

ẢNH HƯỞNG CỦA INDOLE ACETIC ACID (IAA) DO VI KHUẨN *AZOSPIRILLUM* TỔNG HỢP LÊN SỰ PHÁT TRIỂN CỦA RỄ LÚA TRỒNG Ở ĐIỀU KIỆN NHÀ LƯỚI

Trần Văn Chiêu¹ và Nguyễn Hữu Hiệp²

ABSTRACT

Three *Azospirillum lipoferum* strains isolated and identified by Polymerase Chain Reaction (PCR) technique were used to test their ability of synthesis of Indole Acetic acid (IAA) and their effects on the growth of rice root cultivated in the greenhouse.

The results showed that all of three strains R7b1, R8b2 and R29b1 could synthesized high amount of IAA than the control in the medium without Tryptophan. *Azospirillum lipoferum* strain R29b1 could synthesized the highest amount of IAA (19,9µg/ml) after inoculating 4 days. These amount of IAA supported the growth of rice root length and the amount of lateral root grown in the green house. After inoculating 28 days, the rice root length were 2.03 times compared to the control.

Keywords: *Azospirillum lipoferum*, Indole Acetic acid (IAA), tryptophan, rice root, green house

Title: Effect of Indole Acetic acid (IAA) synthesized by *Azospirillum* on the growth of rice root grown in the green house

TÓM TẮT

Ba dòng vi khuẩn *Azospirillum lipoferum* phân lập được từ rễ lúa, nhận diện bằng kỹ thuật PCR, được chọn để khảo sát khả năng tổng hợp IAA và ảnh hưởng của chúng lên sự phát triển của rễ lúa trong điều kiện nhà lưới.

Kết quả thí nghiệm cho thấy, cả ba dòng R7b1 R8b2 và R29b1 đều tổng hợp được lượng IAA nhiều hơn đối chứng trong môi trường nuôi không có Tryptophan. Dòng R29b1 tổng hợp được lượng IAA nhiều nhất 19,9µg/ml vào ngày thứ 4 sau khi chủng. Lượng IAA này góp phần làm tăng chiều dài rễ lúa và tăng số lượng rễ phụ trong thí nghiệm nhà lưới. Chiều dài rễ lúa tăng 2,03 lần so với đối chứng khi được chủng dòng R29b1 sau 28 ngày.

Từ khóa: *Azospirillum lipoferum*, Indole Acetic acid (IAA), tryptophan, rễ lúa, nhà lưới

1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Việt Nam đang là nước đứng thứ hai trên thế giới về sản lượng lúa gạo xuất khẩu (<http://www.fita.org/countries/vietnam.html>) (Truy cập vào tháng 11/2009). Trong đó, Đồng bằng sông Cửu Long đóng vai trò rất quan trọng (đóng góp 90% lượng gạo xuất khẩu của Việt Nam) (<http://www.tapchiconsan.org.vn/print.asp>) (truy cập ngày 11/02/2009).

Muốn tăng năng suất cho cây lúa, người nông dân đã sử dụng một lượng lớn phân hóa học, trong đó có phân đạm. Tuy nhiên, bên cạnh mặt tích cực, lượng phân hóa

¹ Nghiên cứu sinh chuyên ngành Vi sinh vật

² Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

học thừa gây ô nhiễm môi trường, làm cho con người, đặc biệt là trẻ em, và gia súc bị ngộ độc. Thêm vào đó, phần lớn phân hóa học đều được nhập khẩu với chi phí rất cao.

Để giải quyết vấn đề đó, xu hướng sử dụng phân sinh học chứa các loài vi khuẩn có trong đất đang được quan tâm. Một số dòng vi khuẩn thuộc giống *Azospirillum* đã và đang được các nhà khoa học trên thế giới quan tâm nghiên cứu. Ngoài khả năng cố định N cho cây trồng, *Azospirillum* còn có thể tiết ra những kích thích tố tăng trưởng như: IAA (Indole-3-acetic acid), IBA (Indole-3-butyric acid), ABA (Abscisic acid) và cytokynins (Bashan và Levanony, 1990). Những kích thích tố đó làm tăng chiều dài rễ, tăng thể tích rễ và số lượng rễ. Từ đó, chúng làm tăng khả năng hấp thu khoáng chất và nước, nhờ đó, tăng khả năng sinh trưởng và phát triển cũng như tăng năng suất của cây (Okon and Kapulnik, 1986). Ngoài ra, chúng còn giúp cho cây chống chịu được điều kiện khô hạn. Kolb và Martin (1985) phun dịch vi khuẩn *A.brasilense* FT-326 trên rễ của *Beta vulgaris* làm cho rễ mọc dài hơn và phát triển luôn các rễ thứ cấp. Những thí nghiệm ở Mỹ cho thấy *Azospirillum* có thể thay thế được 40kg N/ ha/ năm (Smith *et al.*, 1978). *Azospirillum* còn làm tăng sản lượng lúa mì ở Mexico 23-63% (Paredes- Cardona *et al.*, 1988), ở Argentina 13-30% (Rodriguez-Caceres *et al.*, 1994). Những thử nghiệm bước đầu trên cây bắp trồng ở Cù Lao Dung, Sóc Trăng, Việt Nam cho thấy *A. lipoferum* HA28 có thể giúp nông dân tiết kiệm 90N/ha và giúp gia tăng năng suất bắp (Hiệp *et al.*, 2009).

Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm xác định khả năng tổng hợp IAA của vi khuẩn *Azospirillum lipoferum* cũng như khảo sát ảnh hưởng của vi khuẩn lên chiều dài rễ lúa trong điều kiện nhà lưới.

2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Địa điểm nghiên cứu

Các thí nghiệm được tiến hành tại phòng thí nghiệm Vi sinh vật, phòng Sinh học Phân tử và nhà lưới Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ từ tháng 01 đến tháng 04 năm 2009.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

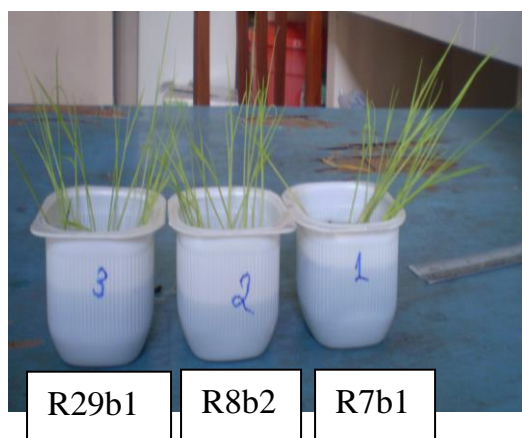
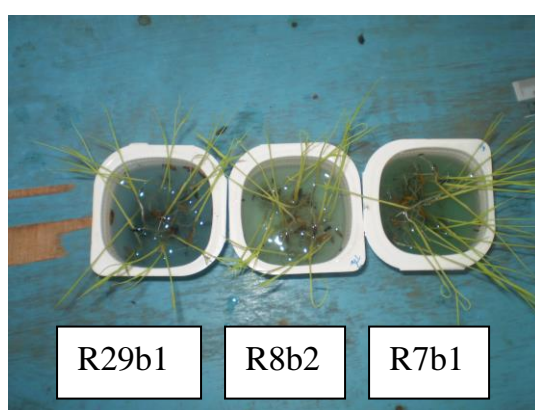
2.2.1 So sánh khả năng tổng hợp IAA của một số dòng vi khuẩn *Azospirillum lipoferum* trong điều kiện phòng thí nghiệm

Chọn ngẫu nhiên 3 dòng vi khuẩn *Azospirillum lipoferum* (R7b1, R8b2 và R29b1) đã phân lập được từ cây lúa ở tỉnh Bạc Liêu, Đồng bằng Sông Cửu Long, Việt Nam. Ba dòng vi khuẩn này đã được nhận diện bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi chuyên biệt dựa trên gen *nif* H và được sử dụng để khảo sát khả năng tổng hợp IAA trong điều kiện phòng thí nghiệm. Thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên, 3 lần lặp lại. Các dòng vi khuẩn này cùng với các dòng vi khuẩn đối chứng (Ab 28, Ab10 và Ab39) được nhân mật số trong môi trường NFb lỏng, không N, ủ lactic ở nhiệt độ phòng (28-30°C), 200 vòng/phút, che kín ống nghiệm bằng bao nylon đen trong khi ủ để tránh IAA bị ánh sáng phân huỷ. Xác định nồng độ IAA do vi khuẩn tạo ra trong 1, 2, 4, 6 và 8 ngày sau khi chủng bằng cách hút

1,5ml sinh khối vi khuẩn ly tâm 5.500 vòng/phút trong 10 phút, nhẹ nhàng hút 1ml dịch trong của mẫu sau khi ly tâm trộn với 2ml thuốc thử Salkowski R2 (4,5g Fe₂Cl trong 1lít H₂SO₄ 10,8M), ủ mẫu trong tối 15 phút trước khi đo OD ở bước sóng 530nm. Dựa vào đường chuẩn có nồng độ IAA tăng dần: 0, 5, 10, 20, 30, 40 µg/ml để xác định lượng IAA do vi khuẩn tạo ra (Eric Glickmann *et al.*, 1995).

2.2.2 Khảo sát ảnh hưởng của vi khuẩn *Azospirillum lipoferum* lên chiều dài rễ lúa

Hạt lúa Một Bụi đỏ được khử trùng bằng cồn 5 phút, oxy già 10% trong 3 phút, rồi ngâm hạt trong nước ấm 60°C đến 70°C trong 30 phút Ủ hạt trong tối cho tới khi hạt nứt nanh chuẩn bị nảy mầm. Gieo hạt nảy mầm và thu mạ sau 2-3 ngày gieo. Chọn những cây có chiều cao tương đối đồng đều để bố trí thí nghiệm (Hình 1).



Hình 1: Ngâm mạ trong dịch vi khuẩn

Dùng môi trường NFb lỏng, không N nhân mật số 3 dòng vi khuẩn *Azospirillum lipoferum* (R7b1, R8b2 và R29b1) để đạt mật số 10⁹ CFU/ml.

Thí nghiệm có 4 nghiệm thức được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 4 lần lặp lại. Nghiệm thức 1 (nghiệm thức đối chứng): mạ ngâm trong nước cất 30 phút. Nghiệm thức 2, 3, 4 lần lượt ngâm mạ riêng biệt 30 phút trong dịch vi khuẩn R7b1, R8b2 hay R29b1. Cát được khử trùng nhiệt uớt 2 lần, cách ngày ở 121°C trong 20 phút. Ly được khử trùng bằng cồn 70°. Cân chính xác 300g cát đã khử trùng cho vào ly nhựa. Sau đó, mạ được trồng trong ly với cát đã khử trùng (Hình 2).



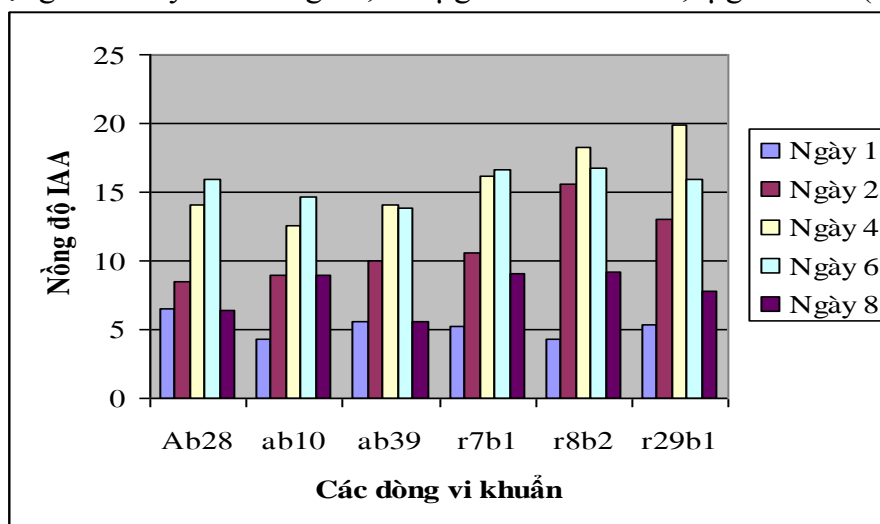
Hình 2: Trồng lúa trong ly với cát đã khử trùng

Tưới lúa hằng ngày bằng môi trường khoáng không N (Kronzucker *et al.*, 1999) gồm (g/l): 3g NaHCO₃, 1g NaCl, 1g KH₂PO₄, 0,5g MgCl₂, 1g NH₄Cl, 0,1g CaCl₂, 0,7g Na₂SO₄, 1g Na-acetate, 1ml dung dịch khoáng vi lượng, 1ml dung dịch vitamin và 10ml Sodium ascorbate. Đo chiều dài rễ ở các ngày 7, 14, 21 và 28 sau khi cấy.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Lượng IAA do vi khuẩn tổng hợp trong môi trường không có tryptophan

Cả ba dòng vi khuẩn được khảo sát (R7b1, R8b2 và R29b1) đều có khả năng tổng hợp acid indole-3-acetic (IAA) mà không cần bổ sung Tryptophan vào môi trường nuôi vi khuẩn. Lượng IAA do các dòng này tạo ra cao hơn các dòng vi khuẩn đối chứng. Tuy nhiên hàm lượng IAA tổng hợp được có sự khác nhau giữa ba dòng, hàm lượng IAA này ở khoảng 16,656 µgIAA/ml đến 19,9µgIAA/ml (Hình 3)

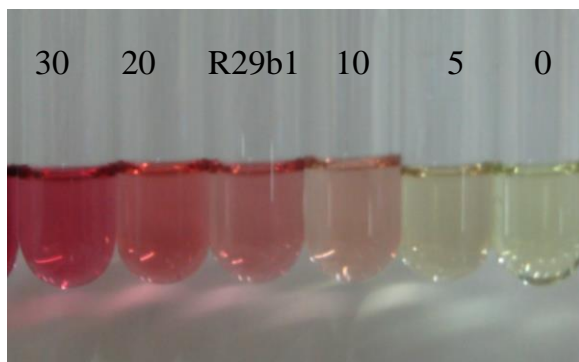


Hình 3: Nồng độ IAA do vi khuẩn sản sinh ra trong 8 ngày

Ab28, Ab10 và Ab39: Vi khuẩn *Azospirillum lipoferum* đối chứng dương.

R7b1, r8b2 và r29b1: các vi khuẩn cần xác định khả năng tổng hợp IAA.

Sau một ngày chủng, các dòng vi khuẩn *Azospirillum lipoferum* đã sản sinh ra IAA nhưng nồng độ còn thấp. Sau đó, nồng độ IAA tiếp tục tăng và tăng cao nhất ở ngày thứ 4 (đối với các dòng Ab39, R8b2 và R29b1) còn các dòng Ab28, Ab10 và R7b1 đạt nồng độ IAA tối đa vào ngày thứ 6 sau khi chủng (Hình 3).



Hình 4: IAA do vi khuẩn R29b1 tạo ra so với đường chuẩn từ 0-30µg/ml

Dòng R29b1 sinh ra lượng IAA cao nhất là 19,9 (µg/ml) vào ngày thứ 4 (Hình 4) và khác biệt có ý nghĩa so với các dòng còn lại (bảng 1). Trong khi đó, kết quả của Andriollo *et al.* (1990) cho thấy IAA khoảng 0,5-18 (µg/ml) khi bổ sung 50 (µg/ml) Tryptophan vào môi trường nuôi vi khuẩn. Còn kết quả của Patten *et al.* (2002) khi có bổ sung Tryptophan với nồng độ 500 (µg/ml) vào môi trường nuôi vi khuẩn thì vi khuẩn sản sinh được lượng IAA là 32,7±2,9 (µg/ml/OD600 unit). Khalid *et al.* (2001) khi phân lập một số chủng vi sinh vật từ vùng rễ của cây lúa gạo và lúa mì và thử khả năng tổng hợp IAA của các dòng vi khuẩn đó, cho thấy lượng IAA tổng hợp được của các dòng đó cao nhất là 12,1 µgIAA/ml. Tuy nhiên, các dòng vi khuẩn R7b1, R8b2 và R29b1 sử dụng trong nghiên cứu này sản sinh lượng IAA phù hợp với kết quả của Raúl Osvaldo Pedraza *et al.* (2004), nghiên cứu cho thấy các dòng *Azospirillum sp.* tổng hợp được IAA ở khoảng 16,5–38 µg IAA/ml.

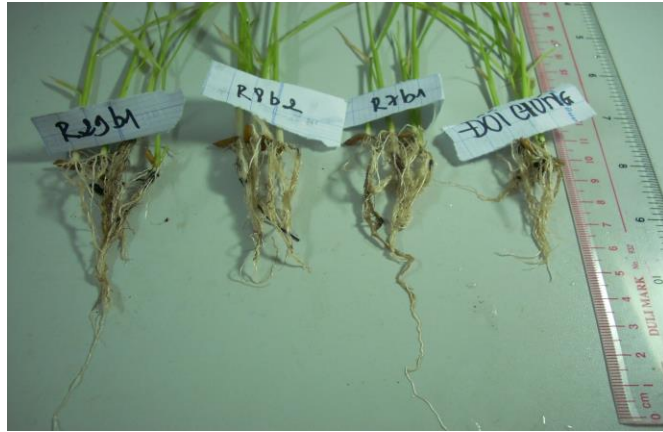
Bảng 1: Lượng IAA do các dòng vi khuẩn tạo ra

Dòng vi khuẩn	Lượng IAA được sinh ra (µg/ml)
Ab39	14,06 f
Ab10	14,875 e
Ab28	16,05 d
R7b1	16,675 c
R8b2	18,2 b
R29b1	19,9 a
CV (%)	2,24

Trong cùng một cột những số có chữ theo sau giống nhau thì khác biệt không ý nghĩa ở mức 5% qua phép thử Duncan.

3.2 Ảnh hưởng của vi khuẩn lên chiều dài rễ lúa trồng trong nhà lưới

Sau khi chủng vi khuẩn 7 ngày, chiều dài rễ lúa ở các nghiệm thức không khác biệt với nhau và không khác biệt so với đối chứng về mặt thống kê (Hình 5) (Bảng 2), có thể do vi khuẩn chưa đủ thời gian để tác động lên chiều dài rễ lúa.



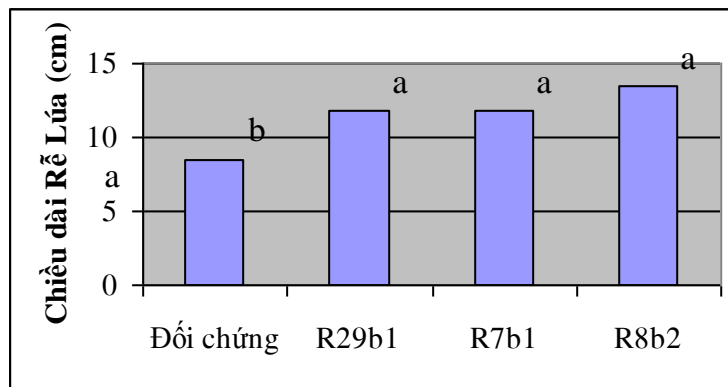
Hình 5: Ảnh hưởng của vi khuẩn lên rễ lúa sau 7 ngày chủng

Bảng 2: Chiều dài rễ lúa sau 7 ngày chủng vi khuẩn

Nghiệm thức	Chiều dài rễ lúa (cm)
Đối chứng	4,875 a
R7b1	7,375 a
R8b2	7,125 a
R29b1	7,625 a
CV (%)	29,55

Trong cùng một cột những số có chữ theo sau giống nhau thì khác biệt không ý nghĩa ở mức 5% qua phép thử Duncan.

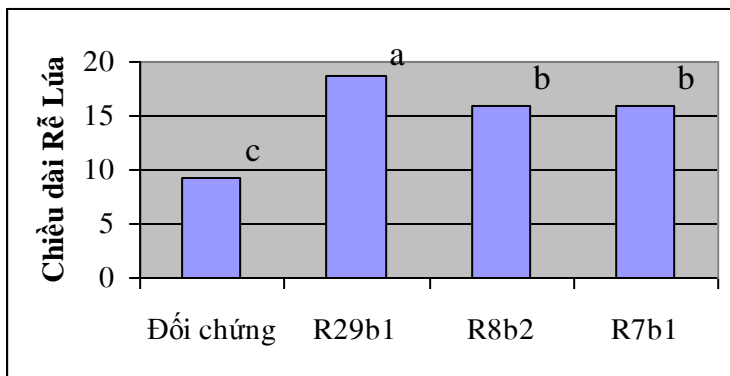
Tuy nhiên, chiều dài rễ lúa ở cả ba nghiệm thức có chủng vi khuẩn đã khác biệt có ý nghĩa so với nghiệm thức đối chứng ở mức ý nghĩa 5% vào ngày 14 sau khi chủng (Hình 6), do vi khuẩn đã có đủ thời gian để giúp rễ lúa phát triển dài hơn đối chứng. Kết quả tương tự cũng được Abbas (2007) tìm thấy khi ủ rễ lúa mì trong dịch vi khuẩn *Azospirillum sp.* trong 14 ngày thì rễ của các cây này dài hơn, có nhiều rễ phụ hơn so với chỉ ủ trong nước cất.



Hình 6: Ảnh hưởng của vi khuẩn lên chiều dài rễ lúa 14 ngày sau khi chủng

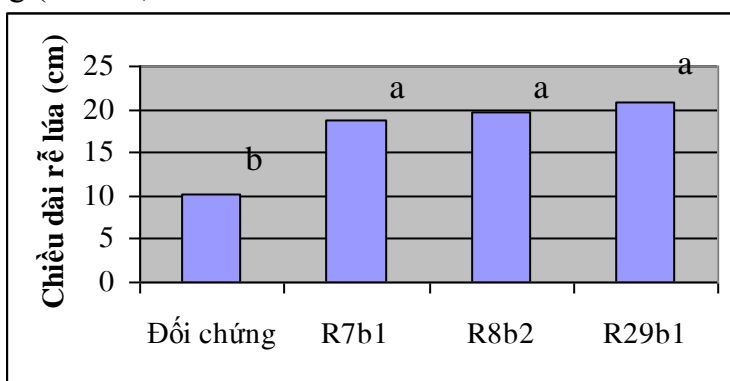
Đến ngày thứ 21, nghiệm thức chủng vi khuẩn R29b1 cho chiều dài rễ lúa cao nhất, khác biệt có ý nghĩa so với tất cả các nghiệm thức còn lại và gấp 2,03 lần so với đối chứng. Dòng R7b1 và R8b2 cũng giúp tăng chiều dài rễ lúa, khác biệt ở mức ý nghĩa 5% so với đối chứng (Hình 7); do cả ba dòng vi khuẩn này đều có khả năng tổng hợp IAA và dòng R29b1 tạo ra lượng IAA nhanh hơn hai dòng còn lại nên giúp rễ lúa dài hơn. Kết quả này phù hợp với kết quả của thí nghiệm khảo sát

lượng IAA sinh ra và được Kolb và Martin (1985) chứng minh bằng thí nghiệm phun IAA có nồng độ là 10^{-9} g/l vào rễ của cây lúa mì kết quả là rễ cây dài hơn.



Hình 7: Ảnh hưởng của vi khuẩn lên chiều dài rễ lúa 21 ngày sau khi chủng

Đến ngày thứ 28, rễ lúa ở các nghiệm thức bón vi khuẩn đều có chiều dài khác biệt so với đối chứng (Hình 8).



Hình 8: Ảnh hưởng của vi khuẩn lên chiều dài rễ lúa 28 ngày sau khi chủng

Dòng R29b1 có chiều dài rễ lúa gấp 2,03 lần so với đối chứng. Hai dòng R7b1 và R8b2 lần lượt gấp 1,83 và 1,93 lần so với đối chứng. Ngoài ra, số lượng rễ phụ ở các nghiệm thức có chủng vi khuẩn nhiều hơn so với nghiệm thức đối chứng (Hình 9, Bảng 3).



Hình 9: Ảnh hưởng của vi khuẩn lên rễ lúa sau 28 ngày chủng

Bảng 3: Chiều dài rễ lúa 28 ngày sau khi chủng vi khuẩn

Nghiệm thức	Chiều dài rễ lúa
Đối chứng	10,25 b
R7b1	18,75 a
R8b2	19,75 a
R29b1	20,25 a
CV (%)	13,39

Trong cùng một cột những số có chữ theo sau giống nhau thì khác biệt không ý nghĩa ở mức 5% qua phép thử Duncan.

Như vậy, sau 28 ngày chủng, các dòng vi khuẩn đã giúp tăng chiều dài rễ cây lúa. Đặc biệt, dòng R29b1 giúp tăng chiều dài rễ lúa lên 2,03 lần so với đối chứng. Kết quả này tương tự như kết quả của Kolb và Martin (1985) khi phun dịch vi khuẩn *Azospirillum brasilense* FT-326 trên rễ của *Beta vulgaris* làm cho rễ mọc dài hơn và phát triển cả các rễ thứ cấp và Amalia *et al.* (1988) cũng đã chứng minh *Azospirillum brasilense* làm tăng chiều dài rễ *Panicum miliaceum*.

4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1 Kết luận

Cả ba dòng R7b1, R8b2 và R29b1 đều có khả năng tổng hợp IAA mà không cần thêm tryptophan vào môi trường nuôi. Lượng IAA nhiều nhất được dòng R29b1 tổng hợp là 19,9µg/ml.

Chiều dài rễ lúa ở các nghiệm thức có chủng vi khuẩn khác biệt so với đối chứng một cách có ý nghĩa. Dòng R29b1 giúp rễ lúa dài hơn 2,03 lần so với đối chứng sau 28 ngày chủng.

4.2 Đề nghị

Thí nghiệm ngoài đồng cần được tiến hành ở nhiều vùng sinh thái khác nhau để hướng đến việc sản xuất phân sinh học cho cây lúa, xây dựng nền nông nghiệp bền vững, thân thiện với môi trường.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Amalia H., J. Kigel and Y. Okon. 1988. Involment of IAA in the interaction between *Azospirillum brasilense* and *Panicum miliaceum* roots. *Plant and Soil*. 110: 275-282.
- Andriollo N., Noris E., Signorini E., Tolentino D. and Pirali G.. 1990. Screening program for the isolation of N₂-fixing bacteria of the genus *Azospirillum*. *Nitrogen fixation*. 48: 347-348.
- Azeem K., M. Arshad , Z.A. Zahir and M. Khalid. 2001. Relative efficiency of rhizobacteria for auxin biosynthesis. *Journal of Biological Sciences*.18: 750-754.
- Bashan Y. and H. Levanony. 1990. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. *Can. J. Microbiol.* 36: 591-603.
- Eric Glickmann and Yves Dessaux. 1995. A Critical Examination of the Specificity of the Salkowski Reagent for Indolic Compounds produced by Phytopathogenic Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 793-796.
- Glickmann E. and Y. Dessaux. 1995. A critical examination of the Salkowski reagent for Indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(2): 793-796.

- Haraki A., J. Kigel and Y. Okon. 1988. Involvement of IAA in the interaction between *A. brasilense* and *Panicum miliaceum* roots. *Plant and soil*. 110: 275-282.
- Hiep N.H., N.N. Hung, N.T.P. Tam and T.Q. Giau. 2009. Effects of inoculated Nitrogen-fixing bacteria on growth of hybrid maize. *Science and Technology Journal of Agriculture and Rural Development*. 132: 41-45.
- Okon Y. and Y. Kapulnik. 1986. Development and function of *Azospirillum*-inoculated roots. *Plant and Soil*. 90: 3-16.
- Paceras-Cardona E., Carcano- Montiel M., Mascarua-Es-Parza M. A. and Caballero-Mellado J..1988. Respuesta del Maiz a la inoculacion con *Azospirillum brasilense*. *Revista Latinoamericana de Microbiologia*. 30: 351-355.
- Patten C. L and B. R. Glick. 2002. Role of *Pseudomonas putida* Indoleacetic Acid in Development of the Host plant root system. *Appl. Environ. Microbiol*. 68(8): 3795 – 3801.
- Pedraza R.O., A.R. Mata, M.L. Xiqui and B.E. Baca. 2004. Aromatic amino acid aminotransferase activity and indole-3-acetic acid production by associative nitrogen-fixing bacteria. *FEMS Microbiology Letters*. 233 (1).
- Smith R. L., Schank S. C., Bouton J. R. and Quesenbery K. H. 1987. Yield increases in tropical grasses after inoculation with *Spirillum lipoferum*. *Ecological Bulletin (Stockholm)* 26: 380-385.