

ẢNH HƯỞNG CỦA *Bacillus amyloliquefaciens* EK2 ĐẾN SINH TRƯỞNG CỦA CÂY BẠC HÀ (*Mentha arvensis* L.) TRONG ĐIỀU KIỆN NUÔI CẤY *IN VITRO* VÀ *EX VITRO*

Trần Thị Phương Hạnh¹, Trịnh Thị Huyền Trang¹, Trần Thị Kim Thi¹, Lê Thị Thu Sa¹

Ngày nhận bài: 26/11/2022; Ngày phản biện thông qua: 07/12/2022; Ngày duyệt đăng: 30/01/2023

TÓM TẮT

Cây Bạc hà (*Mentha arvensis* L.) được xem là nguồn dược liệu quý, tiềm năng nhằm phát triển các sản phẩm chăm sóc, bảo vệ sức khỏe. Nhu cầu về cây giống có chất lượng cao ngày càng gia tăng. Để giảm chi phí, vì sinh vật có khả năng kích thích sinh trưởng thực vật có thể được sử dụng trong nhân giống như một giải pháp bền vững. Vì vậy, trong nghiên cứu này, dịch lọc vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* EK2 với nồng độ IAA 1 – 5 mg/l đã được sử dụng để kích thích sự sinh trưởng của cây Bạc hà trong điều kiện *in vitro*. Kết quả cho thấy rằng dịch lọc vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* EK2 có ảnh hưởng tích cực lên sự sinh trưởng của đốt thân cây Bạc hà *in vitro*. Môi trường MS½ có bổ sung dịch lọc vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* EK2 với nồng độ IAA 2 mg/l phù hợp cho sự sinh trưởng với tỷ lệ bật chồi và tạo rễ 100%, số chồi phát sinh đạt 7,87 chồi/cụm, chiều cao chồi 9,43 cm, 24,87 rễ/chồi, chiều dài rễ 2,54 cm, trọng lượng tươi 665,47 mg/chồi, trọng lượng khô 50,17 mg/chồi, chlorophyll a+b 0,75 mg/g và tỷ lệ chlorophyll a/b là 1,45 sau 4 tuần nuôi cấy. Ngoài vườn ươm, cây tăng trưởng tốt, tạo rễ mới, lông kéo dài, cây phân nhánh khi xử lý 10 ml huyền phù *B. amyloliquefaciens* EK2 với mật độ 10⁸ CFU/ml. Sau 16 tuần, chiều cao cây đạt 55,58 cm, đường kính thân 4,85 mm, diện tích lá 15,27 cm², 30,63 cành cấp I, trọng lượng thân tươi 58,96 g, trọng lượng thân khô 5,50 g, số rễ chính 8,40 rễ, chiều dài rễ 57,57 cm, trọng lượng rễ tươi 73,23 g, trọng lượng rễ khô 7,01 g, chlorophyll a+b 1,17 mg/g và tỷ lệ chlorophyll a/b là 1,34.

Từ khóa: *Bacillus amyloliquefaciens*, cây Bạc hà, chồi, *in vitro*, *ex vitro*, rễ.

1. MỞ ĐẦU

Cây Bạc hà (*Mentha arvensis* L.) hay còn được gọi là Bạc hà Á, Bạc hà Nhật có nguồn gốc phân bố ở các vùng ôn đới khu vực châu Âu, phía tây các nước Trung Á, phía đông Himalaya và Siberia. Bạc hà được trồng phổ biến do đặc tính dễ trồng. Đến nay, Bạc hà Á đã được trồng nhiều nước trên thế giới như Nhật Bản, Trung Quốc, Hàn Quốc, Braxin, Ấn Độ, Nga, Việt Nam... Tinh dầu Bạc hà được dùng để chế biến những thuốc chữa cảm cúm, ho sốt, hen suyễn, bệnh về gan, lá lách và vàng da... được các nhà bào chế thuốc quan tâm và đặt hàng với số lượng lớn (Đỗ Tất Lợi, 2004; Jeyakumar, 2014). Ngoài ra, tinh dầu Bạc hà thường được dùng để tạo hương liệu cho dược phẩm, thực phẩm... (Mai Hải Châu và cộng sự, 2017; Galeotti và cộng sự, 2002). Điều này cho thấy, Bạc hà được xem là nguồn dược liệu quý, tiềm năng nhằm phát triển các sản phẩm chăm sóc, bảo vệ sức khỏe.

Ở nước ta, Bạc hà được trồng nhiều ở các vùng như Bắc Ninh, Lào Cai, Hà Giang, Quảng Nam, Bình Thuận, Lâm Đồng, Bà Rịa - Vũng Tàu, Hồ Chí Minh, Tiền Giang... Nhu cầu về cây giống có chất lượng cao ngày càng gia tăng, vì vậy công nghệ vi nhân giống bằng nuôi cấy mô tế bào thực vật đã và đang trở thành một ngành công nghiệp quan trọng trong sản xuất dược liệu ở nhiều nước

trên thế giới (Suman, 2017). Đây cũng là công nghệ quan trọng để bảo tồn nguồn gen thực vật, cải thiện cây trồng và nhân giống cây trồng. Tuy nhiên, kỹ thuật này yêu cầu sử dụng chất khử trùng hóa học, nồng độ thay đổi của chất điều hòa sinh trưởng thích hợp, thuốc kháng sinh, thuốc kháng nấm, thuốc kháng vi-rút hầu như ở mỗi giai đoạn của quá trình sinh trưởng và phát triển (Liang và cộng sự, 2019). Một số chất điều hòa sinh trưởng thực vật thường dùng trong nuôi cấy mô, tế bào thực vật có giá thành cao. Để giảm chi phí, vì sinh vật bản địa có khả năng kích thích sinh trưởng thực vật (PGPM) có thể được sử dụng như một giải pháp bền vững (Verma và cộng sự, 2019). Nhiều PGPM có thể tổng hợp chất điều hòa sinh trưởng thực vật và nhiều hợp chất thứ cấp khác có thể cải thiện sự tăng trưởng và năng suất của cây trồng. Tuy nhiên cho đến nay các PGPM chưa được sử dụng nhiều trong nuôi cấy mô thực vật *in vitro* và chỉ có một số ít nghiên cứu sử dụng PGPM trong quá trình vi nhân giống được công bố (Soumare và cộng sự, 2021). Vi khuẩn nội sinh *Bacillus megaterium* có khả năng tổng hợp IAA kích thích sự tăng trưởng của cây đậu cô ve trong nuôi cấy *in vitro* (Grunenvaldt và cộng sự, 2018). Bên cạnh đó, *Bacillus* là nhóm vi khuẩn chiếm ưu thế trong sinh quyển, có mặt tại vùng rễ của các cây trồng khác nhau và có thể sống sót được trong điều kiện

¹Khoa Khoa học Tự nhiên và Công nghệ, Trường Đại học Tây Nguyên

Tác giả liên hệ: Trần Thị Phương Hạnh; ĐT: 0988861311; Email: ttpanh@ttn.edu.vn.

stress do khả năng hình thành nội bào tử.

Việc sử dụng *Bacillus* trong nuôi cấy cây Bạc hà *in vitro* chưa thấy công bố. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm mục tiêu xác định được ảnh hưởng của *Bacillus amyloliquefaciens* EK2 đến sinh trưởng của cây Bạc hà trong điều kiện *in vitro* và *ex vitro*.

2. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nội dung nghiên cứu

- Nghiên cứu ảnh hưởng của dịch lọc *B. amyloliquefaciens* EK2 đến sinh trưởng của cây Bạc hà trong điều kiện *in vitro*.

- Nghiên cứu ảnh hưởng của *B. amyloliquefaciens* EK2 đến sinh trưởng của cây mô Bạc hà trong điều kiện *ex vitro*.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Nghiên cứu ảnh hưởng của dịch lọc *B. amyloliquefaciens* EK2 đến sinh trưởng của cây Bạc hà trong điều kiện *in vitro*

B. amyloliquefaciens EK2 thuộc chương trình Khoa học và Công nghệ “Nghiên cứu và ứng dụng Công nghệ sinh học trong phát triển bền vững cây hồ tiêu (*Piper nigrum* L.) ở Tây Nguyên” được bảo quản tại Viện CNSH&MT, trường ĐH Tây Nguyên, có khả năng phân giải phosphate khó tan, cố định đạm và sinh tổng hợp IAA tốt (Nguyễn Anh Dũng, 2020).

Nhân giống cấp 1: Cây chủng *B. amyloliquefaciens* EK2 từ ống giống vào bình tam giác có chứa 50 ml môi trường LB lỏng (đã hấp khử trùng ở 121°C trong 15 phút). Nuôi vi khuẩn trên máy lắc với tốc độ lắc 150 vòng/phút, thời gian 24 giờ, điều chỉnh để đạt mật độ 10^8 CFU/ml.

Lên men chủng tuyển chọn trong bình tam giác: Chuyển 1ml giống cấp 1 với mật độ 10^8 CFU/ml vào các bình tam giác có chứa sẵn 50 ml môi trường LB có bổ sung 1% L-tryptophan.

Chủng vi khuẩn được nuôi trên máy lắc với tốc độ lắc 150 vòng/phút, thời gian nuôi 5 ngày. Ly tâm 13.000 vòng/phút trong 5 phút, thu dịch bỏ cặn. Dịch này được lọc qua giấy lọc 3 lần rồi tiếp tục lọc qua phin lọc CA, lỗ lọc 0,20 μ m, Ø28 mm (đã tiệt trùng) thu được dịch lọc. Xác định hàm lượng IAA trong dịch nuôi cấy. Dịch lọc vi khuẩn được bổ sung vào môi trường nuôi cấy *in vitro* đảm bảo được vô trùng.

Đốt thân được cắt bỏ lá của cây Bạc hà *in vitro*, dài khoảng 1,5 - 2 cm được cấy vào môi trường MS½ có bổ sung đường saccharose 20g/l, agar 6,5 g/l và dịch lọc vi khuẩn với nồng độ IAA

từ 0 ml/l – 5 ml/l.

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, 3 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại cấy 3 bình, mỗi bình cấy 5 mẫu.

Chỉ tiêu theo dõi: tỷ lệ tạo chồi, số chồi/mẫu, chiều cao chồi, tỷ lệ tạo rễ, số rễ, chiều dài rễ, trọng lượng tươi, trọng lượng khô, hàm lượng chlorophyll được ghi nhận sau 4 tuần nuôi cấy.

2.2.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của *B. amyloliquefaciens* EK2 đến sinh trưởng của cây mô Bạc hà trong điều kiện *ex vitro*

Cây mô Bạc hà cao khoảng 8 -10 cm được trồng trên giá thể trấu hun và sơ dừa với tỷ lệ 1:1 (v:v) tưới nước phủ sương ngày 2 lần trong điều kiện nhà lưới trước khi trồng trong điều kiện vườn ươm.

Chuẩn bị đất trồng cây mô Bạc hà: chọn đất tốt, không lấy đất ở những vùng trồng cây đã bị nấm bệnh gây hại. Đất được đập nhỏ, tạo lớp mỏng phơi nắng 1 ngày trước khi vào bịch. Thành phần đất trồng trong bịch: tỷ lệ đất: cát: phân chuồng hoai mục là 2:1:1. Phối trộn, ẩm độ 60 – 70%. Đóng bịch: 1 kg/ bịch. Hấp khử trùng: 90 – 95°C, 1 giờ, để nguội.

Chuẩn bị bầu đất: Bầu đất kích thước: 24 x 35 cm, có 8 lỗ thoát nước ở nửa dưới của bầu phân bố thành 2 hàng, hàng dưới cách đáy bầu khoảng 2 cm.

Chuẩn bị dịch vi khuẩn: *B. amyloliquefaciens* EK2 được nuôi cấy trên môi trường LB Agar trong 24 giờ, sau đó chuyển vào bình 200 ml chứa môi trường LB lỏng, ủ trong máy lắc với tốc độ 150 vòng/phút trong 2 ngày ở 25°C. Tế bào vi khuẩn được điều chỉnh ở mật độ 10^8 CFU/ml được xem là dịch khuẩn gốc.

Cây mô Bạc hà sau khi được huấn luyện cao khoảng 10 - 12 cm được trồng trên các bầu đất được xử lý 10 ml huyền phù *B. amyloliquefaciens* EK2 với mật độ 10^8 CFU/ml. Đối chứng 1 chỉ xử lý nước, đối chứng 2 chỉ xử lý môi trường LB. Thí nghiệm gồm 3 nghiệm thức (2 nghiệm thức đối chứng và 1 nghiệm thức sử dụng vi khuẩn), được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại, mỗi lần lặp 10 bầu/nghiệm thức.

Chỉ tiêu theo dõi: chiều cao cây, đường kính thân, số cành cấp I, diện tích lá, trọng lượng thân tươi, trọng lượng thân khô, tỷ lệ tạo rễ, số rễ chính, chiều dài rễ, trọng lượng rễ tươi, trọng lượng rễ khô, Chlorophyll a+b, Chlorophyll a/b được ghi nhận sau 4 tháng trồng trong điều kiện vườn ươm.

Điều kiện nuôi cấy *in vitro*: Điều kiện phòng thí nghiệm với nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$, quang chu kỳ 16 h/

ngày, cường độ chiếu sáng $35 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ của ánh sáng huỳnh quang và độ ẩm trung bình 55 - 60%.

Điều kiện ngoài vườn ươm: Nhiệt độ 19 - 28°C, độ ẩm khoảng 70 - 80%, ánh sáng tự nhiên, che phủ 50% với cường độ ánh sáng thay đổi từ 50-550 $\mu\text{mol m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (đo từ 8 giờ sáng đến 17 giờ chiều).

2.2.3 Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu được xử lý thống kê bằng chương trình Statiscal Program Scienttific System (SPSS) phiên bản 22.0 trong Duncan's test (Duncan, 1955) với $P \leq 0,05$.

3. KẾT QUẢ - THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của dịch lọc *Bacillus amyloliquefaciens* EK2 đến sinh trưởng của cây

Bảng 1. Ảnh hưởng của dịch lọc *Bacillus amyloliquefaciens* EK2 đến sinh trưởng của cây Bạc hà trong điều kiện *in vitro* sau 4 tuần nuôi cấy

Nghiệm thức	% mẫu hình thành cụm chồi	Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)	% mẫu hình thành rễ	Số rễ	Chiều dài rễ (cm)	Trọng lượng tươi (mg)	Trọng lượng khô (mg)	Chlorophyll a+b (mg/g)	Chlorophyll a/b (mg/g)
C0	100	5,73 ± 0,37 ^c	8,50 ± 0,33 ^b	100	20,13 ± 0,39 ^b	1,49 ± 0,05 ^d	247,71 ± 4,99 ^e	23,70 ± 0,62 ^c	0,55 ± 0,02 ^c	1,44 ± 0,18 ^a
A1	100	6,33 ± 0,33 ^{bc}	7,24 ± 0,31 ^{cd}	100	19,67 ± 0,42 ^b	2,11 ± 0,06 ^{bc}	349,68 ± 5,97 ^f	37,41 ± 2,07 ^d	0,67 ± 0,03 ^{ab}	1,55 ± 0,21 ^a
A2	100	7,87 ± 0,48 ^a	9,43 ± 0,28 ^a	100	24,87 ± 0,53 ^a	2,54 ± 0,08 ^a	665,47 ± 16,07 ^a	50,17 ± 1,17 ^a	0,75 ± 0,03 ^b	1,45 ± 0,13 ^a
A3	100	6,53 ± 0,24 ^{bc}	8,19 ± 0,38 ^{bc}	100	20,53 ± 0,26 ^b	2,22 ± 0,04 ^b	624,07 ± 10,24 ^b	45,31 ± 0,44 ^b	0,65 ± 0,03 ^{ab}	1,75 ± 0,33 ^a
A4	100	7,20 ± 0,38 ^{ab}	7,48 ± 0,28 ^{cd}	100	19,27 ± 0,64 ^b	2,22 ± 0,05 ^b	606,45 ± 9,78 ^b	43,69 ± 1,30 ^b	0,70 ± 0,03 ^a	1,50 ± 0,12 ^a
A5	100	6,53 ± 0,41 ^{bc}	7,13 ± 0,35 ^d	100	20,40 ± 0,51 ^b	1,97 ± 0,05 ^c	439,42 ± 14,23 ^c	38,06 ± 1,31 ^c	0,78 ± 0,05 ^{ab}	1,19 ± 0,14 ^a

Chú thích: *Những chữ cái khác nhau (a, b, c) trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa với $P \leq 0,05$ trong Duncan's test.

Trọng lượng tươi của cây Bạc hà được nuôi cấy trên môi trường có bổ sung dịch lọc vi khuẩn khoảng 349,68 - 665,47 mg cao gấp 41,16 - 168,64% so với cây Bạc hà được nuôi cấy trên môi trường đối chứng MS $\frac{1}{2}$ (247,71 mg). Trọng lượng khô cây Bạc hà được nuôi cấy trên môi trường có bổ sung dịch lọc vi khuẩn từ 37,41 - 50,17 mg cao gấp 57,85 - 111,68% cây Bạc hà được nuôi cấy trên môi trường đối chứng (23,70 mg) (bảng 1).

Hàm lượng chlorophyll a + b khoảng 0,65 - 0,75 mg/g cao hơn so với đối chứng (0,58 mg/g) từ 19,38 - 36,93%. Tỷ lệ chlorophyll a/b không có sự khác biệt giữa các nghiệm thức.

Một số nghiên cứu về auxin tác động đến sự sinh trưởng của cây Bạc hà trong điều kiện *in vitro*: Gomes và cộng sự (2015) ghi nhận, việc bổ sung auxin vào môi trường không ảnh hưởng đến cảm ứng rễ cây Bạc hà. Tuy nhiên, IAA ở nồng độ 5 μM cho kết quả tốt nhất về chiều dài rễ và trọng

Bạc hà trong điều kiện *in vitro*

Sau 4 tuần theo dõi, kết quả cho thấy, ở tất cả các nghiệm thức có bổ sung hoặc không bổ sung dịch lọc vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* EK2 có nồng độ IAA khác nhau đều hình thành cụm chồi và rễ 100% (bảng 1, hình 1).

Số chồi, chiều cao chồi, số rễ, chiều dài rễ ở nghiệm thức A2 (môi trường có bổ sung dịch lọc vi khuẩn có nồng độ IAA 2mg/l) cao hơn các nghiệm thức còn lại lần lượt từ 9,26 - 37,22%, 10,98 - 32,24%, 21,10 - 29,07%, 14,41 - 70,8 (bảng 1).

Trọng lượng tươi, trọng lượng khô của cây Bạc hà được nuôi cấy trên môi trường có bổ sung dịch lọc vi khuẩn cũng cao hơn hẳn so với đối chứng.

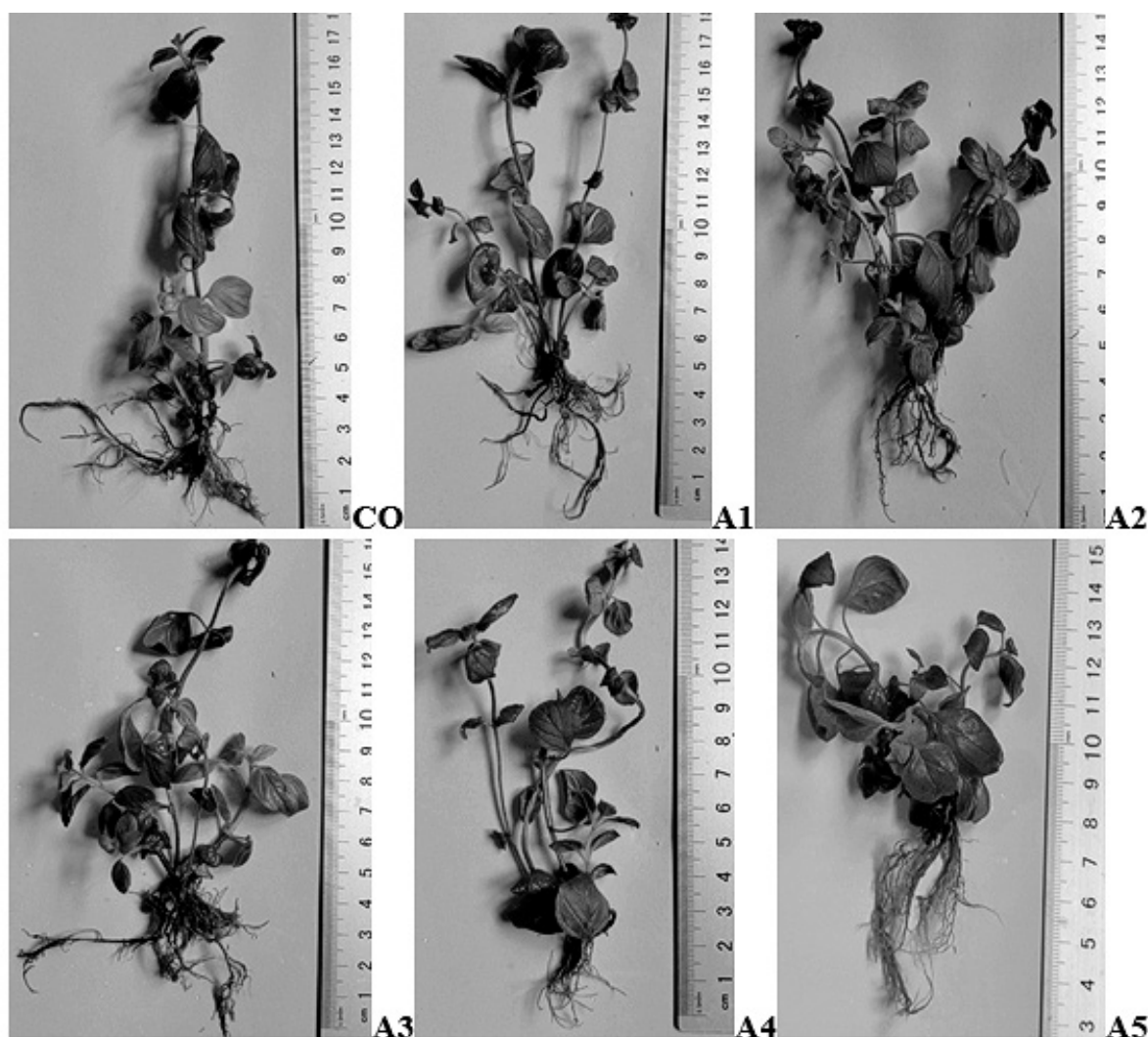
lượng tươi, trung bình lần lượt là 11,1 cm và 0,16 g. Lyczko và cộng sự (2020) ghi nhận, môi trường MS có bổ sung IBA 0,5 mg/l thích hợp cho sự sinh trưởng của cây Bạc hà (*Mentha piperita* L.), 100% mẫu đốt thân ra rễ. Raja và Arockiasamy (2008) vì nhân giống cây Bạc hà từ đốt thân (*Mentha viridis* L.) cho thấy, cây sinh trưởng và rễ được hình thành tốt trên môi trường MS có bổ sung 1,5 mg/l IBA. Ngoài nguồn auxin tổng hợp có tác động lên sinh trưởng của cây Bạc hà và một số loại cây khác trong điều kiện *in vitro*. IAA từ vi sinh vật cũng có tác động tương tự. Santoro và cộng sự (2015) nghiên cứu ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng thực vật từ *Pseudomonas* lên cây Bạc hà (*Mentha piperita*) trong điều kiện *in vitro* cho thấy 3 chủng *Pseudomonas putida* được phân lập từ đất trồng cây Bạc hà ở Córdoba, Argentina đều có khả năng phân giải phosphate và sinh tổng hợp IAA kích thích tăng trọng lượng thân tươi, trọng lượng rễ khô, số lá và

đốt thân của cây Bạc hà trong điều kiện *in vitro*. Vi khuẩn nội sinh *Bacillus megaterium* sinh IAA kích thích sự tăng trưởng của cây đậu cô ve trong nuôi cấy *in vitro* (Grunennvaldt và cộng sự, 2018).

Trần Thị Phương Hạnh và cộng sự (2014) nghiên cứu nuôi cấy quang tự dưỡng cây Bạc hà cho thấy, cây bạc hà nuôi cấy *in vitro* tăng trưởng tốt hơn trong điều kiện quang tự dưỡng (104%) so với cây nuôi cấy trong điều kiện quang dị dưỡng (truyền thống) với các chỉ tiêu chiều cao khoảng 7,47 – 7,53cm, chiều dài rễ từ 0,73 – 0,86 cm, khối lượng tươi khoảng 589,90 – 648,96 mg, trọng lượng khô khoảng 45,27 – 48,84 mg, hàm lượng

Chlorophyll a + b khoảng 3,33 - 4,05 mg/dm². So với nghiên cứu ảnh hưởng của dịch lọc vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* EK2 đến sinh trưởng của cây Bạc hà, kết quả nghiên cứu cho thấy, tác động của dịch lọc này và phương pháp nuôi cấy quang tự dưỡng cho kết quả tăng trưởng khá tương đương.

Như vậy, đốt thân Bạc hà tăng trưởng tốt hơn khi được nuôi cấy trên môi trường có bổ sung dịch lọc vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* EK2. Trong đó, cây Bạc hà được nuôi cấy trên môi trường có bổ sung dịch lọc vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* EK2 với nồng độ IAA 2mg/l sinh trưởng tốt hơn so với các nghiệm thức còn lại.



Hình 1. Cây Bạc hà sau 4 tuần nuôi cấy *in vitro*

Ghi chú: (C0: Đối chứng, A1: IAA 1 mg/l, A2: IAA 2 mg/l, A3: IAA 3 mg/l, A4: IAA 4 mg/l, A5: IAA 5 mg/l)

3.2. Ảnh hưởng của *Bacillus amyloliquefaciens* EK2 đến sinh trưởng của cây Bạc hà trong điều kiện *in vitro*

Bacillus có khả năng thúc đẩy sinh trưởng cũng như gia tăng hàm lượng tinh dầu trong lá của cây Bạc hà trong điều kiện vườn ươm. *Bacillus* có khả

năng kích thích sinh trưởng ở thực vật thông qua khả năng phân giải Phosphate, cố định đạm, sinh IAA và sản xuất các chất chuyển hóa thứ cấp bên trong tế bào thực vật (Prakash & Arora, 2019; Ahmad và cộng sự, 2018; Soumare và cộng sự, 2021).

Bảng 2. Ảnh hưởng của *B. amyloliquefaciens* EK2 đến sinh trưởng thân cây Bạc hà trong điều kiện *ex vitro* sau 4 tháng

Nghiệm thức	Chiều cao cây (cm)	Đường kính thân (mm)	Diện tích lá cm ²	Số cành cấp I	Trọng lượng thân tươi (g)	Trọng lượng thân khô (g)
ĐC1	50,49 ± 1,37 ^b	4,72 ± 0,17 ^a	12,62 ± 0,24 ^b	26,09 ± 0,85 ^b	52,37 ± 0,82 ^b	5,05 ± 0,09 ^a
ĐC2	57,92 ± 1,29 ^a	4,46 ± 0,19 ^a	16,28 ± 0,38 ^a	24,80 ± 0,69 ^b	54,55 ± 1,03 ^b	5,09 ± 0,19 ^a
B2	55,58 ± 0,94 ^a	4,85 ± 0,18 ^a	15,27 ± 0,63 ^a	30,63 ± 1,04 ^a	58,96 ± 0,70 ^a	5,50 ± 0,20 ^a

Chú thích: *Những chữ cái khác nhau (a, b, c) trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa với $P \leq 0,05$ trong Duncan's test.

Chiều cao cây và diện tích lá ở nghiệm thức có bổ sung vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* EK2 (B2) cao hơn đối chứng 1 và tương đương với đối chứng 2. Đường kính thân không có sự khác biệt giữa các nghiệm thức. Số cành cấp I, trọng lượng thân tươi có sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê. Các chỉ tiêu này tăng khi có bổ sung dịch nuôi cấy vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* EK2, số cành cấp I cao

hơn 2 nghiệm thức đối chứng từ 17,40 – 23,51%, trọng lượng thân tươi tăng từ 8,07 - 12,57%. Trọng lượng thân khô không có sự khác biệt so với các đối chứng (bảng 2).

Tương tự sự sinh trưởng thân, sự sinh trưởng rễ có kết quả tương tự. Số rễ chính và chiều dài rễ ở nghiệm thức có bổ sung vi khuẩn cao hơn đối chứng 1, tương đương với đối chứng 2 (bảng 3).

Bảng 3. Ảnh hưởng của *B. amyloliquefaciens* EK2 đến sinh trưởng rễ cây Bạc hà trong điều kiện *ex vitro* sau 4 tháng

Nghiệm thức	Số rễ chính	Chiều dài rễ (cm)	Trọng lượng rễ tươi (g)	Trọng lượng rễ khô (g)
ĐC1	6,93 ± 0,35 ^b	44,10 ± 1,62 ^b	54,77 ± 3,11 ^c	5,31 ± 0,32 ^b
ĐC2	8,57 ± 0,47 ^a	58,20 ± 2,64 ^a	61,02 ± 5,38 ^b	5,95 ± 0,52 ^b
B2	8,40 ± 0,31 ^a	57,57 ± 2,96 ^a	73,23 ± 3,01 ^a	7,01 ± 0,29 ^a

Chú thích: *Những chữ cái khác nhau (a, b, c) trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa với $P \leq 0,05$ trong Duncan's test.

Trọng lượng rễ tươi và trọng lượng rễ khô cao hơn hẳn so với 2 nghiệm thức đối chứng. Trọng lượng rễ tươi cao hơn từ 20,02 - 33,72%, Trọng lượng rễ khô từ 17,79 – 32,17% so với 2 đối chứng.

Hàm lượng Chlorophyll a+b trong lá cây Bạc hà giữa các nghiệm thức có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. Cây bạc hà trồng tại vườn ươm được xử

lý với dịch nuôi cấy vi khuẩn hầu hết đều có ảnh hưởng tích cực đến hàm lượng chlorophyll a + b so với hai nghiệm thức đối chứng ĐC1 và ĐC2. Nghiệm thức có bổ sung dịch nuôi cấy vi khuẩn có hàm lượng chlorophyll a + b cao (1,22 mg/g) tăng từ 27,07 - 91,33% so với nghiệm thức ĐC1 và ĐC2 (bảng 4).

Bảng 4. Ảnh hưởng của *B. amyloliquefaciens* EK2 đến một số chỉ tiêu sinh lý ở cây Bạc hà trong điều kiện vườn ươm sau 4 tháng

Nghiệm thức	Chlorophyll a+b (mg/g)	Chlorophyll a/b
ĐC1	0,61 ± 0,01 ^c	4,41 ± 0,37 ^a
ĐC2	0,92 ± 0,02 ^b	1,62 ± 0,08 ^b
B2	1,17 ± 0,03 ^a	1,34 ± 0,09 ^b

Chú thích: *Những chữ cái khác nhau (a, b, c) trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa với $P \leq 0,05$ trong Duncan's test.

Bên cạnh sự ảnh hưởng đến hàm lượng chlorophyll tổng số của cây Bạc hà, các chủng vi khuẩn cũng tác động đến tỷ lệ chlorophyll a/b. Kết quả thu được ở bảng 4 cho thấy, tỷ số chlorophyll a/b của các cây Bạc hà ở nghiệm thức bổ sung dịch nuôi cấy vi khuẩn là 1,34 thấp hơn so với đối chứng 1 (4,41). Như vậy, khi bổ sung dịch nuôi cấy vi khuẩn làm tăng khả năng diệp lục b. Tuy nhiên, nghiệm thức có bổ sung dịch nuôi cấy vi

khuẩn và đối chứng 2, tỷ lệ chlorophyll a/b không có sự khác biệt (bảng 4).

Nhìn chung, dịch nuôi cấy vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* EK2 có ảnh hưởng đến sinh trưởng của cây Bạc hà trong điều kiện vườn ươm, thể hiện rõ qua các chỉ tiêu theo dõi đều tăng như chiều cao cây, diện tích lá, số cành cấp 1, trọng lượng thân tươi, số rễ chính, chiều dài rễ, trọng lượng rễ tươi, trọng lượng thân khô, hàm lượng

chlorophyll tổng số (bảng 2, 3, 4; hình 2).

Các chủng *Bacillus* đã được chứng minh có khả năng thúc đẩy sự sinh trưởng, phát triển của nhiều loại cây trồng (Akinrinlola và cộng sự, 2018). Mười hai chủng *Bacillus* được phân lập từ rễ lúa mì đều có khả năng kích thích sự sinh trưởng của ngô, đậu tương và lúa mì trong điều kiện nhà kính. Trong đó bốn chủng hiệu quả nhất trên ngô,

đậu tương và lúa mì là *B. megaterium* R181, *B. safensis* R173, *B. simplex* R180 và *Paenibacillus graminis* R200. Santoro và cộng sự (2011) xác định được các hợp chất bay hơi từ các chủng vi khuẩn *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*, *Azospirillum brasilense* có khả năng kích thích sinh trưởng cũng như gia tăng hàm lượng tinh dầu, menthone trong cây Bạc hà.



Hình 2. Cây Bạc hà sau 4 tháng trồng trong điều kiện vườn ươm

4. KẾT LUẬN

Dịch lọc vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* EK2 với nồng độ IAA 2mg/l thích hợp cho sự sinh trưởng của cây Bạc hà trong điều kiện *in vitro* (tỷ lệ bật chồi và tạo rễ 100%, số chồi phát sinh 7,87 chồi/cụm, chiều cao chồi 9,43 cm, 24,87 rễ/chồi, chiều dài rễ 2,54 cm, trọng lượng tươi 665,47 mg/chồi, trọng lượng khô 50,17 mg/chồi, chlorophyll a+b 0,75 mg/g và tỷ lệ chlorophyll a/b là 1,45).

Dịch nuôi cấy vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* EK2 thúc đẩy sự sinh trưởng của cây Bạc hà trong điều kiện *ex vitro* (chiều cao cây 55,58 cm, đường kính thân 4,85 mm, diện tích lá 15,27 cm², 30,63 cành cấp I, trọng lượng thân tươi 58,96 g, trọng lượng thân khô 5,50 g, số rễ chính 8,40 rễ, chiều dài rễ 57,57 cm, trọng lượng rễ tươi 73,23 g, trọng lượng rễ khô 7,01 g, chlorophyll a+b 1,17 mg/g và tỷ lệ chlorophyll a/b là 1,34).

THE EFFECTS OF *Bacillus amyloliquefaciens* EK2 ON THE GROWTH OF MINT (*Mentha arvensis* L.) UNDER *IN VITRO* AND *EX VITRO* CULTIVATION CONDITIONS

Tran Thi Phuong Hanh², Trinh Thi Huyen Trang², Tran Thi Kim Thi², Le Thi Thu Sa²

Received Date: 26/11/2022; Revised Date: 07/12/2022; Accepted for Publication: 30/01/2023

SUMMARY

Mint (*Mentha arvensis* L.) is a valuable and potential source of medicinal herbs for developing health care and protection products. The demand for high-quality seedlings is increasing. Exploiting the potential benefits of plant growth-promoting microbes will reduce the production cost of Vitro plants

²Faculty of Natural Science and Technology, Tay Nguyen University;

Corresponding author: Tran Thi Phuong Hanh; Tel: 0988861311; Email: ttphanh@ttn.edu.vn

during micropropagation as a sustainable solution. In this initial study, filtered culture supernatants of *B. amyloliquefaciens* EK2 have IAA at concentrations from 1 – 5 mg/l and were used to promote the growth of mint *in vitro*. The results showed that these positively affect *in vitro* shoot and root growth efficiency. The best medium for the nodal shoot segments of mint growth was MS½ medium supplemented with filtered culture supernatant of *B. amyloliquefaciens* EK2, have IAA at concentrations of 2 mg/l. After four weeks of culture, the rate of budding and rooting shoots was 100%, the number of shoots reached 7.87 shoots/cluster, the high shoot length was 9.43 cm, the number of roots was 24.87 roots/bud, and root size was 2.54 cm in height, shoots cluster had the fresh weight 665.47 mg and the dried weight 50.17 mg, chlorophyll a+b was 0.75 mg/g, chlorophyll a/b was 1.45. The results also indicated that adding a 10 ml *B. amyloliquefaciens* EK2 cells suspension (108 CFU/ml) for each plantlet was suitable for the growth of the completed nurslings in *ex-vitro* conditions. The average growth indexes reached: a high stem length of 55.58 cm, stem diameter of 4.85 mm, leaf area of 15.27 cm², 30.63 main branches, a fresh stem weight of 58.96 g, the stem dried weight of 5.50 g, 8.40 primary roots, root size was 57.57 cm in length, the new root weight 73.23 g and the root dried weight 7.01 g, chlorophyll a+b was 1.17 mg/g, chlorophyll a/b was 1.34 after four months.

Keywords: *B. amyloliquefaciens*, *Mentha arvensis* L., *in vitro*, *ex vitro*, root, shoot.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tài liệu tiếng Việt

Mai Hải Châu, Nguyễn Thị Mai, Tường Thị Thu Hằng (2017). Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian thu hoạch đến sinh trưởng và năng suất tinh dầu bạc hà (*Mentha piperita* L.). *Tạp chí Khoa học và công nghệ lâm nghiệp* số 6 – 2017.

Nguyễn Anh Dũng, Nguyễn Văn Bốn, Trần Trung Dũng, Nguyễn Văn Nam, Nguyễn Đình Sỹ, Võ Thị Phương Khanh, Trần Thị Phương Hạnh, Trần Minh Định, Trịnh Thị Huyền Trang, Trương Hồng Hà, Trần Thị Huế, Nguyễn Thị Huyền, Mai Quốc Quân, Ngô Văn Anh (2020). Nghiên cứu ứng dụng các giải pháp Công nghệ Sinh học tổng hợp để phát triển hồ tiêu bền vững ở Tây Nguyên. *Nhà xuất bản Giáo dục Việt Nam*.

Đỗ Tất Lợi (2004). Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam. *Nhà xuất bản Y học*.

Trần Thị Phương Hạnh, Trịnh Thị Huyền Trang (2014). Nghiên cứu vi nhân giống quang tự dưỡng cây bạc hà (*Mentha arvensis* L.). *Tạp chí Trường ĐH Tây Nguyên*, số 12, ISSN 1859-4611, 31-38.

Tài liệu tiếng nước ngoài

Ahmad M., Ahmad I., Hilger T.H., Nadeem S.M., Akhtar M.F., Jamil M., Hussain A., Zahir Z.A. (2018). Preliminary study on phosphate solubilizing *Bacillus subtilis* strain Q3 and *Paenibacillus* sp. strain Q6 for improving cotton growth under alkaline conditions. *Peer J* 6:e5122, doi.org/10.7717/peerj.5122).

Akinrinlola R. J., Yuen G. Y., Drijber R. A., and Adesemoye A. O. (2018). Evaluation of Bacillus Strains for Plant Growth Promotion and Predictability of Efficacy by In Vitro Physiological Traits. *International Journal of Microbiology*, Volume 2018, Article ID 5686874, doi.org/10.1155/2018/5686874.

Galeotti N., Mannelli L. D. C., Mazzanti G., Bartolini A., and Ghelardini C. (2002). Menthol: a natural analgesic compound. *Neuroscience Letters*, vol. 322, pp. 145-148.

Gomes H. T., Bartos P.M.C., Martins A. E., Oliveira S. O. D., Scherwinski-Pereira J. E. (2015). Assessment of mint (*Mentha* spp.) species for large-scale production of plantlets by micropropagation. *Maringá*, v. 37, n. 4, p. 405-410.

Jeyakumar J. J., Kamaraj M., Srinivasan S., Thiruvengadam M (2014). In vitro propagation of *Mentha arvensis* L. and the studies of their antibacterial activities. *Journal of Antimicrobials*. Photon 129 (2014) 333-337.

Liang C., Wu R., Han Y., Wan T., Cai Y. (2019). Optimizing Suitable Antibiotics for Bacterium Control in Micropropagation of Cherry Rootstock Using a Modified Leaf Disk Diffusion Method and E Test. *Plants (Basel)*, 16;8(3):66,doi: 10.3390/plants8030066. PMID: 30884789; PMCID: PMC6473490.

Lyczko J., Piotrowski K., Kolasa K., Galek R., Szumnyl A. (2020). *Mentha piperita* L. Micropropagation and the Potential Influence of Plant Growth Regulators on Volatile Organic Compound Composition. *Molecules*, 25(11): 2652.

- Prakash J., & Arora N. K. (2019). Phosphate-solubilizing *Bacillus* sp. enhances growth, phosphorus uptake and oil yield of *Mentha arvensis* L. *3 Biotech*, 9(4), doi: 10.1007/s13205-019-1660-5.
- Grunenvaldt R., Degenhardt-Goldbach J., Tomas J.D.C., Tomasi C., (2018). *Bacillus megaterium*: an endophytic bacteria from callus of *Ilex paraguariensis* with growth promotion activities. *Biotechnología Vegetal*, Vol. 18, No. 1: 3 - 13, enero - marzo, 2018 Instituto de Biotecnología de las Plantas. UCLV. MES.eISSN 2074-8647, RNPS: 2154.
- Raja H. D., Arockiasamy D.I. (2008). In vitro Propagation of *Mentha viridis* L. from Nodal and Shoot tip Explants. *Plant Tissue Cult. & Biotech.* 18(1): 1-6, doi.org/10.3329/ptcb.v18i1.3243.
- Santoro M. V., Cappellari L. R., Giordano W., Banchio E. (2015). Plant growth-promoting effects of native *Pseudomonas* strains on *Mentha piperita* (peppermint): an in vitro study. *Plant Biology*, Plant Biol (Stuttg); 17(6):1218-1226, doi: 10.1111/plb.12351. Epub 2015 Jun 22.
- Santoro, M. V., Zygadlo, J., Giordano W., & Banchio E. (2011). Volatile organic compounds from rhizobacteria increase biosynthesis of essential oils and growth parameters in peppermint (*Mentha piperita*). *Plant Physiology and Biochemistry*, 49(10), 1177-1182.
- Soumare A., Diédhiou A.G., Arora N. K., Al-Ani L. K. T., Ngom M., Fall S., Hafidi M., Ouhdouch Y, Kouisni L., Sy M. O. (2021). Potential Role and Utilization of Plant Growth Promoting Microbes in Plant Tissue Culture. *REVIEW article Front. Microbiol.*, Sec. Microbe and Virus Interactions with Plants, doi.org/10.3389/fmicb.2021.649878.
- Suman S. (2017). Plant tissue culture: a promising tool of quality material production with special reference to micropropagation of banana. *Biochem. Cell. Arch*, 17, 1–26.
- Verma M., Mishra J., and Arora N. K. (2019). Plant growth-promoting rhizobacteria: diversity and applications in Environmental biotechnology: For sustainable future. eds. R. C. Sobti, N. K. Arora, and R. Kothari, *New Delhi: Springer*, 129–173.