KHẢ NĂNG ỨNG DỤNG VI KHUẨN *METHYLOBACTERIUM* SPP. TRONG VIỆC GIA TĂNG TỈ LỆ NẢY MẦM CỦA HẠT GIỐNG CÂY TRỒNG

Kiều Phương Nam [(1)], Hồ Lê Trung Hiếu[(2)], Trần Minh Tuấn[(1)], Đỗ Thị Di Thiện[(1)], Bùi Văn Lệ[(1)]

(1)Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

(2) Trường Đại học Mở Thành phố Hồ Chí Minh

(Bài nhận ngày 13 tháng 10 năm 2009, hoàn chỉnh sửa chữa ngày 03 tháng 11 năm 2010)

TÓM TẮT: *Chi vi khuẩn Methylobacterium có khả năng kích thích sự sinh trưởng của thực vật, thông qua việc tiết các phytohormone. Trong nghiên cứu này, chúng tôi khảo sát ảnh hưởng của một số chủng vi khuẩn thuộc chi Methylobaterium (M. thiocyanatum JCM 10863T (MT), M. radiotolerans JCM 2831T (MR), M. fujisawaense JCM 10890T (MJ), M. extorquens JCM 2802T (ME), M. oryzea 1021b, M. radiotolerans 1019 và M. fujisawaense 1024) lên sự nảy mầm của hạt giống (đậu đũa, đậu xanh, đậu cove và cà chua). Kết quả cho thấy: Các chủng ME, 1019, 1024, MT, MR, MJ, 1021b đều có tác động tích cực lên sự nảy mầm của các loại hạt giống và mỗi chủng đặc hiệu với một hay một vài loại hạt. Phương pháp đông khô sinh khối, hay đồng khô sinh khối với cát hoặc than bùn không giữ hoạt tính của chủng vi khuẩn so với phương pháp dùng chính hạt giống cây trồng làm chất mang.*

Từ khóa: *Methylobacterium, phytohormone, sự nảy mầm của hạt giống, chế phẩm*

1. GIỚI THIỆU

Methylobacterium là nhóm vi khuẩn có sắc tố hồng, dinh dưỡng methyl tùy ý (PPFM) [2]. Chúng hiện diện chủ yếu trên bề mặt thực vật và có ảnh hưởng tích cực tới sự sinh trưởng và phát triển của thực vật thông qua quá trình tiết các phytohormone (auxin, cytokinin), ACC deaminase (điều hòa ethylene), Urease và cố định nitơ [5], [8], [10], [11], [12]. *Methylobacterium* có khả năng gia tăng năng suất lúa, mía, hạn chế bệnh hại ở cây đậu phộng, cam, chanh và kích thích sự phát sinh hình thái của cây thuốc lá, cây hông và cây saintpaulia nuôi cấy *in vitro* [1], [4]. Trong tự nhiên, vi khuẩn *Methylobacterium* lan truyền qua đất, nước, không khí và cả hạt giống cây trồng [2], [3], [9]. Chính vì thế, vi khuẩn *Methylobacterium* có khả năng phục hồi khả năng nảy mầm của hạt giống sau bảo quản [3]. Trong khuôn khổ bài báo này, chúng tôi đề cập tới tính đặc hiệu với các loài thực vật của vi khuẩn *Methylobacterium* và phương pháp thích hợp cho việc tạo chế phẩm có tác dụng gia tăng tỉ lệ nảy mầm của hạt từ vi khuẩn *Methylobacterium*.

2. THỰC NGHIỆM

2.1Vật liệu

- Các chủng vi khuẩn *M. oryzea* 1021b, *M. radiotolerans* 1019 và *M. fujisawaense* 1024; *M. thiocyanatum JCM 10863T* (MT), *M. radiotolerans JCM 2831T* (MR), *M. fujisawaense JCM 10890T* (MJ),

Methylobacterium. extorquens JCM 2802T (ME) từ Bộ môn CNSH Thực vật và chuyển hóa Sinh học – Đại học khoa học Tự nhiên TP HCM [5].

- Hạt giống đậu đũa, đậu xanh, đậu cove và cà chua của Công ty giống cây trồng Thành phố Hồ Chí Minh, 97 Nghĩa Thục, Phường 5, Quận 5, Thành phố Hồ Chí Minh.

2.2 Phương pháp

2.2.1 Xác định tính đặc hiệu của các chủng Methylobacterium sp. lên sự nảy mầm của từng loại hạt giống

Dịch khuẩn của các chủng *Methylobacterium* spp. được nuôi cấy lắc 4 ngày trên môi trường CMS (thành phần khoáng môi trường Murashige & Skoog-1962- bổ sung 30 g/l sucrose, 2 g/L cao thịt, 2 g/l peptone from casein), Sinh khối của 50 ml canh trường (mật độ tế bào 5,4 10^{12} tế bào/ml) sau khi được rửa sạch với dung dịch nước muối sinh lý được trộn với 400 hạt giống, sau đó đem gieo vào giá thể đã được khử trùng, để ở nhiệt độ phòng, theo dõi thường xuyên để giữ độ ẩm thích hợp cho sự nảy mầm của hạt. Trong quá trình nảy mầm ghi nhận các chỉ tiêu sau:

- Tỉ lệ nảy mầm (percentage germination) là tỉ lệ phần trăm số hạt mọc thành cây mầm bình thường, được tính theo công thức:

$$\text{Tỉ lệ nảy mầm (\%)} = \frac{n}{m} \times 100$$

với n: số hạt nảy mầm

m: tổng số hạt đem gieo

- Sức nảy mầm của hạt được đánh giá theo độ đồng đều của lô hạt giống, sức nảy mầm cao cho thấy tính chất đồng đều của lô hạt giống, khi gieo trồng đảm bảo quần thể tăng trưởng đồng đều, mật độ phù hợp, cây giống tăng trưởng mạnh và sức sống cao. Sức nảy mầm được xác định bằng tỉ lệ phần trăm số hạt nảy mầm sau một thời gian nhất định tùy thuộc vào loại hạt giống. Đối với các loại hạt giống sử dụng trong bài báo này, chúng tôi xác định sức nảy mầm sau 2 ngày gieo hạt và tỉ lệ nảy mầm sau 4 ngày.

2.2.2 Khảo sát điều kiện và chất mang thích hợp để bảo quản sinh khối của chủng Methylobacterium đặc hiệu nhất

Thí nghiệm này được tiến hành trên chủng 1021b và hạt đậu xanh. Trong đó sinh khối được xử lý với hạt theo các nghiệm thức như sau:

A. Sinh khối từ 50 ml dịch canh trường (mật độ 5,4 10^{12} tế bào/ml), trộn với hạt, sau đó để khô tự nhiên và bảo quản ở nhiệt độ phòng với các thời gian 4, 6 tuần.

B. Sinh khối đã đông khô (với giá thể than bùn hay cát theo tỉ lệ 1:1) của vi khuẩn được bảo quản ở nhiệt độ -20 hay 4 độ C với các thời gian 4 tuần hoặc 6 tuần. Sau đó trộn với hạt với mật độ tương đương nghiệm thức A.

Giá thể và điều kiện bảo quản thích hợp được đánh giá thông qua tỉ lệ nảy mầm, sức nảy mầm của hạt giống và mật độ tế bào sau bảo quản. Trong đó, mật độ tế bào được xác định bằng phương pháp đổ đĩa trên môi trường khoáng MMS [3] bổ sung 1% nguồn carbon chọn lọc là methanol và sinh khối tế bào sau khi đông khô hay trong hạt giống được huyền phù trong nước muối sinh lý với thể tích bằng

thể tích canh trường dùng để thu sinh khối. Sau đó, tiếp tục pha loãng thành nhiều nồng độ khác nhau và trải lên đĩa để xác định mật độ tế bào.

2.2.3 Xác định hiệu quả tác dụng của chế phẩm khi kết hợp các chủng đặc hiệu trên các loại hạt giống

Sinh khối các chủng vi khuẩn có hiệu quả cao và thích hợp với từng loại hạt giống được trộn với nhau và với các loại hạt giống. Các lô hạt giống này cũng được xác định tỉ lệ nảy mầm và sức nảy mầm sau thời gian bảo quản để khảo sát phổ tác dụng và hiệu quả của chế phẩm trên từng loại hạt giống khác nhau.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Xác định tính đặc hiệu của các chủng Methylobacterium sp. lên sự nảy mầm của từng loại hạt giống

Hiệu quả tác dụng của các chủng vi khuẩn *Methylobacterium* sp. khác nhau lên sự nảy mầm của hạt giống được ghi nhận trong bảng 1.

Kết quả cho thấy, bên cạnh khả năng kích thích sự nảy nầm ở hạt cây mía [9] thì vi khuẩn *Methylobacterium* spp. còn có hoạt tính trên nhiều loại hạt khác (đậu đũa, đậu xanh, cà chua và lúa [6]). Phân tích về hiệu quả tác động của từng chủng vi khuẩn lên từng loại hạt, có thể thấy ở vi khuẩn *Methylobacterium* có tính đặc hiệu chủng. Mỗi chủng tác động mạnh nhất đối với một loại hạt nhất định. Tuy nhiên, vẫn có một vài chủng có phổ hoạt tính rộng, điển hình là chủng 1021b. Các chủng *Methylobacterium* không chỉ làm tăng tỉ lệ nảy mầm và sức nảy mầm của hạt mà còn tăng kích thước và chiều cao của cây con. Hiệu quả này được giải thích dựa trên hoạt động của các chất điều hòa tăng trưởng thực vật (auxin, cytokinin, gibberelin) do chính vi khuẩn *Methylobacterium* sinh tổng hợp nên [3], [6], [7], [9]. Bên cạnh đó, cũng có thể do hàm lượng các chất điều hòa tăng trưởng thực vật của các chủng sinh tổng hợp không giống nhau [6], [7], [11] là nguyên nhân chính của tính đặc hiệu chủng và làm giảm khả năng nảy mầm ở một số nghiệm thức (tỉ lệ nảy mầm của hạt đậu xanh, 74,75 % đối với chủng MT và 76,00 % đối với lô đối chứng) vì mỗi loài thực vật đáp ứng với một nồng độ hormone nhất định. Tuy nhiên, đây cũng chỉ là giả thiết và vấn đề tính đặc hiệu đối với mỗi loài thực vật của mỗi chủng *Methylobacterium* vẫn cần có các nghiên cứu sâu thêm để làm sáng tỏ.

Bảng 1. Tỉ lệ nảy mầm và sức nảy mầm của các loại hạt thí nghiệm (NC: nghiệm thức đối chứng)

Chủng / Hạt	Sức nảy mầm (%)							
	NC	1021b	MR	MT	MJ	1019	1024	ME
Đậu đũa	62,68	70,45	62,22	**81,34**	76,59	58,89	54,44	65,56
Đậu xanh	67,27	**84,81**	79,93	68,67	79,33	73,40	78,80	77,42
Đậu cove	73,35	**80,68**	74,73	65,98	66,07	72,07	72,67	73,98

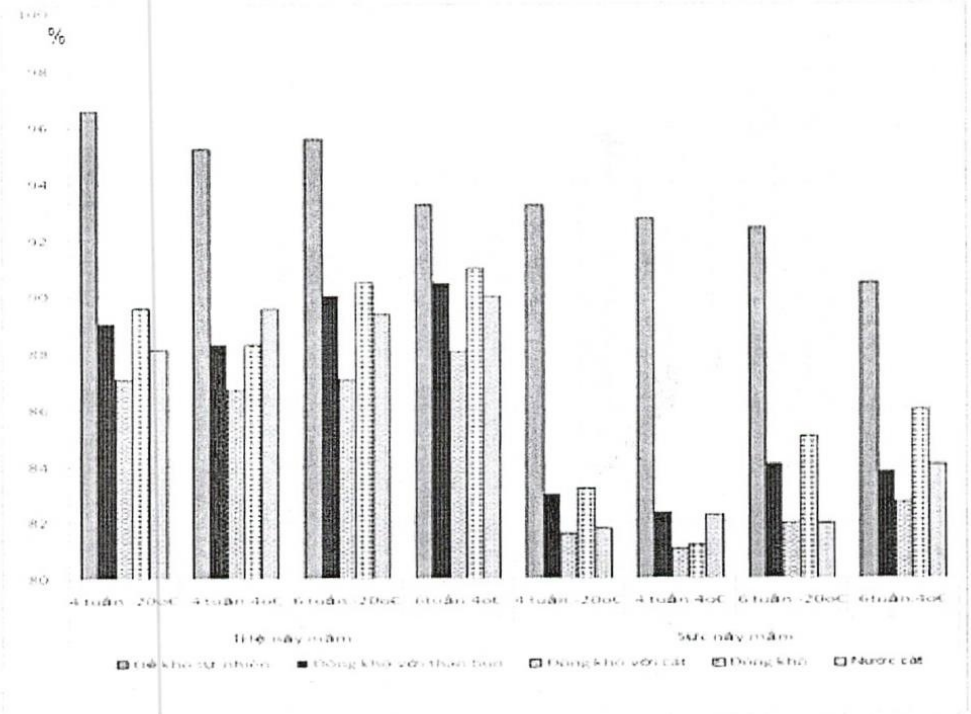
Cà chua	60,68	78,66	67,33	70,73	60,04	75,26	64,68	67,40
Chủng / Hạt	Tỉ lệ nảy mầm (%)							
	NC	1021b	MR	MT	MJ	1019	1024	ME
Đậu đũa	71,18	76,79	70,12	81,25	**85,56**	68,89	62,30	72,58
Đậu xanh	76,00	**87,99**	**85,33**	74,75	**85,42**	**80,03**	78,80	**82,77**
Đậu cove	81,37	**84,73**	79,87	73,93	70,72	76,65	76,69	77,32
Cà chua	66,07	**81,93**	70,53	76,70	65,20	78,73	67,33	70,67

3.2 Khảo sát điều kiện và chất mang thích hợp để bảo quản sinh khối của chủng Methylobacterium đặc hiệu nhất

Từ kết quả khảo sát ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn *Methylobacterium* lên tỉ lệ nảy mầm và sức nảy mầm của các loại hạt (bảng 1), chúng tôi nhận thấy chủng 1021b có tác dụng mạnh đối với nhiều loại hạt, và hạt đậu xanh là loại hạt có giá thành thấp, dễ xử lý và có phản ứng rõ ràng. Vì thế, chúng tôi chọn chủng 1021b để khảo sát loại giá thể và điều kiện bảo quản thích hợp cho sinh khối vi khuẩn *Methylobacterium* (vì vi khuẩn *Methylobacterium* không sinh bào tử, nên khó bảo quản trong điều kiện bình thường) và hiệu quả của các nghiệm thức được đánh giá trên khả năng gia tăng tỉ lệ nảy mầm và sức nảy mầm của hạt đậu xanh. Để thuận tiện cho việc theo dõi, chúng tôi trình bày kết quả của nghiệm thức để khô tự nhiên (bảo quản ở nhiệt độ phòng) chung với các nghiệm thức khác:

So sánh các kết quả cho thấy (hình 1): chỉ có nghiệm thức để khô tự nhiên vẫn có tác dụng gia tăng rõ rệt tỉ lệ nảy mầm và sức nảy mầm của hạt; sinh khối tế bào đông khô không giá thể cũng còn hoạt tính nhưng không cao hơn nhiều so với nghiệm thức đối chứng. Đồng thời các kết quả cũng chỉ ra không có sự khác biệt lớn giữa thời gian bảo quản (4 tuần, 6 tuần) và điều kiện bảo quản (-20°C, 4°C). Bên cạnh đó căn cứ vào mật độ tế bào trước và sau bảo quản ta có thể giải thích được tại sao phương pháp lây nhiễm trực tiếp vi khuẩn trên hạt lại cho kết quả cao nhất vì mật độ tế bào vi khuẩn ban đầu ($4,85.10^{12}$ tế bào/ml) không cao hơn so với sau khi bảo quản 4 tuần ($4,47.10^{10}$ tế bào/ml) và 6 tuần ($4,68.10^{10}$ tế bào/ml). So sánh với tỉ lệ tế bào còn sống của các phương pháp bảo quản khác (bảng 2) cho thấy phương pháp lây nhiễm vi khuẩn vào hạt là một phương pháp đơn giản, chi phí thấp mà vẫn đảm bảo hoạt tính cao vì đây là một phương pháp rất tự nhiên, vi khuẩn *Methylobacterium* lan truyền qua hạt và chính các điều kiện trong hạt giống đảm bảo cho vi khuẩn tồn tại [3].

Ngoài ra, nhiệt độ bảo quản chỉ là nhiệt độ phòng còn cho thấy tính khả thi và chi phí thấp trong việc tạo ra chế phẩm có vai trò gia tăng phẩm chất của hạt giống.



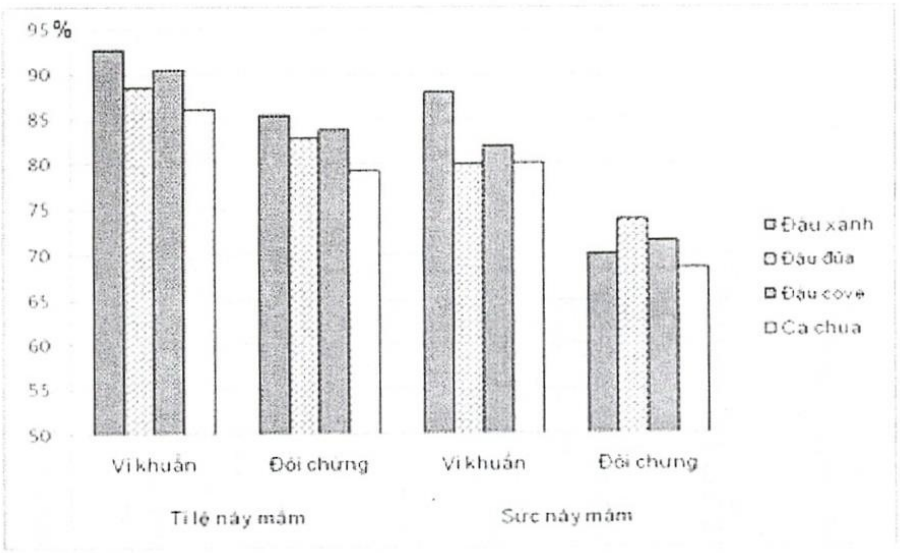
Hình 1. Đồ thị biểu diễn tỉ lệ nảy mầm và sức nảy mầm của hạt đậu xanh trong các điều kiện bảo quản sinh khối vi khuẩn khác nhau

Bảng 2. Mật độ tế bào sau khi bảo quản bằng phương pháp đông khô (tế bào/ml)

Giá thể / Điều kiện	Trước bảo quản (tế bào/ml)	Than bùn (tế bào/ml)	Cát (tế bào/ml)	Không giá thể (tế bào/ml)
4 tuần. -20°C	$4,85.10^{12}$	$3,20.10^{3}$	$2,03.10^{4}$	$4,25.10^{4}$
4 tuần. 4°C		$3,06.10^{3}$	$2,41.10^{4}$	$4,42.10^{4}$
6 tuần. -20°C		$3,17.10^{3}$	$2,27.10^{4}$	$4,33.10^{4}$
6 tuần. 4°C		$3,31.10^{3}$	$2,16.10^{4}$	$4,16.10^{4}$

3.4 Kết hợp các chủng đặc hiệu để tạo thành chế phẩm

Với mục tiêu tạo ra chế phẩm để có thể áp dụng trên nhiều loại cây trồng, chúng tôi khảo sát hoạt tính của hỗn hợp các chủng vi khuẩn *Methylobacterium* trên các loại hạt giống. Trên cơ sở các kết quả này có thể định hướng phương án tạo chế phẩm là lây nhiễm từng chủng trên từng loại hạt chuyên biệt hay có thể lây nhiễm một hỗn hợp các chủng vi khuẩn khác nhau cho tất cả các loại hạt.



Hình 2. Đồ thị biểu diễn tỉ lệ nảy mầm và sức nảy của các loại hạt thí nghiệm khi xử lý hạt với hỗn hợp nhiều chủng vi khuẩn *Methylobacterium* spp.

Kết quả thí nghiệm cho thấy một hiệu quả cộng gộp. Hỗn hợp sinh khối của nhiều chủng có tác dụng gia tăng đáng kể tỉ lệ nảy mầm và sức nảy mầm của nhiều loại hạt so với tác dụng đơn chủng (Bảng 1, Hình 2). Như vậy, hỗn hợp các chủng vi khuẩn không những thích hợp cho nhiều loại cây mà còn làm gia tăng hiệu quả nảy mầm, chính sự tương tác giữa các chủng vi khuẩn với hạt giống đã tạo nên hiệu quả này.

4. KẾT LUẬN

Từ các kết quả đạt được, chúng tôi nhận thấy: phương pháp lây nhiễm trực tiếp một hỗn hợp các chủng vi khuẩn *Methylobacterium* vào các loại hạt giống là một biện pháp giúp gia tăng khả năng nảy mầm của hạt giống. Đây là phương pháp có chi phí thấp, không sử dụng các trang thiết bị chuyên dùng và điều kiện bảo quản đơn giản. Tuy nhiên, vẫn cần phải có các nghiên cứu trên quy mô rộng hơn và nhiều loại hạt giống hơn, để chế phẩm này có thể tới tay người tiêu dùng.

Bên cạnh đó, kết quả còn cho thấy các chủng vi khuẩn *Methylobacterium*: ME, 1019, 1024, MT, MR, MJ, 1021b đều có tác dụng tích cực lên sự nảy mầm của các loại hạt giống và mỗi chủng đặc hiệu với một hay một vài loại hạt. Trong đó, chủng 1021b là chủng có tác dụng tích cực trên nhiều loại hạt nhất và cũng là chủng có hoạt tính mạnh nhất.

INCREASE THE RATIO OF SEED GERMINATION BY USING METHYLOBACTERIUM SPP.

Kieu Phuong Nam [(1)], Ho Le Trung Hieu[(2)], Tran Minh Tuan[(1)], Do Thi Di Thien[(1)], Bui Van Le[(1)]

(1) University of Sciences, VNU-HCM; (2) Ho Chi Minh City Open University

ABSTRACT: *The genus methylobacteria can stimulate plant growth by producing phytohormones. In this research, we investigate the effect of several Methylobacterium strain (M.. thiocyanatum JCM 10863T (MT), M.. radiotolerans JCM 2831T (MR), M. fujisawaense JCM 10890T (MJ), M. extorquens JCM 2802T (ME), M. oryzea 1021b, M. radiotolerans 1019 và M. fujisawaense 1024) on the germination of, tomato, green bean, yard long bean and bean pole. The results showed that all strains positively affected seed germination and each strain was specific on one or many kinds of seed. The biomass lyophilizing method or lyophilizing with activated charcoal did not maintain the activity of bacteria while the use of seeds as carrier ensured the effect of those strains.*

Key words*: Methylobacterium, phytohormone, seed germination.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1]. W. L. Araújo, J. Marcon., W. Jr. Maccheroni, J. D. Van Elsas, J. W. L. Van Vuurde, J. L. Azevedo, *Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with Xyllella fastidiosa in citrus plants*, Applied and Enviromental Microbiology, 68(10): 4906-4914. (2002).

[2]. P. N. Green, *The Genus Methylobacterium*, 2342-2345. In Balows A., Trüper H. G., Dworkin M., Harder V., Schleifer K. H. (ed.) *The Prokaryote*, 2nd ed., Springer-Verlag, Berlin. (1992).

[3]. M. A. Holland, J. C. Polacco, *PPFMs and other covert contaminants: is there more to plant physiology than just plant*?, Plant Physiology, 45: 197-209. (1994)

[4]. Kiều Phương Nam, Đỗ Thị Di Thiện, Trần Minh Tuấn, Bùi Văn Lệ, *Ảnh hưởng của vi khuẩn Methylobacterium radiotolerans 1019 lên sự phát sinh cơ quan ở thực vật.* Tạp chí khoa học Lâm Nghiệp, ISSN: 1859-0373, 4: 1071-1076. (2009)

[5]. Kiều Phương Nam, Trần Minh Tuấn, Đỗ Thị Di Thiện, Biện Tuấn An, Phan Trung Hậu, Cao Đăng Việt, Bùi Văn Lệ, *Định danh các chủng vi khuẩn phân lập được ở vùng Đông Nam Bộ bằng kỹ thuật rDNA 16S và xác định quan hệ di truyền của chúng trong chi Methylobacterium.* Tạp chí nông nghiệp và phát triển nông thôn, ISSN 0866-7020, 3: 44-49. (2010a)

[6]. Kiều Phương Nam, Trần Minh Tuấn, Đỗ Thị Di Thiện, Lê Thị Thùy Dương, Trần Thị Trinh, Phạm Vũ Việt Dũng, Bùi Văn Lệ, *Sinh tổng hợp giberelin (gibberellin) ở*

vi khuẩn Methylobacterium spp.. Tạp chí nông nghiệp và phát triển nông thôn, ISSN 0866-7020, 5: 51-54. (2010b)

[7]. M. E. Lidstrom, L. Chistoserdova, *Plants in the pink: cytokinin production by Methylobacterium*, Journal of bacteriology 184(7): 1818. (2002)

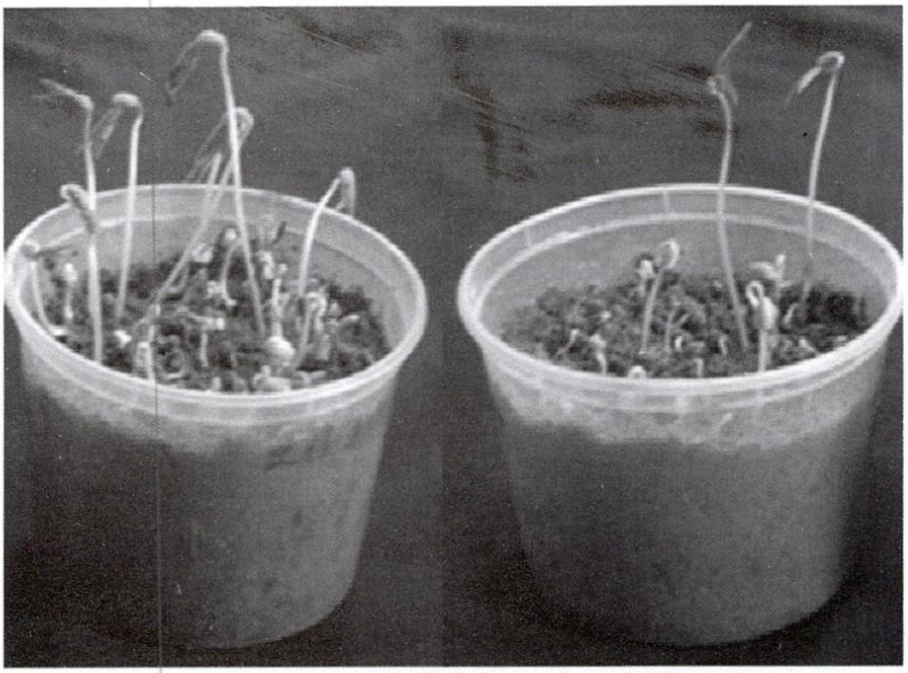
[8]. M. Madhaiyan, S. Poonguzhali, M. Senthilkumar, S. Seshdri, H. Chung, J. Yang, S. Sundaram., *Growth promotion and induction of systemic resistance in rice cultivar Co-47 (Oryza sativa L.) by Methylobacterium spp.*, Bot. Bull. Acad. Sin., 45: 315-324. (2004).

[9]. M. Madhaiyan, S. Poongguzhali, H. S. Lee, K. Hari, S. P. Sundaram, T. M. Sa., *Pink-pigmented facultative methylotrophic bacteria accelerate germination, growth and yield of sugarcane clone Co86032 (Saccharum officinarum L.)*, Biology and fertility of soils, 41(5): 350-358. (2005)

[10]. M. Madhaiyan, S. Poonguzhali, S.P. Sundaram, Sa. Tongmin, *A new insight into foliar applied methanol influencing phylloplane methylotrophic dynamics and growth promotion of cotton (Gossypium hirsutum L.) and sugarcane (Saccharum officinarum L.)*, Environmental and Experimental Botany, 57(1-2): 168-176. (2006).

[11]. Z. S. Omer, R. Tombolini, A. Broberg, B. Gerhardson, *Indole-3-acetic acid production by pink-pigmented facultative methylotrophic bacteria*, Plant Growth Regulation 43: 93-96. (2004).

[12]. A. Sy, E. Giraud, P. Jourand, N. Garcia, A. Willems, P. De Lajudie, Y. Prin, M. Neyra, M. Gillis, C. Boivin-Masson, B. Dreyfus, *Methylotrophic Methylobacterium bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes*, Journal of Bacteriology, 183(1): 214–220. (2001).



A B

Hình 3. Hạt đậu xanh nảy mầm sau 4 ngày gieo hạt

A: Hạt được xử lý với hỗn hợp các chủng vi khuẩn *Methylobacterium*

B: Nghiệm thức đối chứng, hạt được xử lý với nước cất.