

ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC VÀ KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP CHẤT KÍCH THÍCH SINH TRƯỞNG THỰC VẬT CỦA XẠ KHUẨN NỘI SINH *STREPTOMYCES HEBEIENSIS* TQR8-7

Phan Thị Hồng Thảo*, Nguyễn Vũ Mai Linh, Nguyễn Văn Hiếu,
Nguyễn Thị Hồng Liên

Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KHCNVN, 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội

*Email: pthongthaoibt@gmail.com

Đến Tòa soạn: 15/8/2016; Chấp nhận đăng: 5/10/2016

TÓM TẮT

Trong tự nhiên, ngoài thực vật, một số nhóm vi sinh vật cũng có khả năng sinh chất kích thích sinh trưởng thực vật indole-3-acetic acid (IAA). Xạ khuẩn nội sinh là những loài xạ khuẩn cư trú trong nội mô thực vật mà không gây hại cho cây chủ. Ngày nay, đối tượng này được quan tâm nghiên cứu do có khả năng sinh nhiều hợp chất trao đổi thứ cấp có tác dụng điều hòa sinh trưởng và kiểm soát dịch bệnh cho cây trồng, do đó có tiềm năng ứng dụng trong sản xuất nông nghiệp bền vững. Bài báo này trình bày kết quả nghiên cứu khả năng sinh IAA của các chủng xạ khuẩn nội sinh phân lập được từ cây có múi đặc sản của miền Bắc như cam Hàm Yên (Tuyên Quang), Cao Phong (Hòa Bình), bưởi Diễn Hà Nội. Trong số đó, chủng xạ khuẩn nội sinh TQR8-7 có khả năng sinh IAA cao nhất, được nghiên cứu về đặc điểm sinh học, phân loại và điều kiện sinh tổng hợp IAA. Trong phòng thí nghiệm, xạ khuẩn TQR8-7 sinh trưởng tốt trên nhiều loại môi trường thử nghiệm, với khoảng nhiệt độ sinh trưởng từ 15÷40°C, pH 5÷10 và chịu được độ muối đến 5%. Chủng TQR8-7 có khuẩn ty khí sinh màu vàng ngả xám nhạt đến xám xanh trên các môi trường ISP 2, 3, 4 và 8, sinh ra nhiều chuỗi bào tử dài xoắn lò xo, mỗi chuỗi mang từ 30-50 bào tử có bề mặt dạng mụn cơm. Chủng TQR8-7 có khả năng đồng hóa tốt D-glucose, D-sucrose, D-xylose, D-cellulose và D-rhamnose, và sinh enzym ngoại bào như cellulase, xylanase. Dựa vào các đặc điểm sinh học và phân tích trình tự gen 16S rDNA, có thể xếp chủng TQR8-7 thuộc chi *Streptomyces*, loài *S. hebeiensis*, nên được đặt tên là *Streptomyces hebeiensis* TQR8-7. Chủng *S. hebeiensis* TQR8-7 có khả năng sinh IAA cao nhất là 37 µg/ml trên môi trường 79 có bổ sung 0,2% tryptophan, ở nhiệt độ 37°C và pH 7,0.

Từ khóa: cây có múi, IAA, phân loại xạ khuẩn, *Streptomyces hebeiensis*, xạ khuẩn nội sinh, 16S rDNA.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong số gần 300.000 loài thực vật tồn tại trên trái đất thì mỗi loại cây là cây chủ cho một hoặc nhiều loài vi sinh vật nội sinh [1]. Chúng không những không gây bệnh cho cây chủ mà còn có khả năng thúc đẩy sự phát triển của cây bằng cách sản xuất các chất kích thích tăng

trường và bảo vệ thực vật. Vào thế kỷ 19, một vài xạ khuẩn đã được chứng minh là có quan hệ gần gũi với thực vật, có tác dụng tốt hoặc tiêu cực với cây chủ. Ví dụ, xạ khuẩn nội sinh tiết ra các auxin làm ảnh hưởng xấu đến quá trình sinh tổng hợp trên cây chủ, nhằm phục vụ cho mục đích của riêng chúng [2]. Nhưng phần lớn, IAA sinh ra từ xạ khuẩn nội sinh có ý nghĩa tích cực với thực vật, như làm dài rễ đồng thời gia tăng số lượng rễ phụ và lông rễ tham gia vào quá trình hấp thu dinh dưỡng [3]. IAA kích thích kéo dài tế bào bằng cách thay đổi các điều kiện nhất định như tăng tính thấm lọc các chất của tế bào, làm tăng tính thấm nước vào trong tế bào, làm giảm áp lực thành tế bào, tăng tổng hợp thành tế bào. IAA còn ngăn chặn và trì hoãn hiện tượng sinh lý của lá, thúc đẩy sự ra hoa, tạo quả [4]. IAA cũng có tác dụng là một tác nhân điều hòa đến sự phân hóa tế bào của vi sinh vật, ví dụ như kích thích nảy mầm bào tử và sự kéo dài hệ sợi trong *Streptomyces*. Một vài loài *Streptomyces* ví dụ như *Streptomyces olivaceoviridis*, *S. remosus*, *S. rochei* và *Streptomyces* sp. từ vùng rễ đã được khẳng định là có khả năng sản xuất IAA và cải thiện tăng trưởng thực vật bằng tăng khả năng nảy mầm của hạt, kéo dài rễ và tăng trọng lượng rễ khô [5].

IAA là một chất chuyển hóa từ tryptophan bằng các con đường phụ thuộc hoặc không phụ thuộc ở thực vật và vi sinh vật. Ở một chủng vi sinh vật có thể tồn tại đồng thời nhiều con đường chuyển hóa [6]. Trong những con đường phụ thuộc tryptophan, tryptophan được chuyển hóa thành indole-3-acetamide (IAM) bởi enzym tryptophan-2-monooxygenase và IAM được chuyển hóa thành IAA bởi enzym IAM-hydrolase [7]. Quá trình tổng hợp IAA có thể thực hiện thông qua con đường không phụ thuộc tryptophan, mặc dù trong điều kiện có mặt tryptophan, vi sinh vật giải phóng ra hàm lượng lớn hơn IAA và các hợp chất liên quan. Con đường chuyển hóa không phụ thuộc tryptophan có thể đóng góp một cách đáng kể vào sự tổng hợp IAA mới.

Trong tình trạng lạm dụng các hóa chất kích thích sinh trưởng, gây ra những tác động xấu đến môi trường và sức khỏe, xạ khuẩn nội sinh có nhiều tiềm năng quan trọng để trở thành giải pháp hữu ích cho tương lai trong tăng trưởng thực vật. Nghiên cứu này trình bày kết quả đánh giá khả năng sinh IAA của các chủng xạ khuẩn nội sinh được phân lập từ một số cây có mùi đặc sản tại Tuyên Quang, Hà Nội và Hòa Bình và nghiên cứu một số điều kiện sinh tổng hợp IAA của chủng TQR8-7.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Các chủng xạ khuẩn nội sinh thu nhận từ cây cam Hàm Yên - Tuyên Quang, Cam Cao Phong Hòa Bình và Bưởi Diễn Hà Nội trong bộ sưu tập của Phòng Vi sinh vật Đất.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Nghiên cứu đặc điểm sinh học

Nghiên cứu đặc điểm sinh học theo phương pháp trong ISP (1974) và khóa phân loại Bergey. Màu sắc của khuẩn ti cơ chất (KTCC), khuẩn ty khí sinh (KTKS) và sắc tố tan tiết ra môi trường được đánh giá theo Shirling và Gottlieb (1966) trên bảng màu của Tresner và Backus [8]. Hình dạng cuống sinh bào tử và cấu trúc bề mặt bào tử của xạ khuẩn nghiên cứu được quan sát dưới kính hiển kính hiển vi điện tử quét JSM-5000 tại Viện Khoa học Vật liệu, Viện Hàn Lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Xạ khuẩn kiểm tra được nuôi trên môi trường Bennett rắn được bổ sung NaCl với nồng độ thay đổi từ 1 - 10 %, ở 28 – 30 °C, sau 7 ÷ 14 ngày quan sát khả năng sinh trưởng của chúng.

Xạ khuẩn kiểm tra được nuôi trên môi trường rắn Bennett ở các nhiệt độ 10 ÷ 60 °C. Sau 7 ÷ 14 ngày quan sát sự sinh trưởng. Chủng xạ khuẩn được cấy vào môi trường Bennett lỏng đã được chỉnh pH từ 2 ÷ 12, nuôi lắc ở nhiệt độ 28 ÷ 30 °C. Sau 7 ngày quan sát sự sinh trưởng của chúng.

2.2.2. Phân tích trình tự gen mã hóa 16S rRNA

DNA tổng số của chủng TQR8-7 được tách chiết theo kit tách chiết DNA tổng số (NucleoSpin® Tissue extraction kit, Macherey-Nagel, Germany) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Gen mã hóa 16S rRNA của chủng xạ khuẩn được khuếch đại bằng phản ứng PCR từ DNA tổng số sử dụng cặp mồi 27F (5'-TAACACATGCAAGTCGAACG-3') và 1492R (5'-GG(C/T)TACCTTGTTACGACTT-3') theo chu trình nhiệt: 94 °C trong 5 phút, 30 chu trình (94 °C trong 60 giây, 60 °C trong 60 giây, 72 °C trong 90 giây), 72 °C trong 10 phút, giữ mẫu ở 4 °C. Sản phẩm của phản ứng PCR được phân tích trên máy đọc trình tự ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer, xử lý bằng phần mềm SeqAssem version 01/2005 và Sequencher version 4.0.5. Mức độ tương đồng gen 16S rDNA của chủng nghiên cứu được so sánh với các trình tự gen 16S rDNA trong Genbank. Mức độ tương đồng di truyền của các chủng được xây dựng dựa trên phần mềm CLC DNA workbench 6.6.

2.2.3. Xác định khả năng sinh tổng hợp một số enzym: cellulase, xylanase, protease, chitinase bằng phương pháp khuếch tán trên thạch

Chủng xạ khuẩn được cấy trên môi trường khoáng có bổ sung các cơ chất đặc hiệu: CMC (cacboxyl metyl xenlulose) để xác định hoạt tính xenlulose, tinh bột để xác định hoạt tính amylase, casein để xác định hoạt tính protease, chitin cho xác định chitinase và xylan để xác định khả năng phân hủy lignocellulose. Sử dụng phương pháp cấy chấm điểm, nuôi ở 28 – 30 °C, kiểm tra kết quả sau 5 ngày. Khả năng sinh tổng hợp cellulase và amylase được xác định bằng việc bổ sung 2 ml dung dịch lugol và đo đường kính vòng phân giải xuất hiện trên đĩa. Bổ sung 2 ml dung dịch axit tricloaxetic 50 % (w/v) để xác định khả năng sinh tổng hợp protease. Xác định vòng phân hủy xylan và chitin được xác định bằng vòng trong xuất hiện xung quanh khuẩn lạc.

2.2.4. Kiểm tra khả năng sinh tổng hợp IAA

Hàm lượng IAA được tạo ra trong dịch lên men của các chủng xạ khuẩn khảo sát được xác định bằng phương pháp đo màu được tạo thành với thuốc thử Van Urk Salkowski trong phương pháp của Salkowski. Chủng xạ khuẩn nội sinh kiểm tra được nuôi trên môi trường ISP2 (yeast malt dextrose broth) ở nhiệt độ 28 °C trong 5 ngày. Sau 5 ngày nuôi cấy ly tâm thu dịch trong 1ml dịch sau ly tâm được trộn đều với 2 ml thuốc thử Salkowski (2 % 0.5 FeCl₃ in 35 % HClO₄ solution) và giữ trong tối [9]. Sự xuất hiện của màu hồng trong mẫu đo cho thấy sự có mặt của hoạt chất IAA trong mẫu thử. Đo độ hấp thụ quang (OD) ở bước sóng 530 nm sau 30 phút. Đường chuẩn được dựng dựa trên các mẫu có chứa nồng độ IAA chuẩn khác nhau. Phương trình đường chuẩn IAA: $y = 30.24x + 0.4164$.

2.2.5. Lựa chọn môi trường và điều kiện sinh tổng hợp IAA

Xạ khuẩn TQR8-7 được nuôi trên môi trường ISP2 không và có bổ sung tryptophan 0,2 %. Sau 5 ngày nuôi cấy xác định lượng IAA sinh tổng hợp được.

Xạ khuẩn nghiên cứu được nuôi trên 7 môi trường: Gause I, Gause II, ISP4, ISP2, A-H4 (glucose, 15 g/l; bột đậu tương, 15 g/l; NaCl, 5 g/l; CaCO₃, 1 g/l; pH 7,0), 79 (glucose, 10 g/l; peptone, 10 g/l; casein hydrolysis, 2 g/l; NaCl, 6 g/l; pH 7,2) và tinh bột casein (SCA) có bổ sung thêm 0,2 % tryptophan và nuôi ở điều kiện lắc 150 vòng/phút, nhiệt độ 28 – 30 °C. Hàm lượng IAA sinh tổng hợp được xác định sau 5 ngày nuôi cấy.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khảo sát khả năng sinh tổng hợp IAA của các chủng xạ khuẩn nội sinh

Trên cơ sở 47 chủng xạ khuẩn nội sinh thu thập được, tiến hành khảo sát khả năng sinh tổng hợp IAA trên môi trường ISP 2, kết quả được chỉ ra trên Bảng 1.

Bảng 1. Khả năng sinh tổng hợp IAA của các chủng xạ khuẩn nội sinh trên cây có múi đặc sản tại ba vùng Hòa Bình, Tuyên Quang và Hà Nội.

STT	Hàm lượng IAA (µg/ml)	Số chủng	Phần trăm số chủng có hoạt tính IAA (%)
1	0	0	0
2	<6	5	10,64
3	6 < IAA < 14	22	46,81
5	14 < IAA < 20	18	38,30
6	20 < IAA	2	4,26
	Tổng số chủng	47	100



(a) (b)
Hình 1. Khuẩn lạc chủng TQR8-7 trên môi trường ISP2 sau 7 và 14 ngày nuôi cấy.

Theo Shutsrirung và cộng sự (2013) [10], tương tự các loài vi sinh vật khác, sự sinh ra hormone thực vật như IAA ở xạ khuẩn nội sinh là một trong những cơ chế để kích thích sự tăng trưởng của cây chủ, tăng trọng lượng khô của lá, rễ và chiều dài rễ khiến cho cây phát triển khỏe mạnh hơn. Mối liên hệ giữa xạ khuẩn nội sinh với cây chủ và việc sản sinh ra các sản phẩm tự nhiên có hoạt tính sinh học tạo ra cơ hội tìm ra các loại chế phẩm đặc hiệu có tiềm năng ứng dụng trong bảo vệ và hỗ trợ tăng trưởng thực vật. Từ cây lô hội, bạc hà và hương nhu tía [11], cây quýt [10], cây lúa mì, ngô và đậu răng ngựa [5] nhiều chủng xạ khuẩn có khả năng sinh tổng hợp IAA cao đã được tìm ra. Trong đó có nhiều chủng xạ khuẩn thuộc chi Streptomyces. Trong nghiên cứu của chúng tôi, trong số 47 chủng xạ khuẩn nội sinh thu thập từ các cây có múi có 5 chủng (10,64 %) sinh tổng hợp IAA dưới 6 (µg/ml), 22 chủng (46,81 %) sinh tổng hợp IAA từ 6 đến 14 µg/ml và 18 chủng (38,3 %) sinh IAA trong khoảng từ 14 đến 20 µg/ml. Chiếm số ít là các chủng xạ khuẩn sinh tổng hợp IAA > 20 µg/ml (4,26 %) (Bảng 1). Xạ khuẩn TQR8-7 là một trong hai chủng có khả năng sinh tổng hợp IAA cao (> 20 µg/ml), được lựa chọn để nghiên cứu phân loại và sinh tổng hợp IAA trong bài báo này (Hình 1).

3.2. Đặc điểm sinh học của chủng xạ khuẩn nội sinh TQR8-7

Đặc điểm sinh học của chủng TQR8-7 được nghiên cứu trên các môi trường nuôi cấy ISP và sử dụng làm cơ sở cho việc phân loại theo phương pháp trong ISP và khóa phân loại Bergey (1989).

Chủng TQR8-7 có khả năng đồng hóa tốt 7 trong số 9 nguồn đường cơ bản: D-glucose, D-sucrose, D-xylose, D-cellulose, D-rhamnose, manitol và raffinose, không đồng hóa được arabinose và fructose. Chủng sinh trưởng tốt ở 25, 30 và 37 °C và trong dải pH 5 ÷ 10. Khuẩn ty khí sinh có màu vàng xám nhạt đến xám xanh trên các môi trường ISP 2, 3, 4 và 8. Khuẩn ty cơ chất có màu vàng đậm đến xám đen trên các môi trường kiểm tra (Bảng 2). Từ một cuống sinh bào tử có thể sinh ra 1 đến 2 chuỗi bào tử dài dạng xoắn lò so, mang 30 đến 50 bào tử hình cầu có bề mặt dạng mụm com (Hình 2). Sắc tố tan màu xám nâu được tạo ra trên môi trường ISP2 và ISP3. Chủng nghiên cứu có khả năng phân hủy các cơ chất như cellulose, xylan, chitin và casein (Bảng 2). Chủng có khả năng phát triển trên môi trường có 5 % NaCl.

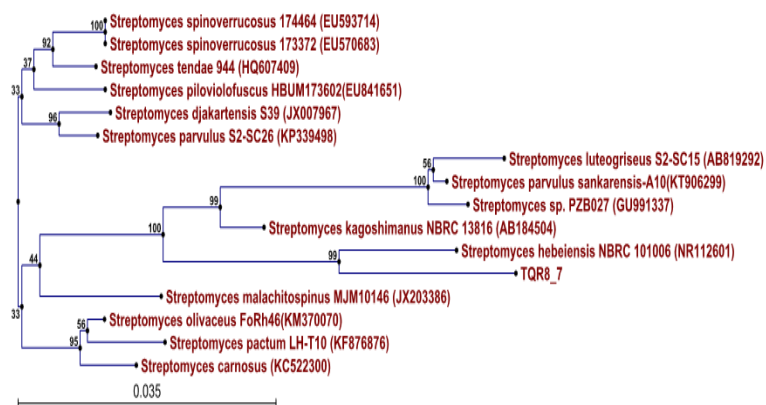
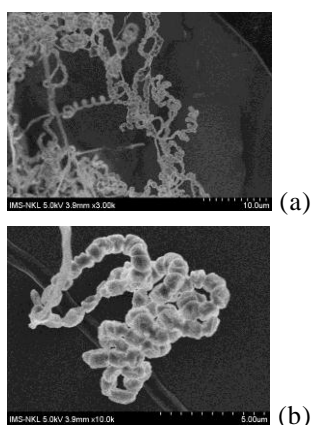
Đối chiếu các đặc điểm phân loại của chủng nghiên cứu theo các khóa định tên loài xạ khuẩn trong ISP, so sánh với khóa phân loại Bergey, chúng tôi xác định chủng TQR8-7 có thể xếp vào nhóm xạ khuẩn *Streptomyces*. Tuy nhiên, để phân loại chủng TQR8-7 đến loài, cần kết hợp kết quả về đặc điểm sinh hóa và trình tự gen 16S rDNA.

Bảng 2. Một số đặc điểm nuôi cấy và sinh học của xạ khuẩn TQR8-7.

Từ kết quả xác định trình tự cho thấy, gen 16S rDNA của chủng TQR8-7 có độ tương đồng cao (99 %) với các gen tương ứng của một số xạ khuẩn thuộc chi *Streptomyces* (Hình 3): *Streptomyces hebeiensis* NBRC 101006, *S. kagoshimanus* NBRC 13816, *Streptomyces* sp. PZB027, *S. parvulus* sankarensis-A10. Như vậy, kết quả phân loại cho thấy chủng xạ khuẩn TQR8-7 có đặc điểm rất gần gũi và có độ tương đồng cao với loài *Streptomyces hebeiensis* nên chủng xạ khuẩn này được đặt tên là *Streptomyces hebeiensis* TQR8-7.

Đặc điểm khảo sát	Xạ khuẩn TQR8-7
Chuỗi bào tử	Xoắn dạng lò so
Bề mặt bào tử	Mụm com
Màu khuẩn ty khí sinh	30 ÷ 50
Màu khuẩn ty cơ chất	Màu vàng xám nhạt đến xám xanh trên môi trường ISP 2, 3, 4 và 8
Màu khuẩn ti cơ chất	Vàng đậm đến xám đen
Sắc tố tan	Xám đen trên ISP2 và ISP3
Sắc tố Melanin	Không
pH sinh trưởng	pH 5 ÷ 10
Nhiệt độ sinh trưởng	15 ÷ 40°C
Khả năng chịu muối	0 ÷ 5%
Khả năng phân hủy một số cơ chất	Đường kính vòng phân hủy, mm
Cellulose	18
Xylan	20
Tinh bột	0
Casein	30
Chitin	30
Khả năng sử dụng nguồn đường	Sinh trưởng
Glucose	+
Manitol	+/-
Sucrose	+
Fructose	-
Xylose	+
Arabinose	-
Cellulose	++
Rhamnose	++
Raffinose	+/-
ĐC (-)	-

Ghi chú: “++” Sinh trưởng rất tốt, “+” Sinh trưởng tốt, “+/-” Sinh trưởng yếu, “-” Không sinh trưởng

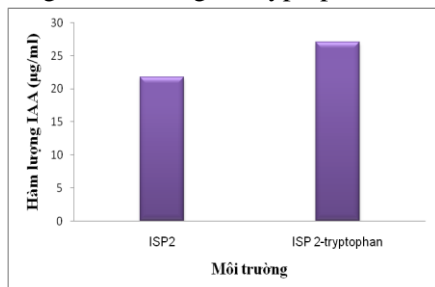


Hình 2. Chuỗi bào tử (a) và bào tử (b) của xạ khuẩn nội sinh TQR8-7. Hình 3. Mức độ tương đồng di truyền giữa chủng *S. hebeiensis* TQR8-7 với các loài xạ khuẩn có họ hàng gần dựa vào 16S rRNA.

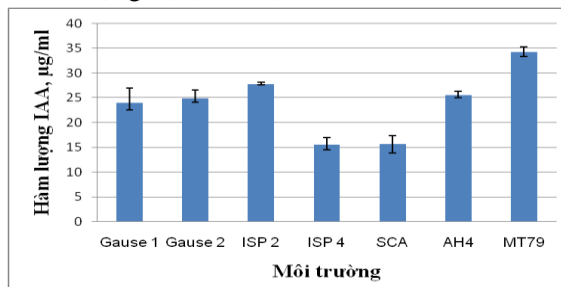
3.3. Nghiên cứu điều kiện sinh tổng hợp IAA của xạ khuẩn TQR8-7

Ảnh hưởng của tryptophan

Tryptophan là một tiền chất quan trọng để sinh tổng hợp IAA [12]. Sự tương đồng về cấu trúc của β - indol acetic acid và tryptophan là cơ sở cho giả định rằng: auxin có thể được tổng hợp từ axit amin đó. Trong nghiên cứu dưới đây, quá trình sinh tổng hợp IAA được khảo sát trên môi trường có và không có tryptophan ở nồng độ 0,2 % (2 g/L) (Hình 4).



Hình 4. Ảnh hưởng của tryptophan trong môi trường đến khả năng sinh tổng hợp IAA của chủng xạ khuẩn TQR8-7.



Hình 5. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến sinh tổng hợp IAA của xạ khuẩn nội sinh TQR8-7.

Kết quả cho thấy khi bổ sung 2 g/L tryptophan vào môi trường nuôi cấy ISP2 thì lượng IAA sinh tổng hợp ra tăng lên 28,6 % so với môi trường không bổ sung tryptophan ban đầu. Như vậy có thể thấy, tryptophan ảnh hưởng lớn đến sinh tổng hợp IAA từ chủng xạ khuẩn nghiên cứu. Trong các nghiên cứu tiếp theo các môi trường nuôi cấy được bổ sung tryptophan với hàm lượng 2 g/L.

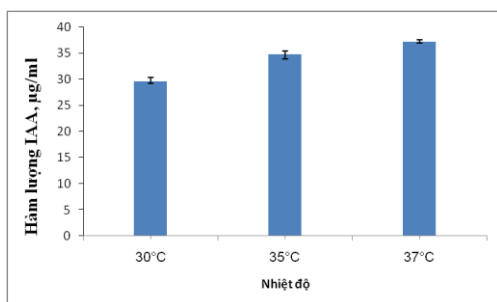
Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy

Xạ khuẩn TQR8-7 được nuôi trên 7 môi trường: Gause I, Gause II, A-H4, ISP4, ISP2, 79 và tinh bột casein (SCA). Kết quả cho thấy, TQR8-7 sinh trưởng tốt trên các môi trường lỏng AH4, 79, ISP 2 và SCA, sinh khối tạo dạng pellet nhỏ, mịn, kích thước dưới 0,5 mm. Trên các

môi trường ISP4, Gause 1 và Gause 2, chủng sinh trưởng kém hơn và tạo các pellet có kích thước từ 1÷1,5 mm. Trên các môi trường nuôi cấy lỏng này chủng TQR8-7 tạo sắc tố màu vàng nâu. Xạ khuẩn nghiên cứu sinh IAA cao nhất trên môi trường 79 (Hình 5), vì vậy môi trường này được lựa chọn cho sinh trưởng và sinh tổng hợp IAA trong các thí nghiệm tiếp theo.

Ảnh hưởng của nhiệt độ và pH nuôi cấy

Xạ khuẩn TQR8-7 được nuôi 5 ngày ở các nhiệt độ 30, 35 và 37°C trên môi trường thích hợp 79, bổ sung 0,2 % tryptophan và khảo sát hàm lượng IAA sinh ra sau 5 ngày nuôi cấy.



Hình 6. Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy đến sinh tổng hợp IAA của xạ khuẩn nội sinh TQR8-7.

Bảng 3. Ảnh hưởng của pH nuôi cấy đến sinh trưởng và sinh tổng hợp IAA của xạ khuẩn nội sinh TQR8-7.

pH môi trường	Hàm lượng IAA, µg/ml	Sinh khối ướt, g/lít
6	34,70 ± 0,60	73,20 ± 8,10
6,5	34,86 ± 0,72	96,80 ± 5,83
7	37,53 ± 0,18	99,73 ± 6,04
7,5	34,32 ± 0,66	89,33 ± 8,76
8	31,40 ± 0,69	75,87 ± 4,74

Kết quả cho thấy, chủng sinh tổng hợp IAA cao nhất trên môi trường 79 với nhiệt độ nuôi là 37 °C (Hình 6). Trên cơ sở môi trường và nhiệt độ thích hợp cho sinh tổng hợp IAA, tiến hành điều chỉnh pH của môi trường nuôi từ 6 ÷ 8 để lựa chọn pH thích hợp cho sinh tổng hợp IAA của chủng TQR8-7. Kết quả cho thấy, TQR8-7 sinh trưởng tốt trong khoảng pH từ 6 ÷ 8. Khoảng pH thích hợp cho sinh trưởng là 6,5 ÷ 7, với sinh khối ướt đạt 96 – 99 g/L. Hàm lượng IAA sinh tổng hợp đạt cao nhất ở pH 7,0 và nhiệt độ 37°C. Khi tăng hoặc giảm 0,5 độ pH thì hàm lượng IAA thu được giảm nhẹ (7 %). Khi tăng pH môi trường nuôi lên 8,0 thì hàm lượng IAA thu được giảm khoảng 16 % (Bảng 3).

Trong nghiên cứu của Abd-Alla và cộng sự [5], từ đất vùng rễ của các cây lúa mì, ngô và đậu răng ngựa ông đã thu được chủng *S. atrovirens* ASU14 có khả năng sinh tổng hợp IAA trên 22 µg/ml. Thông qua nghiên cứu môi trường và điều kiện thích hợp cho sinh tổng hợp IAA, ông đã nâng được hàm lượng IAA tổng hợp lên gần 200 µg/ml. Trong hầu hết các nghiên cứu về sinh tổng hợp IAA, một số tác giả công bố điều kiện thích hợp cho sinh tổng hợp IAA là dao động trong khoảng pH từ 6 ÷ 7,0 và nhiệt độ là 30 ÷ 37 °C [5, 13], tương tự kết quả chúng tôi nhận được từ chủng *S. hebeiensis* TQR8-7. Trong nghiên cứu này, bước đầu chúng tôi đã tìm được điều kiện và môi trường thích hợp cho sinh tổng hợp IAA, tuy vậy, cần tiếp tục nghiên cứu tối ưu hóa quá trình lên men để thu nhận được lượng IAA cao hơn. Mặt khác, khả năng tái xâm nhiễm và kích thích sinh trưởng của chủng *S. hebeiensis* TQR8-7 trên cây có múi cũng cần được nghiên cứu và đánh giá.

4. KẾT LUẬN

Trong số 47 chủng xạ khuẩn nội sinh phân lập được từ cây có múi, 42 chủng (88 %) có khả năng sinh IAA, trong đó có hai chủng (chiếm 4 %) có khả năng sinh IAA cao, trên 20 µg/ml. Chủng TQR8-7 là một trong hai chủng có khả năng sinh tổng hợp IAA cao được lựa chọn cho phân loại và nghiên cứu sinh tổng hợp IAA trong nghiên cứu này. Thông qua nghiên cứu về đặc điểm sinh học và phân tích trình tự gen 16S rDNA, chủng TQR8-7 có độ tương đồng cao với các

loài *S. hebeiensis* và được đặt tên là *S. hebeiensis* TQR8-7. Chúng xạ khuẩn nghiên cứu sinh trưởng và sinh IAA đạt 37 µg/ml trong điều kiện thích hợp nhất là môi trường 79 có bổ sung 2 g/L tryptophan, pH 7 và nhiệt độ 37 °C. Trong tương lai, đây là một chủng xạ khuẩn có tiềm năng trong sản xuất IAA để sử dụng trong nông nghiệp.

Lời cảm ơn. Nghiên cứu này nhận được sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài “Nghiên cứu sự đa dạng của xạ khuẩn nội sinh trên cây có mùi đặc sản ở miền Bắc Việt Nam và tiềm năng sinh tổng hợp các chất kháng khuẩn và kích thích tăng trưởng thực vật của chúng” MS: VAST.ĐLT.12/15-16 và trang thiết bị của phòng TNTĐCNG, Viện CNSH.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Kandpal K. C., Jain D. A., Kumar U., Tripathi R., Kumar T. S. - Isolation and screening of endophytic actinomycetes producing antibacterial compound from Citrus aurantifolia Fruit, Eur. J. Exp. Biol. **2** (5) (2012) 1733-1737.
2. Costacurta A., and J. Vanderleyden. - Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria, Crit. Rev. Microbiol. **21** (1995) 1-18.
3. Datta C., Basu P. - Indole acetic acid production by a *Rhizobium* species from root nodules of a leguminous shrub, Cajanus cajan, Microbiol. Res. **155** (2) (2000) 123 – 127.
4. Zhao Y. - Auxin biosynthesis and its role in plant development, Annu. Rev. Plant Biol. **61** (2010) 49-64.
5. Abd-Alla M. H, El-Sayed E. S. A., Rasmeay A. H. M. - Indole-3-acetic acid (IAA) production by *Streptomyces atrovirens* isolated from rhizospheric soil in Egypt, J. Biol. Earth. Sci. **3** (2) (2013) 182-193.
6. Pattern C. L., Glick B. R. - Role of *Pseudomonas putida* in lactic acid in development of the host plant root system, Appl. Environ. Microbiol. **68** (2002) 3795-3801.
7. Matsukawa E., Nakagawa Y., Iimura Y., Hayakawa M. - Stimulatory effect of indole-3-acetic acid on aerial mycelium formation and antibiotic production in *Streptomyces* spp., Actinomycetologica **21** (2007) 32-39.
8. Nomomura H. - Key for Classification of 458 species of the *Streptomyces* included in ISP, J. Ferment Technol. **52** (2) (1974) 78-92.
9. Mohite B. - Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth, J. Soil Sci. Plant Nutr. **13** (3) (2013) 638-649.
10. Shutsrirung A., Chromkaew Y., Pathom-Aree W., Choonluchanon S., Boonkerd N. - Diversity of endophytic actinomycetes in mandarin grown in northern Thailand, their phytohormone production potential and plant growth promoting activity, Soil Sci. Plant Nutr. **59** (3) (2013) 322–330.
11. Gangwar M., Dogra S., Gupta U. P., Kharwar R. N. - Diversity and biopotential of endophytic actinomycetes from three medicinal plants in India, African Journal of Microbiology Research **8** (2) (2014) 184-191.
12. Janardan Y., Jay P. V., Kavindra N. T. - Effect of plant growth promoting Rhizobacteria on seed germination and plant growth Chickpea (*Cicer arietinum* L.) under in Vitro conditions, Biological Forum-An International Journal **2** (2) (2010) 15-18.

13. Khamna S., Yokota A., Peperdy J., Lumyong S. - Indole-3-acetic acid production by *Streptomyces* sp. isolated from some Thai medicinal plant rhizosphere soils, Eur. Asian. J. Biol. Sci. **4** (2010) 23-32.

ABSTRACT

BIOLOGICAL CHARACTERISTICS AND PRODUCTION OF PLANT GROWTH REGULATOR IAA BY ENDOPHYTIC *STREPTOMYCES HEBEIENSIS* TQR8-7

Phan Thi Hong Thao*, Nguyen Vu Mai Linh, Nguyen Van Hieu, Nguyen Thi Hong Lien

Institute of Biotechnology, VAST, 18 Hoang Quoc Viet, Cau Giay, Hanoi

*Email: *pthongthaoibt@gmail.com*

Indole acetic acid (IAA) is one of the most physiologically active auxins produced in nature by plants as well as by several microorganisms. Endophytic microorganisms colonize living plant tissues (roots, braches, leaves) but cause no harm to the host plant. Recently, research has been focused on endophytic actinomycetes, since they produce a large number of secondary metabolites potentially applicable in sustainable agricultural production as plant growth regulators and antimicrobial agents. In this paper, among dozens of endophytic actinomycetes of citrus plants (Dien grapefruit, Cao Phong and Ham Yen orange), the isolate TQR8-7 was selected for studying on biological characteristics and IAA production. This strain gave high biomass yields on several tested cultivation media of pH 5÷10, salinity up to 5 %, and growth temperature of 15 ÷ 40 °C. On a series of agar-agar media ISP-2 to -8, isolate TQR8-7 produced pale yellow-grey to green-grey branched aerial mycelia. Its spiral spore-chains bore 30 to 50 warty spores each. Isolate TQR8-7 utilized D-glucose, D-sucrose, D-xylose, D-cellulose and D-rhamnose. Its extracellular enzymes included cellulase and xylanase. Based on the results of morphological characteristics and phylogenetic analysis of 16S rDNA, isolate TQR8-7 was identified as *Streptomyces hebeiensis*, hence *Streptomyces hebeiensis* TQR8-7. At laboratory scale, culture of this strain on medium 79 supplemented with 0.2 % tryptophan, pH 7.0 at 37 °C, produced 37 µg/ml of IAA.

Keywords: endophytic actinomycetes, citrus plant, actinomycete identification, 16S rDNA, *Streptomyces hebeiensis*, IAA.