

## PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN VI KHUẨN *AZOSPIRILLUM* TRÊN GIỐNG LÚA OM4218 TRỒNG TRONG NHÀ LƯỚI TẠI HUYỆN CHÂU PHÚ, TỈNH AN GIANG

Đào Thanh Hoàng<sup>1</sup> và Nguyễn Hữu Hiệp<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Nghiên cứu sinh chuyên ngành Vi sinh vật học

<sup>2</sup> Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

### Thông tin chung:

Ngày nhận: 09/10/2013

Ngày chấp nhận: 23/12/2013

### Title:

Isolation and selection of *Azospirillum* on the rice OM4218 grown in greenhouse in Chau Phu district, An Giang province

### Từ khóa:

*Azospirillum*, giống lúa OM4218, lúa hoang, phân lập, vi khuẩn cố định đạm

### Keywords:

*Azospirillum*, isolate, nitrogen-fixing bacterium, rice OM4218, wild rice

### ABSTRACT

Twenty-five samples of high yield rice and five samples of wild rice appeared in cultivated rice field were collected to isolate nitrogen-fixing bacterium *Azospirillum*. These bacteria were applied to the high yield rice OM4218 grown in Chau Phu district, An Giang province in order to evaluate the efficiency of the isolated bacterial strains. The results showed that 4/30 strains including *Azospirillum* sp. 6T1, *Azospirillum* sp. 7T, *Azospirillum* sp. 7R and *Azospirillum* sp. 25HR were identified. When these four strains were applied separately to the high yield rice OM4218 grown in pots in a greenhouse, they supported the rice to increase their height (20.0-21.7%), dry weight (83.5-92.9%) in comparison to *Azospirillum* sp. free treatments. The number of full grains on blossoms and 1,000-seed weight of inoculated *Azospirillum* sp. treatments was higher (60.7-61.2%) and (5.7-6.7%) than those of nitrogen and *Azospirillum* sp. free ones.

### TÓM TẮT

Hai mươi lăm mẫu giống lúa cao sản và năm mẫu lúa hoang được thu thập để phân lập vi khuẩn cố định đạm *Azospirillum*. Vi khuẩn *Azospirillum* dùng chủng cho giống lúa OM4218 trồng tại huyện Châu Phú, tỉnh An Giang nhằm xác định hiệu quả của các dòng vi khuẩn đã phân lập được. Kết quả có 04 dòng vi khuẩn *Azospirillum* sp. 6T1, *Azospirillum* sp. 7T, *Azospirillum* sp. 7R và *Azospirillum* sp. 25HR được định danh trong tổng số 30 dòng vi khuẩn *Azospirillum* đã được phân lập. Khi chủng riêng lẻ từng dòng vi khuẩn cho giống lúa OM4218 trồng trong nhà lưới, kết quả cho thấy các dòng vi khuẩn giúp lúa gia tăng chiều cao cây (20,0-21,7%), trọng lượng khô thân lá (83,5-92,9%) so với nghiệm thức đối chứng không chủng vi khuẩn *Azospirillum* sp. và không bón đạm. Ở các nghiệm thức được chủng vi khuẩn *Azospirillum* sp. có số hạt/bông (60,7-61,2%) và trọng lượng 1.000 hạt (5,7-6,7%) cao hơn so với nghiệm thức đối chứng không chủng vi khuẩn.

## 1 GIỚI THIỆU

Tỉnh An Giang là một trong mười ba tỉnh, thành thuộc khu vực Đồng bằng sông Cửu Long,

An Giang có tổng diện tích đất tự nhiên là 353.675,89 ha. Năm 2012, ngành nông nghiệp tỉnh An Giang gặt hái được thành công khi đạt trên 3,8

triệu tấn lúa. Qua ba vụ sản xuất, nông dân trên toàn tỉnh An Giang đã gieo trồng được 518.032 ha, trong đó diện tích đất trồng lúa là 475.644 ha cho năng suất lúa bình quân khoảng 6,4 tấn/ha. Các giống lúa được nông dân trồng phổ biến như OM6976, OM4218, OM2518, OM2717, OM4517, Yasmine 85,... trong đó mười giống lúa tiêu biểu cho năng suất và chất lượng cao được nông dân ưa chuộng và trồng phổ biến là OM6976, OM4218, OM2514, OM2517, OM2718, OM4900, OM3393, OM4655, OM1490, OM4926 và Jasmine 85 (Cục Thống kê An Giang, 2013). Để đạt năng suất và sản lượng cao, nông dân thường sử dụng một lượng lớn phân đạm vô cơ (khoảng 100 kgN/ha) dẫn đến chi phí sản xuất tăng cao, lợi nhuận thu được sau thu hoạch thấp do một lượng lớn phân đạm bị thất thoát, bị rửa trôi và gây ô nhiễm môi trường.

Các báo cáo gần đây mô tả ảnh hưởng có lợi của phương pháp chủng vi khuẩn cố định đạm *Azospirillum* đối với sự phát triển của cây trồng, do đó các vi khuẩn thuộc giống *Azospirillum* này rất được quan tâm (Döbereiner *et al.*, 1995; Okon, 1985). Các nhà khoa học đã chứng minh được *Azospirillum* là vi khuẩn có khả năng cố định đạm và cộng sinh với cây lúa, vì vậy cây trồng có thể sử dụng lượng đạm tự do trong không khí dưới dạng phân tử nitơ thông qua vi khuẩn tổng hợp được. Mặt khác, vi khuẩn *Azospirillum* được biết đến chính là nhờ khả năng tổng hợp những hợp chất kích thích tăng trưởng cho cây trồng, giúp hệ thống rễ của cây phát triển mạnh nhờ đó cây trồng sẽ hấp thu nước và các khoáng chất tốt hơn, giúp cây trồng gia tăng sản lượng và khả năng chịu hạn (Okon, 1985).

Nhiều công trình nghiên cứu trên thế giới đã phát hiện được các nhóm vi khuẩn *Azospirillum* có khả năng cố định đạm cho cây lúa và giúp gia tăng năng suất lúa từ 15% đến 54% (Omar *et al.*, 1989). Theo Okon và Labandera-Gonzalez (1994) cho biết khoảng 60% đến 70% ở các cây trồng có chủng vi khuẩn *Azospirillum* giúp năng suất lúa tăng từ 5% đến 30%. Để giảm chi phí sản xuất trong nông nghiệp, giảm lượng phân đạm hóa học khi bón cho cây lúa và góp phần tăng lợi nhuận cho nông dân trồng lúa, đề tài sau đây được nghiên cứu với mục tiêu: Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn *Azospirillum* trên giống lúa OM4218 trồng trong nhà lưới tại huyện Châu Phú, tỉnh An Giang.

## 2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Phân lập, định danh và xác định khả năng cố định đạm của *Azospirillum*

#### 2.1.1 Phân lập vi khuẩn

Thu thập 25 mẫu lúa cao sản và 05 lúa hoang mọc lẫn trong ruộng lúa phân bố tại nhiều huyện, thị xã, thành phố trong tỉnh An Giang. Sau đó phân lập vi khuẩn từ thân và rễ lúa theo mô tả của tác giả Nguyễn Hữu Hiệp *et al.* (2005).

#### 2.1.2 Định danh vi khuẩn

Các dòng vi khuẩn đã phân lập được định danh bằng kỹ thuật PCR. Trình tự 02 cặp mồi chuyên biệt dùng định danh là *Azospirillum lipoferum* (mồi xuôi: 5'-GTAAATCCACCACCTCCC-3', mồi ngược: 5'-TGTAGATTTCTGCGCCT-3') và *Azospirillum brasilense* (mồi xuôi: 5'-AGTAACCTCCCATGTCTTTG-3', mồi ngược: 5'-ACGAAGTGGATGAGCTGGG-3') (hai cặp mồi này do Tập đoàn Bioneer, Hàn Quốc sản xuất và cung cấp). Thành phần cho 01 phản ứng PCR (25 µL) gồm: 1,0 µL ADN vi khuẩn, 2,5 µL (10X) PCR buffer, 1,0 µL (10 µM) mồi xuôi, 1,0 µL (10 µM) mồi ngược, 1,0 µL (25 µM) dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0,5 µL (5U) *Taq* polymerase và 18 µL nước cất tiệt trùng. Chu kỳ phản ứng PCR qua các giai đoạn: Biến tính mẫu ADN ở 95°C (5 phút), thực hiện tiếp ở 95°C, 1 phút; ở 55°C, 1 phút; ở 72°C, 1 phút (lặp lại 30 chu kỳ bắt đầu từ bước 2 đến bước 4) và ở 72°C (10 phút). Sản phẩm PCR được điện di trên agarose gel 1,2% và quan sát kích thước ADN trên gel bằng hệ thống chụp hình gel Bio-Rad UV rồi so sánh kích thước ADN của gen *nifH* với vi khuẩn đối chứng dương *Azospirillum lipoferum* và *Azospirillum brasilense* do Đại học Florence, Ý cung cấp.

#### 2.1.3 Xác định khả năng cố định đạm của vi khuẩn

Xác định khả năng cố định đạm của vi khuẩn *Azospirillum* trên giống lúa OM4218 bằng cách trồng lúa trong dung dịch trồng cây không đạm vô trùng ở phòng thí nghiệm theo mô tả của tác giả Yoshida (1978). Thí nghiệm gồm 05 nghiệm thức (NT) với 4 lần lặp lại gồm: NT1: Đối chứng (không chủng vi khuẩn, không bón đạm), NT2: Chủng vi khuẩn *Azospirillum* sp. 6T1 và không bón đạm, NT3: Chủng vi khuẩn *Azospirillum* sp. T7 và không bón đạm, NT4: Chủng vi khuẩn *Azospirillum* sp. 7R và không bón đạm, NT5:

Chủng vi khuẩn *Azospirillum* sp. 25HR và không bón đạm. Sau 5 tuần thì thu hoạch, cân trọng lượng khô cây lúa và phân tích hàm lượng đạm của cây lúa để xác định khả năng cố định đạm của các dòng vi khuẩn *Azospirillum* sp.

**2.2 Thí nghiệm trong nhà lưới**

Các dòng vi khuẩn *Azospirillum* sp. có khả năng cố định đạm được chủng cho giống lúa OM4281 trồng trong nhà lưới và so sánh độ hữu hiệu của các dòng vi khuẩn này. Đất trồng lúa được lấy từ vùng đất trồng lúa tại xã Vĩnh Thạnh Trung, huyện Châu Phú, tỉnh An Giang, mỗi chậu gồm 05 kg đất và được bón phân theo công thức 0N-60P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-30K<sub>2</sub>O. Hạt giống lúa OM4218 được khử trùng bằng nước đun sôi để nguội khoảng 50-60°C, sau đó rửa lại 03 lần bằng nước sạch trước khi đem ủ cho ra mầm, sau đó đem chủng vi khuẩn *Azospirillum* sp. và gieo vào mỗi chậu 06 hạt.

Thí nghiệm gồm 09 nghiệm thức (NT) bố trí theo kiểu khối hoàn toàn ngẫu nhiên với 04 lần

$$E(\%) = \frac{\text{TLKTL cây có chủng vi khuẩn} - \text{TLKTL cây không chủng vi khuẩn}}{\text{TLKTL cây không chủng vi khuẩn}} \times 100\%$$

E (Effectiveness): Độ hữu hiệu; TLKTL: Trọng lượng khô thân lá.

**2.4 Ghi nhận kết quả và xử lý**

Số liệu thí nghiệm được phân tích bằng phần mềm thống kê Statgraphics Centurion XVI.I và Microsoft Office Excel 2013.

**3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**3.1 Phân lập, định danh và xác định khả năng cố định đạm của *Azospirillum***

**3.1.1 Phân lập vi khuẩn *Azospirillum***

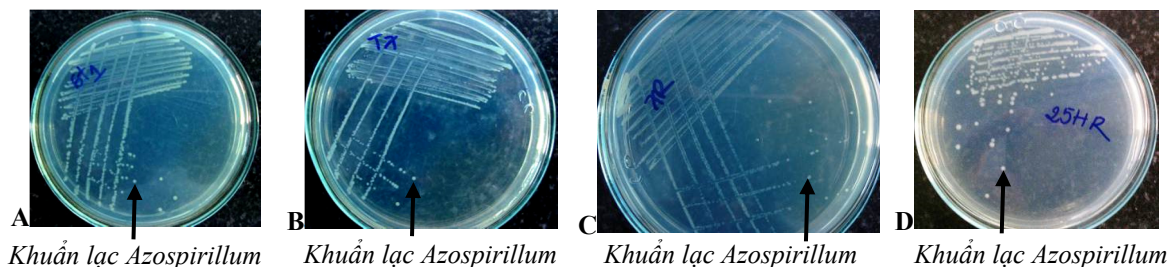
Ba mươi dòng vi khuẩn *Azospirillum* đã được phân lập được từ thân, rễ của 25 mẫu lúa cao sản

lập lại gồm: TN1: Đối chứng (không chủng vi khuẩn và không bón đạm); TN2: Không chủng vi khuẩn và bón 20 kgN/ha; TN3: Không chủng vi khuẩn và bón 40 kgN/ha; TN4: Không chủng vi khuẩn và bón 60 kgN/ha; TN5: Không chủng vi khuẩn và bón 120 kgN/ha; TN6: Chủng vi khuẩn *Azospirillum* sp. 6T1 và không bón đạm; TN7: Chủng vi khuẩn *Azospirillum* sp. T7 và không bón đạm; TN8: Chủng vi khuẩn *Azospirillum* sp. 7R và không bón đạm và TN9: Chủng vi khuẩn *Azospirillum* sp. 25HR và không bón đạm. Thu hoạch và phân tích các chỉ tiêu nông học như: Màu lá, chiều cao cây, trọng lượng khô thân lá, số hạt/bông, trọng lượng 1.000 hạt và xác định độ hữu hiệu của vi khuẩn để đánh giá khả năng cố định đạm của các dòng vi khuẩn *Azospirillum* sp. trên giống lúa OM4218.

**2.3 Đánh giá độ hữu hiệu của *Azospirillum***

Độ hữu hiệu của vi khuẩn *Azospirillum* sp. dựa trên trọng lượng khô thân lá (TLKTL) và được tính theo công thức:

và 05 mẫu lúa hoang mọc lẫn trong ruộng lúa cao sản. Khuẩn lạc của 30 dòng *Azospirillum* có màu trắng đục (hay trắng trong) và có dạng hình tròn, bìa nguyên, nhầy (không nhầy) độ nổi mô (hay lồi) (Hình 1); đường kính khuẩn lạc lớn nhất là 2,10 mm, nhỏ nhất là 0,60 mm, đường kính khuẩn lạc trung bình của 30 dòng *Azospirillum* là 1,14 mm. Tế bào của 30 dòng *Azospirillum* có dạng hình que ngắn, kích thước trung bình (dài 1,07 μm, rộng 0,67 μm), Gram âm và có khả năng chuyển động.



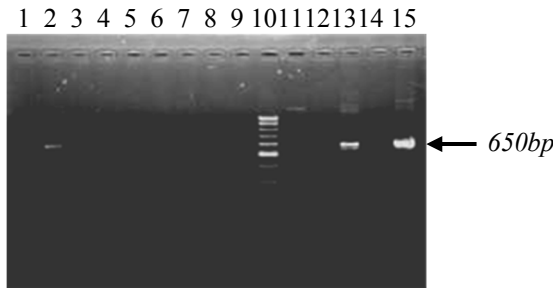
**Hình 1: Khuẩn lạc của *Azospirillum* sp. 6T1 (A), *Azospirillum* sp. T7 (B) được phân lập từ thân lúa và *Azospirillum* sp. 7R (C), *Azospirillum* sp. 25HR (D) được phân lập từ rễ lúa**

**3.1.2 Định danh vi khuẩn *Azospirillum***

Ba mươi dòng *Azospirillum* được định danh bằng kỹ thuật sinh học phân tử (PCR), kết

quả có 02 dòng thuộc loài *Azospirillum lipoferum* là *Azospirillum* sp. 6T1 và *Azospirillum* sp. T7; 02 dòng thuộc loài *Azospirillum brasilense* là *Azospirillum* sp. 7R và *Azospirillum* sp. 25HR;

26/30 dòng còn lại khi phân tích bằng kỹ thuật PCR có kích thước băng (band) không trùng với kích thước băng của vi khuẩn đối chứng dương nên 26 dòng này không thuộc loài *Azospirillum lipoferum* và *Azospirillum brasilene* (Hình 2 và Hình 3). Kết quả tương tự cũng được tác giả Krieg và Döbereiner (1984) và Đào Thanh Hoàng (2005) đã nghiên cứu trước đây.



**Hình 2: Phổ điện di các dòng vi khuẩn *Azospirillum* với cặp môi chuyên biệt *Azospirillum brasilene***

Chú thích:

Giếng 1: Đối chứng âm

Giếng 2: Đối chứng dương *A. brasilene*

Giếng 3 và 12: Dòng 5R

Giếng 4 và 13: Dòng 25HR

Giếng 5 và 14: Dòng 9R

Giếng 6 và 15: Dòng 7R

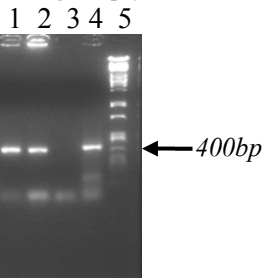
Giếng 7: Dòng 8CR

Giếng 8: Dòng 31R

Giếng 9: Dòng 8HT

Giếng 10: Thang chuẩn 100bp

Giếng 11: Đối chứng dương *A. lipoferum*



**Hình 3: Phổ điện di các dòng vi khuẩn *Azospirillum* với cặp môi chuyên biệt *Azospirillum lipoferum***

Chú thích:

Giếng 1: Dòng T7

Giếng 2: Dòng 6T1

Giếng 3: Đối chứng âm

Giếng 4: Đối chứng dương *A. lipoferum*

Giếng 5: Thang chuẩn 100bp

Kết quả này đã được công bố bởi tác giả Đào Thanh Hoàng và Nguyễn Hữu Hiệp, (2013)

### 3.1.3 Khả năng cố định đạm của vi khuẩn *Azospirillum*

Kết quả thí nghiệm cho thấy khả năng cố định đạm của vi khuẩn *Azospirillum* sp. khi chủng cho lúa trồng trong dung dịch trồng cây không đạm, cho thấy tất cả các dòng vi khuẩn *Azospirillum* sp. đều có khả năng cố định đạm cho cây lúa và làm gia tăng hàm lượng đạm trong cây lúa. Riêng dòng vi khuẩn *Azospirillum* sp. 6T1, *Azospirillum* sp. 7R, *Azospirillum* sp. 25HR khi được chủng cho cây lúa cho hàm lượng đạm trong cây lúa cao hơn nghiệm thức đối chứng không chủng vi khuẩn, không bón đạm (0,540%). Dòng vi khuẩn còn lại là *Azospirillum* sp. T7 khi được chủng cho cây lúa cũng cho hàm lượng đạm gần bằng nghiệm thức đối chứng không chủng vi khuẩn, không bón đạm, điều này cho thấy dòng vi khuẩn này có độ hữu hiệu trên giống lúa này chưa cao (Bảng 1). Kết quả tương tự cũng được tìm thấy bởi giả Bashan et al. (2004).

**Bảng 1: Hàm lượng đạm của cây lúa trong phòng thí nghiệm (%)**

TT	Nghiệm thức	Hàm lượng đạm của cây lúa (%)
1	Đối chứng (không chủng vi khuẩn và không bón đạm)	0,540
2	Chủng <i>Azospirillum</i> sp. 6T1 và không bón đạm	0,856
3	Chủng <i>Azospirillum</i> sp. T7 và không bón đạm	0,532
4	Chủng <i>Azospirillum</i> sp. 7R và không bón đạm	0,592
5	Chủng <i>Azospirillum</i> sp. 25HR và không bón đạm	0,570

### 3.2 Kết quả thí nghiệm trong nhà lưới

#### 3.2.1 Chiều cao cây lúc 30 ngày sau khi trồng

Các nghiệm thức được chủng riêng lẻ từng dòng *Azospirillum* sp. 6T1, *Azospirillum* sp. T7, *Azospirillum* sp. 7R, *Azospirillum* sp. 25HR và không bón đạm có chiều cao cây khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) so với so với nghiệm thức đối chứng không chủng vi khuẩn, không bón đạm. Cây lúa không được chủng vi khuẩn và bón 20 kgN/ha, 40 kgN/ha, 60 kgN/ha hoặc 120 kgN/ha có chiều cao cây khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng không chủng vi khuẩn, không bón đạm. Song song đó, ở nghiệm thức chủng vi khuẩn và bón 40 kgN/ha có chiều cao cây tương đương và khác biệt không có



ý nghĩa thống kê so với cây lúa đối chứng không chủng vi khuẩn và không bón đạm. Mặt khác, ở cây lúa không chủng vi khuẩn và bón 40 kgN/ha có chiều cao cây tương đương và khác biệt không ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức được chủng vi khuẩn nêu trên. Điều này cho thấy, vi khuẩn đã cố định lượng đạm cho cây tương đương 40 kgN/ha và giúp cây gia tăng chiều cao (Bảng 2, Hình 4 và Hình 5). Khi nghiên cứu về chiều cao cây lúa, Albreicht *et al.* (1981), Bashan và Levanony (1990) cũng cho kết quả tương tự.

3.2.2 Chiều cao cây lúc thu hoạch (90 ngày)

Ở những cây lúa được chủng riêng lẻ từng dòng *Azospirillum* sp. 6T1, *Azospirillum* sp. T7, *Azospirillum* sp. 7R, *Azospirillum* sp. 25HR và không bón đạm có chiều cao cây cao hơn và khác

biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) so với so với lúa đối chứng không chủng vi khuẩn và không bón đạm (58,6cm). Mặt khác, ở nghiệm thức chủng vi khuẩn và bón 40 kgN/ha có chiều cao cây tương đương và khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với cây lúa đối chứng không chủng vi khuẩn, không bón đạm. Bên cạnh đó, những cây lúa không chủng vi khuẩn và bón 60 kgN/ha hoặc 120 kgN/ha có chiều cao cây tương đương và khác biệt không ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức được chủng vi khuẩn. Kết quả trên cho thấy, vi khuẩn *Azospirillum* sp. đã cố định lượng đạm cho cây tương đương 60-120 kgN/ha và giúp cây tăng chiều cao từ 20,0-21,7% so với cây đối chứng (Bảng 2, Hình 4 và Hình 5). Kết quả tương tự được Bashan và Levanony (1990), Albreicht *et al.* (1981) phát hiện.

**Bảng 2: Chiều cao cây lúc 30 ngày sau khi trồng và lúc thu hoạch**

TT	Nghiệm thức	Chiều cao cây lúc 30 ngày (cm)	Chiều cao cây lúc thu hoạch (cm)
1	Đối chứng (không chủng vi khuẩn và không bón đạm)	32,1a	58,6a
2	Không chủng vi khuẩn và bón 20 kgN/ha	36,2b	65,5b
3	Không chủng vi khuẩn và bón 40 kgN/ha	38,7cd	66,8b
4	Không chủng vi khuẩn và bón 60 kgN/ha	38,5c	68,3bc
5	Không chủng vi khuẩn và bón 120 kgN/ha	38,3c	68,9bc
6	Chủng <i>Azospirillum</i> sp. 6T1 và không bón đạm	39,5d	71,3c
7	Chủng <i>Azospirillum</i> sp. T7 và không bón đạm	39,2d	70,8c
8	Chủng <i>Azospirillum</i> sp. 7R và không bón đạm	39,4d	70,3c
9	Chủng <i>Azospirillum</i> sp. 25HR và không bón đạm	39,0d	70,6c
CV (%)		3,5	5,8

Chú thích: Các giá trị trung bình trong cùng một cột theo sau có cùng mẫu tự biểu thị sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5%

3.2.3 Màu lá

Các nghiệm thức khi được chủng riêng lẻ từng dòng vi khuẩn *Azospirillum* sp. 6T1, *Azospirillum* sp. T7, *Azospirillum* sp. 7R, *Azospirillum* sp. 25HR và không bón đạm đều cho màu lá xanh tốt và có sự khác biệt ( $p < 0,05$ ) có ý nghĩa thống kê so với cây lúa đối chứng không chủng vi khuẩn, không bón đạm. Ở cây lúa không chủng vi khuẩn và bón 60 kgN/ha hoặc 120 kgN/ha thì lá có màu xanh tốt, biểu thị tình trạng không thiếu đạm và màu lá cùng màu và khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với những cây lúa được chủng 04 dòng vi khuẩn nêu trên. Kết quả cho thấy, khi cây lúa có chủng vi khuẩn và không bón đạm có thể cố định lượng đạm cho lúa tương đương ít nhất là 60 kgN/ha (Bảng 3, Hình 4 và Hình 5). Khi nghiên cứu về vi khuẩn cố định đạm trên cây lúa Mehnaz *et al.* (2007); Young *et al.* (2008) và Lin *et al.* (2009) cũng cho kết quả tương tự.



**Hình 4: Đặc điểm giống lúa OM4218 không chủng vi khuẩn và có chủng vi khuẩn *Azospirillum* sp. lúc 60 ngày sau khi trồng trong nhà lưới**

Chú thích: Từ trước ra sau trên cùng một hàng là các nghiệm thức từ 1 đến 9, từ trái sang phải trên cùng 1 hàng là các lần lặp lại từ 1 đến 4

3.2.4 Trọng lượng khô thân lá

Những cây lúa được chủng riêng lẻ từng dòng vi khuẩn *Azospirillum* sp. 6T1, *Azospirillum* sp. T7, *Azospirillum* sp. 7R, *Azospirillum* sp. 25HR và không bón đạm có trọng lượng khô thân lá khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) so với cây lúa đối chứng không chủng vi khuẩn, không bón đạm. Cây không được chủng 04 dòng vi khuẩn và bón 20 kgN/ha, 40 kgN/ha, 60 kgN/ha hoặc 120 kgN/ha có trọng lượng khô thân lá khác biệt

có ý nghĩa thống kê so với cây lúa đối chứng. Mặt khác, cây lúa chủng vi khuẩn và không bón đạm có trọng lượng khô thân lá tương đương và khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với cây lúa không chủng vi khuẩn và bón 120 kgN/ha. Kết quả này cho thấy, những cây lúa được chủng vi khuẩn *Azospirillum* sp. thì vi khuẩn đã giúp cây gia tăng trọng lượng khô thân lá từ 83,5-92,9% so với cây lúa đối chứng (Bảng 3 và Hình 5). Kết quả tương tự cũng được tìm thấy bởi Bashan và Levanony (1990), Albreicht *et al.* (1981).

**Bảng 3: Màu lá lúa và trọng lượng khô thân lá**

TT	Nghiệm thức	Màu lá lúa	Trọng lượng khô thân lá (g)
1	Đối chứng (không chủng vi khuẩn và không bón đạm)	3,0a	12,7a
2	Không chủng vi khuẩn và bón 20 kgN/ha	3,2a	14,2b
3	Không chủng vi khuẩn và bón 40 kgN/ha	3,4b	15,8c
4	Không chủng vi khuẩn và bón 60 kgN/ha	3,8bc	17,7c
5	Không chủng vi khuẩn và bón 120 kgN/ha	4,2c	19,9cd
6	Chủng <i>Azospirillum</i> sp. 6T1 và không bón đạm	4,0c	23,3d
7	Chủng <i>Azospirillum</i> sp. T7 và không bón đạm	4,0c	24,2d
8	Chủng <i>Azospirillum</i> sp. 7R và không bón đạm	4,0c	24,5d
9	Chủng <i>Azospirillum</i> sp. 25HR và không bón đạm	4,0c	24,3d
CV (%)		10,8	11,5

Chú thích: Các trị số ở cột Màu lá thể hiện mức độ thiếu và thừa đạm khi bón cho lúa. Các giá trị có chữ cái theo sau trong cùng một cột khác nhau sẽ khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5%

3.2.5 Số hạt/bông

Ở những nghiệm thức được chủng riêng lẻ từng dòng vi khuẩn *Azospirillum* sp. 6T1, *Azospirillum* sp. T7, *Azospirillum* sp. 7R, *Azospirillum* sp. 25HR và không bón đạm có số hạt/bông lúa khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) so với đối chứng không chủng vi khuẩn, không bón đạm. Mặt khác, cây lúa được chủng vi khuẩn có số hạt/bông tương đương và khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với lúa không chủng vi khuẩn và bón 60 kgN/ha hoặc 120 kgN/ha. Bên cạnh đó, cây lúa không chủng vi khuẩn và bón 20 kgN/ha, 40 kgN/ha, 60 kgN/ha hoặc 120 kgN/ha có số hạt/bông lúa khác biệt có ý nghĩa thống kê so với cây lúa đối chứng không chủng vi khuẩn và không bón đạm. Như vậy, khi chủng vi khuẩn *Azospirillum* sp. cho cây lúa đã giúp cây gia tăng số hạt/bông từ 60,7-61,2% so với cây không chủng vi khuẩn, không bón đạm hoặc bón đạm (Bảng 4 và Hình 5). Kết quả tương tự cũng được Mehnaz *et al.* (2007); Young *et al.* (2008) và Lin *et al.* (2009) phát hiện.

3.2.6 Trọng lượng 1.000 hạt

Nghiệm thức có chủng riêng lẻ từng dòng vi khuẩn *Azospirillum* sp. 6T1, *Azospirillum* sp. T7, *Azospirillum* sp. 7R, *Azospirillum* sp. 25HR và không bón đạm có trọng lượng 1.000 hạt khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) so với cây đối chứng không chủng vi khuẩn, không bón đạm. Tương tự, cây lúa không chủng vi khuẩn và bón 20 kgN/ha, 40 kgN/ha, 60 kgN/ha hoặc 120 kgN/ha có trọng lượng 1.000 hạt khác biệt có ý nghĩa thống kê so với cây đối chứng không chủng vi khuẩn, không bón đạm. Mặt khác, lúa được chủng vi khuẩn và không bón đạm có trọng lượng 1.000 hạt khác biệt có ý nghĩa thống kê so với cây không chủng vi khuẩn và bón 20 kgN/ha, 40 kgN/ha, 60 kgN/ha hoặc 120 kgN/ha. Do đó, những cây lúa được chủng vi khuẩn *Azospirillum* sp. đã giúp cây gia tăng trọng lượng 1.000 hạt từ 5,7-6,7% so với đối chứng (Bảng 4 và Hình 5). Kết quả tương tự cũng được Bashan *et al.* (2004), Yokota, (2005) và Peng *et al.* (2006) tìm thấy.

**Bảng 4: Số hạt trên bông và trọng lượng 1.000 hạt khi thu hoạch**

TT	Nghiệm thức	Số hạt trên bông (hạt)	Trọng lượng 1.000 hạt (g)
1	Đối chứng (không chủng vi khuẩn và không bón đạm)	239,3a	18,5a
2	Không chủng vi khuẩn và bón 20 kgN/ha	350,1b	20,3b
3	Không chủng vi khuẩn và bón 40 kgN/ha	363,2c	20,8b
4	Không chủng vi khuẩn và bón 60 kgN/ha	377,3cd	21,7bc
5	Không chủng vi khuẩn và bón 120 kgN/ha	386,9d	22,5c
6	Chủng <i>Azospirillum</i> sp. 6T1 và không bón đạm	385,7d	22,4c
7	Chủng <i>Azospirillum</i> sp. T7 và không bón đạm	384,9d	22,7c
8	Chủng <i>Azospirillum</i> sp. 7R và không bón đạm	385,1d	22,6c
9	Chủng <i>Azospirillum</i> sp. 25HR và không bón đạm	384,6d	22,8c
CV (%)		13,2	6,7

Chú thích: Các giá trị trung bình trong cùng một cột theo sau có cùng mẫu tự biểu thị sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5%



**Hình 5: Đặc điểm sinh trưởng của giống lúa OM4218 đối chứng (A), lúa được chủng vi khuẩn *Azospirillum* sp. (B, C, D và E) khi trồng trong nhà lưới lúc 60 ngày**

Chú thích: A-Đối chứng (không chủng vi khuẩn và không bón đạm); B-Chủng *Azospirillum* sp. 6T1 và không bón đạm; C-Chủng *Azospirillum* sp. T7 và không bón đạm; D-Chủng *Azospirillum* sp. 7R và không bón đạm và E-Chủng *Azospirillum* sp. 25HR và không bón đạm

### 3.3 Độ hữu hiệu của các dòng vi khuẩn *Azospirillum*

Khi chủng riêng lẻ dòng *Azospirillum* sp. 6T1, *Azospirillum* sp. T7, *Azospirillum* sp. 7R., *Azospirillum* sp. 25HR và không bón đạm cho cây lúa nhận thấy dòng vi khuẩn có độ hữu hiệu cao nhất là *Azospirillum* sp. 25HR (156,17%) và dòng *Azospirillum* sp. 6T1 có độ hữu hiệu thấp nhất (55,43%) trong tổng số 04 dòng vi khuẩn đã chủng cho cây lúa. Độ hữu hiệu trung bình của 04 dòng vi khuẩn là 98,5%. Điều này cho thấy 04 dòng vi khuẩn *Azospirillum* sp. đều có độ hữu hiệu khi chủng cho giống lúa OM6976 (Bảng 5 và Hình 5). Mehnaz *et al.* (2007); Young *et al.* (2008) và Lin *et al.* (2009) cũng cho kết quả tương tự.

**Bảng 5: Độ hữu hiệu của *Azospirillum* khi chủng cho lúa OM4218**

TT	Nghiệm thức	Độ hữu hiệu E (%)
1	Chủng <i>Azospirillum</i> sp. 6T1 và không bón đạm	83,5
2	Chủng <i>Azospirillum</i> sp. T7 và không bón đạm	90,6
3	Chủng <i>Azospirillum</i> sp. 7R và không bón đạm	92,9
4	Chủng <i>Azospirillum</i> sp. 25HR và không bón đạm	91,3

#### 4 KẾT LUẬN

Ba mươi dòng vi khuẩn *Azospirillum* sp. đã được phân lập, định danh và tuyển chọn được 04 dòng là *Azospirillum* sp. 6T1, *Azospirillum* sp. T7, *Azospirillum* sp. 7R, *Azospirillum* sp. 25HR.

Nghiệm thức có chủng vi khuẩn *Azospirillum* sp. và không bón đạm có màu lá xanh tốt, có cao cây, số hạt/bông, trọng lượng khô thân lá, trọng lượng 1.000 hạt khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng không chủng vi khuẩn và không bón đạm.

Vi khuẩn *Azospirillum* sp. 7R và *Azospirillum* sp. 25HR có độ hữu hiệu trên lúa OM4218 cao hơn dòng *Azospirillum* sp. 6T1, *Azospirillum* sp. T7 và cả 04 dòng *Azospirillum* sp. đều có độ hữu hiệu và có khả năng cố định đạm cho lúa OM4218.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Albreicht, S. L., and Y. Okon, 1980. Cultures of *Azospirillum*. *Methods Enzymol.* 69: 740-749.
2. Bashan, 2004. *Azospirillum* Plant relationships: Physiological, molecular, agriculture, and environmental advances 1997-2003. *Can. J. Microbiol.* 50: 521-577.
3. Bashan, Y., and H. Levanony, 1990. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. *Can. J. Microbiol.* 36: 591-608.
4. Đào Thanh Hoàng và Nguyễn Hữu Hiệp, 2013. Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn *Azospirillum* trên lúa cao sản trồng ở nhà lưới tại huyện Châu Phú, tỉnh An Giang. Báo cáo khoa học Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc 2013. Nhà xuất bản Khoa học tự nhiên và Công nghệ. Quyển 2: 237-241.
5. Đào Thanh Hoàng, 2005. Phân lập và nhận diện các dòng vi khuẩn *Azospirillum*. Luận văn Thạc sĩ Công nghệ sinh học. Trường Đại học Cần Thơ, Việt Nam.
6. Döbereiner, J., V. L. D. Baldani and V. M. Reis, 1995. Endophytic occurrence of diazotrophic bacteria in non-leguminous crops, In: *Azospirillum* VI and relate microorganisms, Fendrik I; M. del Gallo J. Vanderleyden and M. de Zamarocy (eds.). Springer Verlag, Berlin, Germany: 3-14.
7. Krieg, N. R. and J. Döbereiner, 1984. Genus *Azospirillum* in *Bergey's manual of Systematic Bacteriology* 1, N. R. Krieg and J. G. Holt Eds., *Williams and Wilkins, Baltimore*: 94-103.
8. Lin, S. Y., C. C. Young, H. Hupfer, C. Siering, A. B. Arun, W. M. Chen, W. A. Lai, F. T. Shen, P. D. Rekha, and A. F. Yassin, 2009. *Azospirillum picis* sp. nov., isolated from discarded tar. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59: 761-765.
9. Mehnaz S., B. Weselowski and G. Lazarovits, 2007. *Azospirillum canadense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from corn rhizosphere. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 620-624.
10. Nguyễn Hữu Hiệp, Phạm Thị Khánh Vân, Trần Văn Chiêu, Đào Thanh Hoàng và Nguyễn Khắc Minh Loan, 2005. Phân lập và nhận diện các dòng vi khuẩn *Azospirillum* bằng kỹ thuật PCR. *Tạp chí Khoa học, Đại học Cần Thơ*. Số 4: 119-126.
11. Okon, Y. and C. A. Labandera-Gonzalez, 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*: An evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biol. Biochem.* 26(12): 1591-1601.
12. Okon, Y., 1985. *Azospirillum* as a potential inoculant for agriculture. *Trends in Biotech.* 3: 223-228.
13. Omar, N., Th. Heulin, P. Weinhard, M. N. A. El-Din and J. Balandreau, 1989. Field inoculation of rice with in vitro selected plant/growth promoting-rhizobacteria. *Agronomie.* 9: 803-808.
14. Yoshida, S. 1978. Tropical climate and its influence on rice. IRRRI Research series 20. Los Banos, The Philippines.
15. Young, C. C., H. Hupfer, C. Siering, M. J. Ho, A. B. Arun, W. A. Lai, P. D. Rekha, F. T. Shen, M. H. Hung, W. M. Chen, and A. F. Yassin, 2008. *Azospirillum rugosum* sp. nov., isolated from oil-contaminated soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58: 959-963.