa chọn và đánh

giá các giống lúa truyền thống, hiện nay các nhà khoa học còn có thể tuyển chọn các dòng lúa kháng mặn bằng phương pháp tái sinh cây lúa hoàn chỉnh qua chọn lọc và nuôi cấy túi phấn, cụ thể như các dòng: *C53/Đốc Phụng-17*, *C53/Đốc Phụng-19*, *C53/Pokkali-5*, *C53/Pokkali-11*, *C53/Pokkali-27*, *C53/Pokkali-42*, *C53/Pokkali-43*, *C53/Pokkali-44*, *C53/D51-4*, *C53/D5* [26, 27].

1.3.2 Chuyển gen

Yếu tố chịu mặn trên cây lúa đã được đưa vào xử lý bằng phương pháp đưa gen ngoại lai hoặc tăng cường biểu hiện của gen chịu mặn có sẵn trong cây lúa. Các nhà khoa học đã tìm ra các gen mới như *HVA1* và *codA* cung cấp khả năng chịu hạn và mặn đã được giải trình tự và chuyển vào cây lúa từ chủng *Arthrobacter globiformis* được phân lập [28, 29]. Năm 2015, Das và cộng sự đã đưa ra báo cáo cho rằng một gen biểu hiện quá mức có tên là *HFBV2* liên quan đến tính chống chịu mặn cao ở cây lúa bằng cách ngăn chặn các hoạt động của RNAi [30]. Hơn nữa, trong cùng năm Haong và cộng sự đã cung cấp bằng chứng về mức độ cải thiện đáng kể khả năng chịu mặn bằng cách đưa vào ba gen biểu hiện quá mức chống apoptotic ngoại sinh có nguồn gốc khác nhau, đó là *AtBAG4* (*Arabidopsis*), *Hsp70* (*Citrus tristeza virus*) và *p35* (*Baculovirus*) vào trong lúa [31]. Điều này đã chứng minh các đặc điểm liên quan đến các giống chống chịu bao gồm cải thiện khả năng quang hợp, tính toàn vẹn của màng, hệ thống duy trì ion và ROS, tốc độ tăng trưởng và các thành phần năng suất.

1.3.3 Đột biến

Trong những năm trở về trước, xử lý đột biến bằng phương pháp vật lý hay rõ ràng hơn là việc sử dụng pháp chiếu xạ bằng tia gamma sau đó sàng lọc stress do muối dựa trên Hệ thống đánh giá chỉ tiêu. Nhiều nghiên cứu đã được báo cáo trên lúa tạo về khả năng chịu mặn ở lúa đột biến, *ST-87* và *ST-301* được chọn trong số 1.500 dòng đột biến M6 [21].

Ngày nay, theo sự tiến bộ của nền công nghệ sinh học, kỹ thuật chỉnh sửa hệ gen bằng *CRISPR-Cas9* dẫn đầu xu hướng hay còn được gọi dưới cái tên là đột biến InDels [33]. Nhiều nghiên cứu trên thế giới gần đây cho thấy rằng việc đột biến một số gen chức năng cần thiết lúa sẽ giúp cho cây có khả năng chống chịu mặn, đặc biệt có thể biết đến nghiên cứu về sự giảm mật độ khí khổng khi mất các đột biến chức năng của *dst*, ít nhất, một phần là do sự

điều hòa quá mức của các gen phát triển khí khổng *SPCH1*, *MUTE* và *ICE1*. Đột biến *dstΔ184–305* không có *Cas9* thể hiện khả năng chống chịu ở mức độ trung bình đối với áp lực thâm thấu và áp lực muối ở mức độ cao trong giai đoạn cây con. Cùng với đó việc đột biến nhằm chỉnh sửa gen *OsRR22-Grna* bằng công cụ *CRISPR/Cas9* có chủ đích cũng có thể giúp cây có khả năng chịu mặn ở mức nhất định [34].

1.3.4 Sử dụng vi sinh vật

Trong hoàn cảnh môi trường đất bị xâm nhập mặn một cách đáng nghiêm trọng, kèm theo đó là vấn đề thiếu nguồn nước ngọt đáng kể thì giải pháp hiện tại là sử dụng chế phẩm vi sinh để cải thiện những vùng đất bị nhiễm mặn đã được đưa ra. Vi khuẩn nội sinh thực vật là vi khuẩn cư trú bên trong cây, có khả năng nội sinh bên trong rễ, lá, thân. Nhóm vi sinh vật này không gây hại cho cây chủ. Chúng thúc đẩy sự phát triển của cây trồng nhờ khả năng cố định đạm sinh học và hòa tan lân khó tan và khả năng phòng vệ của cây. Chế phẩm vi sinh cải tạo đất nhiễm mặn với thành phần là các vi sinh vật chuyên phân giải P, K hay thậm chí là Ca và các hợp chất hữu cơ hỗ trợ cho cây trồng phát triển sinh trưởng tốt hơn, cùng với đó là những khả năng tạo màng sinh học kháng mặn cho cây trồng. Các chủng vi sinh vật có trong phân bón vi sinh phân giải các chất khó tan, cung cấp năng lượng giúp cây vượt hạn mặn vì quá trình trao đổi chất và hút nước giữ rễ cây và môi trường được diễn ra thuận lợi [35].

1.4. VI SINH VẬT KÍCH THÍCH SINH TRƯỞNG - PGPR

1.4.1 PGPR

Vi sinh vật Rhizobacteria với một số khả năng liên quan đến sự phát triển và sinh trưởng của thực vật hay còn được gọi với tên gọi vi sinh vật vùng rễ kích thích sinh trưởng ở thực vật (Plant growth promoting rhizobacteria - PGPR). PGPR thúc đẩy sinh trưởng thông qua một số con đường trực tiếp hoặc gián tiếp. Trong những nghiên cứu gần đây từ các nhà khoa học, nhiều chủng khuẩn thuộc nhóm vi sinh vật PGPR đã được tìm ra và nghiên cứu, điển hình một số loài thuộc các chi như: *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Paenibacillus*, *Serratia*... [36] Những lợi ích mà những vi khuẩn này mang lại có thể bao gồm: khả năng cung cấp chất dinh dưỡng, sản xuất phytohormone, kích thích phát triển chồi và rễ, bảo vệ hoặc chống lại một số

tác nhân gây bệnh thực vật và các stress khác [36]. Ngoài ra, PGPR có thể giúp thực vật chống lại các stress phi sinh học như mặn và hạn hán, đồng thời sản sinh các enzyme cần thiết để giúp thực vật khỏi một số độc tính từ kim loại nặng. PGPR đã trở thành biện pháp quan trọng trong nông nghiệp do khả năng giảm phân bón hóa học và thuốc trừ sâu, thúc đẩy tăng trưởng và sức khỏe của cây trồng, đồng thời nâng cao chất lượng đất [36].

1.4.2 PGPR giảm thiểu tác hại của các điều kiện bất lợi phi sinh học

Bất kỳ điều kiện môi trường bất lợi nào có thể ảnh hưởng đến stress phi sinh học như kim loại nặng, nhiễm mặn, hạn hán và lũ lụt ảnh hưởng đến hệ vi sinh vật, thực vật và hệ sinh thái xung quanh. Đối với mỗi điều kiện stress khác nhau, hệ vi sinh vật tại môi trường xung quanh nói chung và nhóm PGPR nói riêng sẽ có những cơ chế riêng biệt nhằm đáp ứng lại sự bất lợi đó. Tại các vùng đất nhiễm kim loại nặng khó khăn để thực vật phát triển, PGPR đã có những cơ chế biến đổi như tích lũy sinh học kim loại, hấp thụ sinh học, kết tủa, oxy hóa và khử kim loại theo con đường enzym, tác dụng độc hại của các ion kim loại nặng [37]. Trong điều kiện stress mặn, PGPR hỗ trợ cây trồng chịu mặn bằng cách loại bỏ các gốc oxy hóa (ROS) và giảm mức độ etylen. Cùng với đó cây trồng trong điều kiện hạn, PGPR giúp cải thiện hàm lượng nước tương, hệ thống rễ để hút nước, tạo điều kiện thuận lợi cho sự phát triển của chồi và tăng cường các sinh trưởng thực vật. Nhiều báo cáo chỉ ra ảnh hưởng của vi khuẩn rhizobacterium đối với sinh lý thực vật trong điều kiện tiếp xúc với môi trường ngập lụt cho rằng hệ thống rễ cây có liên quan đến tác động từ quần thể vi khuẩn trong việc điều hòa etylen để cây trồng thích nghi trong điều kiện bất lợi đó.

1.4.3 PGPR giảm thiểu tác hại stress mặn

Tác động chính của hạn mặn lên sinh trưởng của thực vật là làm mất cân bằng dinh dưỡng hoặc ngăn cản sự hấp thu dinh dưỡng thích hợp. Trong đó, ACC deaminase được sản sinh từ PGPR được sử dụng rộng rãi để chống lại stress mặn ở nhiều cây trồng như cà chua, lạc... [38]. PGPR thể hiện những đặc điểm có lợi cho phép chúng giảm thiểu tác hại hạn mặn do nồng độ muối cao gây ra. PGPR có thể cải thiện sự phát triển của thực vật trong môi trường muối theo hai cách chính: điều chỉnh các hệ thống phản ứng của thực vật và tổng hợp các hợp chất chống ROS trong quá trình tiếp xúc với muối. Các cơ chế để cải thiện sự tăng trưởng và sức đề kháng của thực vật tiếp xúc với độ mặn bao gồm: cải thiện sự hấp thu chất dinh dưỡng, duy trì cân bằng nước, ảnh hưởng đến cân

bằng nội môi ion, duy trì tỷ lệ K^+/Na^+ cao; điều hòa các chất thâm thấu, điều chỉnh sự biểu hiện của các gen phản ứng với muối [38].

1.5. ỨNG DỤNG PGPR ĐỂ GIẢM TÁC HẠI CỦA MẶN TRÊN CÂY LÚA

1.5.1 Nghiên cứu trên thế giới

Sử dụng vi sinh vật để nâng cao tính chống chịu mặn trên cây lúa đã được công bố trong nhiều nghiên cứu. Điển hình, chủng vi sinh vật *Enterobacter* sp. P23 có khả năng kháng muối và sản sinh enzyme ACC deaminase, từ đó tác động kích thích sinh trưởng và làm giảm sự sản sinh, tích tụ etylen trên cây lúa [39]. Ngoài ra, nghiên cứu của Jaemsaeng và cộng sự (2018) cho thấy rằng, chủng *Streptomyces* sp. GMKU 336 sản sinh enzyme ACC deaminase, có thể nâng cao tính kháng mặn thông qua việc giảm tích tụ ethylen, cân bằng nồng độ ion nội bào và phân giải các dạng oxy phản ứng mạnh [40]. Khả năng chịu mặn của cây lúa cũng được nâng lên nhờ vi khuẩn *Glutamicibacter* sp. (YD01). Chủng vi khuẩn này có khả năng sản sinh enzym ACC deaminase, IAA, giảm sản sinh etylen và tăng cường hấp thụ K^+ .

1.5.2 Một số nghiên cứu ở Việt Nam

Hiện nay, các vi sinh vật kích thích sinh trưởng trên cây lúa đã và đang được nghiên cứu. Gần đây nhất, Cuong và cộng sự (2020) đã phân lập được 48 dòng vi khuẩn từ rễ cây lúa tại vùng nhiễm mặn ở tỉnh Bến Tre và Sóc Trăng, trong đó có 22 dòng có khả năng sản sinh IAA, 17 dòng có thể sinh trưởng trên môi trường không chứa nguồn nitơ và Nguyễn Huy Anh và Nguyễn Hữu Hiệp (2019) đã đánh giá hiệu quả của 2 dòng vi khuẩn *Burkholderia* sp. PL19 và *Acinetobacter* sp. GH1-1 được phân lập từ đất lúa nhiễm mặn tại Bạc Liêu và Sóc Trăng [41, 42]. Kết quả cho thấy các dòng vi khuẩn này có thể tiết kiệm lượng phân N sử dụng cho cây lúa trồng trên điều kiện đất nhiễm mặn lên đến 50% mà vẫn đảm bảo các chỉ tiêu nông học tương đương sử dụng đầy đủ lượng phân NPK.

CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. VẬT LIỆU

Nguyên liệu được sử dụng trong nghiên cứu là mẫu đất vùng rẫy và rẫy cây lúa được thu thập từ vùng đất nhiễm mặn ở Kiên Giang khu vực đồng bằng sông Cửu Long. Cùng với đó là hạt giống lúa Khang dân 18 đạt chuẩn từ Vinaseed – Công ty cổ phần tập đoàn cây trồng Việt Nam được bảo quản kỹ lưỡng nhằm mục đích tiến hành lây nhiễm khuẩn trong các môi trường *in vitro* và nhà lưới.

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

Thời gian thực hiện đề tài:

+ Nội dung 1: Phân lập hệ vi sinh vật đất nhiễm mặn và hệ vi sinh vật vùng rẫy cây lúa nhiễm mặn từ 02/23 đến 04/2023.

+ Nội dung 2: Sàng lọc, đánh giá và tuyển chọn các chủng vi sinh vật có khả năng kích thích sinh trưởng, phát triển và nâng cao tính chịu mặn của cây lúa từ 04/23 đến 8/2023.

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Thu mẫu đất và rẫy cây lúa tại Kiên Giang

Địa điểm thu mẫu được xác định là vùng đất bị nhiễm mặn, tại vùng đất Hòn Đất, Kiên Giang với tọa độ 10°06'04.0"N 104°57'17.4"E đã được chọn làm địa điểm thu mẫu. Mẫu đất và rẫy cây lúa được thu tại 03 địa điểm. Theo đó, mẫu lúa sẽ được thu thập trọn vẹn các phần rễ, thân và lá và được bọc kín trong túi nilong khử trùng. Mẫu lúa thu được phải đảm bảo vẫn còn sống khi được di chuyển. Ngoài ra, mẫu đất được thu thập tại nơi không có chứa hệ rễ lúa và được lấy từ bề mặt tới độ sâu 15 cm. Mẫu đất sau đó sẽ được bọc trong túi nilon khử trùng.

2.2.2. Bẫy vi sinh vật nội sinh rẫy cây lúa có nguồn gốc từ đất

Để thu được vi sinh vật có nguồn gốc từ đất mà có thể sinh sống trong rẫy cây lúa, lúa dòng KD18 sẽ được trồng trên cát trắng khử trùng và bổ sung 1 g đất thu tại Kiên Giang. Mẫu đối chứng cũng được tiến hành tương tự, tuy nhiên mẫu sẽ được khử trùng tại 121°C trong 20 phút. Hạt giống KD18 sau khi khử trùng sẽ được đem trồng trên các chậu chứa đất khử trùng và không khử trùng. Sau 1 tháng, chiều dài thân, rẫy và khối lượng tươi của chúng sẽ được xác định.

2.2.3. Xử lý mẫu rễ cây lúa

Chọn các cây lúa sinh trưởng tốt, khỏe mạnh, không còi cọc, không bị sâu hại hay biểu hiện bệnh trên ruộng bị nhiễm mặn. Thêm vào đó, mẫu rễ cây lúa sau 1 tháng trên cát có xử lý với mẫu đất thu tại Kiên Giang cũng sẽ được xử lý. Cụ thể, mẫu rễ cây thu thập được rửa sạch với nước, để khô tự nhiên và sau đó được khử trùng tại phòng thí nghiệm. Các phần rễ được cắt và khử trùng mẫu bằng Tween 80 trong 30 giây, tiếp theo rửa bằng cồn 70% trong 5 phút và NaClO trong 3 phút, rửa lại với nước cất vô trùng ít nhất 5 lần để tẩy rửa các loại hóa chất còn thừa.

2.2.4 Phân lập vi sinh vật nội sinh rễ cây lúa có khả năng sản sinh ACC deaminases tại vùng nhiễm mặn

Phân lập các dòng vi sinh vật nội sinh rễ cây lúa, vi sinh vật trong đất tại vùng nhiễm mặn được tiến hành theo phương pháp pha loãng của Huu và cộng sự (2022) [43]. Các chủng vi khuẩn được phân lập từ mẫu đất và rễ lúa thu thập tại các vùng nhiễm mặn ở Kiên Giang, quá trình triển khai được thực hiện tại Phòng Công nghệ tế bào thực vật Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Các chủng vi sinh vật được cấy trải lên hai môi trường thạch LB và ACC (các mẫu được lặp lại ít nhất 3 lần) và được ủ ở 28°C trong 3 ngày cho đến khi phát hiện các khuẩn lạc. Các khuẩn lạc có các đặc điểm hình thái khác biệt đã được chọn lọc và làm sạch bằng cách nuôi cấy phụ hai lần trên các môi trường tương ứng trước khi chúng được bảo quản trong dung dịch glycerol 25% ở -80°C [44].

2.2.5 Phương pháp tách chiết DNA tổng số

DNA vi khuẩn sẽ được tách chiết theo phương pháp Alkaline lysis buffer như sau: Cho 20 µL Alkaline lysis buffer (2,5 ml 10% SDS, 5,0 ml 1N NaOH và 92.5 ml H₂O khử trùng). Bổ sung 2 µL dung dịch vi khuẩn nuôi qua đêm tại 28°C vào ống đựng dung dịch Alkaline lysis buffer và trộn đều. Đặt ống có chứa dung dịch khuẩn và Alkaline lysis buffer vào máy PCR với chu trình nhiệt 95°C trong vòng 10 phút. Sau đó đặt các ống này trên đá trong vòng 15 phút. Thêm 180 µL H₂O khử trùng vào mỗi ống và ly tâm ở 4000 vòng/phút trong 5 phút. Dịch nổi được chuyển sang ống 200 µL mới và sử dụng như khuôn DNA cho các thí nghiệm tiếp theo [45].

2.2.6 Phân tích trình tự và khuếch đại DNA

Việc xác định phân loại của PSB đã chọn được thực hiện bằng cách sử dụng trình tự gen 16S rRNA. Các đoạn mồi 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') và 1492R (5'-ACGGCTACCTTGTTA-3') [43] được sử dụng để khuếch đại gen 16SrRNA. Tất cả các phản ứng PCR được thực hiện trong 25 μ L thể tích cuối cùng chứa với 12,5 μ L MasterMix, 1 μ L mỗi loại 27F/1492R (10 pM), 1 μ L DNA khuôn, 9,5 μ L H₂O. Phản ứng PCR được tiến hành trên máy PCR hãng *BIO RAD T100™ Thermal Cycler* với chu trình nhiệt như sau: biến tính ban đầu ở 94°C trong 5 phút, tiếp theo là 35 chu kỳ biến tính ở 94°C trong 30 giây, ủ ở 54°C trong 30 giây và kéo dài ở 72°C trong 1 phút 30 giây, với bước kéo dài cuối cùng ở 72°C trong 10 phút. Đoạn mồi được sử dụng cho vùng biến đổi mục tiêu 16S rRNA gen V1–V5. Các sản phẩm PCR (~1500 bp đối với trình tự 16S rRNA đã được giải trình tự thương mại. Trình tự DNA tạo ra tìm kiếm căn chỉnh bằng công cụ BLAST trên cơ sở dữ liệu NCBI (đối với trình tự 16S rRNA. Các trình tự 16S rRNA đã được gửi vào NCBI GenBank và được so sánh với nhau trong phần mềm MEGA X [43].

2.2.7. Đánh giá các chỉ tiêu hóa sinh của hai chủng vi sinh vật

Các đặc điểm kích thích sinh trưởng của vi sinh vật sẽ được đánh giá bằng các phương pháp khác nhau dựa vào nghiên cứu của Hahib và cộng sự (2016), như khả năng cố định nito sử dụng phương pháp Kjeldahl, khả năng sản sinh IAA sử dụng phương pháp Salkowski, tổng hợp ACC deaminase, tổng hợp NH₃ phân giải phosphate, phân giải kali, phân giải canxi, định lượng EPS, định tính màng sinh học, kháng mặn và kháng kháng sinh [46].

2.2.7.1 Phân giải phosphate

Các chủng vi sinh vật được nuôi trong môi trường LB lỏng ở 28°C, 16 giờ, tốc độ lắc 280 vòng/phút. Dịch nuôi được tiếp xúc với môi trường PKO (Pikovskaya) [46] bằng phương pháp chấm điểm khuẩn, nhỏ 1 μ L trên mặt đĩa thạch. Sau đó xác định khả năng phân giải phosphate khó tan bằng cách theo dõi sự hình thành vòng phân giải của các chủng vi sinh vật sau 7 ngày ở 28°C, điều kiện tối.

2.2.7.2 Phân giải kali

Các chủng vi sinh vật được nuôi trong môi trường LB lỏng ở 28°C, 16 giờ, tốc độ lắc 280 vòng/phút. Dịch nuôi được tiếp xúc với môi trường Alex

(Alexandrov) [47] bằng phương pháp chấm điểm khuẩn, nhỏ 1 μL trên mặt đĩa thạch. Sau đó xác định khả năng phân giải kali khó tan bằng cách theo dõi sự hình thành vòng phân giải của các chủng vi sinh vật sau 7 ngày ở 28°C, điều kiện tối.

2.2.7.3 Phân giải Canxi

Các chủng vi sinh vật được nuôi trong môi trường LB lỏng ở 28°C, 16 giờ, tốc độ lắc 280 vòng/phút. Dịch nuôi được tiếp xúc với môi trường CDB [48] bằng phương pháp chấm điểm khuẩn, nhỏ 1 μL trên mặt đĩa thạch. Sau đó xác định khả năng phân giải canxi khó tan bằng cách theo dõi sự hình thành vòng phân giải của các chủng vi sinh vật sau 7 ngày nuôi cấy ở 28°C, điều kiện tối.

Chỉ số phân giải SI với phosphate, kali và canxi được xác định như sau: $SI = D/d$. Trong đó, D: đường kính vòng phân giải; d: đường kính khuẩn lạc.

2.2.7.4 Tổng hợp ACC deaminases

Các chủng vi sinh vật được nuôi trong môi trường LB lỏng ở 28°C, 16 giờ, tốc độ lắc 280 vòng/phút. Dịch nuôi được tiếp xúc với môi trường ACC [49] bằng phương pháp chấm điểm khuẩn, nhỏ 1 μL trên mặt đĩa thạch. Sau đó xác định khả năng các chủng vi sinh vật sinh trưởng và phát triển sau 7 ngày ở 28°C, điều kiện tối.

2.2.7.5 Phương pháp nhuộm Gram

Nuôi khuẩn trên bề mặt thạch: thu được khuẩn lạc. Khuẩn lạc được trải đều trên lame, sau đó hong khô trên ngọn lửa đèn cồn. Tiếp theo, đổ dung dịch gentian lên mẫu khuẩn trên lame 30s. Rửa từ từ thuốc tím với nước cất, nhuộm vết trải vi khuẩn với lugol để tạo phức hợp không tan với tím gentian để giúp giữ màu tím 30 giây, cuối cùng rửa trôi với nước. Cho vết trải vi khuẩn tiếp xúc với cồn 96 độ 30 giây, rồi rửa với nước cất. Nhuộm vết trải vi khuẩn với thuốc nhuộm fuchsin 30s, sau đó rửa với nước cất. hong khô trên đèn cồn và soi kính hiển vi [50]. Trong đó màu xanh tím là vi khuẩn gram dương và hồng là vi khuẩn gram âm.

2.2.7.6 Nhuộm màng sinh học

Bổ sung 100 μL dung dịch pha loãng cho mỗi giếng vào đĩa 96 giếng. Ủ đĩa microtiter trong 24 giờ ở 28°C. Sau khi ủ, đổ các tế bào ra ngoài bằng cách lật ngược đĩa và lắc hết chất lỏng. Nhẹ nhàng nhấn chìm đĩa trong một chậu

nước nhỏ (nghĩa là sử dụng đáy của hộp đựng đầu pipet dành cho pipetmen P1000 làm chậu), sau đó loại bỏ nước bằng cách lập ngược đĩa lại. Lặp lại quá trình này một đến hai lần. Thêm 125 μL dung dịch cristal violet 0,1% trong nước vào mỗi giếng. Ủ đĩa microtiter ở nhiệt độ phòng trong 10-15 phút. Rửa sạch đĩa 3-4 lần bằng nước bằng cách ngâm trong chậu nước như đã nêu ở trên, và để khô qua đêm. Thêm 125 μL axit axetic 30% trong nước vào mỗi giếng của tấm microtiter để hòa tan crystal violet. Ủ đĩa microtiter ở nhiệt độ phòng trong 10-15 phút. Chuyển 125 μL CV đã hòa tan sang đĩa microtiter đáy phẳng mới. Định lượng độ hấp thụ trong máy đọc bản mỏng Elisa ở bước sóng 550 nm sử dụng axit axetic 30% trong nước làm mẫu [51]

2.2.7.7 Định tính Amoni

Định lượng amoniac được thực hiện bằng cách sử dụng đĩa 96 giếng microtiter đáy phẳng và mật độ quang học được thực hiện bằng đầu đọc vi bản (Thermo Science™ Multiskan™ FC -MIB 51119000). 50 μL dung dịch sau ly tâm được chuyển ống 1.5 ml khác nhau và 100 μL thuốc thử Nessler được thêm vào sau đó. Ủ đĩa trong 10 phút ở nhiệt độ phòng và lắc trong 30 giây. Sau đó pha loãng 6 lần bằng cách cho 55 μL của mỗi hỗn hợp phản ứng được chuyển ống 1.5 ml mới và 330 μL nước deion được thêm vào để thu được thể tích cuối cùng là 385 μL . 100 μL của dung dịch pha loãng được cho vào mỗi giếng trên đĩa microtiter và đo ở bước sóng 450nm. Chất chuẩn được sử dụng là $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ với các nồng độ 0, 0,1, 0,2, 0,4, 0,8 1,6 mg/ml được sử dụng.

2.2.7.8 Định lượng IAA

Dựa trên phương pháp đo màu của Gordon và Weber (1951) [52]. Nuôi cấy vi khuẩn vào ống peniciline chứa 5 ml dung dịch LB + 0,1% tryptophan máy lắc trong 7 ngày, 28°C. Chuyển 2 ml dung dịch vi khuẩn vào các ống 2,0 ml và ly tâm ở tốc độ 12000 vòng/phút trong 10 phút. Chuyển 300 μL dịch nổi sau ly tâm vào các ống 2,0 ml. Tương tự 300 μL chất chuẩn được chuẩn bị ở các nồng độ 0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 và 200 $\mu\text{g/ml}$ (ppm) IAA. Chuyển 600 μL thuốc thử Salkowski vào các ống nghiệm chứa 300 μL chất chuẩn và mẫu. Ủ ở nhiệt độ phòng trong 25 phút rồi chuyển 100 μL sang các giếng microtiter và đọc ở bước sóng 530nm.

2.2.7.9 Đánh giá tính kháng mặn của vi khuẩn

Bổ sung 200 μ L dung dịch LB với các nồng độ NaCl vào đĩa microtiter 96 giếng. Bổ sung 1 μ L mỗi chủng khuẩn vào mỗi giếng chứa dung dịch LB với các nồng độ NaCl (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 và 11%). Thu kết quả sau 7 ngày, rồi quan sát sự sinh trưởng của các chủng khuẩn cần kiểm tra.

2.2.7.10 Định lượng EPS

Chuẩn bị 100 ml dung dịch EPS vào bình tam giác 250 ml đã được khử trùng. Bổ sung 2 μ L khuẩn mỗi bình, sau đó nuôi khuẩn trong tủ lắc 160 vòng/phút, 48 giờ, 28°C. Sau đó 50 ml dịch sẽ được chuyển ra ống falcon 50 ml và ly tâm ở 6000 vòng/phút, 4°C trong 15 phút. Dịch nổi sẽ được tủa với cồn tuyệt đối với tỉ lệ 1:3 ở 4°C, 24 giờ. Sau đó tiếp tục đem dung dịch có trong ống falcon đi ly tâm 10000 vòng/phút, 4°C trong 15 phút. Đổ bỏ phần dung dịch, phần cặn còn lại sẽ đem đi hong khô trong 58°C, 24 giờ. Tách phần cặn bám trên đáy ống falcon 50 ml đem đi cân, sẽ thu được khối lượng EPS mà các chủng vi sinh vật sản sinh [53]

2.2.8 Đánh giá khả năng khả năng kích thích sinh trưởng và nâng cao tính chịu mặn ở lúa trong điều kiện *in vitro*

Chủng khuẩn được nuôi qua đêm 16 giờ, 280 vòng/phút, điều kiện tối, 28°C sau đó đem đi nuôi hoạt hóa trong 4 giờ. Lấy 20 ml dung dịch khuẩn sau hoạt hóa sẽ được đem đi ly tâm 10000 vòng/phút, 4°C nhằm thu phần cặn khuẩn và bỏ phần dịch nổi phía trên. Hòa phần cặn khuẩn với 20 ml nước cất khử trùng, lắc đều, nhẹ nhàng để thu được dung dịch đồng nhất. Sau đó đo OD₆₀₀ và pha loãng dung dịch đến nồng độ 0,01. Hạt đã ngâm được xử lý bằng cồn etylic 70% trong 30 giây rồi rửa sạch bằng nước cất. Sau đó, hạt được xử lý với 0,1% thủy ngân clorua (HgCl₂) trong 10-15 phút, rửa sạch bằng nước cất vô trùng ba lần. Đặt hạt để nảy mầm trên giấy lọc trong đĩa petri đường kính 10 cm chứa 15 ml dung dịch nước cất khử trùng với các nồng độ muối NaCl khác nhau từ 0, 50, 100, 150, 200 mM. Cây con thu được sau 7 ngày ủ hạt trong điều kiện 25°C, tối sẽ được đem đi thu khối lượng [54].

2.2.9 Đánh giá khả năng khả năng kích thích sinh trưởng và nâng cao tính chịu mặn ở cây lúa ở nhà lưới

Chuẩn bị dung dịch vi khuẩn và khử trùng hạt giống với bước trên. Sau

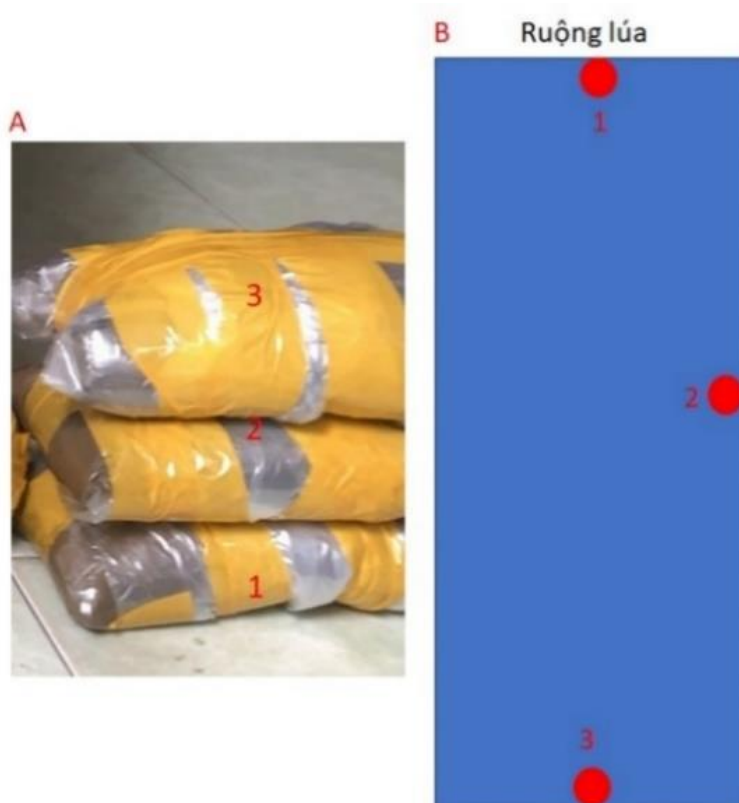
đó hạt được nảy nầm 7 ngày trong điều kiện 25°C, tối. Cây con thu được sẽ đem đi trồng vào mỗi giếng xốp ở khay nhựa (đường kính 5 cm) với môi trường 1/10 MS. Cây con được theo dõi sự sinh trưởng và phát triển trong 14 ngày sau khi trồng ở nhà lưới, sau đó bổ sung vào mỗi khay đánh giá mặn 60 g NaCl trong 10 L nước cất (khoảng 100 mM), tiếp tục theo dõi tới 14 ngày sau đó. 14 ngày sau khi xử lý năm, mẫu lúa sẽ được thu lại để đo chiều dài, khối lượng tươi, khối lượng khô của rễ và thân [7, 45].

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. KẾT QUẢ KHẢO SÁT ĐỊA ĐIỂM THU MẪU

3.1.1. Thu mẫu đất tại vùng nhiễm mặn

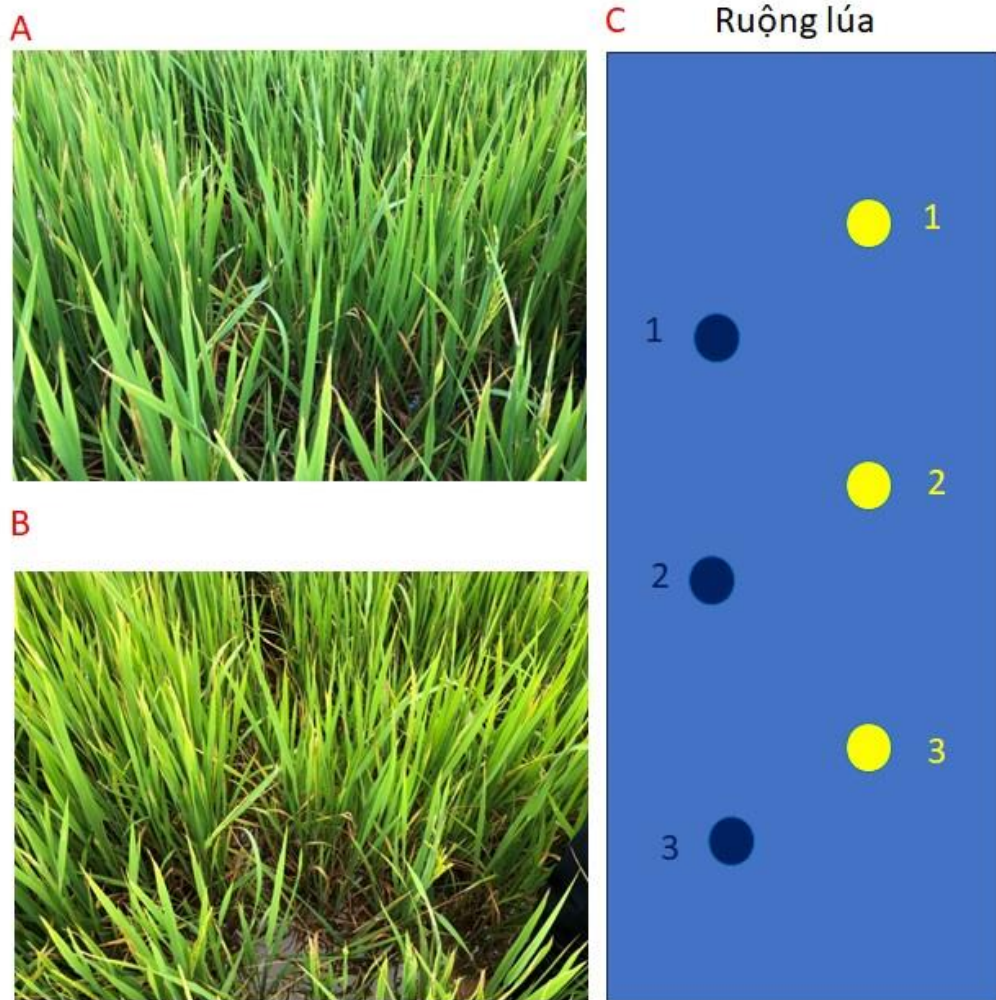
Để phục vụ việc phân lập một số chủng vi sinh vật từ đất để phục vụ cho nghiên cứu, 03 mẫu đất đã được thu thập tại 03 vị trí khác nhau mà tại đó không có cây lúa được trồng. Mỗi mẫu được thu thập cách bề mặt 5 và sâu đến 15 cm với khối lượng tối thiểu là 2 kg/mẫu. Sau khi được thu thập các mẫu sẽ được đóng gói vào túi nilong khử trùng và bọc kín (Hình 3.1).



Hình 3.1. Mẫu đất (A) và địa điểm thu tại ruộng (B) tại xã Sơn Bình, Hòn Đất, Kiên Giang

3.1.2. Thu thập mẫu cây lúa sinh trưởng tốt và kém

Các mẫu lúa sinh trưởng tốt và sinh trưởng kém tại đồng ruộng sẽ được thu thập với tối thiểu 03 mẫu mỗi loại để phục vụ cho việc phân lập các chủng vi sinh vật và so sánh các đặc điểm nông sinh học của các mẫu này (Hình 3.2). Các mẫu thu được bằng cách thu cả cụm lúa và sẽ được bọc kín khu rễ lúa bằng túi nilong khử trùng.



Hình 3.2. Mẫu cây lúa sinh trưởng tốt (A), sinh trưởng kém (B) và địa điểm thu tại ruộng với mẫu sinh trưởng tốt (màu vàng) và sinh trưởng kém (màu xanh đen) (B) tại xã Sơn Bình, Hòn Đất, Kiên Giang.

3.2. PHÂN LẬP VI SINH VẬT NỘI SINH RỄ CÂY LÚA CÓ KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP ACC DEAMINASES TẠI VÙNG NHIỄM MẶN

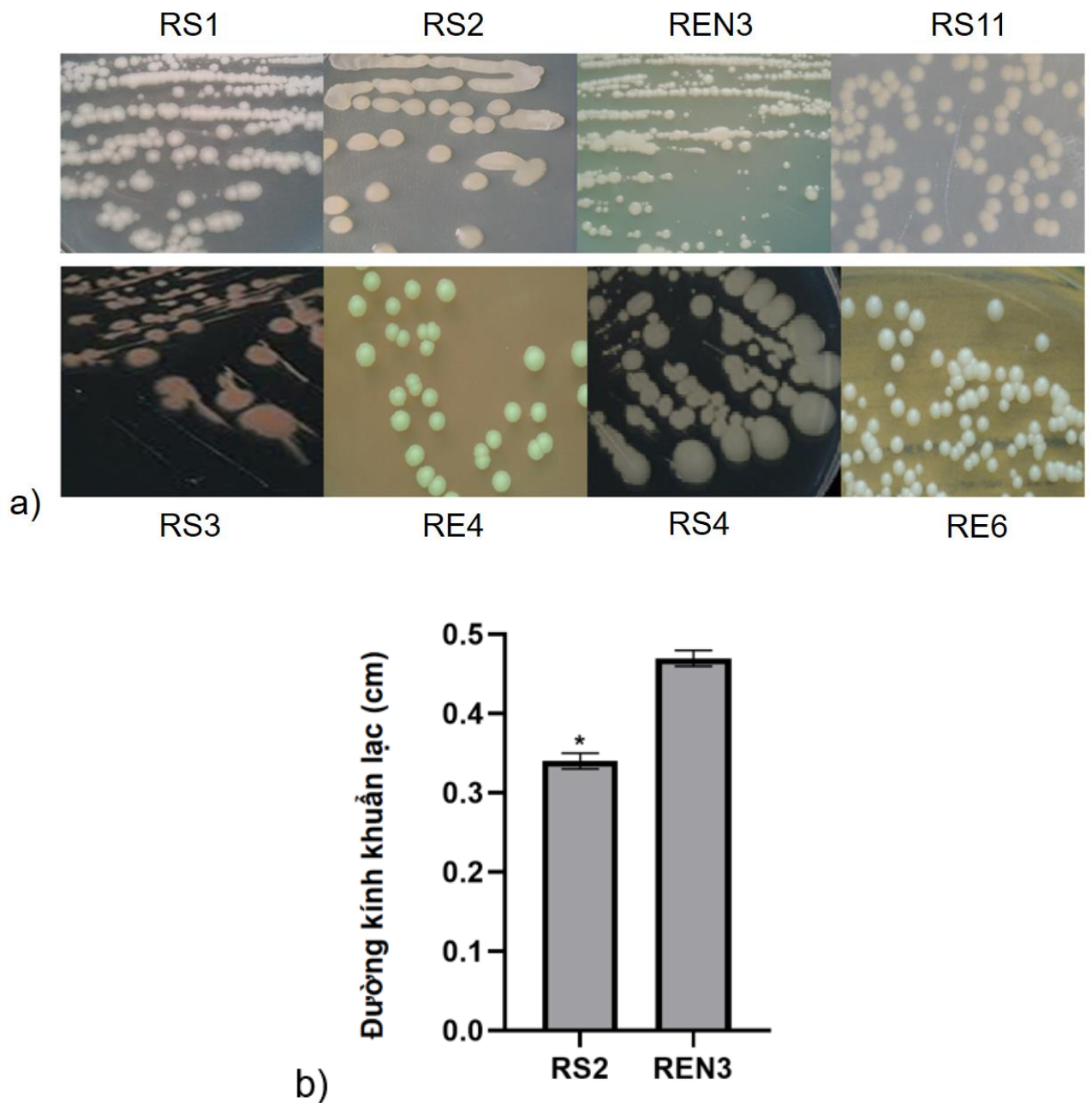
Stress mặn từ môi trường dẫn đến sản sinh ethylene, gây bất lợi đến sự sinh trưởng và phát triển của cây lúa. Do đó, việc kiểm soát tổng hợp ethylene ở lúa đang trở thành một chiến lược hấp dẫn giúp tăng năng suất cây trồng. Acid 1-aminocyclopropane-1-carboxylic (ACC) là tiền chất để tổng hợp ethylene trong thực vật. Các vi khuẩn vùng rễ kích thích sinh trưởng thực vật (PGPR) có khả năng sinh tổng hợp ACC deaminase có vai trò làm giảm nồng độ ethylene trong thực vật (được gọi là “yếu tố điều tiết stress, qua đó giúp cây sinh trưởng, phát triển tốt hơn trong điều kiện stress mặn. Nhằm tuyển chọn các chủng vi sinh vật tiềm năng kích thích sinh trưởng và khả năng chịu mặn, trước tiên cần thực hiện phân lập các chủng có khả năng sinh tổng hợp ACC

Deminases. Do đó, trước hết tiến hành tuyển chọn các chủng vi sinh vật bằng thí nghiệm xét hình thái sau khi trải trên các môi trường phân lập như LB và ACC. Kết quả thí nghiệm phân lập được 32 dòng khuẩn tại vùng nhiễm mặn được tiến hành theo phương pháp pha loãng của Tuong và cộng sự (2022) trên môi trường LB [43]. Sau đó, 32 chủng khuẩn này được tiến hành đánh giá khả năng sinh tổng hợp ACC deminases trên môi trường ACC. Trong số các chủng phân lập được, hai chủng RS2 và REN3 có khả năng sinh tổng hợp ACC deminases được lựa chọn để tiến hành nghiên cứu tiếp theo. Khả năng phân giải sinh tổng hợp ACC deminases được đánh giá thông qua phương pháp đường kính sinh trưởng của khuẩn lạc trong môi trường ACC (Xem hình 3.3b). Để đánh giá khả năng sinh tổng hợp ACC deminases của 2 chủng vi khuẩn phân lập, môi trường ACC là môi trường được sử dụng để nuôi cấy và kết quả sẽ được quan sát sau 07 ngày. Quan sát sự sinh trưởng, độ đục cũng như đường kính khuẩn lạc, kết quả chỉ ra hai chủng đều có khả năng sinh tổng hợp ACC deminases, tuy nhiên đường kính khuẩn lạc và mức độ sinh trưởng của chủng REN3 tốt hơn RS2 nhưng không đáng kể, lần lượt là $0,47 \pm 0,01$ cm và $0,34 \pm 0,01$ cm. So sánh với kết quả từ báo cáo của Li và cộng sự (2000) [55], chủng *Enterobacter* sp. PR14 mà RS2 cùng chi đã sản sinh ACC deminases nhằm chống lại các chất thuộc nhóm ROS khi cây lúa tiếp xúc với nồng độ 30 mM. Chủng *Serratia marcescens* tương đồng cao nhất với chủng REN3 được phân lập đã phát hiện ra rằng trình tự của chúng chứa mã *Gen acDs* có khả năng sản sinh ACC Deaminase được báo cáo trong nghiên cứu của Khan và cộng sự (2021) [56]. Vì đều có thể tổng hợp ACC deaminase, do đó RS2 và REN3 có thể phân giải ACC để không hình thành etylen trong rễ của cây lúa, điều đó làm giảm lượng etylen được sản sinh, thúc đẩy tăng trưởng của cây trồng dù trong điều kiện mặn.

Vi khuẩn được phân lập từ mẫu rễ cây lúa sinh trưởng tại vùng đất nhiễm mặn Kiên Giang thu được tổng số 32 vi khuẩn có hình thái khuẩn lạc như sau:

Bảng 3.1. Hình thái khuẩn lạc 32 chủng vi khuẩn nội sinh được phân lập từ rễ cây lúa sinh trưởng trên vùng đất nhiễm mặn tại Kiên Giang

Chủng	Hình thái	Chủng	Hình thái
RE1	Tròn, lồi, trắng sữa, bóng	RS1	Tròn, trắng vàng, lồi, bóng, mép trong
RE2	Vô định hình, lồi lõm, trắng đục, mép nhăn	RS2	Tròn, trắng sữa, lồi, bóng, mép trong
RE3	Tròn, lồi, trắng ngà, bóng	RS3	Tròn, trắng trong, lồi, bóng, mép trong
RE4	Tròn, phẳng, vàng ngà, mép nhăn	RS4	Tròn, lồi, trắng trong, bóng, mép trong
RE5	Tròn, lồi, trắng trong, bóng, mép trong	RS5	Vô định hình, trắng ngà, lồi lõm, mép nhăn
RE6	Tròn, trắng đục, lồi, bóng	RS6	Tròn, vàng hồng, nhăn, nóng, mép nhăn
RE7	Tròn, trắng trong, lồi, bóng, mép trong	RS7	Tròn, lồi, trắng trong, bóng, mép trong
RE8	Tròn, vàng chanh, lồi, bóng, mép trong	RS8	Tròn, vàng nâu, lồi, bóng, mép trong
RE9	Tròn, trắng đục, lồi, bóng	RS9	Vô định hình, trắng ngà, lồi lõm, mép nhăn
RE10	Tròn, trắng trong, lồi, bóng, mép trong	RS10	Tròn, lồi, trắng ngà, bóng, mép trong
RE11	Vô định hình, vàng nâu, phẳng, mép nhăn	RS11	Tròn, trắng vàng, phẳng, mép nhăn
RE12	Hình phóng xạ, nhiều nếp nhăn, trắng sữa, mép nhăn	RS12	Tròn, phẳng, vàng xanh, mép nhăn
RE13	Tròn, vàng trong, phẳng, bóng, mép trong	RS13	Tròn, trắng vàng, lồi, bóng
RE14	Tròn, trắng ngà, phẳng, mép nhăn	RS14	Tròn, trắng vàng, lồi, bóng
RE15	Tròn, trắng sữa, lồi, bóng, mép trong	RS15	Tròn, lồi, trắng trong, bóng, mép trong
RE16	Tròn, trắng vàng, lồi, bóng	RS16	Vô định hình, phẳng, xanh



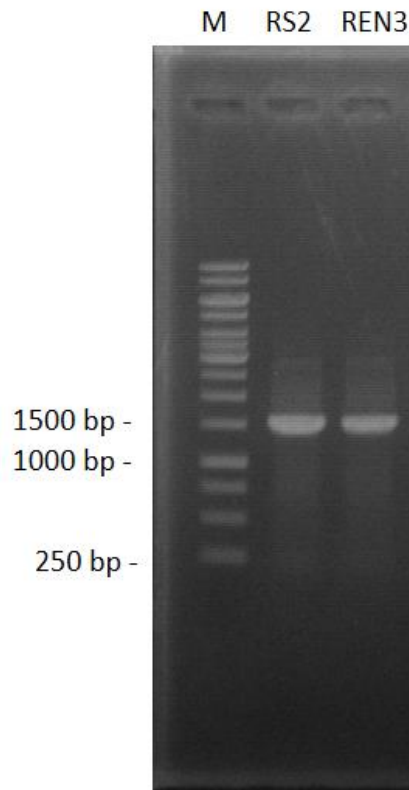
Hình 3.3. a): Hình thái các chủng vi sinh vật nội sinh vùng rễ tại vùng đất nhiễm mặn Kiên Giang; b): Đường kính khuẩn lạc RS2 và REN3 sau 7 ngày nuôi cấy ACC.

3.3. ĐỊNH DANH CÁC CHỦNG VI SINH VẬT

3.3.1 Khuếch đại vùng 16S rRNA

Kết quả khuếch đại vùng 16S rRNA của hai chủng khuẩn RS2 và REN3 với cặp mồi 27F/1492R được thể hiện ở Hình 3.2. Kết quả PCR cho thấy đoạn DNA được khuếch đại cho bằng vạch rõ ràng và kích thước khoảng 1500 bp. Đoạn DNA được khuếch đại này đúng với kích thước lý thuyết của phân đoạn

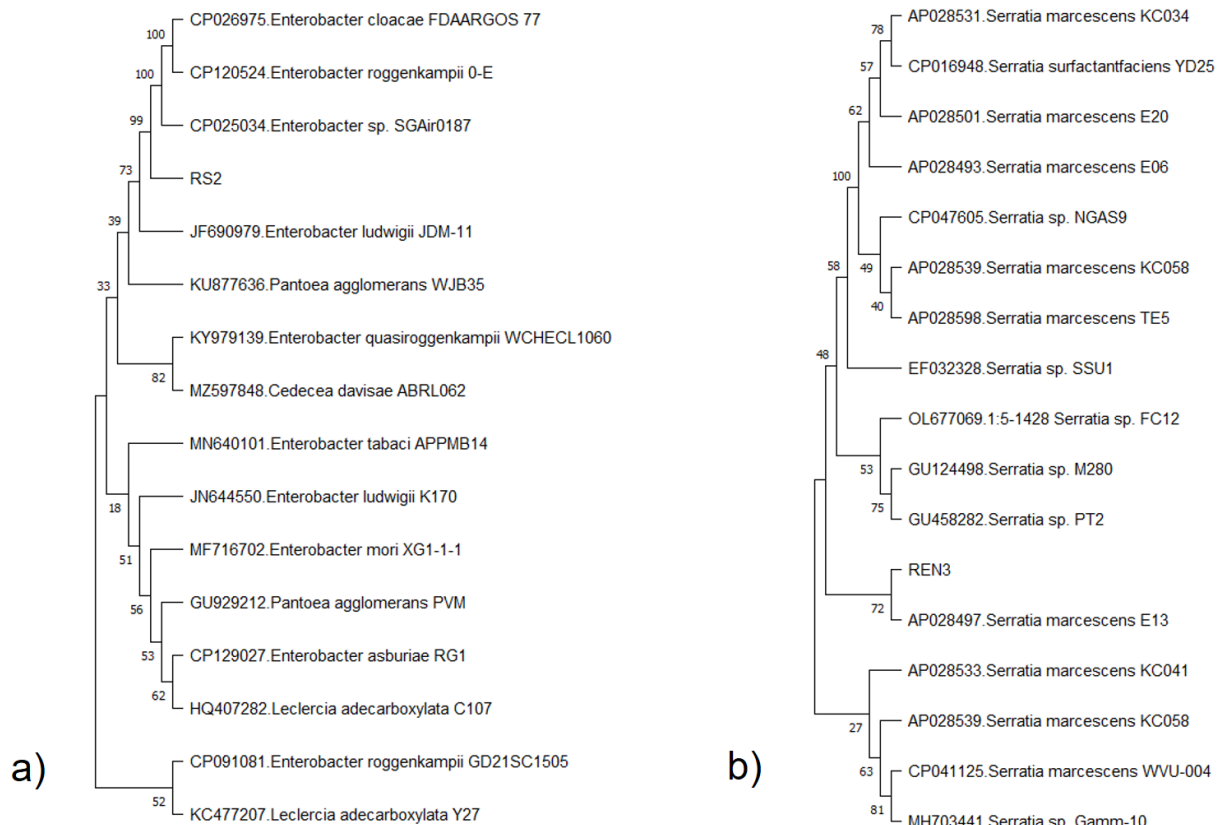
16S được nhân lên với cặp mồi 27F/1492R. Sau đó đoạn DNA này sẽ được tinh sạch và gửi đọc trình tự.



Hình 3.4. Kết quả điện di sản phẩm PCR của hai chủng RS2 và REN3 với cặp mồi 27F/1492R. M: DNA ladder 1 kb (Thermo Scientific).

3.3.2 Định danh vi khuẩn bằng phân tích trình tự gen 16S rRNA

Kết quả đọc trình tự cho thấy trình tự 16S rRNA của hai chủng RS2 và RE6 có kích thước 1435 bp. So sánh với trình tự gen 16S rRNA trên ngân hàng gen cho thấy, trình tự của chủng RS2 tương đồng 98,86% với loài *Enterobacter ludwigii*. Tương tự, trình tự của chủng REN3 tương đồng 99,93% với loài *Serratia marcescens* và các loài của chi này trên BLAST. Kết quả phân tích này được khẳng định bằng cách xây dựng cây phân loại di truyền (Xem hình 3.5).



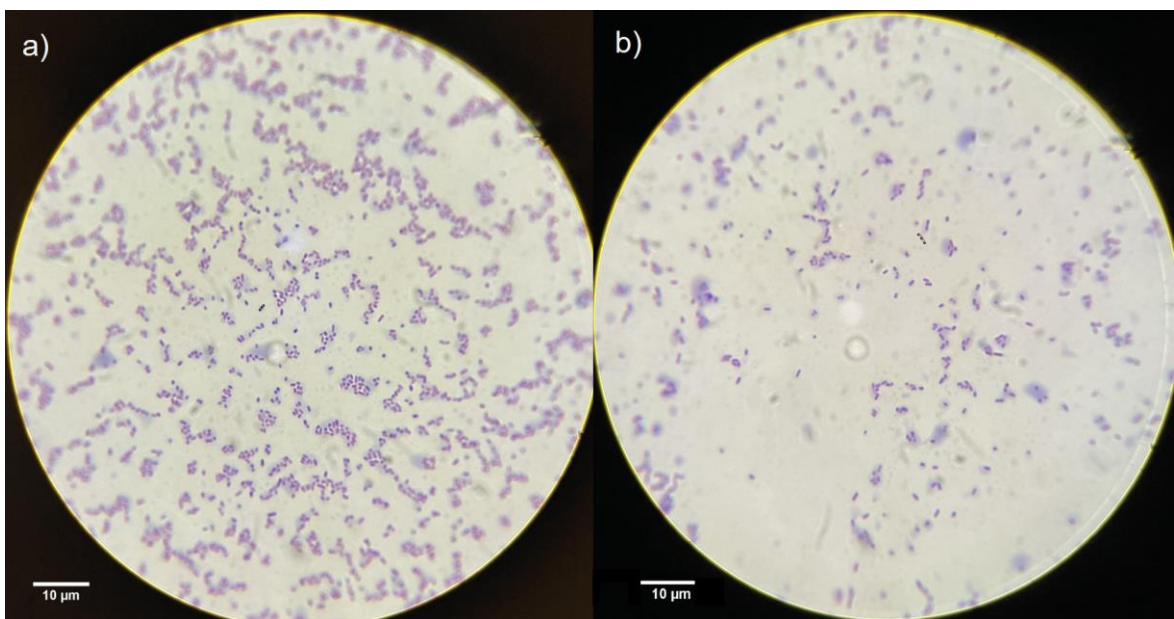
Hình 3.5. Cây phân loại di truyền dựa trên trình tự 16S rRNA của chủng RS2 (a) và REN3(b) với các chủng vi khuẩn khác cùng loài trên NCBI.

Quan sát cây phân loài (Xem hình 3.5) cho thấy chủng khuẩn RS2 có thể thuộc chi *Enterobacter*. *Enterobacter* được biết là có nhiều đặc điểm PGP liên quan đến cố định đạm, phân giải phosphate trong đất, sản xuất kháng sinh, có khả năng tiết ra sản phẩm siderophore, chitinase, ACC deaminase, enzyme thủy phân bên cạnh exopolysaccharit và tăng cường độ xốp của đất. Nhiều chủng thuộc chi *Enterobacter* thể hiện các hoạt động thúc đẩy tăng trưởng và ngăn chặn mầm bệnh ở thực vật trong đất [57]. Các đặc điểm hóa sinh và hình thái của chủng RS2 cũng cho thấy, chủng này cũng có sự tương đồng lớn các loài trong chi *Enterobacter* trên [58]. Tương tự với chủng khuẩn REN3, kết quả cho thấy rằng REN3 chắc chắn thuộc loài *Serratia marcescens* chi *Serratia*. Tuy *Serratia* là một chi khuẩn phần lớn gây bệnh cho con người, nhưng một vài loài trong chi *Serratia* cũng được nhiều báo cáo nghiên cứu cho rằng cũng thuộc nhóm vi khuẩn PGPR với khả năng kích thích sinh trưởng và tăng cường chịu mặn ở thực vật [59].

3.4. ĐÁNH GIÁ CÁC CHỈ TIÊU HÓA SINH

3.4.1 Xác định đặc tính Gram của các chủng vi sinh vật phân lập

Mỗi vi khuẩn đều có những hình dạng và cấu trúc tế bào khác biệt, vì vậy để xác định đặc tính của chúng, một trong những phương pháp hiệu quả đã được đưa ra, đó là nhuộm gram. Nhuộm gram là kỹ thuật phân biệt hai nhóm vi khuẩn gram âm (-) và vi khuẩn gram dương (+) bằng hóa chất qua cấu trúc vách tế bào của vi khuẩn. Xác định chủng vi khuẩn mang đúng đặc tính, từ đó góp phần định danh chủng vi khuẩn cần tìm. Kết quả nhuộm gram cho thấy cả hai chủng RS2 và REN3 đều bắt màu hồng, hình thái tế bào là hình que (Xem hình 3.6). Kết quả cho thấy hai loại khuẩn đều là những trực khuẩn, và là vi khuẩn Gram âm. Điều này trùng khớp với các nghiên cứu trước đây xác định loài thuộc chi *Enterobacter*, và *Serratia* cũng đều là những vi khuẩn Gram âm.

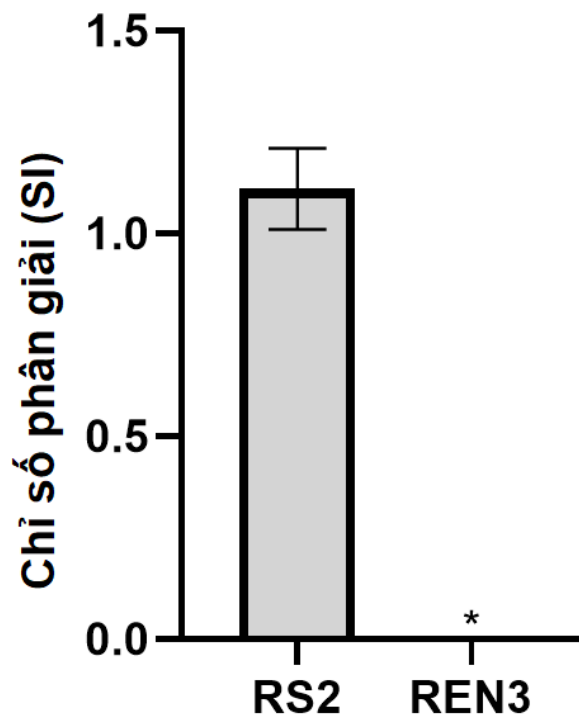


Hình 3.6. Kết quả nhuộm gram của 2 chủng vi khuẩn RS2 (a) và REN3 (b) với thuốc nhuộm crystal violet. Kết quả được quan sát dưới kính hiển vi với độ phóng đại 100 lần. Scale bar 10 µm.

3.4.2 Đánh giá khả năng phân giải kali của các chủng vi sinh vật phân lập

PGPR là nhóm các chủng vi sinh vật có khả năng kích thích sinh trưởng ở thực vật, yếu tố phân giải các chất khó tan từ đó cung cấp các chất dễ hấp thụ hơn cho cây là một trong những đặc tính của chúng. Từ vấn đề trên, thí nghiệm đánh giá khả năng phân giải kali của hai chủng khuẩn phân lập đã được thực hiện. Sau 7 ngày nuôi cấy trên môi trường Aleksandrov có thành phần chính là

$KAlSi_2O_6$, khả năng phân giải K sẽ được xác định (Xem hình 3.5). Kết quả chỉ ra chủng RS1 tạo được vòng phân giải K tuy nhiên không khá mạnh với chỉ số phân giải thu được là $1,11 \pm 0,22$, trong khi đó chủng REN3 không có khả năng phân giải K. Các chủng thuộc chi *Enterobacter* luôn cho khả năng phân giải K ở ngưỡng khá tốt như trong nghiên cứu trước đây của Pirhadi và cộng sự (2016) [60]. Trong khi REN3 có đặc điểm thuộc chi *Serratia* và không có khả năng phân giải K như đã được chỉ ra bởi nghiên cứu của Rani và cộng sự (2020) [61].

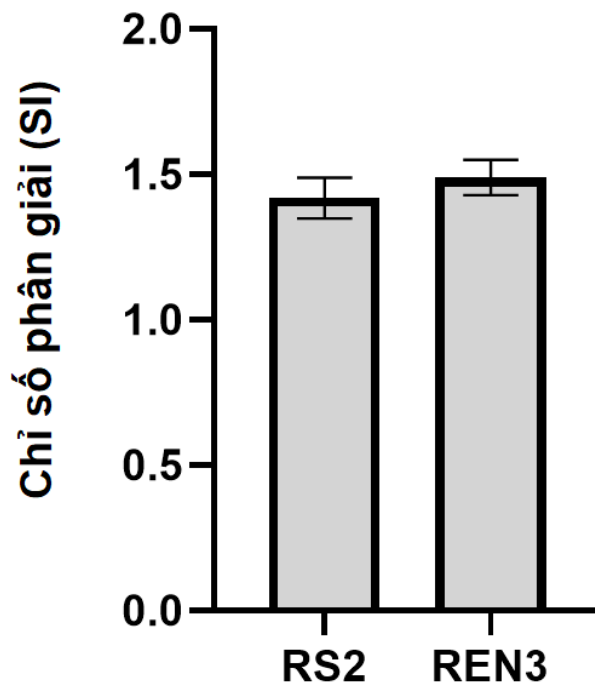


Hình 3.7. Chỉ số phân giải (SI) sau 7 ngày nuôi cấy trên môi trường Aleksandrov. Trong đó D: đường kính vòng phân giải, d: đường kính khuẩn lạc.

3.4.3 Đánh giá khả năng phân giải canxi của các chủng vi sinh vật phân lập

Một số chủng khuẩn vùng dễ có thể phân giải được canxi từ các hợp chất khó tan về dạng dễ tan cho cây hấp thụ, đặc biệt là $CaCO_3$ tồn tại nhiều trong đất. Khả năng sử dụng canxi của hai chủng được đánh giá thông qua phương pháp tính tỉ lệ đường kính vòng phân giải với đường kính khuẩn lạc theo phương pháp của Kwon-Chung và cộng sự (1982) trên môi trường CDB (Xem hình 3.8). Kết quả cho thấy, cả hai chủng khuẩn có khả năng phân giải mạnh sau 7 ngày nuôi cấy [62]. Trong đó, chỉ số phân giải canxi của chủng REN3 ($1,49 \pm 0,06$) không có sự khác biệt so với RS2 ($1,42 \pm 0,07$). Kết quả này phù

hợp với nghiên cứu trước đây của Thakur và cộng sự (2017), trong đó khẳng định các chủng *Enterobacter* spp. có khả năng phân giải canxi [63].

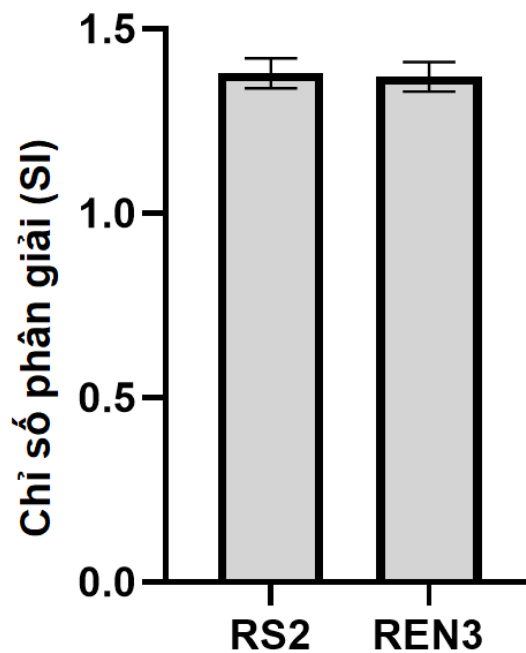


Hình 3.8. Chỉ số phân giải (SI) sau 7 ngày nuôi cấy trên môi trường CDB.
Trong đó D: đường kính vòng phân giải, d: đường kính khuẩn lạc.

3.4.4 Đánh giá khả năng phân giải phosphate của các chủng vi sinh vật phân lập

Phosphate đóng vai quan trọng trong nhiều quá trình cần thiết cho sự phát triển như: quá trình trao đổi chất, quang hợp và sự di truyền đặc tính của gen quá các thế hệ. Cây lúa chỉ có thể hấp thụ P ở dạng hòa tan, chẳng hạn như (HPO_4^{2-} , H_2PO_4^-), chỉ chiếm 0,1 đến 0,5% tổng lượng P của đất [46]. Do đó, hiện tượng được diễn ra sự chuyển hóa P dạng khó tan sang dạng hòa tan bởi các vi sinh vật đất yếu tố quan trọng việc kích thích sinh trưởng ở cây lúa. Khả năng phân giải phosphate được đánh giá thông qua phương pháp tính tỉ lệ đường kính vòng phân giải với đường kính khuẩn lạc trong môi trường PKO (Xem hình 3.9). Kết quả cho thấy, cả hai chủng khuẩn có khả năng phân giải nhanh và mạnh sau 7 ngày nuôi cấy so với chủng khuẩn phân lập còn lại. Tuy nhiên, chỉ số phân giải thu được không có sự khác biệt thống kê giữa hai chủng ($1,38 \pm 0,04$ và $1,37 \pm 0,03$). Kết quả này có sự tương đồng với khả năng phân giải P của loài *Enterobacter ludwigii* trong nghiên cứu trước đây của Kang và

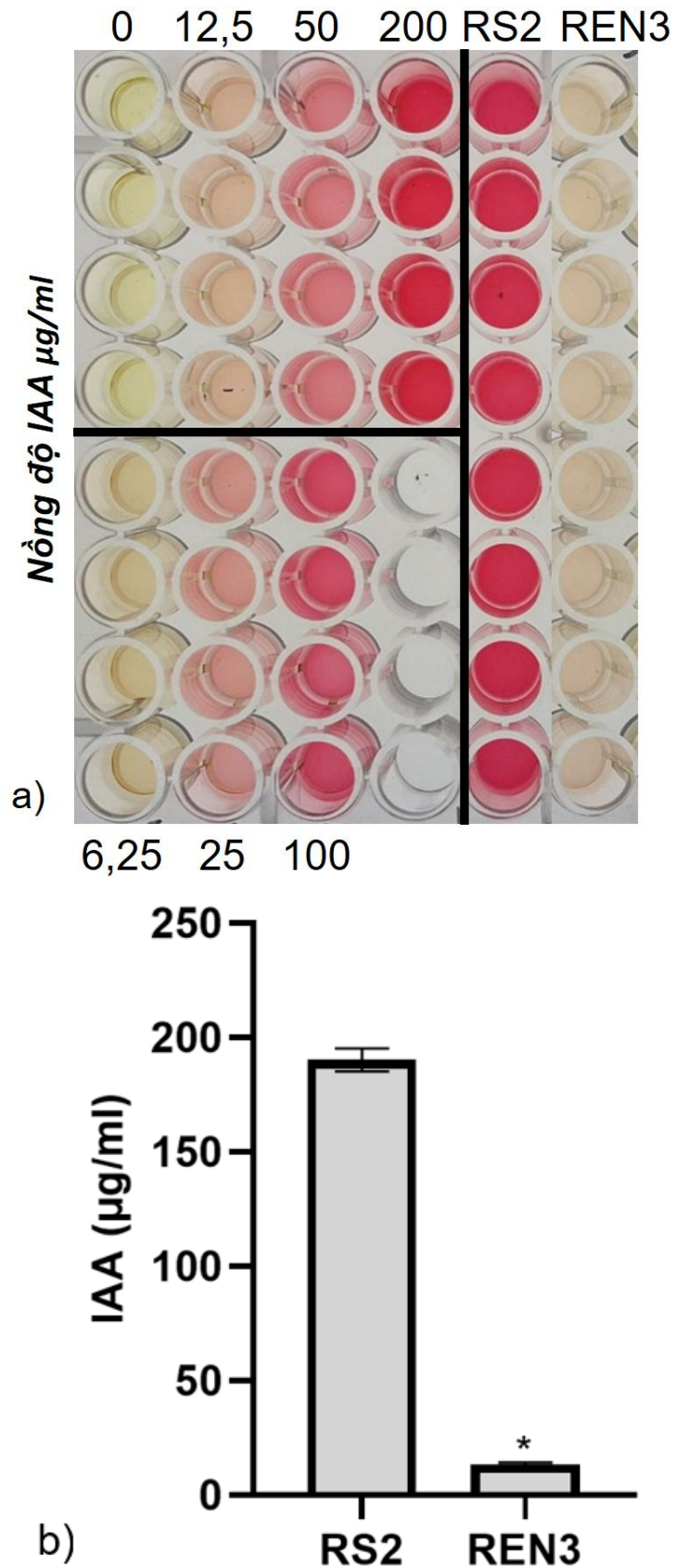
cộng sự (2021) [64] và loài *Serratia marcescens* của Patel và cộng sự (2016) [65].



Hình 3.9. Chỉ số phân giải (SI) 02 chủng khuẩn RS2 và REN3 sau 7 ngày nuôi cấy PKO. Trong đó D: đường kính vòng phân giải, d: đường kính khuẩn lạc.

3.4.5 Đánh giá khả năng sản sinh IAA của các chủng vi sinh vật phân lập

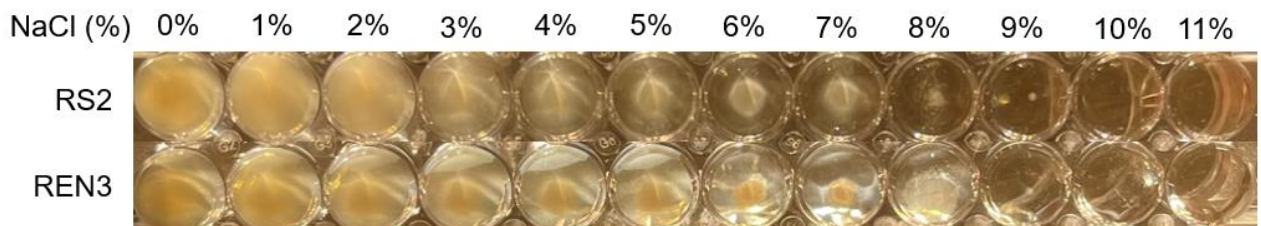
Đa số các chủng vi khuẩn thuộc nhóm PGPR đều có khả năng sinh tổng hợp IAA [38]. Nghiên cứu của chúng tôi cho thấy chủng RS2 sản sinh hàm lượng IAA đạt 190,34 $\mu\text{g/ml}$. Trong khi chủng REN3 lại sinh tổng hợp IAA ở mức thấp là 13,41 $\mu\text{g/ml}$ (Xem hình 3.10). Điều này cho thấy trong điều kiện thường, không có áp lực muối cho cây lúa, chủng RS2 là một chủng vi sinh vật tiềm năng kích thích sinh trưởng cho cây lúa, đặc biệt tương đồng với số liệu cao đáng kể từ chủng *Enterobacter ludwigi* trong báo cáo của Lee và cộng sự (2019) [66]. Theo báo cáo của Khan và cộng sự (2021) [56], bộ gen của *S. marcescens* RSC-14 chứa các gen có chức năng trong việc thúc đẩy tăng trưởng thực vật, bao gồm các gen liên quan đến sinh tổng hợp indole-3-acetic acid (IAA), như vậy REN3 cũng có khả năng sinh tổng hợp IAA nhưng ở ngưỡng khá thấp (Xem hình 3.8b).



Hình 3.10. Kết quả xác định hàm lượng IAA của chủng RS2 và REN3 bằng thuốc thử Salkowski trên đĩa 96 giếng (a) và ở bước sóng 550nm (b).

3.4.6 Đánh giá khả năng kháng NaCl của các chủng vi sinh vật phân lập

PGPR được sử dụng rộng rãi trong vấn đề tăng cường chống chịu mặn cho cây trồng và một trong những yếu tố góp phần cho khả năng trên là sự kháng mặn của chủng vi sinh vật trên. Thí nghiệm thấy rằng sinh trưởng của hai chủng RS2 và REN3 bị ức chế ở nồng độ 9% NaCl (Xem hình 3.11). Trong đó ở các nồng độ NaCl thấp hơn khả năng sinh trưởng của cả hai chủng vi khuẩn RS2 và REN3 là tốt hơn. Điều này cho thấy RS2 và REN3 đều là những chủng có khả năng chịu muối tốt, rất tiềm năng giúp cho cây lúa có sự sinh trưởng tương đối trong điều kiện mặn. Trong báo cáo của Mahdi và cộng sự (2021), Hua và cộng sự (2010) cũng cho thấy sự tương đồng về khả năng chịu mặn của 02 chủng phân lập với hai chủng cùng chi là *Enterobacter cloacae* 7,5% NaCl và *Serratia rubidaea ED1* 10% NaCl [67, 68].



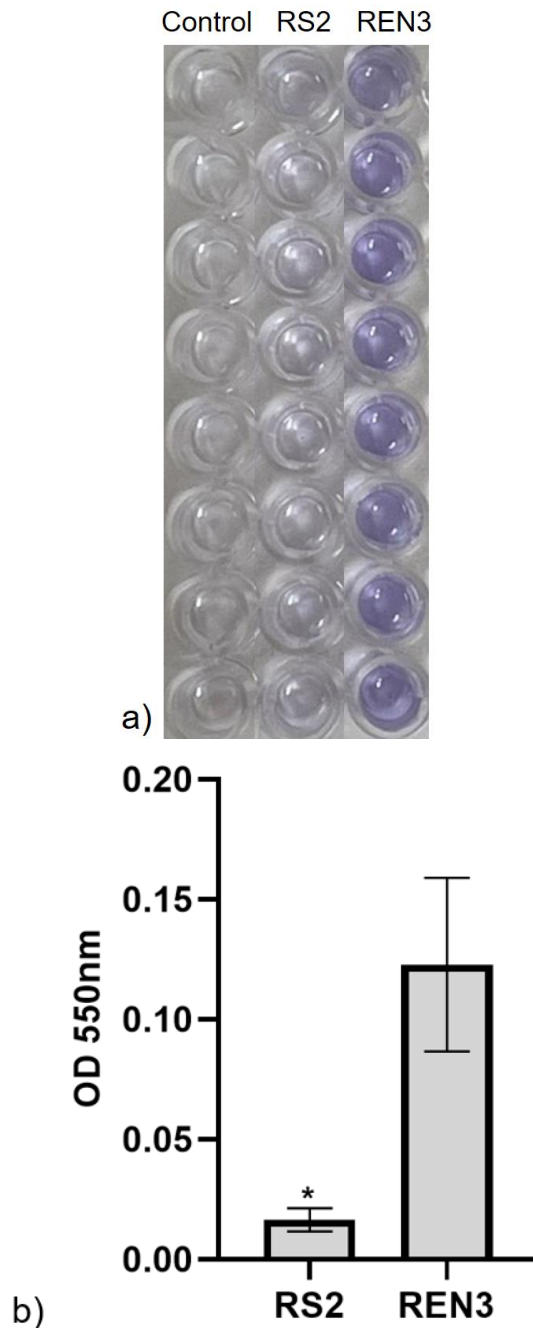
Hình 3.11. Kết quả đánh giá khả năng sinh trưởng của chủng RS2 và REN3 ở các nồng độ NaCl từ 0 đến 11%.

3.4.7 Khả năng hình thành màng sinh học của các chủng vi sinh vật phân lập

Màng sinh học là tập hợp các vi sinh vật được gắn kết với nhau bằng một mạng lưới cấu trúc các chất polyme ngoài tế bào. Màng sinh học được tạo ra từ nhóm chủng vi sinh vật PGPR là yếu tố tăng cường chống chịu mặn cho cây trồng vô cùng hiệu quả, từ đó thực hiện thí nghiệm định tính khả năng tạo màng sinh học của các chủng vi sinh vật phân lập [69]. Kết quả thí nghiệm cho thấy cả hai chủng đều có khả năng tạo màng sinh học, tuy nhiên chỉ có chủng REN3 là khả năng tạo màng sinh học cao trong môi trường LB đạt giá trị OD 550nm 0,122. Trong khi đó, chủng RS2 có khả năng tạo màng sinh học thấp trong môi trường này với giá trị OD 550nm chỉ đạt 0,016.

Trong báo cáo của Veira và cộng sự (2021) [69] khi so sánh giữa hai chủng

khuẩn là *Enterobacter* sp. và *Serratia marcescens* đã cho thấy khả năng tạo ra màng sinh học của hai chủng tương đương nhau. Trong nghiên cứu này của chúng tôi, chủng RS2 (thuộc chi *Enterobacter*) có khả năng tạo màng sinh học kém hơn hẳn chủng REN3 (thuộc chi *Serratia*). Kết quả trên cần phân tích thêm về sự tương quan giữa việc sản sinh màng sinh học và khả năng liên kết màng của hai chủng vi sinh vật phân lập.



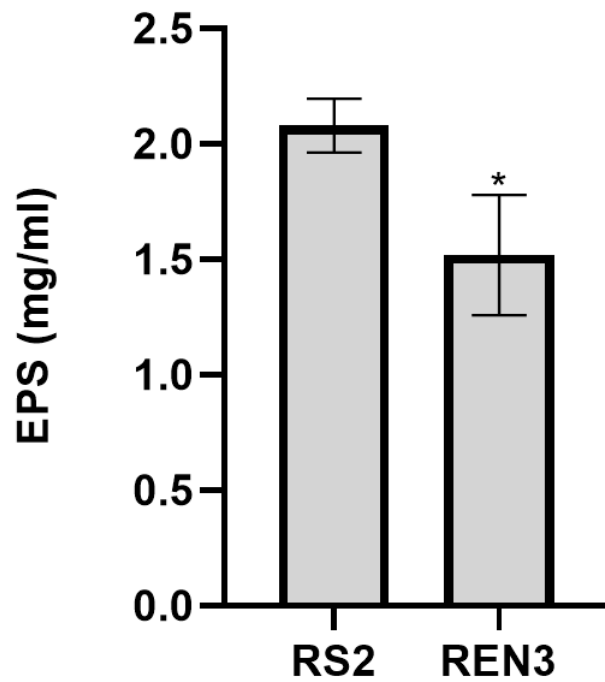
Hình 3.12. Kết quả đánh giá khả năng hình thành màng sinh học của chủng RS2 và REN3 trên đĩa 96 giếng (a) và xác định hàm lượng ở bước sóng 550nm (b).

3.4.8 Đánh giá khả năng sản sinh EPS của các chủng vi sinh vật phân lập

EPS là một polyme tự nhiên do vi khuẩn sản sinh, có nhiều chức năng quan trọng và là thành phần chính cấu tạo nên vách ngăn thành tế bào của vi khuẩn. Ngoài hợp chất polyme ngoại bào này còn quy định cấu trúc và sự ổn định của màng sinh học [70]. Một số đặc tính cơ bản của màng sinh học đều nhờ chất nền EPS, từ đó chúng tôi tiến hành thí nghiệm khả năng sản sinh EPS của hai chủng khuẩn phân lập trên.

Kết quả đánh giá khả năng sản sinh EPS cho thấy chủng khuẩn RS2 có khả năng sản sinh EPS tốt hơn so với chủng REN3 đạt lần lượt là 2,08 mg/ml và 1,52 mg/ml. Kết quả định lượng thu được có sự khác biệt lớn với kết quả định tính đã nêu trước (Xem hình 3.13), điều này có thể được giải thích rằng do cơ chế tạo màng sinh học của vi khuẩn [70], RS2 có thể tạo lượng EPS tốt hơn so với chủng REN3 nhưng cấu trúc màng sinh học của chủng khuẩn RS2 không có sự kết cấu EPS chắc chắn và sự bám dính bề mặt bằng chủng REN3 tạo ra, nên sau khi đổ dịch khuẩn để chuẩn bị cho bước nhuộm, màng sinh học do chủng RS2 tạo ra đã mất đi phần nào sau nhiều lần rửa, trong khi đó màng REN3 vẫn có khả năng bám dính.

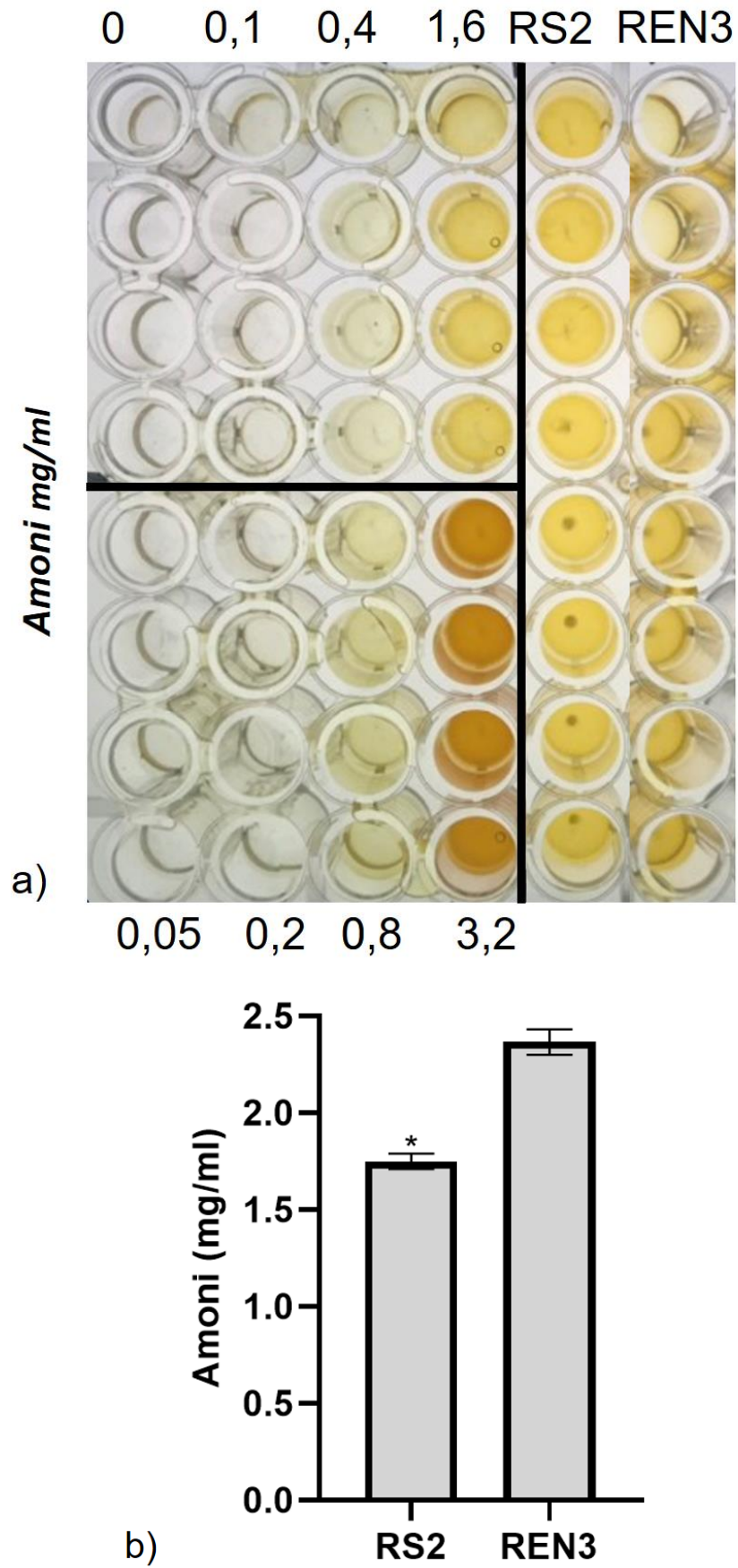
Khối lượng EPS thu được sau 48 giờ nuôi cấy trong môi trường lỏng của chủng REN3 tương đương với hai chủng vi khuẩn *E. cloacae* MBB8 trong các công bố trước đây (lần lượt là 2,52 mg/ml và 2,45 mg/ml EPS) [70, 71]. Điều này cho thấy tiềm năng ứng dụng của chủng khuẩn này cho các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 3.13. Biểu đồ cột định lượng EPS sản sinh bởi 02 chủng khuẩn sau 2 ngày nuôi trong môi trường EPS.

3.4.9 Đánh giá khả năng sản sinh Amoni của các chủng vi sinh vật phân lập

Một số chủng vi khuẩn tiềm năng thuộc nhóm chủng khuẩn PGPR có khả năng sinh tổng hợp amonia do chuyển được chuyển đổi nito có sẵn trong đất và môi trường xung quanh (Xem hình 3.14). Những loại phân bón vi sinh sử dụng đặc điểm sinh tổng hợp amoni của nhóm chủng khuẩn trên nhằm mục đích tăng cường hấp thụ lượng đạm cho cây, đảm bảo chất lượng đất trồng trở được bền vững, cũng như quản lý được chu trình nito trong đất ổn định hơn. Trong nghiên cứu của chúng tôi, hai chủng khuẩn RS2 và REN3 đều là những chủng khuẩn có khả năng sản sinh amoniac ở ngưỡng cao, lần lượt là 1,75 mg/ml và 2,37 mg/ml. Ngoài ra, REN3 thể hiện khả năng tổng hợp amonia tốt hơn rõ rệt so với chủng khuẩn RS2. Trong các nghiên cứu của Howell và cộng sự (1988) hay Kai và cộng sự (2010), hai chủng *Enterobacter cloacae* và *Serratia odorifera* thể hiện khả năng sinh tổng hợp amoni ở mức ổn định lần lượt là 2 mg/ml và 2,5 mg/ml [72, 73]. Như vậy, hai chủng khuẩn chúng tôi phân lập được đã cho thấy khả năng sinh tổng hợp tương đương hoặc cao hơn so với hai chủng đã công bố và có tiềm năng trong ứng dụng để kích thích sự sinh trưởng của cây trồng.



Hình 3.14. Kết quả đánh giá khả năng sản sinh ammonia của hai chủng RS2 và REN3 trên đĩa 96 giếng (a) và ở bước sóng 450nm (b).

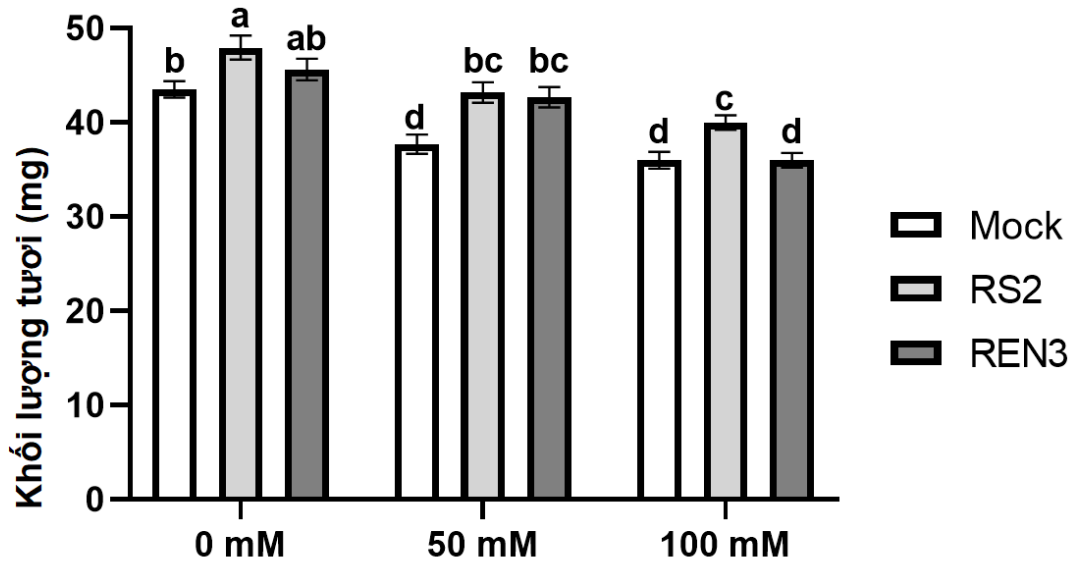
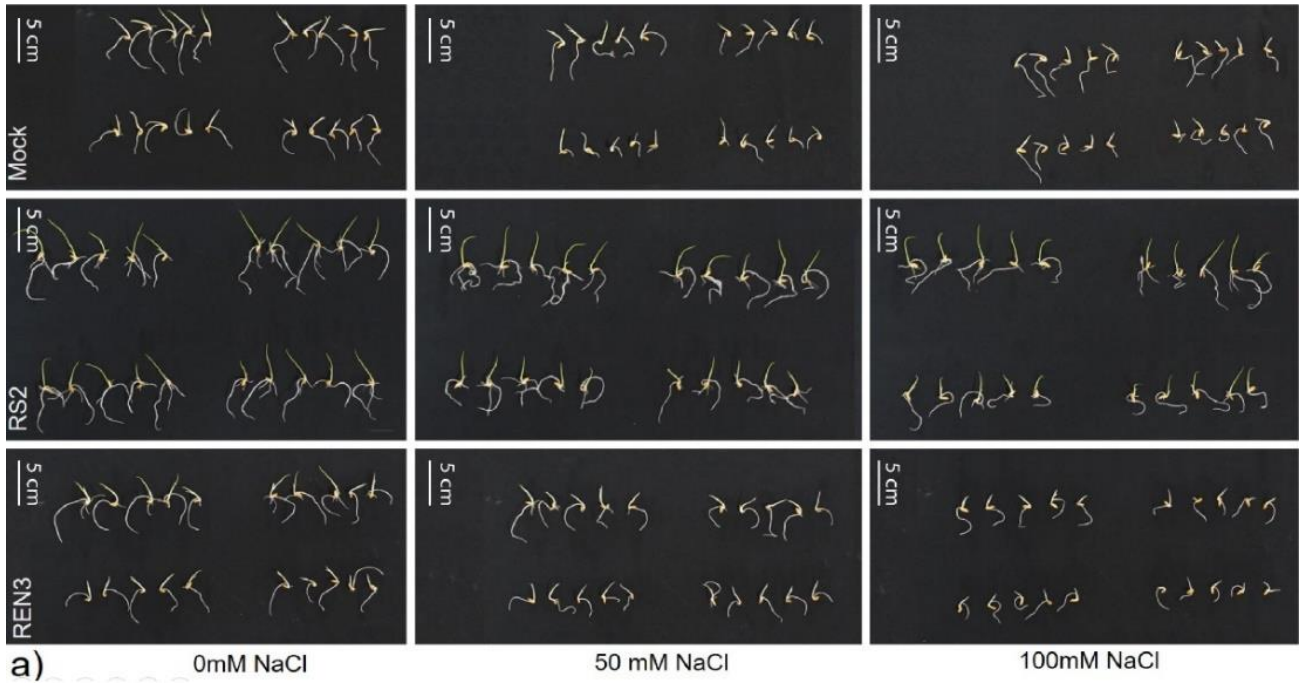
3.5 ĐÁNH GIÁ CHŨNG KHUẨN CÓ KHẢ NĂNG KÍCH THÍCH SINH TRƯỞNG VÀ TĂNG CƯỜNG TÍNH CHỐNG CHỊU MẶN CỦA CÂY LÚA

3.5.1 Đánh giá khả năng khả năng kích thích sinh trưởng và nâng cao tính chịu mặn trong điều kiện *in vitro*

Chúng tôi tiến hành đánh giá khối lượng cây lúa sau 7 ngày nuôi cấy trong điều kiện *in vitro* theo phương pháp Bal và cộng sự (2013) [74]. Kết quả cho thấy, chủng khuẩn RS2 và REN3 có thể giúp cây lúa 7 ngày tuổi sinh trưởng tốt hơn so với cây đối chứng trong điều kiện mặn. Cây lúa được lây nhiễm với hai chủng RS2 và REN3 tăng khối lượng so với cây đối chứng lần lượt là 14,54% và 13,24% ở điều kiện 50 mM. Ở nồng độ muối 100 mM, khối lượng thu được ở cây được lây nhiễm chủng RS2 cao hơn cây đối chứng nhưng chủng REN3 không có sự chênh lệch so với cây đối chứng. Trong khi, ở điều kiện bình thường (0 mM) chỉ có cây được lây nhiễm chủng RS2 thể hiện sự tăng sinh so với cây đối chứng (tăng 10,18% khối lượng).

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng phù hợp với các nghiên cứu trước đây về khả năng nâng cao tính chịu mặn của cây lúa của một số chủng vi khuẩn phân lập. Cụ thể, chủng *Enterobacter* sp. cùng chi với chủng RS2 giúp tăng tăng khối lượng cây con trung bình tới 63.15% so với đối đối chứng trong điều kiện mặn 30 mM NaCl trong báo cáo của Sagar và cộng sự (2020) và kết quả do Nascente và cộng sự (2019) công bố chủng *Serratia* spp cùng chi với chủng REN3 cũng cho thấy sự tăng trưởng khối lượng của cây lúa ở giai đoạn sau nảy mầm [75, 76].

Như vậy, hai chủng phân lập trong nghiên cứu này có tiềm năng trong tăng cường tính chịu mặn của cây lúa.



Hình 3.15. Kết quả đánh giá khả năng sinh trưởng của cây lúa sau 7 ngày tuổi không được và được lây nhiễm với RS2 và REN3 (a) và khối lượng tươi của chúng (b) trong điều kiện in vitro ở các nồng độ NaCl 0, 50, 100 mM.

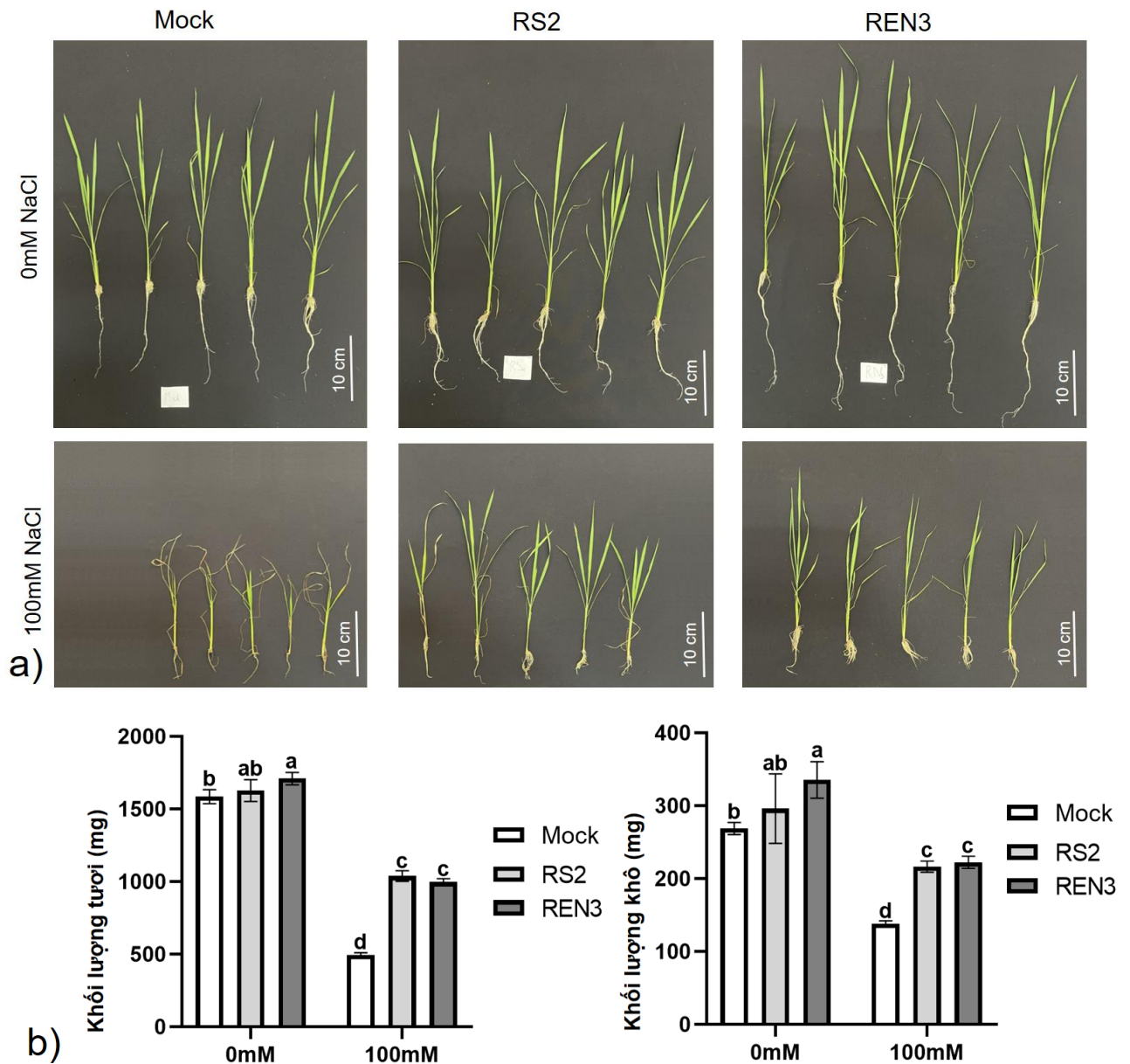
Scale bar 5 cm.

3.5.2 Đánh giá khả năng khả năng kích thích sinh trưởng và nâng cao tính chịu mặn trong điều kiện nhà lưới

Kết quả đánh giá khối lượng tươi của cây được lây nhiễm chủng khuẩn RS2 tăng 109,88% và REN3 tăng 101,2% so với cây đối chứng ở nồng độ 100 mM NaCl trong điều kiện tại nhà lưới (Xem hình 3.16). Trong khi đó, khối lượng khô của cây được lây nhiễm chủng khuẩn RS2 tăng 56,88% và REN3 tăng 61,07% so với cây đối chứng ở nồng độ 100 mM trong điều kiện tại nhà lưới. Như vậy, cả hai chủng khuẩn đều giúp cây lúa tăng khả năng chịu mặn.

Tuy nhiên, khối lượng tươi thu được ở cây được lây nhiễm chủng RS2 và REN3 có sự giảm sút so với cây đối chứng ở điều kiện không muối. Mặc dù vậy, khối lượng khô của cây lúa lây nhiễm tương đương ở chủng RS2, đồng thời cao hơn ở chủng REN3 so với đối chứng. Điều khá tương đồng giữa với các nghiên cứu trước đây. Cụ thể, trong báo cáo của Ghosh và cộng sự (2022), chủng *Enterobacter Cloace* trong điều kiện thường (0mM) không cho thấy sự khác biệt về sinh trưởng của cây được lây nhiễm, tuy nhiên nó giúp tăng khả năng sinh trưởng của cây lúa trong điều kiện mặn [77]. Trong khi đó, ở báo cáo của Moon và cộng sự (2023), cây lúa lây nhiễm chủng *Serratia fontiola* (*SIT1*) đều tăng sinh khối tươi và khô so cây đối chứng lần lượt là 26,71% và 24,8% [78].

Các kết quả trên cho thấy tiềm năng của hai chủng vi khuẩn chúng tôi phân lập được trong kích thích sinh trưởng và nâng cao tính chống chịu mặn của cây lúa. Các nghiên cứu tiếp theo của chúng tôi tiếp tục được thực hiện nhằm nghiên cứu cơ chế tương tác của hai chủng khuẩn với cây lúa đồng thời đánh giá hiệu quả của hai chủng vi khuẩn này trong điều kiện thực địa và định hướng trong phát triển chế phẩm vi sinh nhằm nâng cao tính chống chịu của cây lúa trước điều kiện mặn xâm thực trong tương lai.



Hình 3.16. Kết quả đánh giá khả năng sinh trưởng của cây lúa sau 35 ngày tuổi không được và được lây nhiễm với RS2 và REN3 (a) và khối lượng của chúng trong điều kiện nhà lưới ở các nồng độ NaCl 0, 100 mM (b). Scale bar 10 cm.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

Đã phân lập và định danh thành công 32 dòng vi khuẩn từ vùng rễ cây lúa được thu thập ở vùng đất nhiễm mặn tại đồng bằng sông Cửu Long. đồng thời, xác định được hai chủng vi khuẩn có khả năng sản sinh ACC deaminases. Kết quả phân tích trình tự và định danh cho thấy, chủng RS2 thuộc chi *Enterobacter* và REN3 thuộc chi *Serratia*.

Kết quả sàng lọc hóa sinh cho thấy, cả hai chủng khuẩn được lựa chọn đều mang đặc tính Gram âm, có khả năng phân giải P, Ca, sinh tổng hợp ACC deaminases, sản sinh IAA và amoni, có tiềm năng trong tạo màng sinh học. Kết quả đánh giá sinh trưởng và khả năng nâng cao tính chịu mặn của cây lúa cho thấy, cả hai chủng RS2 và REN3 đều có khả năng sinh trưởng trong môi trường có nồng độ NaCl cao (9%), đồng thời giúp nâng cao tính chịu mặn của cây lúa trong điều kiện *in vitro* và nhà lưới. Đây là hai chủng khuẩn tiềm năng để sử dụng trong các nghiên cứu tiếp theo nhằm nâng cao khả năng sinh trưởng và tính chịu mặn của cây lúa.

KIẾN NGHỊ

Nghiên cứu cơ chế tương tác giữa hai chủng RS2 và REN3 với cây lúa, từ đó xác định được các con đường liên quan đến khả năng kích thích sinh trưởng và nâng cao tính chống chịu mặn của hai chủng khuẩn tiềm năng này.

DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Akbar, M., Ponnampereuma, F.N. (1982). Saline soils of South and Southeast Asia as potential rice lands. *Rice Research Strategies For The Future*. IRRI, 265-281.
2. Collard, B.C.Y., Septiningsih, E.M., Das, S.R., Carandang, J.J., Sanchez, D.L., Kato Pamplona, A.M. (2013). Developing new flood-tolerant varieties at the International Rice Research Institute (IRRI). *SABRAO Journal of Breeding genetics*, 45(1).
3. Flowers, T.J., Yeo, A.R. (1981). Variability in the resistance of Sodium chloride salinity within rice (*Oryza sativa* L.) varieties. *The New Phytologist*, 88, 363-373.
4. Change, I.P.O.C. (2014). Ipcc. *Climate change*.
5. Chen, H.J., Chen J.Y, Wang S.J. (2008). Molecular regulation of starch accumulation in rice seedling leaves in response to salt stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 30(2), 135-142.
6. Cuong H.T, Cuong B.V, Thuong L.T, Hoang T.M, Huong L.T.T, Phuong P.T.D, Son N.G, Canh N.X. (2020). Investigation of salt-tolerant rhizosphere bacteria from seawater-intruding paddy rice field in Vietnam. *Academia Journal of Biology*, 42(3).
7. Kovach, M.J., Calingacion, M.N., Fitzgerald, M.A., & McCouch, S.R. (2009). The origin and evolution of fragrance in rice (*Oryza sativa* L.). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(34), 14444-14449.
8. Li, W., Zhang, Q J., Zhu, T., Tong, Y., Li, K., Shi, C., Gao, L.Z. (2020). Draft genomes of two outcrossing wild rice, *Oryza rufipogon* and *O. longistaminata*, reveal genomic features associated with mating-system evolution. *Plant Direct*, 4(6), e00232.
9. Muthayya, S., Sugimoto, J.D., Montgomery, S., Maberly, G.F. (2014). An overview of global rice production, supply, trade, and consumption. *Annals of the new york Academy of Sciences*, 1324(1), 7-14.
10. Khush, G.S. (1997). Origin, dispersal, cultivation and variation of rice. *Plant Molecular Biology*, 35, 25-34.
11. Ashikari, M., Matsuoka, M. (2006). Identification, isolation and pyramiding of quantitative trait loci for rice breeding. *Trends in plant science*, 11(7), 344-350.

12. Agnoun, Y., Biaou, S.S., Sié, M., Vodouhè, R.S., Ahanchédé, A. (2012). The African rice *Oryza glaberrima* Steud: knowledge distribution and prospects. *International Journal of Biology*, 4(3), 158.
13. Vinci, G., Ruggieri, R., Ruggeri, M., Prencipe, S.A. (2023). Rice Production Chain: Environmental and Social Impact Assessment—A Review. *Agriculture*, 13(2), 340.
14. <https://worldpopulationreview.com/country-rankings/rice-production-by-country>
15. Hoàng, B.D. (2020). Vai trò của kinh tế nông nghiệp vùng Đồng bằng sông Cửu Long, những lĩnh vực sản xuất phát triển động lực trong nông nghiệp của vùng. *Trường Đại học Văn hóa Hà Nội*.
16. Robertson, C.E. (2003). Book review: McCance and Widdowson's the composition of foods-sixth summary edition.
17. Juliano, B.O. (1985). Factors affecting nutritional properties of rice protein. *Trans. Natl. Acad. Sci. Technol.(Philipp.)*, 7, 205-216.
18. Hameed, M., Naz, N., Ahmad, M.S.A., Islam-ud-Din, R.A. (2008). Morphological adaptations of some grasses from the salt range, Pakistan. *Pak. J. Bot*, 40(4), 1571-1578.
19. Yeo, A. (1998). Molecular biology of salt tolerance in the context of whole-plant physiology. *Journal of experimental Botany*, 49(323), 915-929.
20. Fairhurst, T., Dobermann, A. (2002). Rice in the global food supply. *World*, 454-349.
21. Cha-Um, S., Supaibulwatana, K., Kirdmanee, C. (2007). Glycinebetaine accumulation, physiological characterizations and growth efficiency in salt-tolerant and salt-sensitive lines of indica rice (*Oryza sativa* L. ssp. indica) in response to salt stress. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 193(3), 157-166.
22. Alamgir, A.N.M., Ali, M.Y. (1999). Effect of salinity on leaf pigments, sugar and protein concentrations and chloroplast ATPase activity of rice (*Oryza sativa* L.). *Bangladesh Journal of Botany*, 28(2), 145-149.
23. Foyer, C.H., Noctor, G. (2000). Tansley Review No. 112 Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signalling. *The New Phytologist*, 146(3), 359-388.

24. Krishnamurthy, P., Ranathunge, K., Franke, R., Prakash, H.S., Schreiber, L., Mathew, M. K. (2009). The role of root apoplastic transport barriers in salt tolerance of rice (*Oryza sativa* L.). *Planta*, 230, 119-134.
25. Lang, N.T., Buu, B.C. (2002). Identification and fine mapping of SSR marker linked to fgr gen of rice. *Omonrice*, 10, 16-22.
26. Buu, B. C., Lang, N. T. (2003). Application of molecular markers in rice breeding in the Mekong Delta of Vietnam. In *Advances in Rice genetics: (In 2 Parts)* (pp. 216-220).
27. Thi Lang, N., Chi Buu, B. (2003). genetic and physical maps of gen Bph10 controlling brown plant hopper resistance in rice (*Oryza sativa* L.). *Omonrice*, 11, 35-41.
28. Uchimiya H, Fujii S, Huang J.R, Fushimi T, Nishioka M. (2002). Transgenic rice plants conferring increased tolerance to rice blast and multiple environmental stresses. *Molecular Breeding*, 9,25-31.
29. Gosal SS, Wani SH, Kang MS. (2009) *Biotechnology and drought tolerance. Journal Crop Improvement*, 19-54.
30. Eng, A.G. (2015). Advancements in genetic Engineering.
31. Hoang, T.M., Moghaddam, L., Williams, B., Khanna, H., Dale, J., Mundree, S. G. (2015). Development of salinity tolerance in rice by constitutive-overexpression of genes involved in the regulation of programmed cell death. *Frontiers in plant science*, 6, 175.
32. Song, J.Y., Kim, D.S., Lee, M.C., Lee, K.J., Kim, J.B., Kim, S.H., Kang, S.Y. (2012). Physiological characterization of gamma-ray induced salt tolerant rice mutants. *Australian Journal of Crop Science*, 6(3), 421-429.
33. Zhang, A., Liu, Y., Wang, F., Li, T., Chen, Z., Kong, D., Luo, L. (2019). Enhanced rice salinity tolerance via CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the OsRR22 gen. *Molecular breeding*, 39, 1-10.
34. Santosh Kumar, V.V., Verma, R.K., Yadav, S.K., Yadav, P., Watts, A., Rao, M.V., Chinnusamy, V. (2020). CRISPR-Cas9 mediated genome editing of drought and salt tolerance (OsDST) gen in indica mega rice cultivar MTU1010. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 26, 1099-1110.
35. Tian, J., Ge, F., Zhang, D., Deng, S., Liu, X. (2021). Roles of phosphate solubilizing microorganisms from managing soil phosphorus deficiency to mediating biogeochemical P cycle. *Biology*, 10(2), 158.

36. Andrade, L.A., Santos, C.H.B., Frezarin, E.T., Sales, L.R., Rigobelo, E.C. (2023). Plant growth-promoting rhizobacteria for sustainable agricultural production. *Microorganisms*, 11(4), 1088.

37. Sharma, R.K., Archana, G. (2016). Cadmium minimization in food crops by cadmium resistant plant growth promoting rhizobacteria. *Applied Soil Ecology*, 107, 66-78.

38. Giannelli, G., Potestio, S., Visioli, G. (2023). The Contribution of PGPR in Salt Stress Tolerance in Crops: Unravelling the Molecular Mechanisms of Cross-Talk between Plant and Bacteria. *Plants*, 12(11), 2197.

39. Rima, F.S., Biswas, S., Sarker, P.K., Islam, M.R., Seraj, Z.I. (2018). Bacteria endemic to saline coastal belt and their ability to mitigate the effects of salt stress on rice growth and yields. *Annals of Microbiology*, 68, 525-535.

40. Jaemsaeng, R., Jantasuriyarat, C., & Thamchaipenet, A. (2018). 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. *Scientific Reports*, 8(1), 1950.

41. Cuong, H.T., Van Cuong, B., Thuong, L.T., Hoang, T.M., Huong, L.T.T., Phuong, P.T.D., Canh, N.X. (2020). Investigation Of Salt - Tolerant Rhizospere Bacteria From Seawater – Intruding Paddy Rice Field In Vietnam. *Tap Chi Sinh Hoc*, 42(3).

42. Nguyễn Anh Huy, Nguyễn Hữu Hiệp (2019). Hiệu quả của vi khuẩn chịu mặn *Burkholderia* sp. PL19 và *Acinetobacter* sp. GH1-1 lên sinh trưởng và năng suất lúa LP15 trồng ở huyện Mỹ Xuyên, tỉnh Sóc Trăng. *Tap chí Khoa học Trường đại học Cần Thơ*. 55(1B), 24-30.

43. Huu, T.N., Hue, N.H., Nhan, T.C., Xuan, L.N.T., Thao, T.T., & Khuong, N.Q. (2022). PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN VÀ ĐỊNH DANH VI KHUẨN NỘI SINH HÒA TAN LÂN VÀ CỐ ĐỊNH ĐẠM TRÊN CÂY ĐINH LĂNG LÁ NHỎ (*Polyscias fruticosa* L. Harms). *Hue University Journal of Science: Agriculture and Rural Development*, 131(3B), 83-97.

44. Zaman, M., Shahid, S.A., Heng, L. (2018). *Guideline for salinity assessment, mitigation and adaptation using nuclear and related techniques* (p. 164).

45. Habib, S.H., Kausar, H., & Saud, H.M. (2016). Plant growth-promoting rhizobacteria enhance salinity stress tolerance in okra through ROS-scavenging enzymes. *BioMed Research International*, 2016.
46. Sang, Y., Jin, L., Zhu, R., Yu, X.Y., Hu, S., Wang, B.T., Lee, H.G. (2022). Phosphorus-Solubilizing Capacity of Mortierella Species Isolated from Rhizosphere Soil of a Poplar Plantation. *Microorganisms*, 10(12), 2361.
47. Parmar, P., Sindhu, S.S. (2013). Potassium solubilization by rhizosphere bacteria: influence of nutritional and environmental conditions. *J Microbiol Res*, 3(1), 25-31.
48. Yadav, S.K., Das, J., Kumar, R., Jha, G. (2020). Calcium regulates the mycophagous ability of Burkholderia gladioli strain NGJ1 in a type III secretion system-dependent manner. *BMC microbiology*, 20, 1-13.
49. Penrose, D.M., Glick, B.R. (2003). Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiologia plantarum*, 118(1), 10-15.
50. Coico, R. (2006). Gram staining. *Current protocols in microbiology*, (1), A-3C.
51. Kragh, K.N., Alhede, M., Kvich, L., Bjarnsholt, T. (2019). Into the well—A close look at the complex structures of a microtiter biofilm and the crystal violet assay. *Biofilm*, 1, 100006.
52. Gordon, S.A., Weber, R.P. (1951). Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant physiology*, 26(1), 192.
53. Molobela, I.P., Ilunga, F.M. (2012). Impact of bacterial biofilms: the importance of quantitative biofilm studies. *Annals of microbiology*, 62, 461-467.
54. Rajer, F.U., Samma, M.K., Ali, Q., Rajar, W.A., Wu, H., Raza, W., Gao, X. (2022). *Bacillus* spp.-Mediated Growth Promotion of Rice Seedlings and Suppression of Bacterial Blight Disease under Greenhouse Conditions. *Pathogens*, 11(11), 1251.
55. Li, J., Ovakim, D.H., Charles, T.C., Glick, B.R. (2000). An ACC deaminase minus mutant of *Enterobacter cloacae* UW4No longer promotes root elongation. *Current microbiology*, 41, 101-105.
56. Khan, A., Singh, AV. (2021). Multifarious effect of ACC deaminase and EPS producing *Pseudomonas* sp. and *Serratia marcescens* to augment

drought stress tolerance and nutrient status of wheat. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37, 1-17.

57. Mahdi, I., Hafidi, M., Allaoui, A., Biskri, L. (2021). Halotolerant endophytic bacterium *Serratia rubidaea* ED1 enhances phosphate solubilization and promotes seed germination. *Agriculture*, 11(3), 224.

58. Pramanik, K., Mitra, S., Sarkar, A., Maiti, T.K. (2018). Alleviation of phytotoxic effects of cadmium on rice seedlings by cadmium resistant PGPR strain *Enterobacter aerogenes* MCC 3092. *Journal of hazardous materials*, 351, 317-329.

59. Singh, R.P., Jha, P.N. (2016). The multifarious PGPR *Serratia marcescens* CDP-13 augments induced systemic resistance and enhanced salinity tolerance of wheat (*Triticum aestivum* L.). *PLoS one*, 11(6), e0155026.

60. Pirhadi, M., Enayatizamir, N., Motamedi, H., Sorkheh, K. (2016). Screening of salt tolerant sugarcane endophytic bacteria with potassium and zinc for their solubilizing and antifungal activity. *Biosci. Biotechnol. Res. Commun*, 9, 530-538.

61. Madhuprakash, J., Rani, T.S., Podile, A. R., Eijsink, V., Sørli, M. (2020). Thermodynamic insights into the role of aromatic residues in chitooligosaccharide binding to the transglycosylating chitinase-D from *Serratia proteamaculans*.

62. Kwon-Chung, K.J., Polacheck, I.T.Z.H.A.C.K., & Bennett, J.E. (1982). Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotypes B and C). *Journal of clinical microbiology*, 15(3), 535-537.

63. Thakur, I.B., Putatunda, C. (2017). In vitro phosphate solubilization by *Enterobacter* spp. isolated from wheat rhizosphere. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 11(4), 2007-2015.

64. Kang, S.M., Khan, M.A., Hamayun, M., Kim, L.R., Kwon, E.H., Kang, Y.S., Lee, I.J. (2021). Phosphate-solubilizing *Enterobacter ludwigii* AFFR02 and *Bacillus megaterium* Mj1212 rescues alfalfa's growth under post-drought stress. *Agriculture*, 11(6), 485.

65. Patel, K., Patel, S., Parekh, V., Jha, S. (2016). Isolation and characterization of salt tolerant phosphate solubilizing *Serratia marcescens*

isolated from coastal area. *Journal of Pure Applied Microbiology*, 10(3), 2401-2408.

66. Lee, K.E., Adhikari, A., Kang, S.M., You, Y.H., Joo, G.J., Kim, J.H., Lee, I.J. (2019). Isolation and characterization of the high silicate and phosphate solubilizing novel strain *Enterobacter ludwigii* GAK2 that promotes growth in rice plants. *Agronomy*, 9(3),

67. Mahdi, I., Fahsi, N., Hafidi, M., Benjelloun, S., Allaoui, A., & Biskri, L. (2021). Rhizospheric phosphate solubilizing *Bacillus atrophaeus* GQJK17 S8 increases quinoa seedling, withstands heavy metals, and mitigates salt stress. *Sustainability*, 13(6), 3307.

68. Hua, X., Wang, J., Wu, Z., Zhang, H., Li, H., Xing, X., Liu, Z. (2010). A salt tolerant *Enterobacter cloacae* mutant for bioaugmentation of petroleum- and salt-contaminated soil. *Biochemical Engineering Journal*, 49(2), 201-206.

69. Vieira, M.S., da Silva, J.D., Ferro, C.G., Cunha, P.C., Vidigal, P.M.P., da Silva, C. C., Dias, R. S. (2021). A highly specific *Serratia*-infecting T7-like phage inhibits biofilm formation in two different genera of the *Enterobacteriaceae* family. *Research in Microbiology*, 172(6), 103869.

70. Shyam, K.P., Rajkumar, P., Ramya, V., Sivabalan, S., Kings, A.J., Miriam, L.M. (2021). Exopolysaccharide production by optimized medium using novel marine *Enterobacter cloacae* MBB8 isolate and its antioxidant potential. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 2, 100070.

71. Bezawada, J., Hoang, N.V., More, T.T., Yan, S., Tyagi, N., Tyagi, R.D., Surampalli, R.Y. (2013). Production of extracellular polymeric substances (EPS) by *Serratia* sp. 1 using wastewater sludge as raw material and flocculation activity of the EPS produced. *Journal of environmental management*, 128, 83-91.

72. Howell, C.R., Beier, R.C., Stipanovic, R.D. (1988). Production of ammonia by *Enterobacter cloacae* and its possible role in the biological control of *Pythium* preemergence damping-off by the bacterium. *Phytopathology*, 78(8), 1075-1078.

73. Kai, M., Crespo, E., Cristescu, S.M., Harren, F.J., Francke, W., Piechulla, B. (2010). *Serratia odorifera*: analysis of volatile emission and biological impact of volatile compounds on *Arabidopsis thaliana*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 88, 965-976.

74. Bal, H.B., Nayak, L., Das, S., Adhya, T. K. (2013). Isolation of ACC deaminase producing PGPR from rice rhizosphere and evaluating their plant growth promoting activity under salt stress. *Plant and soil*, 366, 93-105.

75. Sagar, A., Sayyed, R. Z., Ramteke, P. W., Sharma, S., Marraiki, N., Elgorban, A. M., Syed, A. (2020). ACC deaminase and antioxydant enzymes producing halophilic *Enterobacter* sp. PR14 promotes the growth of rice and millets under salinity stress. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 26, 1847-1854.

76. Nascente, A.S., Lanna, A.C., de Sousa, T.P., Chaibub, A.A., de Souza, A.C.A., & de Filippi, M.C.C. (2019). N fertilizer dose-dependent efficiency of *Serratia* spp. for improving growth and yield of upland rice (*Oryza sativa* L.). *International Journal of Plant Production*, 13, 217-226.

77. Ghosh, A., Pramanik, K., Bhattacharya, S., Mondal, S., Ghosh, S. K., Maiti, T. K. (2022). A potent cadmium bioaccumulating *Enterobacter cloacae* strain displays phytobeneficial property in Cd-exposed rice seedlings. *Current Research in Microbial Sciences*, 3, 100101.

78. Moon, Y.S., Khan, M., Khan, M.A., & Ali, S. (2023). Ameliorative symbiosis of *Serratia fonticola* (S1T1) under salt stress condition enhance growth-promoting attributes of *Cucumis sativus* L. *Symbiosis*, 1-15.

PHỤ LỤC

Các môi trường được sử dụng cho các thí nghiệm liên quan tới đánh giá chịu mặn, kích thích sinh trưởng, cũng như đánh giá hóa sinh gồm có:

+ MS: Gồm thành phần các muối đa lượng, vi lượng và vitamin.

+ LB: Tryptone 10 g, cao nấm men 5 g, NaCl 5 g, Nước cất vừa đủ: 1000 ml, pH 7

+ CDB: Glucose 5 g; Yeast extract 1 g; Peptone 1 g; K₂HPO₄ 0.4 g; MgSO₄ 0.01 g; NaCl 5 g; (NH₄)₂SO₄ 0.05 g; CaCO₃ 5 g and Agar 7.5 g

+ Ashby: Glucose 20,0 g; CaSO₄ 0,1 g; KH₂PO₄ 0,1 g; CaCO₃, 5,0 g; MgSO₄. 7H₂O 0,2 g; NaCl 20,0 g; thạch 0,2 g; Nước cất vừa đủ: 1000 ml; pH:7,0- 7,5.

+ Ashby không chứa CaSO₄: Glucoza 20,0 g; KH₂PO₄ 0,1 g; CaCO₃, 5,0 g; MgSO₄. 7H₂O 0,2 g; NaCl 20,0; thạch 0,2 g; Nước cất vừa đủ: 1000 ml; pH:7,0- 7,5.

+ ACC: KH₂PO₄ 4.0 g; Na₂HPO₄ 6.0 g; MgSO₄.7H₂O 0.2 g; FeSO₄.7H₂O 1 mg; H₃BO₃ 10 µg; MnSO₄ 10 µg; ZnSO₄ 70 µg; CuSO₄ 50 µg; MoO₃ 10 µg; Glucose, 1.0%, Nước cất vừa đủ: 1000 ml.

+ Alexandrov: Tinh bột tan (C₆H₁₀O₅)_n 20,0 g, MgSO₄.7 H₂O: 0,5g, FeCl₃ 0,005 g, CaCO₃: 0,1 g, Ca₃(PO₄)₂ 2 g, KAISi₃O₈ : 5 g Agar 20 g Nước cất vừa đủ: 1000 ml, pH 7

+ PKO: Glucose:10,0g: Ca₃(PO₄)₂:5,0 g, (NH₄)₂SO₄: 0,5 g, KCl: 0,2 g, MgSO₄.7H₂O: 0,1 g, MnSO₄: vết, FeSO₄: vết, Cao nấm men: 0,5 g, Thạch 20,0 g, Nước cất vừa đủ: 1000 ml, pH 7, Nước cất vừa đủ: 1000 ml.

+ EPS: Glucose 20,0 g, Yeast Extract 0,5 g, KH₂PO₄ 2 g, K₂HPO₄ 5 g, NaCl 0,1 g, pH 7, Nước cất vừa đủ: 1000 ml.

+ Peptone water: Peptone 10 g, NaCl 5 g, NaHPO₄ 3,5 g, KH₂PO₄ 1,5 g, pH 7, Nước cất vừa đủ: 1000 ml.

+ Lugol: Iod 1g, Kali iodid 2g, Nước cất 200 ml

+ Fushin: Fuchsin ziehl: Fucshin kiềm nồng độ 1/10 trong cồn ethylic 95 độ 10ml + Acid phenic 5ml + Nước cất 100ml

+ Gentian: Tím gentians nồng độ 1/10 trong cồn ethylic 95 độ 10ml + Acid phenic 1ml + Nước cất 100ml