BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

TRƯỜNG ĐẠI HỌC ĐÀ LẠT

BÁO CÁO TỔNG KẾT

ĐỀ TÀI NGHIÊN CỨU KHOA HỌC SINH VIÊN NĂM 2022

NGHIÊN CỨU TUYỂN CHỌN VI SINH VẬT NỘI SINH CÓ KHẢ NĂNG TỔNG HỢP CHẤT ĐIỀU HOÀ SINH TRƯỞNG IAA (INDOLE-3-ACETIC ACID), GAs (GIBBERELIC ACID) VÀ BƯỚC ĐẦU ĐÁNH GIÁ THỬ NGHIỆM TRÊN CÂY LAN GIẢ HẠC (*DENDROBIUM* SPP.).

Thuộc nhóm ngành: Khoa học Tự nhiên

LÂM ĐỒNG, THÁNG 5 NĂM 2022

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

TRƯỜNG ĐẠI HỌC ĐÀ LẠT

BÁO CÁO TỔNG KẾT

ĐỀ TÀI NGHIÊN CỨU KHOA HỌC SINH VIÊN NĂM 2021

NGHIÊN CỨU TUYỂN CHỌN VI SINH VẬT NỘI SINH CÓ KHẢ NĂNG TỔNG HỢP CHẤT ĐIỀU HOÀ SINH TRƯỞNG IAA (INDOLE-3-ACETIC ACID), GAs (GIBBERELIC ACID) VÀ BƯỚC ĐẦU ĐÁNH GIÁ THỬ NGHIỆM TRÊN CÂY LAN GIẢ HẠC (*DENDROBIUM* SPP.).

Thuộc nhóm ngành: Khoa học Tự nhiên

Sinh viên thực hiện: Trương Thị Yến Nhi Nam, Nữ: Nữ

Dân tộc: Kinh

Lớp, khoa: Lớp CSK43, Khoa: Sinh học Năm thứ: 03/Số năm đào tạo: 04

Ngành học: Công nghệ sinh học

Người hướng dẫn: ThS. Nguyễn Thị Bích Liên

LÂM ĐỒNG, THÁNG 5 NĂM 2022

CỘNG HOÀ XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM

Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

Lâm Đồng, ngày 24 tháng 05 năm 2022

BÁO CÁO KẾT QUẢ TỰ ĐÁNH GIÁ
ĐỀ TÀI KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ SINH VIÊN 2022

I. Thông tin chung về đề tài:

1. Tên đề tài: **Nghiên cứu tuyển chọn vi sinh vật nội sinh có khả năng tổng hợp chất điều hoà sinh trưởng IAA (indole-3-acetic acid), GAs (Gibberelic acid) và bước đầu đánh giá thử nghiệm trên cây lan giả hạc (*Dendrobium* spp.).**

2. Mục tiêu đề tài: Nghiên cứu tuyển chọn vi sinh vật nội sinh có khả năng tổng hợp chất điều hòa sinh trưởng như IAA (indole – 3 – acetic acid), GAs (Gibberelic acid) để hỗ trợ dinh dưỡng cho cây phong lan nhằm hạn chế sử dụng nguồn phân bón và chất kích thích sinh trưởng có nguồn gốc tổng hợp hóa học góp phần bảo vệ môi trường.

3. Chủ nhiệm đề tài: Trương Thị Yến Nhi

4. Giáo viên hướng dẫn: ThS. Nguyễn Thị Bích Liên

5. Tổng kinh phí thực hiện: 5.000.000 VNĐ (Bằng chữ: năm triệu đồng).

6. Thời gian thực hiện:

Bắt đầu: tháng 11 năm 2021

Kết thúc: tháng 05 năm 2022

7. Danh sách thành viên chính thực hiện đề tài nêu trên gồm:

STT	Họ và tên	Mã số SV	Lớp/ Khoa
1	Trương Thị Yến Nhi	1911319	CSK 43 – Khoa Sinh học
2	Nguyễn Đình Gia Hy	1812600	CSK 42 – Khoa Sinh học
3	Nguyễn Khả Như	2015576	SHK44CLC – Khoa Sinh học
4	Lê Thị Hải Yến	2012340	SHK44CLC – Khoa Sinh học

II. Nội dung tự đánh giá về kết quả thực hiện đề tài:

1. Về sản phẩm khoa học

1.1. Danh mục sản phẩm đã hoàn thành

STT	Tên sản phẩm	Số lượng			Khối lượng			Chất lượng		
		Xuất sắc	Đạt	Không đạt	Xuất sắc	Đạt	Không đạt	Xuất sắc	Đạt	Không đạt
1	Chủng giống vi sinh vật nội sinh		×			×			×	
2	Chế phẩm vi sinh vật nội sinh		×			×			×	
3	Báo cáo kết quả đánh giá sự ảnh hưởng của các chủng vi sinh vật đến sinh trưởng của cây phong lan con.		x			x			x	

Minh chứng:

- Chế phẩm vi sinh vật nội sinh (dạng bột, dạng viên nén).
- Cây phong lan Giả hạc được trồng trên giá thể.

1.2. Danh mục sản phẩm khoa học dự kiến ứng dụng, chuyển giao (nếu có):

STT	Tên sản phẩm	Thời gian dự kiến ứng dụng	Cơ quan dự kiến ứng dụng	Ghi chú
1	Chế phẩm vi sinh hỗ trợ sinh trưởng và phát triển của cây phong lan	Tháng 7 năm 2022	Khoa Sinh học – Trường Đại học Đà Lạt	

1.3.Danh mục sản phẩm khoa học đã được ứng dụng (nếu có):

STT	Tên sản phẩm	Thời gian ứng dụng	Tên cơ quan ứng dụng	Ghi chú
1				

2. Về những đóng góp mới của đề tài:

Nghiên cứu tuyển chọn vi sinh vật nội sinh có khả năng tổng hợp chất điều hòa sinh trưởng như IAA (indole – 3 – acetic acid), GAs (Gibberelic acid) để hỗ trợ dinh dưỡng cho cây phong lan nhằm hạn chế sử dụng nguồn phân bón và chất kích thích sinh trưởng có nguồn gốc tổng hợp hóa học góp phần bảo vệ môi trường.

3. Về hiệu quả của đề tài:

3.1. Hiệu quả kinh tế

Bộ chủng giống vi sinh vật nội sinh rễ cây phong lan khi được ứng dụng thực tiễn sẽ giúp tăng tỷ lệ sống của cây phong lan con khi ra giá thể từ cây mô, thúc đẩy cây con phát triển nhanh chóng mà không cần sử dụng tới những phân tan chậm, phân hóa học. Từ đó, giảm sử dụng phân bón và thuốc bảo vệ thực vật cũng như giảm chi phí đầu tư, nâng cao hiệu quả kinh tế cho người nông dân. Sản phẩm của đề tài là chế phẩm vi sinh vật nội sinh rễ cây phong lan được sản xuất dưới dạng viên nén tan hoàn toàn trong nước, có giá thành sản xuất thấp, dễ tiếp cận và ứng dụng cho tất cả các hệ thống tưới hiện nay, từ đó tiết kiệm chi phí và nhân công chăm sóc, nuôi trồng cây phong lan.

3.2. Hiệu quả xã hội

Sản phẩm của đề tài là giống vi sinh vật nội sinh phong lan có khả năng sinh tổng hợp IAA và GAs giúp tăng tỷ lệ sống, thúc đẩy cây phát triển tốt và giảm sử dụng các loại phân bón, thuốc bảo vệ thực vật, từ đó giảm thiểu ô nhiễm môi trường và cải thiện môi trường sinh thái hiện nay. Bên cạnh đó, chế phẩm vi sinh được sản xuất dưới dạng viên nén tan hoàn toàn trong nước, có khả năng ứng dụng cao cũng như an toàn với người sử dụng.

III. Tự đánh giá, xếp loại kết quả thực hiện đề tài

1. Về tiến độ thực hiện: *(đánh dấu √ vào ô tương ứng*):

- Nộp hồ sơ đúng hạn √

- Nộp chậm từ trên 30 ngày đến 06 tháng

- Nộp hồ sơ chậm trên 06 tháng

2. Về kết quả thực hiện đề tài:

- Xuất sắc

- Đạt √

- Không đạt

Giải thích lý do:

- Đề tài đã thực hiện đúng 02 nội dung đã đăng ký trong thuyết mình đề tài và đáp ứng được mục tiêu của đề tài.

Cam đoan nội dung của Báo cáo là trung thực; Chủ nhiệm và các thành viên tham gia thực hiện đề tài không sử dụng kết quả nghiên cứu của người khác trái với quy định của pháp luật.

CHỦ NHIỆM ĐỀ TÀI	**CHỦ TỊCH HĐ NGHIỆM THU**
Trương Thị Yến Nhi	

LỜI CAM ĐOAN

Chúng tôi xin cam đoan nghiên cứu này là do chúng tôi thực hiện tại Phòng thí nghiệm Công nghệ Vi sinh, trường Đại học Đà Lạt. Những hình ảnh, kết quả, số liệu chưa được công bố trên bất kỳ tài liệu nào.

Chúng tôi xin chịu trách nhiệm với lời cam đoan này.

Đà Lạt, ngày 24 tháng 05 năm 2022

Nhóm nghiên cứu



Trương Thị Yến Nhi

LỜI CẢM ƠN

Chúng tôi xin gửi lời cảm ơn sâu sắc đến thầy Nguyễn Khoa Trưởng cô Nguyễn Thị Bích Liên, anh Phan Trung Trực, chị Lê Thị Hồng và chị Mai Thị Mỹ Mỹ Lanh, những người đã đồng hành, hỗ trợ và giúp đỡ chúng tôi trong quá học tập, nghiên cứu, đặc biệt trong thời gian chúng tôi thực hiện đề tài nghiên cứu khoa học "*Nghiên cứu tuyển chọn vi sinh vật nội sinh có khả năng tổng hợp chất điều hoà sinh trưởng IAA (indole-3-acetic acid), GAs (Gibberelic acid) và bước đầu đánh giá thử nghiệm trên cây lan giả hạc (Dendrobium spp.)''*.

Chúng tôi cũng xin cảm ơn tất cả các thầy cô là giảng viên Trường Đại học Đà Lạt, là những người đã tận tình giúp đỡ, tạo điều kiện để sinh viên có thể thực hiện các đề tài nghiên cứu của mình.

Cảm ơn gia đình, các anh chị, bạn bè đã ủng hộ, động viên và giúp đỡ chúng tôi trong quá trình nghiên cứu đề tài.

Trong quá trình nghiên cứu chúng tôi không thể tránh khỏi những thiếu sót. Vì vậy chúng tôi rất mong nhận được sự góp ý của quý thầy cô và những định hướng phát triển đề tài. Xin chân thành cảm ơn.

Nhóm nghiên cứu

MỤC LỤC

DANH MỤC HÌNH ẢNH I
DANH MỤC CÁC BẢNG II
DANH MỤC BIỂU ĐỒ III
DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT IV
MỞ ĐẦU 1
CHƯƠNG I. TỔNG QUAN TÀI LIỆU 3
1.1. TỔNG QUAN VỀ CÂY PHONG LAN 3
1.1.1. Vị trí trong hệ thống phân loại thực vật và phân bố 3
1.1.2. Tình hình canh tác và giá trị kinh tế của cây phong lan 3
1.1.2.1. Tình hình canh tác và giá trị kinh tế trên thế giới 3
1.1.2.2. Tình hình canh tác và giá trị kinh tế tại Việt Nam 4
1.1.2.3. Tình hình canh tác và giá trị kinh tế tại Lâm Đồng 5
1.2. TỔNG QUAN VỀ VI SINH VẬT NỘI SINH THỰC VẬT 6
1.2.1. Vi sinh vật nội sinh thực vật 6
1.2.2. Vi sinh vật nội sinh sản xuất chất điều hoà sinh trưởng IAA 7
1.2.3. Vi sinh vật nội sinh sản xuất chất điều hoà sinh trưởng GAs 7
1.2.4. Vi sinh vật nội sinh trên cây phong lan 8
1.3. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU Ở THẾ GIỚI VÀ VIỆT NAM 9
CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU 11
2.1. ĐỐI TƯỢNG, ĐỊA ĐIỂM VÀ THỜI GIAN NGHIÊN CỨU 11
2.1.1. Đối tượng nghiên cứu 11
2.1.2. Địa điểm và thời gian nghiên cứu 11
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU 11
2.2.1. Phương pháp thu mẫu rễ của cây phong lan 11
2.2.2. Phương pháp phân lập mẫu rễ của cây phong lan 11
2.2.2. Phương pháp định tính khả năng sinh tổng hợp chất kích thích sinh trưởng IAA 12
2.2.3. Phương pháp định lượng khả năng sinh tổng hợp chất kích thích sinh trưởng IAA 12
2.2.4. Phương pháp định lượng khả năng sinh tổng hợp chất kích thích sinh trưởng GAs 13
2.2.5. Nghiên cứu, xây dựng các bước nhân nuôi sinh khối vi khuẩn nội sinh 13
2.5.6. Đánh giá sự ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh tuyển chọn đến sinh trưởng và phát triển của cây trồng 14
2.5.7. Phương pháp xử lý số liệu 14
CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN 15
3.1. KẾT QUẢ PHÂN LẬP VI SINH VẬT NỘI SINH TRONG MẪU RỄ PHONG LAN 15

3.2. KẾT QUẢ ĐỊNH TÍNH VÀ ĐỊNH LƯỢNG KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP IAA CỦA CÁC CHỦNG VI KHUẨN NỘI SINH....17
3.3. KẾT QUẢ ĐỊNH LƯỢNG GAs....19
3.4. XÂY DỰNG CÁC BƯỚC TẠO CHẾ PHẨM VI KHUẨN NỘI SINH RỄ CÂY PHONG LAN.21
3.4.1. Nghiên cứu các điều kiện lên men thu nhận sinh khối vi khuẩn nội sinh rễ cây phong lan có khả năng sinh tổng hợp IAA....21
3.4.2. Nghiên cứu các điều kiện lên men thu nhận sinh khối vi khuẩn nội sinh rễ cây phong lan có khả năng sinh tổng hợp GAs....22
3.4.3. Xây dựng các bước lên men thu sinh khối vi khuẩn nội sinh cây phong lan có khả năng sinh tổng hợp IAA và GAs....23
3.5. ĐÁNH GIÁ SỰ ẢNH HƯỞNG CỦA CÁC CHỦNG VI SINH VẬT NỘI SINH ĐẾN SINH TRƯỞNG, PHÁT TRIỂN CỦA CÂY PHONG LAN CON....25
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ....28
1. KẾT LUẬN....28
2. KIẾN NGHỊ....28
TÀI LIỆU THAM KHẢO....29
PHỤ LỤC....35

DANH MỤC HÌNH ẢNH

Hình 3.1. Hình thái ria khuẩn lạc và hình thái tế bào của chủng PL 01

Hình 3.2. Hình thái ria khuẩn lạc và hình thái tế bào của chủng PL 02

Hình 3.3. Hình thái ria khuẩn lạc và hình thái tế bào của chủng PL 04

Hình 3.4. Hình thái ria khuẩn lạc và hình thái tế bào của chủng PL 10

Hình 3.5. Kết quả định tính IAA

Hình 3.6. Chế phẩm vi sinh vật nội sinh (Dạng bột, dạng viên nén)

Hình 3.7. So sánh sự khác biệt của một số cây trồng trong các nghiệm thức

Hình 4. Hình thái ria khuẩn lạc và hình thái tế bào của chủng PL 03

Hình 5. Hình thái ria khuẩn lạc và hình thái tế bào của chủng PL 05

Hình 6. Hình thái ria khuẩn lạc và hình thái tế bào của chủng PL 06

Hình 7. Hình thái ria khuẩn lạc và hình thái tế bào của chủng PL 07

Hình 8. Hình thái ria khuẩn lạc và hình thái tế bào của chủng PL 08

Hình 9. Hình thái ria khuẩn lạc và hình thái tế bào của chủng PL 09

Hình 10. Giá thể trồng cây lan thử nghiệm (Dớn sợi)

Hình 11. Chậu trồng lan thử nghiệm

Hình 12. Quá trình theo dõi, đo chiều cao của cây phong lan con

Hình 13: Một số cây phong lan trước khi đưa vào nghiệm thức

Hình 14. Cây phong lan nghiệm thức 1 sau 1 tháng

Hình 15. Cây phong lan nghiệm thức 2 sau 1 tháng bổ sung vi sinh vật

Hình 16. Cây phong lan nghiệm thức 3 sau 1 tháng bổ sung vi sinh vật

Hình 17. Cây phong lan nghiệm thức 4 sau 1 tháng bổ sung vi sinh vật

Hình 18. Hình ảnh các nghiệm thức

Hình 19. Chế phẩm vi sinh vật nội sinh (Dạng bột, dạng viên nén)

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 3.1: Kết quả hình thái khuẩn lạc, hình thái tế bào của các chủng vi sinh vật. .15

Bảng 3.2: Ghi nhận màu sắc phản ứng màu Salkowski của các chủng vi khuẩn nội sinh rễ cây phong lan 17

Bảng 3.3: Hàm lượng GAs sinh tổng hợp được của các chủng vi khuẩn nội sinh rễ cây phong lan 19

Bảng 3.4: Kết quả khảo sát ảnh hưởng của môi trường và nhiệt độ lên men đến mật độ sinh khối chủng PL04 21

Bảng 3.5: Kết quả khảo sát ảnh hưởng của pH môi trường lên men đến mật độ sinh khối chủng PL04 22

Bảng 3.6: kết quả khảo sát ảnh hưởng của môi trường và nhiệt độ lên men đến mật độ sinh khối chủng PL09 23

Bảng 3.7: Kết quả khảo sát ảnh hưởng của pH môi trường lên men đến mật độ sinh khối chủng PL09 23

Bảng 3.8: Kết quả đánh giá sự sinh trưởng và phát triển của cây phong lan con sau khi bổ sung vi khuẩn nội sinh 25

DANH MỤC BIỂU ĐỒ

Biểu đồ 3.1: Tương quan giữa hàm lượng IAA (ug/mL) và OD (530 nm)..... 19

Biểu đồ 3.2: Hàm lượng IAA tổng hợp sau 5 ngày (ug/mL) 19

Biểu đồ 3.3: Phương trình tương quan giữa nồng độ GAs và OD 20

Biểu đồ 3.4: Hàm lượng GAs (mg/mL) sinh tổng hợp được của các chủng vi sinh vật nội sinh 20

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

CFU:	Colony forming unit
GAs:	Gibberelic acid
IAA:	Indole-3-acetic acid
MRS:	De Man, Rogosa and Sharpe
NA:	Nutrient Agar
NT1:	Nghiệm thức 1
NT2:	Nghiệm thức 2
NT3:	Nghiệm thức 3
NT4:	Nghiệm thức 4
OD:	Độ đục của dịch lên men
TCVN:	Tiêu chuẩn Việt Nam

Mẫu 1. Thông tin kết quả nghiên cứu của đề tài

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

TRƯỜNG ĐẠI HỌC ĐÀ LẠT

THÔNG TIN KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU CỦA ĐỀ TÀI

1. Thông tin chung:

- Tên đề tài: Nghiên cứu tuyển chọn vi sinh vật nội sinh có khả năng tổng hợp chất điều hoà sinh trưởng IAA (indole – 3 – acetic acid), GAs (gibberelic acid) và bước đầu đánh giá thử nghiệm trên cây lan Giả Hạc (*Dendrobium* spp.).

- Sinh viên thực hiện: Trương Thị Yến Nhi

- Lớp: CSK43 Khoa: Sinh học Năm thứ: 3 Số năm đào tạo: 4 năm

- Người hướng dẫn: ThS. Nguyễn Thị Bích Liên

2. Mục tiêu đề tài:

Mục tiêu chung: Nghiên cứu tuyển chọn vi sinh vật nội sinh có khả năng tổng hợp chất điều hòa sinh trưởng như IAA (indole – 3 – acetic acid), GAs (Gibberelic acid) để hỗ trợ dinh dưỡng cho cây phong lan nhằm hạn chế sử dụng nguồn phân bón và chất kích thích sinh trưởng có nguồn gốc tổng hợp hóa học góp phần bảo vệ môi trường.

3. Về những đóng góp mới của đề tài:

Nghiên cứu tuyển chọn vi sinh vật nội sinh có khả năng tổng hợp chất điều hòa sinh trưởng như IAA (indole – 3 – acetic acid), GAs (Gibberelic acid) để hỗ trợ dinh dưỡng cho cây phong lan nhằm hạn chế sử dụng nguồn phân bón và chất kích thích sinh trưởng có nguồn gốc tổng hợp hóa học góp phần bảo vệ môi trường.

4. Kết quả nghiên cứu:

1. Từ 20 mẫu rễ phong lan được thu thập tại khoa Sinh học đã phân lập được 10 chủng vi khuẩn nội sinh được ký hiệu từ PL01 đến PL10.

2. Chủng vi khuẩn PL04 có khả năng sinh tổng hợp IAA cao với hàm lượng đạt 107,14 µg/mL sau 5 ngày nuôi cấy. Chủng vi khuẩn PL09 có khả năng sinh tổng hợp GAs cao nhất trong các chủng vi khuẩn nội sinh đã phân lập là 0.3428 mg/mL.

3. Điều kiện thích hợp để nhân sinh khối chủng vi khuẩn PL04 có khả năng sinh tổng hợp IAA là môi trường I3, pH 7,5 và nhiệt độ 37°C trong vòng 36 giờ. Điều kiện thích hợp để nhân sinh khối chủng vi khuẩn PL09 có khả năng sinh tổng hợp GAs là môi trường G3, pH 7,5 và nhiệt độ 37°C trong vòng 36 giờ.

4. Sử dụng đồng thời hai chủng vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp chất điều hoà sinh trưởng IAA và GAs thì có tác dụng tăng tỷ lệ sống, thúc đẩy phát triển chiều cao và cải thiện tình trạng lá của cây phong lan con.

5. Đóng góp về mặt kinh tế -xã hội và khả năng áp dụng của đề tài:

5.1. Hiệu quả kinh tế

Bộ chủng giống vi sinh vật nội sinh rễ cây phong lan khi được ứng dụng thực tiễn sẽ giúp tăng tỷ lệ sống của cây phong lan con khi ra giá thể từ cây mô, thúc đẩy cây con phát triển nhanh chóng mà không cần sử dụng tới những phân tan chậm, phân hóa học. Từ đó, giảm sử dụng phân bón và thuốc bảo vệ thực vật cũng như giảm chi phí đầu tư, nâng cao hiệu quả kinh tế cho người nông dân. Sản phẩm của đề tài là chế phẩm vi sinh vật nội sinh rễ cây phong lan được sản xuất dưới dạng viên nén tan hoàn toàn trong nước, có giá thành sản xuất thấp, dễ tiếp cận và ứng dụng cho tất cả các hệ thống tưới hiện nay, từ đó tiết kiệm chi phí và nhân công chăm sóc, nuôi trồng cây phong lan.

5.2. Hiệu quả xã hội

Sản phẩm của đề tài là giống vi sinh vật nội sinh phong lan có khả năng sinh tổng hợp IAA và GAs giúp tăng tỷ lệ sống, thúc đẩy cây phát triển tốt và giảm sử dụng các loại phân bón, thuốc bảo vệ thực vật, từ đó giảm thiểu ô nhiễm môi trường và cải thiện môi trường sinh thái hiện nay. Bên cạnh đó, chế phẩm vi sinh được sản xuất dưới dạng viên nén tan hoàn toàn trong nước, có khả năng ứng dụng cao cũng như an toàn với người sử dụng.

6. Công bố khoa học của sinh viên từ kết quả nghiên cứu của đề tài *(ghi rõ tên tạp chí nếu có)* hoặc nhận xét, đánh giá của cơ sở đã áp dụng các kết quả nghiên cứu *(nếu có)*:

Ngày 24 tháng 5 năm 2022

Sinh viên chịu trách nhiệm chính thực hiện đề tài

(ký, họ và tên)



Trương Thị Yến Nhi

Nhận xét của người hướng dẫn về những đóng góp khoa học của sinh viên thực hiện đề tài *(phần này do người hướng dẫn ghi):*

Đề tài nghiên cứu đã phân lập và tuyển chọn được 2 chủng giống có khả năng tổng hợp chất điều hòa sinh trưởng IAA và GAs. Tạo ra được 2 sản phẩm dạng bột và dạng viên nén tan 100% trong nước. đáp ứng được nhu cầu thực tiễn trong quá trình trồng cây phong lan.

Đây là những nghiên cứu ban đầu dể làm tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo, tạo ra các sản phẩm hỗ trợ cho việc phát triển nông nghiệp bền vững.

Ngày 24 tháng 5 năm 2022

Xác nhận của trường đại học

(ký tên và đóng dấu)

Người hướng dẫn

(ký, họ và tên)



Nguyễn Thị Bích Liên

Mẫu 2. Thông tin về sinh viên chịu trách nhiệm chính thực hiện đề tài

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC ĐÀ LẠT

THÔNG TIN VỀ SINH VIÊN
CHỊU TRÁCH NHIỆM CHÍNH THỰC HIỆN ĐỀ TÀI



I. SƠ LƯỢC VỀ SINH VIÊN:

Họ và tên: Trương Thị Yến Nhi

Sinh ngày: 13 tháng 9 năm 2001

Nơi sinh: Thành phố Tam Kỳ, tỉnh Quảng Nam

Lớp: Công nghệ sinh học Khóa CSK43

Khoa: Sinh học

Địa chỉ liên hệ: 66/10 Nguyễn Công Trứ, phường 8, Đà Lạt

Điện thoại: 0708166196 Email: 1911319@dlu.edu.vn

II. QUÁ TRÌNH HỌC TẬP

*** Năm thứ 1:**

Ngành học: Công nghệ sinh học Khoa: Sinh học

Kết quả xếp loại học tập: Loại khá

*** Năm thứ 2:**

Ngành học: Công nghệ sinh học Khoa: Sinh học

Kết quả xếp loại học tập: Loại khá

Ngày 24 tháng 5 năm 2022

Xác nhận của trường đại học
(ký tên và đóng dấu)

Sinh viên chịu trách nhiệm chính thực hiện đề tài
(ký, họ và tên)

Trương Thị Yến Nhi

MỞ ĐẦU

Trong thế giới các loài hoa, hoa lan là một trong những loài hoa đẹp nhất, được coi là tinh khiết, vương giả và cao sang. Bên cạnh đó, hoa lan còn có các đặc điểm mà nhiều loài hoa khác không có được như hương thơm, sự đa dạng và lâu tàn do đó hoa lan có giá trị rất cao về mặt thẩm mỹ và kinh tế. Cũng bởi vì lẽ đó mà giá của hoa lan trung bình dao động từ 10 – 15 đô la/cây nhưng cũng có những cây đạt đến giá khoảng 400 đô la/cây và cá biệt hơn là đến vài nghìn đô la/cây (Đào Thanh Vân, 2008). Vài năm trở lại đây, phong trào nuôi trồng hoa lan phát triển sôi động và đã giúp cho nhiều gia đình vươn lên làm giàu chính đáng. Tuy hoa lan có giá trị kinh tế cao đến thế nhưng việc chăm sóc và nuôi trồng cây phong lan hiện nay gặp nhiều khó khăn, tốn nhiều thời gian và công sức của người trồng. Để chăm sóc, người trồng phải sử dụng các loại thuốc bảo vệ thực vật, phân nở và phân tan chậm…, những loại sản phẩm có nguồn gốc từ các thành phần hoá học, dẫn đến việc gây ảnh hưởng rất nhiều đến chất lượng cây, hoa và môi trường sinh thái.

Hệ vi sinh vật nội sinh cây phong lan từ lâu đã được nghiên cứu và chứng minh có tác dụng cải thiện, hỗ trợ và kích thích sinh trưởng mạnh mẽ cho các loài hoa lan. Các chủng vi sinh vật nội sinh trên rễ cây phong lan đã được chứng minh là có tác dụng tổng hợp các chất điều hòa sinh trưởng giúp cây ra rễ và phát triển mạnh mẽ trong điều kiện tự nhiên khắc nghiệt (Alibrandi et al., 2020). Bên cạnh đó, các chủng vi sinh vật nội sinh còn có khả năng bảo vệ cây tránh một số tác nhân gây bệnh. Hơn thế nữa, việc ứng dụng các chủng vi sinh vật vào canh tác, sản xuất nông nghiệp là hướng đi bền vững, giảm thiểu chi phí và tác động của phân bón hóa học, các chất bảo vệ thực vật đến cây trồng, sản phẩm nông nghiệp và bảo vệ môi trường sinh thái. Có thể thấy các nghiên cứu về các nhóm vi sinh vật nội sinh nói chung, vi sinh vật nội sinh ở cây họ Lan nói riêng, là một trong những hướng đi đang được quan tâm, tuy nhiên vẫn chưa có nghiên cứu nào về các nhóm vi sinh vật nội sinh trên cây lan tại Việt Nam. Đồng thời, trong quá trình nuôi trồng và chăm sóc cây lan các nhà vườn tại Việt Nam đa số đều sử dụng phân hóa học, phân tan chậm, thuốc bảo vệ thực vật. Điều này ảnh hưởng lớn đến chất lượng hoa, cây và ảnh hưởng xấu cho hệ sinh thái nông nghiệp cũng như là môi trường sống xung quanh. Thêm vào đó, trên thị trường hiện đang lưu hành một số sản phẩm

chứa các chất có khả năng điều hòa sinh trưởng cây hoa lan như Atonik 1, ProGibb 10 SP, Dekamon 22.43L kích thích ra hoa ra hoa như Asco Gold, HVP, chế phẩm AT,… nhưng vẫn chưa có một loại chế phẩm nào được tạo ra từ các vi sinh vật nội sinh trong rễ cây hoa lan được ứng dụng lưu hành thị trường.

Vì vậy, nhằm đáp ứng nhu cầu phát triển của nông nghiệp bền vững trong tương lai, nghiên cứu ***"Nghiên cứu tuyển chọn vi sinh vật nội sinh có khả năng tổng hợp chất điều hoà sinh trưởng IAA (indole – 3 – acetic acid), GAs (Gibberelic acid) và bước đầu đánh giá thử nghiệm trên cây lan Giả Hạc (Dendrobium spp.)"*** là một nghiên cứu mang tính mới mẻ, tiên phong, sáng tạo và bước đầu đặt nền móng cho các nghiên cứu tiếp theo về vi sinh vật nội sinh trên cây hoa lan.

Nội dung nghiên cứu

1. Phân lập, tuyển chọn một số chủng vi sinh vật nội sinh, có khả năng sinh tổng hợp IAA và GAs trong rễ cây phong lan.
2. Nghiên cứu các điều kiện lên men để xây dựng các bước sản xuất thu sinh khối vi sinh vật nội sinh.
3. Đánh giá sự ảnh hưởng của các chủng vi sinh vật nội sinh đến sinh trưởng, phát triển của cây phong lan.

CHƯƠNG I. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Tổng quan về cây phong lan

1.1.1. Vị trí trong hệ thống phân loại thực vật và phân bố

Họ Lan (Orchidaceae), thuộc lớp thực vật một lá mầm, là họ lớn nhất và đa dạng nhất trong giới thực vật có hoa, chiếm 10% số thực vật bậc cao (Moudi et al., 2013). Họ Lan có 1000 chi và hơn 25000 loài với màu sắc, kích thước, hương thơm và môi trường sống đa dạng. Từ phong lan có nguồn gốc từ tiếng Hy Lạp (Orchis) có nghĩa là tinh hoàn vì hình dạng của củ rễ ở một số loài thuộc chi Orchis. Những cây thuộc họ Lan hoặc biểu sinh (tức là mọc trên các cây khác) hoặc địa sinh (tức mọc trên đất). Hầu hết các loài tự sản xuất thức ăn, nhưng một số sống hoại sinh hoặc lấy chất dinh dưỡng từ nấm cộng sinh (Dodson, 2021). Họ Lan được tìm thấy ở khắp nơi trên thế giới, trong mọi môi trường sống ngoại trừ những vùng lạnh nhất và khô hạn nhất. Nói chung họ này rất đa dạng trong điều kiện ẩm ướt như các vùng nhiệt đới và có nhiều môi trường sống vì chúng có thể phát triển ở độ cao 4200m trên mực nước biển (Moudi et al., 2013). Tuy nhiên phân bố chính của họ này là ở các vĩ độ nhiệt đới, đặc biệt là Châu Mỹ và Đông Nam Á (Trần Hợp, 1998).

Chi Lan hoàng thảo (*Dendrobium*), có từ 800-1400 loài trên thế giới. Hầu hết các loài thuộc chi này thích các vùng có lượng mưa hàng năm cao và không có mùa khô để phát triển (Moudi, 2013); chúng phân bố chủ yếu ở các vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới của Châu Á và Châu Đại Dương (Nie et al., 2018). Các loài thuộc chi *Dendrobium* chủ yếu là biểu sinh, mọc trong tự nhiên trên các cành và thân cây. Tên chi bắt nguồn từ tiếng Hy Lạp *dendron* có nghĩa là cây và *bios* có nghĩa là cuộc sống. Chúng là loài đa thân (sympodial), tạo ra các thân mới (giả hành) ở gốc của các thân cũ. Các loài thuộc chi Lan hoàng thảo là một trong những loài lan phổ biến nhất vì giá trị dược phẩm và thương mại của nó trong các ngành trồng hoa trong chậu và cắt cành (Moudi, 2013).

1.1.2. Tình hình canh tác và giá trị kinh tế của cây phong lan

1.1.2.1. Tình hình canh tác và giá trị kinh tế trên thế giới

Theo Giáo trình hoa lan của Đại học Tây Nguyên, giá lan biến động rất cao trên thị trường, trung bình là 10-15 đôla/cây, nhưng cũng có các loài quý đạt tới 400 đôla/cây, cá biệt có loài giá bán tới vài nghìn đô la (Đào Thanh Vân và Đặng Thị Tố Nga, 2008).

Trong suốt một thập kỷ qua, Thái Lan vẫn giữ vững vị trí quốc gia sản xuất và xuất khẩu hoa lan lớn nhất thế giới với số lượng lên đến 31,6 triệu cây con. Phát biểu tại hội thảo, ông Nguyễn Văn Đức Tiến, Phó giám đốc Trung tâm tư vấn Hỗ trợ nông nghiệp, Sở Nông nghiệp và Phát triển nông thôn Thành phố Hồ Chí Minh, cho biết tình hình xuất khẩu hoa lan trên thế giới tăng dần từ năm 2016 (193,4 triệu USD), đến hết năm 2018 giá trị xuất khẩu đạt ngưỡng cao nhất giai đoạn (khoảng 217,6 triệu USD). Giá trị xuất khẩu về hoa lan hiện nay trên thế giới chủ yếu tập trung ở một vài quốc gia như Hà Lan, Thái Lan, Đài Loan, Singapore, New Zealand (Nguyễn Hiền, 2016). Năm 2009, trị giá lan xuất khẩu Thái Lan là 79,8 triệu USD. Hoa lan Thái Lan xuất khẩu phần lớn thuộc chi *Dendrobium*, hơn 80% lượng hoa thuộc nhóm này trên thị trường thế giới có xuất xứ từ Thái Lan. *Dendrobium* chiếm đến 94,73 % tổng số hoa lan cắt cành và 51,4 % tổng số cây lan xuất khẩu của Thái Lan. Mặc dù là cường quốc xuất khẩu hoa lan, nhưng năm 2009 Thái Lan vẫn phải nhập từ 0,9 – 1 triệu USD tổng giá trị hoa lan cắt cành và lan cây để phục vụ nhu cầu tiêu dùng trong nước. Hiện nay Thái Lan có khoảng hơn 1000 loại lan bao gồm các giống lan thuần và lan lai. Ở Đài Loan, diện tích trồng hoa cây cảnh là 12.481 ha, trong đó diện tích trồng hoa lan là 484 ha. Ở Mỹ, nhu cầu sử dụng hoa lan *Cattleya* và *Dendrobium* rất lớn. Năm 2007, tổng giá trị nhập khẩu hoa lan gần 144 triệu USD, tăng gần 12% so với năm 2006 và đứng thứ hai so với những cây hoa khác (Hoàng Xuân Lam, 2016).

1.1.2.2. Tình hình canh tác và giá trị kinh tế tại Việt Nam

Theo số liệu thống kê của Tổng cục Hải quan, kim ngạch nhập khẩu phong lan cắt cành qua đường chính ngạch của nước ta trong tháng 02/2007 là 26,515 nghìn USD, giảm 20,17% so với tháng 01/2007 nhưng vẫn tăng 51,76% so với tháng 12/2006. Năm 2010, diện tích sản xuất chỉ đạt 190 ha thì đến hết năm 2018 diện tích trồng lan đã đạt mốc 375 ha. Cùng với sự gia tăng về diện tích, quy mô cung ứng hoa lan của TPHCM cũng tăng nhanh, từ mức 84,5 triệu cành năm 2010 lên 134,5 triệu cành vào năm 2018, gấp 1,6 lần. Từ các nguồn cung ra thị trường thành phố, hoa lan được bán cho các cửa hàng hoa (19,5%), các chợ đầu mối (45%), bán đi các tỉnh (30,5%) và xuất khẩu (5%) (Nguyễn Hiền, 2019). Thị trường nhập khẩu lan cắt cành chính của Việt Nam trong thời gian qua là Thái Lan với gần 95% lượng lan cắt cành, chủ yếu là *Dendrobium* và *Oncidium*.Trong tháng 9/2008, kim ngạch xuất khẩu hoa phong lan Việt Nam lại tăng

rất mạnh, tăng 218% so với tháng 8/2008, đạt 61 nghìn USD. Nhật Bản là thị trường xuất khẩu hoa lan tiềm năng của Việt Nam (Trương Thị Vân Hà, 2015).

Tuy diện tích trồng hoa lan ở Việt Nam còn ở mức hết sức khiêm tốn, chỉ chiếm 10% diện tích các loại hoa đang được trồng nhưng số lượng các loài lan được trồng hiện nay tại Thành phố Hồ Chí Minh và các tỉnh lân cận có thể lên đến 100 loài khác nhau. Các loại hoa lan này có thể cho doanh thu từ 500 triệu – 1 tỷ đồng/ha/năm, chủ yếu là hoa cắt cành thuộc nhóm *Dendrobium* và *Mokara*, chiếm tỷ lệ ít hơn là lan *Cattleya* và *Oncidium*. Đối với thị trường trong nước, sản lượng hoa phong lan cũng chưa đáp ứng được nhu cầu của người tiêu dùng. Các cơ sở sản xuất hoa lan cũng chỉ đáp ứng được 30 – 40% nhu cầu lan cắt cành còn lại phải nhập từ các nước khác. Theo tính toán của Bộ Nông Nghiệp và phát triển Nông thôn, nếu trồng hoa lan cắt cành, mỗi ha đất trồng có thể thu nhập 500 triệu đến 1 tỷ đồng/năm, cao hơn hẳn trồng lúa và hoa màu (Trương Thị Vân Hà, 2015).

Hiện nay, mỗi năm Việt Nam vẫn phải chi hàng tỷ đồng để nhập phong lan từ các nước láng giềng cho nhu cầu nội địa. Thị trường nhập khẩu lan cắt cành chính của Việt Nam trong thời gian qua là Thái Lan với gần 90% lượng lan cắt cành (*Dendrobium*) và lan chậu (*Cattleya, Oncidium*). Như vậy, vấn đề sản xuất và kinh doanh hoa lan ở Việt Nam từ trước đến nay vẫn ở dạng tiềm năng (Hoàng Xuân Lam, 2022).

1.1.2.3. Tình hình canh tác và giá trị kinh tế tại Lâm Đồng

Những năm gần đây, việc trồng và kinh doanh hoa lan đang nở rộ trong tỉnh. Sản phẩm hoa lan Lâm Đồng đã và đang trở thành là một trong nhóm sản phẩm nông nghiệp chủ lực, có khả năng ứng dụng công nghệ cao, phát triển theo hướng nông nghiệp đô thị, mang lại hiệu quả kinh tế cao cho nông dân. Hoa lan ở Lâm Đồng hiện được trồng chủ yếu ở Đà Lạt, Đức Trọng, Di Linh, Bảo Lộc, Đơn Dương. Trong đó, nhiều nhất ở huyện Đức Trọng với trên 100 loại và màu sắc khác nhau (Thanh Sa, 2020). Ở Đà Lạt mỗi năm nhân giống lan hàng ngàn cây có nguồn gốc nhập về từ khu vực các nước châu Mỹ, châu Á, bán ra từ 50.000 đồng đến 100.000 đồng/cây. (Văn Việt, 2020).

Đặc trưng khí hậu Đà Lạt là lợi thế để phát triển, nhân giống đa dạng các loài lan rừng, trong đó có loài lan giả hạc. Đặc biệt, giống cây lan giả hạc sản xuất tại Đà Lạt với số lượng đại trà khi đưa về chăm sóc ở những vùng đồng bằng trong cả nước đều đạt chất lượng hoa tươi dài ngày, hoa nhiều cánh, thời gian sinh trưởng lâu dài nếu chăm sóc

đúng kỹ thuật. Giá bán từ 100.000 đồng đến 200.000 đồng/cây với 2 màu chủ đạo là màu tím và màu trắng (Văn Việt, 2020).

1.2. Tổng quan về vi sinh vật nội sinh thực vật

1.2.1. Vi sinh vật nội sinh thực vật

Vi sinh vật nội sinh sống trong mô của tế bào thực vật, không gây hại cho cây chủ mà thường tạo ra các chất có hoạt tính sinh học như: chất điều hòa sinh trưởng, các chất kháng sinh, nhóm axit pholic... các hợp chất này đã phát huy vai trò của nó đối với đời sống của cây chủ, kích thích sinh trưởng thực vật, sinh kháng sinh ức chế sự phát triển của mầm bệnh, tăng sức đề kháng cho cây (Nguyễn Thị Thuý Nga, 2015). Vi sinh vật nội sinh có thể được truyền từ cây bố mẹ sang thế hệ cây con (hệ sợi nấm ăn sâu vào phôi của hạt cây mẹ) hoặc lan truyền trong quần thể cây chủ thông qua bào tử vi sinh vật nội sinh (Suryanarayana, 2013; Tadych et al., 2014). Các vi sinh vật nội sinh có khả năng tăng cường sức đề kháng và khả năng sống sót của cây chủ đối với các loại sâu bệnh, với các stress liên quan đến nước, nhiệt, đất nghèo dinh dưỡng, muối và các động vật ăn cỏ (Pablo et al., 2015). Các vi sinh vật nội sinh có khả năng giúp cây chủ ngăn chặn các mầm bệnh hay các sinh vật ký sinh bằng cách cô lập chúng, cô lập mô bị xâm nhiễm và loại trừ thông qua cạnh tranh với các mầm bệnh hay các sinh vật sử dụng thực vật làm thức ăn (Kuldau el at., 2008). Một số nấm và vi khuẩn nội sinh đã được chứng minh là tăng cường sự sinh trưởng và cải thiện sức chống chịu ở thực vật (Pablo et al., 2008). Mật độ vi sinh vật nội sinh cực kỳ biến thiên trong các loại thực vật và mô khác nhau và đã được chứng minh là khác nhau, từ hàng trăm đạt đến 9×10^9 vi khuẩn/gram mô thực vật (Jacobs et al., 1985). Mặc dù có nhiều nghiên cứu, tuy nhiên cần nghiên cứu thêm để bổ sung nguồn vi khuẩn nội sinh và chọn lọc dòng vi khuẩn nội sinh tốt để ứng dụng trong nhiều lĩnh vực như phân bón sinh học, đối kháng…(Lương Thị Hồng Hiệp & Cao Ngọc Điệp, 2011).

Trong đất, vi khuẩn vùng rễ có khả năng thúc đẩy tăng trưởng thực vật. Không giống như cộng sinh bắt buộc, những vi khuẩn này có thể tương tác với nhiều cây ký chủ và cải thiện sự phát triển và sức khỏe của cây thông qua nhiều cơ chế có thể trực tiếp, chẳng hạn như cố định nitơ hoặc gián tiếp cạnh tranh với mầm bệnh . Vi khuẩn thúc đẩy sinh trưởng thực vật có khả năng điều chỉnh kiến trúc hệ thống rễ (tức là cấu hình không

gian của hệ thống rễ), yếu tố quyết định đáng kể đến năng suất cây trồng (Eline & Louisa, 2016).

1.2.2. Vi sinh vật nội sinh sản xuất chất điều hoà sinh trưởng IAA

Indole-3-Acetic Acid (IAA) là chất điều hòa sinh trưởng thực vật thuộc nhóm auxin đầu tiên được xác định giữ vai trò trung tâm trong sự tăng trưởng ở thực vật và được coi là loại auxin tự nhiên quan trọng nhất trong các chất điều hòa sinh trưởng. Ở thực vật, IAA được sản xuất ở lá non, thân và hạt thông qua các phản ứng decarboxyl hóa và transamin từ tiền chất tryptophan (Lebuhn & Hartmann, 1993). IAA thường được dùng như một chất điều hòa quá trình sinh học, giúp kích thích kéo dài tế bào bằng cách thay đổi các điều kiện nhất định như tính thấm lọc, tăng tính thấm nước, giảm áp lực thành tế bào và 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 (Zhao, 2010). Vi khuẩn phân lập từ vùng rễ các loại cây có khả năng sinh IAA như chất chuyển hóa thứ cấp giúp tham gia vào quá trình hấp thu dinh dưỡng cho cây (Datta et al., 2000), có vai trò quan trọng đối với sự sinh trưởng và năng suất của cây trồng.

Khả năng sản xuất IAA đã được tìm thấy ở các vi khuẩn quang dưỡng và dị dưỡng khác nhau, không chỉ các loài gây bệnh hoặc cộng sinh mà còn cả các vi sinh vật sống tự do không gắn liền với thực vật (Mishke et al., 1988; Kamneva et al., 1999). Việc sinh tổng hợp IAA đã được báo cáo hiện diện ở chi *Pseudomonas, Agrobacterium, Azospirillum, Azotobacter, Alcaligenes, Enterobacter, Acetobacter, Rhizobium, Bradyrhizobium, Bacillus, Arthro bacter, Herbaspirillum, Xanthomonas, Klebsiella, Methylobacterium, Methylovorus, Aminobacter* (Mishke et al., 1988; Kamneva et al., 1999; Ivanova et al., 2001; Agrios et al., 1997). *Achromobacter, Flavobacterium, Rhodococcus, Acinetobacter, Corynebacterium* và *Micrococcus* cũng tạo ra chất điều hòa tăng trưởng thực vật (Libbert et al., 1969; Belimov et al., 1999). Wilkinson và cộng sự đã phân lập từ rễ của cây lan Úc sống trên cạn có liên quan đến vi khuẩn nội sinh, một số trong số đó thuộc chi *Pseudomonas, Bacillus* và *Xanthomonas* sinh tổng hợp IAA (Tsavkelova et al., 2005; Tsavkelova et al., 2004).

1.2.3. Vi sinh vật nội sinh sản xuất chất điều hoà sinh trưởng GAs

Gibberellin là các phân tử nhỏ của một nhóm lớn các acid cacboxylic diterpenoid bốn vòng, được xác định theo cấu trúc hóa học của chúng, dựa trên khung carbon ent-

gibberellane, và số gibberellin được ấn định tùy thuộc vào thứ tự thời gian nhận dạng của chúng. Số lượng gibberellin rất lớn, nhưng không phải tất cả đều hoạt động sinh học; nhiều chất trung gian trong quá trình tổng hợp GAs có hoạt tính sinh học, trong khi những chất khác ở dạng bất hoạt (Malonek et al., 2005). Gibberellin được sản xuất bởi các vi khuẩn chủ yếu liên kết với thực vật, và chúng ảnh hưởng tới quá trình sinh trưởng và phát triển của thực vật như kéo dài thân, nảy mầm, ra hoa. Gibberellin lần đầu tiên được phân lập vào năm 1935 từ nấm *Gibberella fujikuroi* và được tổng hợp bởi một số vi sinh vật trong đất. Ảnh hưởng của gibberellin đối với sự tăng trưởng và phát triển của thực vật đã được nghiên cứu, cũng như các con đường sinh tổng hợp, enzyme, gen và sự điều hòa của chúng (Keswani et al., 2021). Minh chứng của việc gibberellin ảnh hưởng đến sinh trưởng của cây là sau khi phun GAs ở các nồng độ khác nhau cho cây ở cả giai đoạn 1 năm tuổi và 2 năm tuổi đều có tác dụng tăng số lá, số rễ, chiều dài lá, chiều dài rễ so với đối chứng (Đinh Thị Dinh và cộng sự, 2014)

1.2.4. Vi sinh vật nội sinh trên cây phong lan

Vi sinh vật nội sinh trong mối quan hệ cộng sinh với cây phong lan hoạt động như một công cụ sinh học, thúc đẩy sự tăng trưởng và phát triển (điều hòa sinh học), hấp thụ chất dinh dưỡng (phân bón sinh học) và sản xuất phytohormone (bảo vệ sinh học) (Pant et al., 2017). Vi khuẩn nội sinh trong hoa lan chủ yếu được khảo sát ở các loài có giá trị thương mại bằng cách phân lập sau khi khử trùng bề mặt rễ hoặc lá, nhiều dòng phân lập được phát hiện vừa làm tăng sự nảy mầm của hạt vừa thúc đẩy sự phát triển của cây (Alibrandi et al., 2020).

Quá trình sinh trưởng của cây phong lan con phụ thuộc vào các nấm cộng sinh như là nguồn cung cấp cacbon cho chúng và trong giai đoạn trưởng thành các nấm cộng sinh có thể hữu ích để cây phong lan đối phó với các điều kiện môi trường bất lợi như hạn hán, nhiễm mặn, stress oxy hóa,…(Chand et al., 2020). Nấm rễ cộng sinh có thể cung cấp hoặc tăng khả năng hấp thụ các chất dinh dưỡng vô cơ và hữu cơ của lan bao gồm carbon, phốt pho, nitơ, nước, vitamin (Zhu et al., 2008). *Fusarium, Rhizoctonia, Mycena, Tulasnella, Trichoderma* và *Alternaria* là những chi nấm nội sinh thường thấy ở phong lan (Pant et al., 2017; Yuan et al., 2008; Chand et al., 2020). Một số loài vi khuẩn *Bacillus, Burkholderia, Flavobacterium, Pantoea, Pseudomonas* và

Stenotrophomonas được phân lập từ rễ và vùng rễ cây phong lan có khả năng cố định nitơ và sản xuất indole-3-acetic acid (IAA) (Tsavkelova et al., 2007, 2011).

Sự tương tác giữa rễ cây phong lan và nấm nội cộng sinh được nghiên cứu nhiều cho đến hiện nay, tuy nhiên, thành phần và hoạt động chức năng của vi khuẩn liên quan đến phong lan ít được biết đến (Elena et al., 2006). Tsavkelova et al. (2004) đã phát hiện ra rất nhiều vi khuẩn dị dưỡng và quang dưỡng trên rễ của các loài lan nhiệt đới được trồng thuộc các chi *Calanthe, Acampe* và *Dendrobium*. Sau đó, tác giả đã cho ra rằng các chủng vi khuẩn nội sinh trên cây phong lan có khả năng cố định nitơ, sản xuất IAA theo các con đường dị dưỡng khác nhau (Tsavkelova et al., 2005).

Hầu hết các cây thuộc họ Lan đều phụ thuộc vào các loại nấm rễ để nảy mầm. Nấm rễ cung cấp các nguồn dinh dưỡng mà phôi thai cần để phát triển tới giai đoạn tiếp theo. Tuy nhiên, ở giai đoạn hạt nảy mầm và giai đoạn cây con, lan cần các chất dinh dưỡng khác để duy trì sự phát triển và hoàn thành vòng đời của nó. Các vi sinh vật có lợi khác trong đất, chẳng hạn như vi khuẩn sống tự do và cộng sinh, có thể kết hợp với rễ phong lan tạo ra một tương tác đặc biệt mà hầu như chưa được khám phá. Hầu hết các vi khuẩn có lợi liên quan đến rễ có thể giúp cây trồng hòa tan các chất dinh dưỡng thiết yếu như phospho và nitơ, cũng như tạo ra các chất chuyển hóa có lợi đa dạng có thể góp phần cải thiện sản xuất sinh khối, khả năng chống chịu căng thẳng và kiểm soát sinh học của các loài nấm phytopathogenic tiềm năng (Héctor et al., 2022).

1.3. Tình hình nghiên cứu ở Thế giới và Việt Nam

Trên thế giới, cũng đã có các nghiên cứu về vi sinh vật nội sinh trên cây họ Lan như: Phân lập, xác định đặc tính và các hoạt động thúc đẩy tăng trưởng thực vật của nấm nội sinh từ một loài lan rừng *Vanda cristata* (Chand et al., 2020); Phân lập và xác định đặc điểm của nấm nội sinh thúc đẩy tăng trưởng thực vật từ rễ cây *Dendrobium moniliforme* (Shah et al., 2018); Tiềm năng thúc đẩy tăng trưởng thực vật của các vi khuẩn nội sinh từ ba loài địa lan vùng Địa Trung Hải (Alibrandi et al., 2020); Ảnh hưởng của IAA đến sự nảy mầm cộng sinh của một cây lan Úc và sự sản sinh của nó bởi các vi khuẩn liên quan đến cây lan (Wilkinson et al., 1994); Tương tác giữa thực vật và vi khuẩn biểu sinh liên quan đến quá trình trao đổi chất Auxin của chúng. Phân lập và xác định IAA-Sản xuất và tiêu diệt vi khuẩn từ cây đậu (Libbert et al., 1969).

Tại Việt Nam, theo ghi nhận của nhóm nghiên cứu, hiện nay có nhiều đề tài nghiên cứu về vi sinh vật nội sinh như: Đề tài Vi sinh vật nội sinh và sử dụng trong quản lý bệnh rụng lá mùa mưa cây cao su ở Đông Nam Bộ của Đàm Văn Toàn và cộng sự vào năm 2018 ; Phân lập, tuyển chọn vi sinh vật nội sinh tổng hợp indole – 3 – acetic acid (IAA) trong hệ rễ cây cà phê (*Coffea*) tại Đắk Lắk (Nguyễn Khoa Trưởng và cộng sự., 2021); Ảnh hưởng của vi sinh vật nội sinh cây thông nhựa (*Pinus merkusii*) đến một số tập tính của sâu róm thông (*Dendrolimus punctatus*) (Đào Ngọc Quang và Đặng Như Quỳnh, 2014). Nghiên cứu sử dụng vi khuẩn nội sinh phân lập từ các vùng sinh thái khác nhau (Nguyễn Hải Vân và Nguyễn Thị Minh, 2017). Một số đề tài nghiên cứu về IAA như: Khảo sát khả năng kích thích nảy mầm và sinh trưởng rau muống của một số dòng vi khuẩn cố định đạm và tổng hợp IAA (Lê Thị Xã và công sự., 2020); Phân lập các dòng vi khuẩn nội sinh có khả năng tổng hợp IAA và cố định đạm trên cây chuối (Nguyễn Thị Huỳnh Như và cộng sự., 2013); Sự sản xuất IAA và siderophore của các chủng vi khuẩn liên hiệp thực vật và ảnh hưởng lên sự tăng trưởng của cây bắp (*Zea mays* L.) trồng trong chậu (Đặng Thị Ngọc Thanh và cộng sự., 2016). Bên cạnh đó, nhóm cũng ghi nhận được một số đề tài nghiên cứu về Gibberellin như: Sự phân bố các gen sinh tổng hợp gibberellin và sản xuất gibberellin trong *Gibberella fujikuroi* phức hợp loài (Malonek et al., 2005); Sinh tổng hợp và chuyển hóa gibberellin (Sponsel, 1995); Sản xuất gibberellin bởi vi khuẩn và sự tham gia của nó trong việc thúc đẩy sự phát triển của cây trồng và tăng năng suất (Botini et al., 2004); Ảnh hưởng của các vùng sinh thái và xử lý gibberellin (GA_3) tới sinh trưởng và ra hoa của giống lan đai châu trắng đốm tím (Đinh Thị Dinh và cộng sự., 2014).

Nhìn chung, các nghiên cứu về vi sinh vật nội sinh có khả năng sinh tổng hợp các chất điều hòa sinh trưởng đã được thực hiện khá nhiều tại Việt Nam. Tuy nhiên, cho đến hiện nay, nhóm nghiên cứu chưa ghi nhận được một nghiên cứu nào thực hiện về vi khuẩn nội sinh trên cây phong lan. Nhận thấy tầm quan trọng của vấn đề này từ những yêu cầu cấp thiết của nền nông nghiệp hiện nay, chúng tôi tiến hành nghiên cứu, tuyển chọn vi khuẩn nội sinh có khả năng sinh tổng hợp một số chất điều hòa sinh trưởng trên cây phong lan và bước đầu đánh giá hiệu quả của các chủng vi khuẩn đã tuyển chọn trên cây trồng.

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng, địa điểm và thời gian nghiên cứu

2.1.1. Đối tượng nghiên cứu

Các chủng vi khuẩn nội sinh có khả năng sinh tổng hợp IAA và GAs trong hệ rễ cây phong lan.

2.1.2. Địa điểm và thời gian nghiên cứu

- Địa điểm nghiên cứu: Phòng thí nghiệm Công nghệ Vi sinh, khoa Sinh học, trường Đại học Đà Lạt.

- Thời gian nghiên cứu: Từ tháng 11 năm 2021 đến tháng 5 năm 2022.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp thu mẫu rễ của cây phong lan

Mẫu rễ phong lan được thu tại 2 địa điểm khu sản xuất thử nghiệm A12 và vườn nhà kính Khoa Sinh học lúc sáng sớm và chiều mát. Sử dụng dao cắt mẫu để cắt phần rễ non của cây phong lan (mỗi cây thu một rễ). Sau đó mẫu được bảo quản bằng túi zip để đưa về phòng thí nghiệm để phân lập và nghiên cứu.

2.2.2. Phương pháp phân lập mẫu rễ của cây phong lan

Mẫu rễ cây phong lan sau khi thu thập được tiến hành xử lý như sau: Mẫu rễ phong lan được rửa trên vòi nước để loại bỏ các bụi bẩn còn bám trên bề mặt rễ, sau đó rửa lại bằng nước cất vô trùng rồi cắt rễ thành những đoạn nhỏ. Tiến hành khử trùng mẫu bằng cồn 96% trong 3 phút, hypochloride 1% trong 3 phút, hydrogen peroxide 3% (H_2O_2) trong 3 phút và rửa lại với nước cất vô trùng 4 lần để loại bỏ các loại hóa chất còn thừa (Lương Thị Hồng Hiệp và Cao Ngọc Điệp, 2011).

Sau khi khử trùng, mẫu được cắt thành các đoạn dài từ 0.5 – 1cm, một phần được nghiền nhỏ trong nước muối sinh lý vô trùng và một phần được đặt trực tiếp lên bề mặt thạch. Hút 100 µl dịch nghiền mẫu trải trên các đĩa môi trường thạch Nutrient Agar (NA) (Peptone:10 g, Yeast extract: 3 g, NaCl: 5 g, Agar: 20g, pH = 7) đã được khử trùng tại điều kiện 121°C, 15 phút (Nguyễn Thị Minh và Đỗ Minh Thu, 2017) và nuôi mẫu trong tủ ấm ở 30°C trong vòng 24 – 48 giờ. Đồng thời, hút 100 µl dung dịch rửa mẫu lần cuối

cùng trải trên môi trường NA kiểm tra sự xuất hiện vi sinh vật bề mặt (Nguyễn Khoa Trưởng và cộng sự, 2021).

2.2.2. Phương pháp định tính khả năng sinh tổng hợp chất kích thích sinh trưởng IAA

Các chủng vi sinh vật đã phân lập được nuôi tăng sinh trong 100 mL môi trường dịch thể Luria Bertani có bổ sung 0,1% L - Tryptophan trong máy lắc ổn nhiệt ở tốc độ 150 vòng/phút, trong thời gian từ 2 ngày đến 3 ngày, nhiệt độ từ 28°C đến 30°C. Ly tâm không ít hơn 3 mL dung dịch mẫu thử bằng máy ly tâm với tốc độ 6000 vòng/phút, trong thời gian 10 phút. Lấy 2 mL phần dung dịch trên bề mặt (phần nước trong) cho vào bình định mức dung tích 10 mL. Thêm thuốc thử Salkowski đến vạch định mức, trộn đều. ủ tối trog vòng 25 phút và tiến hành so sánh màu sắc của các chủng vi sinh vật, màu càng đỏ thì hàm lượng IAA tổng hợp được càng cao (TCVN 10784:2015).

2.2.3. Phương pháp định lượng khả năng sinh tổng hợp chất kích thích sinh trưởng IAA

Các chủng vi sinh vật đã phân lập được nuôi tăng sinh trong 100 mL môi trường dịch thể Luria Bertani có bổ sung 0,1% L - Tryptophan trong máy lắc ổn nhiệt ở tốc độ 150 vòng/phút, trong thời gian từ 2 ngày đến 3 ngày, nhiệt độ từ 28 °C đến 30 °C để đảm bảo mật độ tế bào vi sinh vật không nhỏ hơn 10^8 CFU/mL.

Dùng một pipet vô trùng lấy 1 mL dung dịch từ bình tăng sinh cho vào bình tam giác chứa 100 mL môi trường dịch thể Luria Bertani có bổ sung 0,1% L - Tryptophan. Nuôi lắc ở tốc độ 150 r/min, trong tối hoàn toàn, thời gian từ 3 ngày đến 5 ngày, nhiệt độ từ 28 °C đến 30 °C. Mỗi mẫu được cấy lặp lại không ít hơn 2 lần.

Ly tâm không ít hơn 3 mL dung dịch mẫu thử bằng máy ly tâm với tốc độ 6000 vòng/phút, trong thời gian 10 phút. Lấy 2 mL phần dung dịch trên bề mặt (phần nước trong) cho vào bình định mức dung tích 10 mL. Thêm thuốc thử Salkowski đến vạch định mức, trộn đều.

Ly tâm không ít hơn 3 mL môi trường dịch thể Luria Bertani có bổ sung 0,1% L - Tryptophan (mẫu trắng) bằng máy ly tâm với tốc độ 6000 vòng/phút, trong thời gian 10 phút. Lấy 2 mL phần dung dịch trên bề mặt (phần nước trong) cho vào bình định mức dung tích 10 mL. Thêm thuốc thử Salkowski đến vạch định mức, trộn đều.

Giữ yên dung dịch mẫu thử và mẫu trắng đã bổ sung thuốc thử Salkowski trong thời gian 25 phút. Xác định hàm lượng IAA trong mẫu trắng bằng máy quang phổ ở bước sóng 530 nm.

Giá trị OD của dung dịch mẫu thử được đối chiếu với đồ thị chuẩn để tính hàm lượng IAA (μg/mL) trong dịch nuôi cấy (Gordon & Weber, 1951; TCVN 10784:2015)

2.2.4. Phương pháp định lượng khả năng sinh tổng hợp chất kích thích sinh trưởng GAs

Các chủng vi sinh vật đã phân lập được nuôi tăng sinh trong 100 mL môi trường dịch Nutrient Agar cho vào trong máy lắc ổn nhiệt ở tốc độ 150 vòng/phút, trong thời gian từ 2 ngày đến 3 ngày, nhiệt độ từ 28 °C đến 30 °C để đảm bảo mật độ tế bào vi sinh vật không nhỏ hơn 10^8 CFU/mL. Dùng một pipet vô trùng lấy 1 mL dung dịch từ bình tăng sinh cho vào bình tam giác chứa 100 mL môi trường dịch thể Nutrient Agar. Nuôi tĩnh ở nhiệt độ phòng trong 7 ngày. Mỗi mẫu được cấy lặp lại không ít hơn 2 lần. Ly tâm không ít hơn 15mL môi trường dịch thể Nutrient Agar trong 10 phút với tốc độ 8000 vòng/phút. Lấy 10 mL phần dung dịch trên bề mặt (phần nước trong), thêm 2 mL dung dịch kẽm axetat và 2 mL kali ferrocyanide vào. Sau đó mang đi ly tâm trong 10 phút ở tốc độ 8000 vòng/phút. Lấy 5 mL phần nổi phía trên thêm vào 5 mL acid clohydric 30% và ủ ở 27°C trong 75 phút. Phép đo độ hấp thụ sử dụng máy quang phổ ở bước sóng 254 nm. So sánh hàm lượng GAs tạo thành của các chủng vi sinh vật với đường chuẩn đã dựng (Gusmiaty et al., 2019).

2.2.5. Nghiên cứu, xây dựng các bước nhân nuôi sinh khối vi khuẩn nội sinh

Sử dụng hệ thống Bioreactor và Fermenter lên men các chủng vi sinh vật đã tuyển chọn tạo sinh khối (Lê Gia Hy và Khuất Hữu Thanh, 2010). Chuẩn bị môi trường thích hợp cho từng chủng vi sinh vật, bơm vào Bioreactor và Fermenter với một thể tích tương ứng với dung tích của thiết bị. Tiến hành khử trùng môi trường ở điều kiện 121°C, 15 phút. Bổ sung giống vi sinh vật đã chuẩn bị sẵn. Theo dõi quá trình lên men qua các thông số và độ đục của dịch lên men (OD). Sau khi lên men tiến hành ly tâm thu sinh khối bằng máy ly tâm liên tục tốc độ cao HIMAC High - Speed Refrigerated Centrifuges CR22N/CR21N ở tốc độ 10.000 rpm. Sinh khối sau ly tâm được phối trộn với cơ chất với tỷ lệ 1:1 và sấy khô ở nhiệt độ nhỏ hơn 45°C.

Các bước lên men được tiến hành như sau

Bước 1: Kiểm tra giống đã lưu

Bước 2: Chuẩn bị môi trường nhân giống các cấp

Bước 3: Chuẩn bị môi trường lên men

Bước 4. Lên men

Bước 5. Theo dõi, kiểm tra quá trình lên men

Bước 6. Ly tâm dịch lên men - thu sinh khối

Bước 7. Kiểm tra mật độ và bảo quản

2.5.6. Đánh giá sự ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh tuyển chọn đến sinh trưởng và phát triển của cây trồng

Sử dụng các cây phong lan giả hạc con có sức sống đồng đều nhau để bố trí thí nghiệm đánh giá sự ảnh hưởng các chủng vi khuẩn nội sinh tuyển chọn đến sinh trưởng và phát triển của cây trồng. Các nghiệm thức được bố trí như sau:

Nghiệm thức 1 (nghiệm thức đối chứng): không bổ sung các chủng vi sinh vật nội sinh.

Nghiệm thức 2: bổ sung chủng vi khuẩn nội sinh có khả năng sinh tổng hợp IAA

Nghiệm thức 3: bổ sung chủng vi khuẩn nội sinh có khả năng sinh tổng hợp GAs

Nghiệm thức 4: bổ sung cả hai chủng vi khuẩn nội sinh có khả năng sinh tổng hợp IAA và GAs.

Các nghiệm thức được chăm sóc như nhau và theo dõi tỷ lệ sống, chiều cao của cây trồng.

2.5.7. Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu của đề tài được tổng hợp và xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel với công cụ phân tích Data analysis.

Xử lý ý nghĩa thống kê theo phép thử Tuskey bằng phần mềm ***R***.

CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả phân lập vi sinh vật nội sinh trong mẫu rễ phong lan

Từ 20 mẫu rễ phong lan chúng tôi đã phân lập được 10 chủng vi khuẩn nội sinh, đặc điểm khuẩn lạc và hình thái tế bào của các chủng vi khuẩn nội sinh được trình bày tại bảng 3.1.

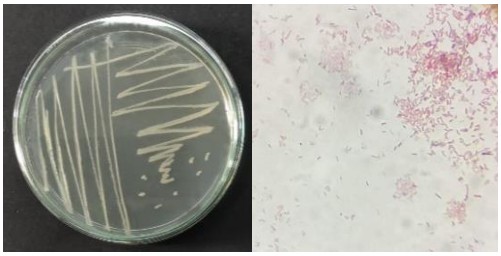
Bảng 3.1. Kết quả hình thái khuẩn lạc, hình thái tế bào của các chủng vi sinh vật

STT	Tên chủng vi khuẩn	Đặc điểm khuẩn lạc	Hình thái tế bào
1	PL 01	Khuẩn lạc tròn, màu trắng ngà; viền đều; bề mặt nhẵn, bóng, phẳng; mọc trên mặt thạch	Trực khuẩn gram (+)
2	PL 02	Khuẩn lạc vô định hình, màu trắng ngà, gâng viền hơi nhăn, bề mặt khô nhám.	Trực khuẩn gram (+)
3	PL 03	Khuẩn lạc tròn, trắng sữa; viền đều; bề mặt phẳng, khô, nhám.	Trực khuẩn gram (+)
4	PL 04	Khuẩn lạc vô định hình, màu vàng, tâm vàng đục; viền vàng trong, dạng tia mỏng; bề mặt phẳng; mọc trên mặt thạch.	Trực khuẩn gram (+)
5	PL 05	Khuẩn lạc tròn màu trắng trong, viền đều, bề phẳng trơn, bóng kích thước nhỏ.	Trực khuẩn gram (-)
6	PL 06	Khuẩn lạc tròn màu vàng cam, có tâm nhô lên cao một xíu màu cam, viền màu vàng chanh đều, bề mặt trơn, bóng.	Trực khuẩn gram (-)

7	PL 07	Khuẩn lạc tròn màu trắng sữa, viền răng cưa thấp hơn một xíu, bề mặt khô.	Trực khuẩn gram (+)
8	PL 08	Khuẩn lạc vô định hình màu trắng sữa, viền răng cưa tâm đậm hơn nhô cao hơn một xíu, bề mặt khô nhám.	Trực khuẩn gram (+)
9	PL 09	Khuẩn lạc tròn màu trắng sữa, viền tròn đậm hơn, bề mặt khô nhám.	Trực khuẩn gram (+)
10	PL 10	Khuẩn lạc màu trắng sữa, viền răng cưa, bề mặt nhăn khô, nhám.	Trực khuẩn gram (+)



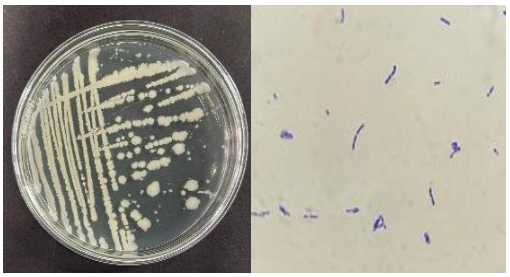
Hình 3.1. Hình thái ria khuẩn lạc và hình thái tế bào của chủng PL 01



Hình 3.2. Hình thái ria khuẩn lạc và hình thái tế bào của chủng PL 02



Hình 3.3. Hình thái ria khuẩn lạc và hình thái tế bào của chủng PL 04



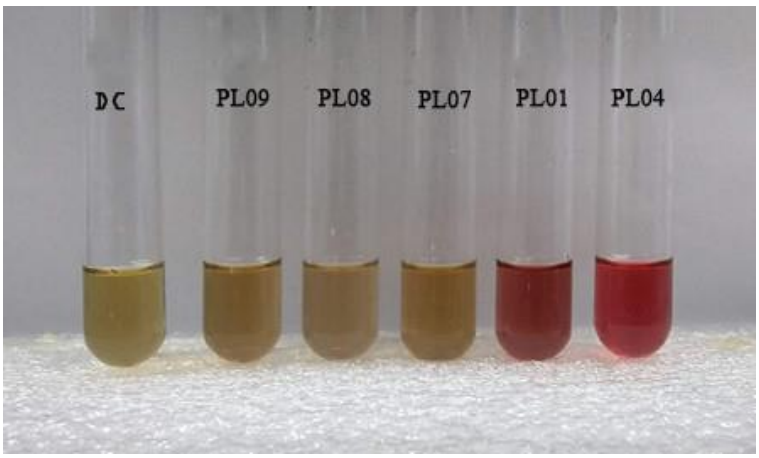
Hình 3.4. Hình thái ria khuẩn lạc và hình thái tế bào của chủng PL 10

3.2. Kết quả định tính và định lượng khả năng sinh tổng hợp IAA của các chủng vi khuẩn nội sinh

Chúng tôi tiến hành định tính khả năng sinh tổng hợp IAA của 10 chủng vi khuẩn nội sinh rễ cây phong lan đã phân lập theo phương pháp được mô tả tại mục 2.2.2. Kết quả định tính được thể hiện tại bảng 3.2 và hình 3.1.

Bảng 3.2. Ghi nhận màu sắc phản ứng màu Salkowski của các chủng vi khuẩn nội sinh rễ cây phong lan

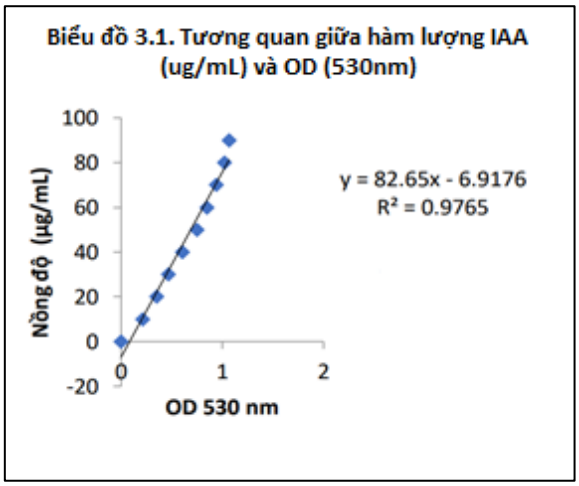
STT	Tên chủng vi sinh vật	Màu sắc phản ứng với thuốc thử Salkowski
1	PL01	Màu đỏ nâu nhạt
2	PL02	Vàng nâu nhạt
3	PL03	Vàng nâu nhạt
4	PL04	Màu đỏ thẫm
5	PL05	Vàng nâu nhạt
6	PL06	Vàng nâu nhạt
7	PL07	Vàng nâu nhạt
8	PL08	Vàng nâu nhạt
9	PL09	Vàng nâu nhạt
10	PL10	Vàng nâu nhạt

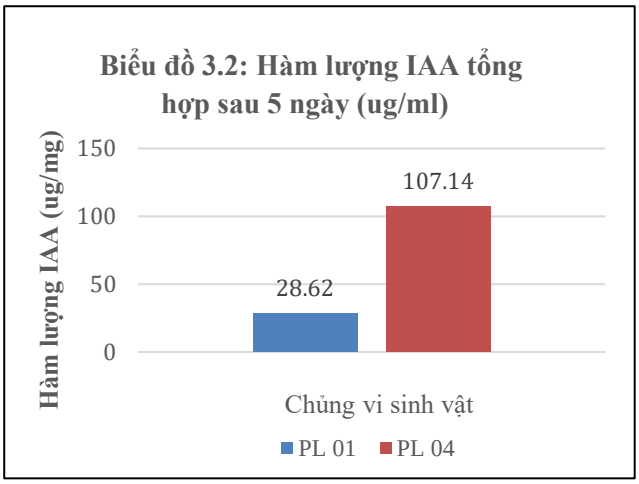


Hình 3.5. Kết quả định tính IAA

Từ bảng 3.2. và hình 3.1 thấy rằng chủng vi khuẩn PL04 cho phản ứng màu đỏ với thuốc thử Salkowski là đậm nhất trong các chủng thử nghiệm, kế tiếp đó là chủng vi khuẩn PL01 với màu đỏ nâu nhạt; các chủng vi khuẩn còn lại không cho phản ứng màu với thuốc thử Salkowski. Do đó, hai chủng vi khuẩn là PL01 và PL04 được chọn để tiến hành định lượng làm hượng IAA tổng hợp được.

Đường chuẩn IAA sau khi thực nghiệm có dạng: y = 82,65x - 6,9176 và R^2=0.9765 cho thấy đây là phương trình đường chuẩn có độ tin cậy cao. Hàm lượng IAA tổng hợp được của các chủng vi khuẩn được thể hiện tại biểu đồ 3.2.





Từ biểu đồ 3.2 có thể thấy rằng, tại thời điểm 5 ngày thì chủng vi khuẩn PL04 sinh tổng hợp được 107,14 µg IAA/mL cao hơn so với chủng PL01 chỉ đạt 28,62 µg IAA/mL IAA. Theo nghiên cứu của Nguyễn Thị Thanh Mai và cộng sự (2018) đã phân lập được dòng vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp được 68,79 µg IAA/mL tại ngày thứ 4 trong quá trình nuôi cấy. Tương tự như vậy, Nguyễn Hoàng Nhựt Lynh và Nguyễn Hoàng Hiệp cũng đã phân lập được 10 dòng vi khuẩn có khả năng sinh IAA với hàm lượng từ 3,04 đến 19,206 µg/mL. Gần đây nhất, Nguyễn Khoa Trưởng và cộng sự (2021) đã tuyển chọn được 04 chủng vi khuẩn nội sinh rễ cây cà phê có khả năng sinh tổng hợp IAA đạt 96,78 µg/mL sau 5 ngày nuôi cấy. Do đó, có thể thấy rằng chủng PL04 với khả năng tổng hợp được 107,14 µg IAA/mL là đã tương được hoặc cao hơn các nghiên cứu khác.

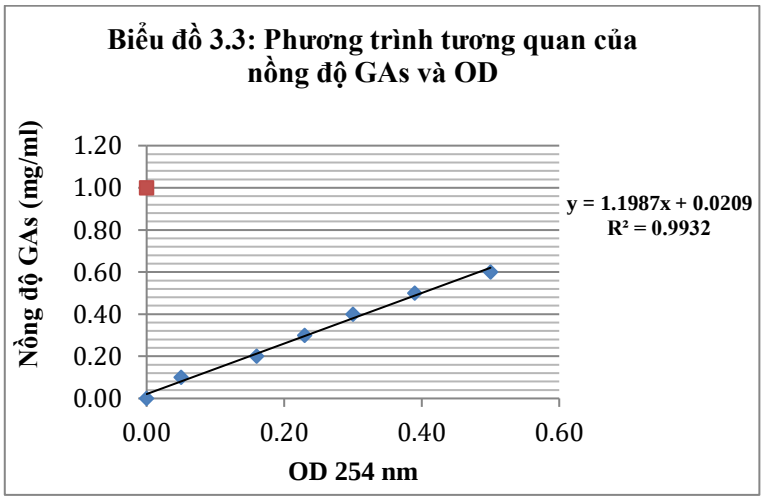
3.3. Kết quả định lượng GAs

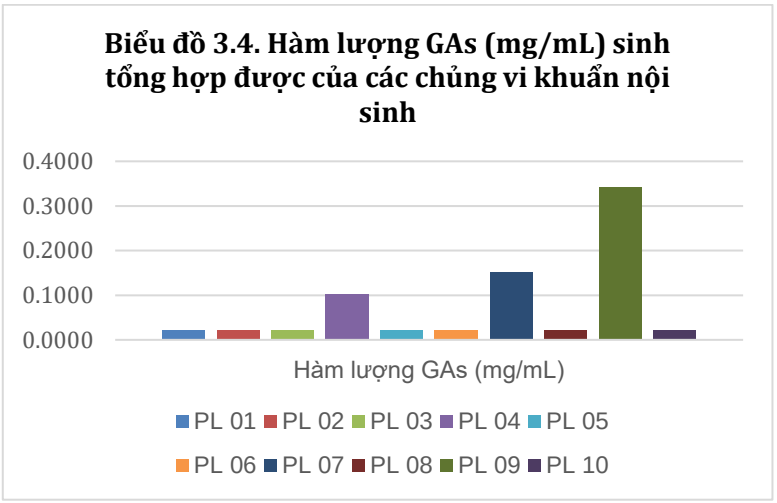
Chúng tôi tiến hành dựng đường chuẩn GAs và định lượng hàm lượng Gibberellin theo phương pháp được mô tả tại mục 2.2.4 cho 10 chủng vi khuẩn nội sinh rễ cây phong lan. Đường chuẩn có dạng: y = 1,1987x + 0,0209 và hàm lượng GAs tổng hợp được của các chủng vi sinh vật được thể hiện tại bảng 3.3 và biểu đồ 3.4.

Bảng 3.3. Hàm lượng GAs sinh tổng hợp được của các chủng vi khuẩn nội sinh rễ cây phong lan

Chủng vi sinh vật	Hàm lượng GAs (mg/mL)
PL 01	0.0209
PL 02	0.0209

PL 03	0.0209
PL 04	0.1018
PL 05	0.0209
PL 06	0.0209
PL 07	0.1508
PL 08	0.0209
PL 09	0.3428
PL 10	0.0209





Kết quả từ bảng 3.3 và biểu đồ 3.4 cho thấy rằng chủng vi khuẩn PL09 sinh tổng hợp được hàm lượng GAs cao hơn so với các chủng vi khuẩn còn lại với hàm lượng đạt 0.3428 mg/mL. Theo sau đó là chủng PL07 với 0.1508 mgGAs/mL và PL04 với 0.1018 mgGAs/mL. Hàm lượng GAs của các chủng vi khuẩn còn lại rất nhỏ, dao động trong

khoảng 0.0209 mg/mL. Năm 2019, Gusmiaty và cộng sự đã phân lập và tuyển chọn được 35 chủng vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp IAA từ 0,389 đến 2,370 mg/L và 1,959 đến 4,322 mgGAs/L. So với kết quả của chúng tôi, chủng PL09 đã có khả năng sinh tổng hợp GAs cao hơn so với nghiên cứu của tác giả trên.

3.4. Xây dựng các bước tạo chế phẩm vi khuẩn nội sinh rễ cây phong lan

3.4.1. Nghiên cứu các điều kiện lên men thu nhận sinh khối vi khuẩn nội sinh rễ cây phong lan có khả năng sinh tổng hợp IAA

Căn cứ vào kết quả phân lập, tuyển chọn vi khuẩn nội sinh rễ cây phong lan có khả năng sinh tổng hợp IAA chúng tôi chọn chủng vi khuẩn có ký hiệu là PL04 để thực hiện nhân nuôi trên hệ thống Bioreactor tạo chế phẩm vi khuẩn nội sinh để thử nghiệm đánh giá trên cây trồng. So sánh giữa đặc điểm khuẩn lạc và hình thái tế bào của chủng vi khuẩn PL04 với khóa phân loại vi khuẩn của Bergey và cộng sự (1992), chúng tôi thấy rằng các đặc điểm mô tả trên phù hợp với mô tả của chi *Bacillus*.

Khảo sát ảnh hưởng của các môi trường (phụ lục 1), nhiệt độ và pH đến mật độ sinh khối chủng PL04 trong vòng 36 giờ, kết quả được trình bày tại bảng 3.4 và bảng 3.5.

Bảng 3.4. kết quả khảo sát ảnh hưởng của môi trường và nhiệt độ lên men đến mật độ sinh khối chủng PL04

Mật độ chủng vi khuẩn PL04 (10^{11}CFU/mL)			
Môi trường	27°C	32°C	37°C
I1	$3,10^{b} \pm 0,22$	$7,50^{c} \pm 0,14$	$10,50^{c} \pm 0,28$
I2	$0,50^{c} \pm 0,16$	$8,40^{b} \pm 0,22$	$15,70^{b} \pm 0,21$
I3	$9,0^{a} \pm 0,29$	$24,40^{a} \pm 0,22$	$62,00^{a} \pm 0,16$

Trong cùng một cột, các ký tự đi sau các giá trị giống nhau thì không có ý nghĩa thống kê với mức ý nghĩa 5% (theo phép thử Tukey).

Bảng 3.5. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của pH môi trường lên men đến mật độ sinh khối chủng PL04

pH	Mật độ sinh khối chủng PL04 (10^{11} CFU/mL)
6,5	$24,00^{c} \pm 0,33$
7	$45,80^{a} \pm 0,37$
7,5	$60,80^{b} \pm 0,41$

Trong cùng một nhiệt độ, các ký tự đi sau các giá trị giống nhau thì không có ý nghĩa thống kê với mức ý nghĩa 5% (theo phép thử Tukey).

Kết quả từ bảng 3.4 và bảng 3.5 có thể thấy rằng môi trường nuôi cấy, nhiệt độ và pH lên men ảnh hưởng rất lớn đến mật độ của các chủng vi khuẩn. Môi trường I3 và nhiệt độ 37°C và pH 7,5 là các điều kiện nhân nuôi chủng PL04 cho mật độ cao lên đến 62 x 10^{11} CFU/mL. Các môi trường và điều kiện lên men khác cho mật độ sinh khối không cao như điều kiện đã nêu, do đó, chúng tôi lựa chọn các điều kiện đã liệt kê bên trên để tiến hành lên men tạo sinh khối vi khuẩn nội sinh rễ cây phong lan có khả năng sinh tổng hợp IAA.

3.4.2. Nghiên cứu các điều kiện lên men thu nhận sinh khối vi khuẩn nội sinh rễ cây phong lan có khả năng sinh tổng hợp GAs

Căn cứ vào kết quả phân lập, tuyển chọn vi khuẩn nội sinh rễ cây phong lan có khả năng sinh tổng hợp GAs chúng tôi chọn chủng vi khuẩn có ký hiệu là PL09 để thực hiện nhân nuôi trên hệ thống Bioreactor tạo chế phẩm vi khuẩn nội sinh để thử nghiệm đánh giá trên cây trồng. Đặc điểm khuẩn lạc và hình thái tế bào của chủng vi khuẩn PL09 là phù hợp với mô tả về chi vi khuẩn *Baciilus* theo khóa phân loại vi khuẩn của Bergey và cộng sự (1992).

Tiến hành khảo sát sự ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy, nhiệt độ và pH lên men đến mật độ sinh khối chủng PL09 trong vòng 36 giờ, kết quả được trình bày tại bảng 3.6 và bảng 3.7.

Bảng 3.6. kết quả khảo sát ảnh hưởng của môi trường và nhiệt độ lên men đến mật độ sinh khối chủng PL09

Mật độ sinh khối chủng PL09 (10^{11}CFU/mL)			
Môi trường	28°C	32°C	37°C
G1	$4,50^{c} \pm 0,20$	$7,50^{c} \pm 0,30$	$20,94^{c} \pm 0,45$
G2	$8,60^{b} \pm 0,35$	$9,20^{b} \pm 0,10$	$33,89^{b} \pm 0,54$
G3	$12,50^{a} \pm 0,62$	$14,80^{a} \pm 0,75$	$94,24^{a} \pm 1,03$

Trong cùng một nhiệt độ, các ký tự đi sau các giá trị giống nhau thì không có ý nghĩa thống kê với mức ý nghĩa 5% (theo phép thử Tukey).

Bảng 3.7. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của pH môi trường lên men đến mật độ sinh khối chủng PL09

pH	Mật độ sinh khối chủng PL09 (10^{11} CFU/mL)
6,5	$65,40^{c} \pm 0,48$
7	$73,32^{b} \pm 0,33$
7,5	$80,24^{a} \pm 0,75$

Trong cùng một nhiệt độ, các ký tự đi sau các giá trị giống nhau thì không có ý nghĩa thống kê với mức ý nghĩa 5% (theo phép thử Tukey).

Kết quả từ bảng 3.6 và bảng 3.7 cho thấy rằng tại môi trường G3, nhiệt độ 37°C và pH 7,5 cho mật độ sinh khối vi khuẩn PL09 là cao nhất đạt 94 x 10^{11} CFU/mL, cao hơn so với các điều kiện khác. Do đó, chúng tôi chọn điều kiện này để lên men thu nhận sinh khối vi khuẩn chủng PL09 nội sinh cây phong lan có khả năng sinh tổng hợp GAs.

3.4.3. Xây dựng các bước lên men thu sinh khối vi khuẩn nội sinh cây phong lan có khả năng sinh tổng hợp IAA và GAs

Các bước lên men thu nhận sinh khối vi khuẩn nội sinh cây phong lan được thực hiện như sau:

Bước 1: Kiểm tra giống đã lưu

Lấy ống giống được bảo quản ở -30°C. Sử dụng ống giống còn nguyên vẹn để tiến hành hoạt hóa trên môi trường lỏng MRS 1 đã chuẩn bị sẵn. Cấy ria tạo khuẩn lạc đơn để kiểm tra độ thuần khiết.

Bước 2: Chuẩn bị môi trường nhân giống các cấp

Chuẩn bị môi trường I3 cho vi khuẩn nội sinh có khả năng sinh tổng hợp IAA và môi trường G3 cho chủng vi khuẩn nội sinh có khả năng sinh tổng hợp GAs, pH môi trường được điều chỉnh về 7,5. Môi trường được hấp khử trùng ở nhiệt độ 121℃ trong 15 phút.

Nhân giống cấp 1: Trong mỗi bình tam giác chứa 100mL môi trường lỏng đã khử trùng, tiến hành cấy 1 vòng khuẩn lạc chủng vi sinh vật vào mỗi bình môi trường tương ứng. Nuôi tại điều kiện 37℃, 150 rpm trong vòng 36 giờ.

Bước 3: Chuẩn bị môi trường lên men

Môi trường lên men các chủng vi khuẩn là tương ứng với môi trường nhân giống, chuẩn bị 5L môi trường và bơm vào hệ thống Bioreactor sau đó khử trùng ở điều kiện 121℃, 15 phút.

Bước 4. Lên men

Bổ sung giống vi sinh vật đã chuẩn bị, bơm vào hệ thống Bioreactor thông qua bơm nhu động và ống giấy silicone đã khử trùng. Sau đó cài đặt thông số cho quá trình lên men bằng hệ thống máy tính điều khiển đi kèm.

- Thời gian lên men: 36h - 48h
- Nhiệt độ lên men: 37℃
- pH môi trường: 7,5
- pO_2: 50%
- Tốc độ khuấy: 150-180 rpm

Bước 5. Theo dõi, kiểm tra quá trình lên men

Trong quá trình lên men, hệ thống máy tính tự động theo dõi và điều chỉnh các thông số lên men theo thời gian thực.

Bước 6. Ly tâm dịch lên men - thu sinh khối

Kết thúc quá trình lên men, sử dụng bơm nhu động để kết nối Bioreactor với máy ly tâm liên tục Himac CR22N, ly tâm dịch lên men ở tốc độ 10.000 rpm, 15℃.

Thu sinh khối sau ly tâm và cố định với chất mang đã khử trùng rồi sấy ở nhiệt độ 40 - 45°C cho đến khi khô hoàn toàn. Sau khi sinh khối khô, tiến hành nghiền mịn để thu được sinh khối thành phẩm.

Bước 7. Kiểm tra mật độ và bảo quản

Tiến hành kiểm tra mật độ vi khuẩn nội sinh phong lan có khả năng sinh tổng hợp IAA và GAs theo phương pháp pha loãng cấy trải (Koch, 1883) trên môi trường tương ứng. Sinh khối vi khuẩn được bảo quản trong túi nhôm hàn kín miệng ở điều kiện nhiệt độ phòng.



Hình 3.6. Chế phẩm vi sinh vật nội sinh (Dạng bột, dạng viên nén)

3.5. Đánh giá sự ảnh hưởng của các chủng vi sinh vật nội sinh đến sinh trưởng, phát triển của cây phong lan con

Tiến hành bổ sung các chủng vi khuẩn nội sinh vào cây phong lan con và chăm sóc, theo dõi quá trình sinh trưởng, phát triển của cây trồng, chúng tôi bước đầu ghi nhận được sự thay đổi về tỷ lệ sống, tốc độ tăng trưởng chiều cao trung bình và đánh giá cảm quan về sự phát triển của cây trồng, chi tiết được trình bày tại bảng 3.8 và bảng 3.9.

Bảng 3.8. Kết quả đánh giá sự sinh trưởng và phát triển của cây phong lan con sau khi bổ sung vi khuẩn nội sinh

TT	Nghiệm thức	Tỷ lệ sống	Tốc độ tăng trưởng	Đánh giá cảm quan

		(%)	trung bình về chiều cao (cm)	
1	NT1	$77,5^{a} \pm 1,2$	$0,15^{a} \pm 0,02$	Nghiệm thức có thêm 14 chồi mới và đường kính cây nhỏ hơn các nghiệm thức khác, lá cây có màu xanh đậm, ít phát triển thêm chồi lá mới.
2	NT2	$92,5^{b} \pm 0,45$	$0,21^{b} \pm 0,02$	Nghiệm thức có thêm 17 chồi mới, đường kính thân cây được cải thiện, lá cây xanh tươi và xuất hiện chồi lá mới
3	NT3	$96^{c} \pm 0,34$	$0,25^{c} \pm 0,01$	Nghiệm thức có thêm 16 chồi mới, đường kính thân cây nhỏ hơn, nghiệm thức 2 tuy nhiên số lá nhiều hơn và số chồi cũng nhiều hơn so với nghiệm thức 2.
4	NT4	$96^{c} \pm 0,56$	$0.36^{d} \pm 0,03$	Nghiệm thức có thêm 23 chồi mới, đường kính thân cây to hơn so với nghiệm thức 3 và chiều cao, số lá cũng được cải thiện hơn so với nghiệm thức số 3.

Trong cùng một nhiệt độ, các ký tự đi sau các giá trị giống nhau thì không có ý nghĩa thống kê với mức ý nghĩa 5% (theo phép thử Tukey).



Hình 3.7. So sánh sự khác biệt của một số cây trồng trong các nghiệm thức

Kết quả từ bảng 3.8 cho thấy rằng nghiệm thức 04 bổ sung đồng thời hai chủng vi khuẩn nội sinh có khả năng sinh tổng hợp IAA và GAs cho thấy tác dụng của chúng đối với cây trồng là lớn hơn so với các nghiệm thức đối chứng (NT1), nghiệm thức bổ sung riêng lẽ chủng vi khuẩn sinh tổng hợp IAA và GAs (NT2 và NT3) với tỷ lệ sống lên đến 96% và tốc độ tăng trưởng chiều cao là 0,36 cm/tuần. Có thể thấy rằng sự kết hợp giữa hai chủng vi khuẩn này có tác dụng tăng tỷ lệ sống của cây phong lan con ra chậu, thúc đẩy phát triển chiều cao và cải thiện tình trạng của lá cây so với sử dụng riêng lẽ các chủng vi khuẩn và không bổ sung các chủng vi khuẩn nội sinh đã tuyển chọn.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

1. Kết luận

1. Từ 20 mẫu rễ phong lan được thu thập tại khoa Sinh học đã phân lập được 10 chủng vi khuẩn nội sinh được ký hiệu từ PL01 đến PL10.

2. Chủng vi khuẩn PL04 có khả năng sinh tổng hợp IAA cao với hàm lượng đạt 107,14 µg/mL sau 5 ngày nuôi cấy. Chủng vi khuẩn PL09 có khả năng sinh tổng hợp GAs cao nhất trong các chủng vi khuẩn nội sinh đã phân lập là 0.3428 mgGAs/mL.

3. Điều kiện thích hợp để nhân sinh khối chủng vi khuẩn PL04 có khả năng sinh tổng hợp IAA là môi trường I3, pH 7,5 và nhiệt độ 37°C trong vòng 36 giờ. Điều kiện thích hợp để nhân sinh khối chủng vi khuẩn PL09 có khả năng sinh tổng hợp GAs là môi trường G3, pH 7,5 và nhiệt độ 37°C trong vòng 36 giờ.

4. Sử dụng đồng thời hai chủng vi khuẩn PL04 và PL09 có tác dụng tăng tỷ lệ sống, thúc đẩy phát triển chiều cao và cải thiện tình trạng lá của cây phong lan con.

2. Kiến nghị

- Tiếp tục định danh 2 chủng vi khuẩn đã được tuyển chọn là PL04 và PL09.

- Tiếp tục phát huy tính mới của đề tài, triển khai đánh giá chuyên sâu hoạt tính sinh học của các chủng vi khuẩn nội sinh đã tuyển chọn.

- Tiếp tục đánh giá sự ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh đến quá trình sinh trưởng, phát triển và ra hoa của cây phong lan trưởng thành.

- Xây dựng thêm một nghiệm thức, bổ sung đồng thời cả 10 chủng vi khuẩn đã phân lập được, để theo dõi sự sinh trưởng và phát triển của cây phong lan có khác biệt gì so với nghiệm thức bổ sung 2 chủng vi khuẩn sản sinh chất điều hoà sinh trưởng IAA và GAs.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Agrios, G.N., Ed., *Plant Pathology, 4th ed*., New York: Academic, 1997.

Alibrandi, P., Lo Monaco, N., Calevo, J., Voyron, S., Puglia, A. M., Cardinale, M., & Perotto, S. (2020). Plant growth promoting potential of bacterial endophytes from three terrestrial Mediterranean orchid species. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 1-12. https://doi.org/10.1080/11263504.2020.1829731

Alibrandi, P., Schnell, S., Perotto, S., & Cardinale, M (2020). Diversity and Structure of the Endophytic Bacterial Communities Associated With Three Terrestrial Orchid Species as Revealed by 16S rRNA Gene Metabarcoding. *In Frontiers in Microbiology* (Vol. 11). Frontiers Media SA. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.604964

Belimov, A.A., Ivanchikov, A.Yu., Yudkin, L.V., Khamova, O.F., Postavskaya, S.M., Popolzukhina, P.V., Shmakova, A.A., and Kozlova, G.Ya., New Strains of Associative Growth-Stimulating Bacteria Dominating the Rhizoplane of Barley Seedlings: Characterization and Introduction, *Mikrobiologiya*, 1999, vol. 68, no. 3, pp. 392–397.

Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn (2015). TCVN 10784:2015 Vi sinh vật - Xác định khả năng sinh tổng hợp axit 3-indol-axetic (IAA). Truy cập tại http://tieuchuan.mard.gov.vn/Documents/Uploads/TCVN10784_2015_915270.pdf

Bottini, R., Cassán, F. & Piccoli, P. Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Appl Microbiol Biotechnol* 65, 497–503 (2004).

Calaway H. Dodson (2021). Orchid Plant. *Britannica*. Truy cập tại: https://www.britannica.com/contributor/Calaway-H-Dodson/755.

Chand, K., Shah, S., Sharma, J., Paudel, M. R., & Pant, B. (2020). Isolation, characterization, and plant growth-promoting activities of endophytic fungi from a wild orchid *Vanda cristata*. *Plant Signaling & Behavior*, 15(5).

Đàm Văn Toàn, Phạm Quang Thu, Đặng Như Quỳnh, Nguyễn Minh Chí (2018). Vi sinh vật nội sinh và sử dụng trong quản lý bệnh rụng lá mùa mưa cây cao su ở Đông Nam Bộ. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, 22, 25-32.

Đặng Thị Ngọc Thanh, Nguyễn Thị Xuân My, Cao Ngọc Điệp (2016). Sự sản xuất IAA và siderophore của các chủng vi khuẩn liên hiệp thực vật và ảnh hưởng lên sự tăng trưởng của cây bắp (*Zea mays* L.) trồng trong chậu. *Tap chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 47, 59-67.

Đào Ngọc Quang và Đặng Như Quỳnh (2014). Ảnh hưởng của vi sinh vật nội sinh cây thông nhựa (*Pinus merkusii*) đến một số tập tính của sâu róm thông (*Dendrolimus punctatus). Tạp chí Khoa học Lâm nghiệp,* 4, 3534-3544.

Đào Thanh Vân, Đặng Thị Tố Nga (2008). Giáo trình Hoa lan. Nhà xuất bản Nông nghiệp.

Datta C, Basu P (2000). Indole acetic acid production by a *Rhizobium* species from root nodules of a leguminous shrub, Cajanus cajan. *Microbiological Research*, 155-123.

Đinh Thị Dinh, Đặng Văn Đông, Trần Duy Quý (2014). Ảnh hưởng của các vùng sinh thái và xử lý gibberellin (GA3) tới sinh trưởng và ra hoa của giống lan đai châu trắng đốm tím. Tạp chí khoa học và phát triển, 12, (7):1049-1057.

Elena A. Tsavkelova; Tatiana A. Cherdyntseva; Svetlana G. Botina; Alexander I. Netrusov (2007). Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin., *Microbiological Research,* 162(1), 69–76. doi:10.1016

Eline H. V., & Louisa M. L., (2016).Beneficial microbes affect endogenous mechanisms controlling root development, *National library of medicine*, 21(3): 218–229. doi: 10.1016

Gusmiaty, M Restu, B Bachtiar and SH Larekeng (2019). Gibberellin and IAA production by Rhizobacteria from Various Private forest. *Earth and Environmental Science*. doi:10.1088/1755-1315/270/1/012018.

Héctor Herrera, Alejandra Fuentes, Javiera Soto, Rafael Valadares, Cesar Arriagad. Orchid-Associated Bacteria and Their Plant Growth Promotion Capabilities. *Orchids Phytochemistry, Biology and Horticulture*, 175-200.

Hoàng Xuân Lam (2016). Tình hình sản xuất và tiêu thụ lan Cattleya, Dendrobium, Oncidium trên thế giới và ở Việt Nam. http://kenhantan.com/2016/06/12/tinh-hinh-san-xuat-va-tieu-thu-lan-cattleya-dendrobium-oncidium-tren-the-gioi-va-o-viet-nam/

IvaKamneva, S.V. and Muronets, E.M., Genetic Control of the Processes of Interaction of Bacteria with Plants in Associations, *Genetika*, 1999, vol. 35, no. 11, pp. 1480–1494

Ivanova, E.G., Doronina, N.V., and Trotsenko, Yu.A. (2001). Aerobic Methylobacteria Are Capable of Synthesizing Auxins. *Mikrobiologiya*, 70,(4), pp. 452–458.

Jacobs, M. J., Bugbee, W. M. and Gabrielson, D. A. (1985). Enumeration, location, and characterization of endophytic bacteria within sugar beet roots. Revue canadienne de botanique, 63(7): 1262-1265.

Keswani, C., Singh, SP, García-Estrada, C., Mezaache-Aichour, S., Glare, TR, Borriss, R., et al. (2021). Biosynthesis and beneficial effects of microbial gibberellins on crops for sustainable agriculture. *Journal of Applied Microbiology*, 132. 1597-1615.

Kuldau, G.; Bacon, C. (2008). Clavicipitaceous endophytes: Their ability to enhance resistance of grasses to multiple stresses. *Biological Control. Special Issue: Endophytes*, 46 (1): 57–71.

Lê Thị Xã, Đỗ Thành Luân, Nguyễn Khởi Nghĩa (2020). Khảo sát khả năng kích thích nảy mầm và sinh trưởng rau muống của một số dòng vi khuẩn cố định đạm và tổng hợp IAA. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 56, 37-46.

Lebuhn, M., Hartmann, A., 1993. Method for the determination of indole-3-acetic acid and related compounds of L-tryptophan catabolism in soils. *Journal of Chromatography A*. 629(2): 255-266.

Libbert, E. and Risch, H., Interactions between Plants and Epiphytic Bacteria Regarding Their Auxin Metabolism. V. Isolation and Identification of the IAA-Producing and Destroying Bacteria from Pea Plants, *Physiol. Plant.*, 1969, vol. 22, pp. 51–58.

Lương Thị Hồng Hiệp và Cao Ngọc Điệp (2011). Phân lập và nhận diện vi khuẩn nội sinh trong cây cúc Xuyến chi (*Wedella trilobata* (L.) Hitche.) bằng kỹ thuật PCR. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ* 18a, 168-176,

Malonek, S., Bömke, C., Bornberg-Bauer, E., Rojas, M. C., Hedden, P., Hopkins, P., & Tudzynski, B. (2005). Distribution of gibberellin biosynthetic genes and gibberellin production in the Gibberella fujikuroi species complex. *Phytochemistry*, 66(11), 1296-1311.

Mishke, I.V., *Mikrobnye fitogormony v rastenievodstve* (Microbial Phytohormones in Agriculture), Riga: Zinatne, 1988.

Moudi Maryam, Rusea Go, Christina Yong Seok Yien, Mohd Nazre Saleh.2013. A Review on Molecular Systematic of the Genus Dendrobium Sw. *Acta Biologica Malaysiana* (2013) 2(2): 71-78.

Nguyễn Hải Vân và Nguyễn Thị Minh (2017). Nghiên cứu sử dụng vi khuẩn nội sinh phân lập từ các vùng sinh thái khác nhau. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, 15(5): 605-618.

Nguyễn Huyền (2019). TP.HCM có tiềm năng lớn trong trồng hoa lan xuất khẩu. *Tạp chí Tổng cục Hải quan.* Truy cập tại: https://haiquanonline.com.vn/tphcm-co-tiem-nang-lon-trong-trong-hoa-lan-xuat-khau-103679.htmL

Nguyễn Khoa Trưởng, Trần Văn Tiến, Lê Thị Anh Tú, Phan Trung Trực, Huỳnh Dương Thị Minh Nguyệt, Mai Thị Mỹ Lanh (2021). Phân lập, tuyển chọn vi sinh vật nội sinh tổng hợp INDOLE-3-ACETIC ACID (IAA) trong hệ rễ cây cà phê (*Coffea*) tại Đắk Lắk. T*ạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, 1*, 38-43.

Nguyễn Thị Huỳnh Như, Nguyễn Hữu Hiệp, Nguyễn Minh Đời, Trần Nguyễn Nhật Khoa, Thái Trần Phương Minh (2013). Phân lập các dòng vi khuẩn nội sinh có khả năng tổng hợp IAA và cố định đạm trên cây chuối. *Tạp chí Khoa học Trường đại học Cần Thơ*, 27, 24-31.

Nguyễn Thị Minh và Đỗ Minh Thu (2017). Nghiên cứu phân lập và tuyển chọn vi sinh vật nội sinh từ vùng sinh thái đất mặn huyện Giao Thuỷ, tỉnh Nam Định. *Tạp chí khoa học Nông nghiệp Việt Nam,* 15 (8): 1022-1032.

Nie, S., Cui, S. W., & Xie, M. (2018). Glucomannans from dendrobium officinale and aloe. *Bioactive Polysaccharides*, 295-347.

Pablo, H. R., Leonard, O. S. van; Gabriele, B., Anna, P. M., Stéphane, C., Andrea, C., Matthias, D. và Angela, S., (2015). The Hidden World within Plants: Ecological Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews,* 79 (3): 293–320.

Pant, B., Shah, S., Shrestha, R., Pandey, S., & Joshi, P. R. (2017). An overview on orchid endophytes. *Mycorrhiza Nutrient Uptake, Biocontrol, Ecorestoration*, 503–524.

Shah, S., Shrestha, R., Maharjan, S., Selosse, M., & Pant, B. (2018). Isolation and characterization of plant growth-pro"Gibberellin biosynthesis and metabolism". Plant Hormones: Physiology, Biomoting endophytic fungi from the roots of *Dendrobium moniliforme*. *Plants*, 8(1), 5. doi:10.3390/plants8010005

Sponsel, V. M. (1995). chemistry and Molecular Biology. Dordrecht: Kluwer. pp. 66-97.

Suryanarayanan, T. S., (2013). Endophyte research: going beyond isolation and metabolite documentation. Fungal Ecology, 6(6): 561–568.

Thanh Sa (2020). Để ngành hoa lan phát triển bền vững. *Báo Lâm Đồng*. http://baolamdong.vn/kinhte/202001/de-nganh-hoa-lan-phat-trien-ben-vung-2984639/

Trần Hợp (1998). Phong lan Việt Nam. Nhà xuất bản Nộng nghiệp.

Troots of epiphytic orchids. *Mikrobiologiya 73*, 710–715.

Trương Thị Vân Hà. 2015. Ảnh hưởng của một số biện pháp kỹ thuật đến sinh trưởng, phát triển cây hoa địa lan hoàng vũ (*Symbium Sinensis*) tại Gia Lâm - Hà Nội. Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

Tsavkelova, E., Cherdyntseva, T., Netrusov, A., 2005. Auxin production by bacteria associated with orchid roots. *Mikrobiologiya 74*, 46–53.

Tsavkelova, E.A., Cherdyntseva, T.A., Lobakova, E.S., Kolomeitseva, G., and Netrusov, A.I. (2001). Microbiota of the Orchid Rhizoplane, *Mikrobiologiya*, 2001, vol. 70, no. 4, pp. 567–573.

Văn Việt (2020). Phát triển đa dạng lan rừng Đà Lạt. *Báo Lâm Đồng*. http://baolamdong.vn/kinhte/202007/phat-trien-da-dang-lan-rung-da-lat-3013378/index.htm

Wilkinson, K. G., Dixon, K. W., Sivasithamparam, K., & Ghisalberti, E. L. (1994). Effect of IAA on symbiotic germination of an Australian orchid and its production by orchid-associated bacteria. *Plant and soil*, *159*(2), 291-295.

Yuan, Z., Chen, Y., & Yang, Y. (2008). Diverse non-mycorrhizal fungal endophytes inhabiting an epiphytic, medicinal orchid (Dendrobium Nobile): Estimation and characterization. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(2), 295-303.

Zhao Y. Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annual Review of Plant Biology*, 61 (2010) 49.

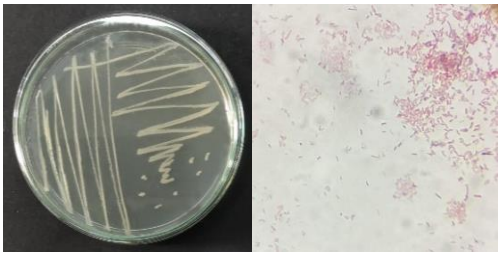
Zhu, G.S., Yu, Z.N., Gui, Y. and Liu, Z.Y. (2008). A novel technique for isolating orchid mycorrhizal fungi. *Fungal Diversity*, 33, 123-137.1.

PHỤ LỤC

Phụ lục 1: Hình ảnh đặc điểm khuẩn lạc và hình thái tế bào của các chủng vi sinh vật đã phân lập được từ rễ cây phong lan



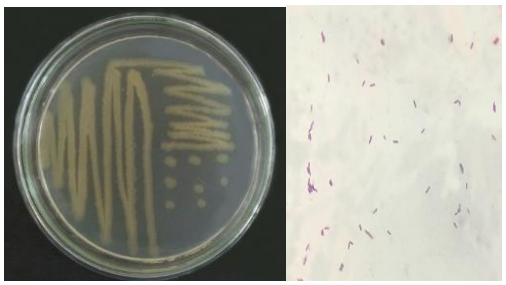
Hình 3.1. Hình thái ria khuẩn lạc và hình thái tế bào của chủng PL 01



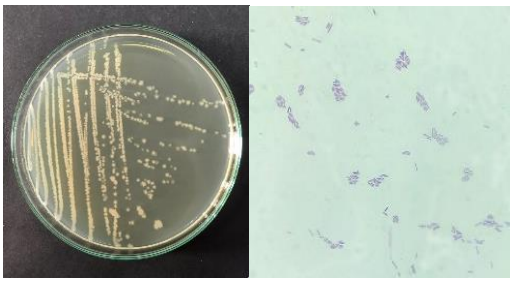
Hình 3.2. Hình thái ria khuẩn lạc và hình thái tế bào của chủng PL 02



Hình 4. Hình thái ria khuẩn lạc và hình thái tế bào của chủng PL 03



Hình 3.3. Hình thái ria khuẩn lạc và hình thái tế bào của chủng PL 04



Hình 5. Hình thái ria khuẩn lạc và hình thái tế bào của chủng PL 05



Hình 6. Hình thái ria khuẩn lạc và hình thái tế bào của chủng PL 06



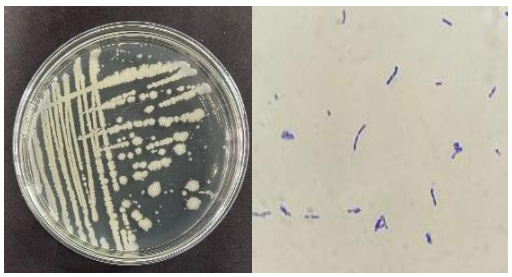
Hình 7. Hình thái ria khuẩn lạc và hình thái tế bào của chủng PL 07



Hình 8. Hình thái ria khuẩn lạc và hình thái tế bào của chủng PL 08



Hình 9. Hình thái ria khuẩn lạc và hình thái tế bào của chủng PL 09



Hình 3.4. Hình thái ria khuẩn lạc và hình thái tế bào của chủng PL 10

Phụ lục 2. Môi trường nhân nuôi sinh khối vi khuẩn nội sinh sinh tổng hợp IAA và GAs.

Môi trường nhân nuôi sinh khối vi khuẩn nội sinh PL04 có khả năng sinh tổng hợp IAA

Tên môi trường	I1	I2	I3
Thành phần	Nước giá: 250mL Peptone:10g Yeast extract:5g Glucose: 20g Cao thịt: 10g KH_2PO_4: 2g CH_3COONa: 5g $MnSO_4$: vết Trytophan: 0.1% Nước vừa đủ 1 lít	Peptone: 5g Yeast extract: 2,5g Glucose: 20g Cao thịt: 5g KH_2PO_4: 2g $MgSO_4$: 0,38g CH_3COONa: 3g Nước giá: 250 mL Trytophan: 0.1% Nước vừa đủ 1 lít	Glucose: 10g Nước giá: 500 mL Amoni citrat 1,7g Mật rỉ: 7,2g Pepton từ thịt: 11,13g $MnCl_2$: 16,58 mM K_2HPO_4: 5g $CaCl_2$ 0,01g NaCl: 4,04 $FeSO_4.7H_2O$: 1µM $MgSO_4.7H_2O$: 0,38g Trytophan: 0.1% Nước vừa đủ 1 lít

Môi trường nhân nuôi sinh khối vi khuẩn nội sinh PL09 có khả năng sinh tổng hợp GAs

Môi trường	G1	G2	G3
Thành phần	Glucose: 10g Amoni citrat 1,7g Mật rỉ: 7,2g Pepton từ thịt:11,13g $MnCl_2$: 16,58 mM K_2HPO_4: 5g $CaCl_2$: 0,01g NaCl: 4,04 $FeSO_4.7H_2O$: 1µM	Peptone: 5g Yeast extract: 2,5g Glucose: 20g Cao thịt: 5g KH_2PO_4: 2g $MgSO_4$: 0,38g CH_3COONa: 3g Nước giá: 250 mL Nước vừa đủ 1 lít	Nước giá: 500 mL Nước thịt: 100 mL Glucose: 20g K_2HPO_4: 5g CH_3COONa: 5g $CaCl_2$: 0,01 g $MgSO_4$: 0,38g $MnSO_4$: 0,01g Amoni citrat: 1,7g

	$MgSO_4.7H_2O$: 0,38g Nước vừa đủ: 1 lít		Mật rỉ đường: 7,2 g Nước vừa đủ 1 lít

Phụ luc 3. Hình ảnh thực hiện các nghiệm thức



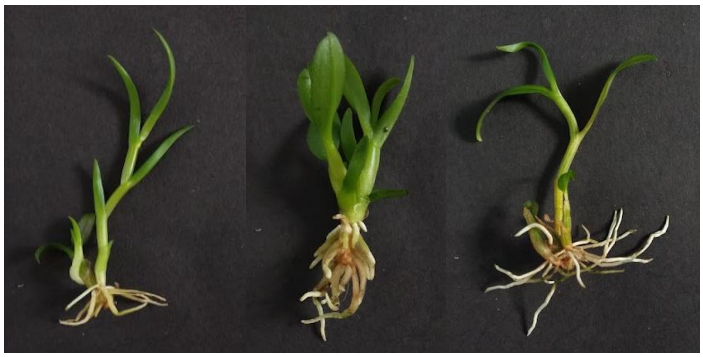
Hình 10. Giá thể trồng cây lan thử nghiệm (Dớn sợi)



Hình 11. Chậu trồng lan thử nghiệm



Hình 12. Quá trình theo dõi, đo chiều cao của cây phong lan con



Hình 13: Một số cây phong lan trước khi đưa vào nghiệm thức



Hình 14. Cây phong lan nghiệm thức 1 sau 1 tháng



Hình 15. Cây phong lan nghiệm thức 2 sau 1 tháng bổ sung vi sinh vật



Hình 16. Cây phong lan nghiệm thức 3 sau 1 tháng bổ sung vi sinh vật



Hình 17. Cây phong lan nghiệm thức 4 sau 1 tháng bổ sung vi sinh vật



Hình 3.7. So sánh sự khác biệt của một số cây trồng trong các nghiệm thức



Hình 18. Hình ảnh các nghiệm thức



Hình 19. Chế phẩm vi sinh vật nội sinh (Dạng bột, dạng viên nén)