



PHÂN LẬP VÀ XÁC ĐỊNH ĐẶC TÍNH VI KHUẨN NỘI SINH TRONG RỄ CÂY KHOAI LANG (*Ipomoea batatas*) TRỒNG TRÊN ĐẤT PHÈN Ở HUYỆN HÒN ĐẤT, TỈNH KIÊN GIANG

Cao Ngọc Điệp¹ và Nguyễn Thị Mộng Huyền²

¹ Viện Nghiên cứu & Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

² Học viên cao học Sinh Thái K19, Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận: 03/06/2014

Ngày chấp nhận: 26/02/2015

Title:

Isolation and characterization of endophytes in roots of sweetpotato cultivated on sulphate soil of Hon Dat District, Kien Giang Province

Từ khóa:

Cây khoai lang, cố định đạm, hòa tan lân, IAA, siderofores, vi khuẩn nội sinh

Keywords:

Endophytes, IAA, nitrogen fixation, phosphate solubilization, siderofores, sweet potato

ABSTRACT

Thirty six bacterial strains were isolated from samples of sweet potato roots in Hondat district, Kiengiang province. All isolated bacterial strains had rod shape and mobile. KL9, KL11, KL39a, KL39b endophytes with several good characteristics such as IAA biosynthesis, phosphate solubilization and fixing nitrogen were detected based on biochemical tests. KL9, KL39a, KL39b endophytes also had the ability to produce siderofores. Sequencing 16S-rDNA gene of these four endophytes indicated that KL9 had 99% identity with *Burkholderia sprentiae* and *Burkholderia vietnamiensis*, KL39a had 99% identity with *Burkholderia ambifaria* and *Burkholderia vietnamiensis*, KL39b had 99% identity with *Enterobacter ludwigii* and *Enterobacter cloacae*, KL11 had 99% identity with *Klebsiella pneumoniae* about 16S-rDNA gene. Interestingly, KL9, KL11, KL39a, KL39b endophytes had the best characteristics, they are suggested for biofertilizer production to apply to sweetpotato planted on sulphate soil of Hon Dat area.

TÓM TẮT

Ba mươi sáu dòng vi khuẩn được phân lập trên môi trường LGI từ các mẫu rễ cây khoai lang trồng ở huyện Hòn Đất, tỉnh Kiên Giang. Tất cả các dòng vi khuẩn này đều có dạng hình que và có khả năng chuyển động. Thực hiện các phép thử sinh hóa đã xác định được các dòng KL9, KL11, KL39a, KL39b là các vi khuẩn nội sinh có đủ 3 đặc tính tốt là cố định đạm, hòa tan lân khó tan, tổng hợp IAA; Ba dòng KL9, KL39a, KL39b còn có khả năng sản xuất siderofores. Khi giải trình tự đoạn gen 16S-DNA của 4 dòng vi khuẩn này, nhận diện được dòng KL9 có tỉ lệ đồng hình của đoạn gen 16S-DNA với loài *Burkholderia sprentiae* và *Burkholderia vietnamiensis* là 99%; tỉ lệ đồng hình đoạn gen 16S-DNA của dòng KL39a với loài *Burkholderia ambifaria* và *Burkholderia vietnamiensis* là 99%; tỉ lệ đồng hình đoạn gen 16S-rDNA của dòng KL39b với loài *Enterobacter ludwigii* và *Enterobacter cloacae* là 99%; tỉ lệ đồng hình đoạn gen 16S-DNA của dòng KL11 với loài *Klebsiella pneumoniae* là 99%. Bốn dòng vi khuẩn có các đặc tính tốt này được đề nghị đưa vào sản xuất phân vi sinh cho cây khoai lang trồng trên đất phèn vùng Hòn Đất.

1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Khoai lang (*Ipomoea batatas*) là cây lương thực được trồng từ lâu đời, có nguồn gốc từ khu vực nhiệt đới Nam Mỹ. Hiện nay, khoai lang được trồng rộng khắp trong các khu vực nhiệt đới và ôn đới ẩm với lượng nước đủ để hỗ trợ sự phát triển của nó (Thái Hà và Đặng Mai, 2011). Khoai lang là cây dễ nhân giống, sức sống mạnh, phát triển tốt trong đất cằn cỗi và nghèo nitơ; Hơn 95% diện tích khoai trên thế giới được trồng tại các quốc gia đang phát triển (Reiter *et al.* 2003). Ở nước ta, khoai lang là một trong ba loại cây lương thực hàng đầu và được trồng ở cả ba miền. Theo thống kê năm 2000 tổng diện tích khoai lang cả nước đạt 269.000 ha với năng suất 1.745.300 tấn, trong đó Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL) luôn dẫn đầu về năng suất (Mai Thạch Hoàn và Nguyễn Công Vinh, 2003). Theo thống kê của ngành Nông nghiệp năm 2012 các tỉnh ĐBSCL tăng diện tích trồng khoai lang lên 21.500 ha, nhiều nhất là Vĩnh Long, Đồng Tháp, Kiên Giang, Cần Thơ, Trà Vinh. Khoai lang dùng làm lương thực cho người, thức ăn chăn nuôi, nguyên liệu chế biến tinh bột, rượu, cồn, xi rô, nước giải khát, bánh kẹo, mì, miến, phụ gia thực phẩm, màng phủ sinh học. Khoai lang chế biến đem lại doanh thu cao, góp phần nâng tầm sản xuất khoai lang thành một sản phẩm nông nghiệp xanh trong cơ cấu nền nông nghiệp hàng hóa và phát triển bền vững. Ở Kiên Giang, cây khoai lang đã đóng góp một phần đáng kể vào GDP của tỉnh. Theo số liệu của Cục Thống kê tỉnh Kiên Giang năm 2010, tổng diện tích sản xuất khoai lang của tỉnh là 1.543 ha tập trung ở các huyện Giồng Riềng, Hòn Đất và rải rác ở các huyện khác trong tỉnh. Trong đó, Hòn Đất là huyện có vùng sản xuất khoai lang chuyên canh lớn nhất trong tỉnh với tổng diện tích sản xuất là 412 ha, tập trung ở các xã Mỹ Thái, Nam Thái Sơn, Mỹ Hiệp Sơn, Mỹ Thuận và riêng xã Mỹ Hiệp Sơn diện tích sản xuất khoai lang tập trung chủ yếu ở trang trại Ba Hạo.

Để có đủ sản lượng khoai lang đáp ứng nhu cầu trong nước và thế giới, tại vùng trồng khoai lang chuyên canh nông dân đã sử dụng một lượng lớn phân hóa học. Theo tính toán trung bình trên mỗi ha trồng trồng, để đạt năng suất 50 tấn/ha, khoai lang lấy từ đất khoảng 350 kgN-63 kgP-636 kgK cùng với các nguyên tố trung và vi lượng (Mai Thạch Hoàn và Nguyễn Công Vinh, 2003). Tuy nhiên, cây trồng chỉ sử dụng dưới mức phân nửa của lượng phân đã bón. Lượng khoáng chất còn lại có thể thấm vào nước ngầm, bị cố định trong đất, hoặc góp phần vào sự ô nhiễm không khí. Việc bón quá nhiều phân hóa học cho cây sẽ dẫn đến chi phí

cao, gây ô nhiễm môi trường và nghiêm trọng hơn là lượng hóa chất dư thừa sẽ tích lũy trong cây, tác động xấu đến sức khỏe con người và làm suy thoái hệ sinh thái nông nghiệp (Lê Văn Khoa và Trần Bá Linh, 2013). Đã có nhiều công trình nghiên cứu cho thấy việc sử dụng phân vi sinh có thể thay thế hoặc làm giảm sử dụng phân hóa học trong sản xuất nông nghiệp. Phân bón vi sinh chứa nhiều vi sinh vật có khả năng cố định đạm, hòa tan lân khó tan và tổng hợp Auxin cho cây, tham gia trực tiếp hay gián tiếp vào quá trình dinh dưỡng của cây, làm tăng quá trình trao đổi chất trong cây, từ đó tăng năng suất và chất lượng cây trồng. Phân vi sinh góp phần quan trọng trong việc bảo vệ môi trường, giảm chi phí sản xuất đồng thời nâng cao chất lượng sản phẩm nông nghiệp. Mục tiêu đề tài (i) Phân lập một số dòng vi khuẩn nội sinh trong rễ cây khoai lang trồng trên đất phèn ở huyện Hòn Đất, tỉnh Kiên Giang (ii) Xác định khả năng cố định đạm, hòa tan lân khó tan và tổng hợp IAA của các dòng vi khuẩn nội sinh phân lập được (iii) Xác định khả năng sản xuất siderofores của dòng vi khuẩn có cả 3 đặc tính: cố định đạm, hòa tan lân khó tan, tổng hợp IAA, (iv) Nhận diện một vài dòng vi khuẩn nội sinh có các đặc tính tốt bằng kỹ thuật PCR.

2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Phương tiện

Bảy mươi lăm mẫu đất và mẫu rễ củ khoai lang (thuộc nhiều giống khoai đang trồng) tại các xã Mỹ Thuận, Mỹ Hiệp Sơn, Mỹ Thái, Sơn Kiên, Nam Thái Sơn (mỗi xã thu tại 3 ấp và mỗi ấp thu 5 mẫu đất và rễ) thuộc huyện Hòn Đất, tỉnh Kiên Giang; đất trồng khoai lang có lý hóa tính thuộc nhóm đất phèn nhẹ (pH thấp, P dễ tiêu thấp trừ mẫu đất ở xã Sơn Kiên) nhưng N tổng số rất cao (Bảng 1).

2.2 Phân lập vi khuẩn

Để loại trừ các vi sinh vật có khả năng còn bám ở bề mặt, mẫu rễ, sau khi thu thập được xử lý như sau: rửa sạch mẫu dưới vòi nước mạnh; tiếp tục rửa lại bằng nước cất vô trùng rồi cắt mẫu thành những đoạn nhỏ 1 - 2 cm, làm khô mẫu bằng giấy hút ẩm; sau đó khử trùng mẫu bằng cồn 96% trong 3 phút, 1% hypochloride trong 3 phút, 3% hydrogen peroxide (H_2O_2) trong 3 phút và rửa lại với nước cất vô trùng 4 lần để tẩy rửa các loại hóa chất còn thừa. Để kiểm tra khả năng các vi sinh vật còn sót lại trên bề mặt mẫu sau khi khử trùng, 200 μ l nước cất vô trùng đã rửa mẫu ở lần cuối được chủng lên các đĩa môi trường tryptone – yeast extract – glucose – agar và ủ ở 30°C, nếu sau 24 giờ ủ các đĩa môi trường này không có các khuẩn lạc xuất

hiện thì các mẫu đã khử trùng đạt yêu cầu. Các mẫu đã khử trùng đạt yêu cầu được cho vào các cối bằng sứ đã khử trùng và dùng chày sứ vô trùng giã mịn mẫu, thêm 10 ml nước cất tiệt trùng, sau đó tất cả mẫu được cho vào một ống falcon-50 mL vô trùng. Lấy 200 µl dịch mẫu nghiên cho vào các ống nghiệm chứa 3 ml môi trường LGI (Cavalcante và Dobreiner, 1988) rồi đem ủ ở 30°C trong 2 - 3 ngày; mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần.

Bảng 1: Thành phần hóa lý tính của đất (phèn) trồng khoai lang ở các xã thuộc huyện Hòn Đất, tỉnh Kiên Giang

Địa điểm	pH	N tổng số (%)	P dễ tiêu (mgP ₂ O ₅ /kg đất)
Xã Sơn Kiên	4,56	0,52	146,01
Xã Mỹ Thái	4,42	0,35	73,83
Xã Mỹ Thuận	5,64	0,53	55,92
Xã Mỹ Hiệp Sơn	4,68	0,42	57,30
Xã Nam Thái Sơn	4,23	0,45	50,41

Sau 2 - 3 ngày nuôi, quan sát thấy các ống nghiệm chứa các môi trường bán đặc LGI, đã chủng dịch trích của mẫu xuất hiện một lớp màng mỏng cách mặt môi trường nuôi khoảng 0,5 cm chỉ thị có sự hiện diện của vi khuẩn nội sinh. Lấy một ít vi khuẩn từ các màng mỏng của các môi trường bán đặc LGI, lần lượt cấy chuyển sang các đĩa môi trường LGI đặc để tách dòng các khuẩn lạc. Sau vài lần cấy chuyển trên các môi trường đặc, chọn các khuẩn lạc rời và đều nằm trên đường cấy quan sát dưới kính hiển vi. Khi thấy vi khuẩn đã rỗng (thuần nhất) thì cấy chuyển sang ống nghiệm chứa môi trường đặc tương ứng để trừ ở 4°C và được xem như là một dòng (chủng [isolate]). Khi cấy chuyển vi khuẩn trên đĩa môi trường phân lập đặc đồng thời đo kích thước và quan sát hình thái các dạng khuẩn lạc bao gồm các chỉ tiêu: màu sắc, hình dạng, độ nổi và dạng bìa khuẩn lạc bằng mắt thường. Tuy nhiên, đối với những khuẩn lạc có kích thước quá nhỏ thì sử dụng kính lúp để quan sát.

2.3 Tách chiết DNA vi khuẩn

Qui trình được thực hiện theo Nguyễn Thị Thu Hà *et al.* (2009).

Kỹ thuật PCR

Để nhận diện vi khuẩn sống nội sinh trong cây, sử dụng các đoạn mồi 16S rDNA được thiết kế (Zinniel *et al.*, 2002) với trình tự như đã trình bày theo Nguyễn Thị Thu Hà *et al.* (2009).

Định lượng ammonium (khả năng cố định đạm)

Vi khuẩn được nuôi trong môi trường Burk's không có N đặc (Park *et al.*, 2005) và định lượng ammonium hình thành trong mẫu bằng phương pháp Phenol Nitro-prusside sodium hypochloride để xác định hàm lượng NH₄⁺ được tạo ra bằng phản ứng so màu ở bước sóng 640 nm. Mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần.

Định lượng lân hòa tan

Vi khuẩn được nuôi trong môi trường NBRIP (Nautiyal, 1999) và định lượng lân hòa tan bằng thuốc thử acid ascorbic - ammoniummolybdate - potassium antinomol tartrate và phương pháp so màu Oniani ở bước sóng 880 nm. Mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần.

Định lượng IAA

Vi khuẩn được nuôi trong môi trường bổ sung 100 mg/l tryptophan và định lượng bằng thuốc thử Salkowski R2 và phương pháp so màu ở bước sóng 530 nm. Mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần.

Đánh giá khả năng sản xuất siderophores

Nhận diện hợp chất siderophores dựa theo phương pháp do Schwyn và Neilands (1987) mô tả bằng cách chuẩn bị môi trường chorome azurol S (CAS) agar, nuôi cấy vi khuẩn trong môi trường PS, lắc 200 vòng trên phút, ở 30°C trong 24 giờ. Nhỏ giọt 50 µl dịch vi khuẩn trên môi trường chorome azurol (CAS) agar và ủ ở 30°C trong 48 giờ. Khi vi khuẩn sử dụng sắt trong môi trường thì màu xanh của môi trường CAS xung quanh khuẩn lạc không còn nữa. Thay vào đó, vòng sáng màu cam sẽ được tạo thành quanh khuẩn lạc, đó là do có sự hiện diện của siderophores.

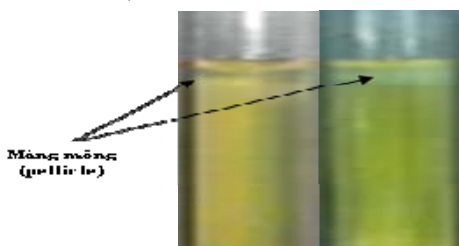
Giải trình tự DNA

Sử dụng đoạn mồi 1 p515FPL trong phản ứng PCR để nhận diện vi khuẩn nội sinh đã mô tả ở phần trên. Sản phẩm PCR được loại bỏ các hóa chất PCR còn lại trong ống nghiệm bằng EDTA và cồn để thu được sản phẩm DNA sạch. Sản phẩm DNA này được sử dụng giải trình tự bằng hệ thống máy giải trình tự động thông qua công ty MACROGEN (Hàn Quốc). Sử dụng chương trình BLAST N và Clustal W để so sánh trình tự các đoạn DNA của 3 dòng vi khuẩn với trình tự DNA của bộ gen ở các loài vi khuẩn có trong ngân hàng gen (NCBI) và vẽ cây phả hệ để định danh vi khuẩn.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Thu thập mẫu, phân lập và đặc điểm của các dòng vi khuẩn phân lập được

Từ các mẫu rễ cây khoai lang trồng ở những vùng đặc trưng của Hòn Đất tỉnh Kiên Giang, qua các giai đoạn phân lập và tách rỗng vi khuẩn trên môi trường LGI đã thu được 36 dòng vi khuẩn khác nhau. Các dòng vi khuẩn phân lập được đều có chung đặc tính là sinh trưởng và phát triển trong điều kiện vi hiếu khí trong môi trường LGI bán đặc, tạo thành lớp màng mỏng (pellicle) cách bề mặt môi trường 2-6 mm (Hình 1), kết quả này phù hợp với báo cáo của Cao Ngọc Diệp và Nguyễn Thành Dũng (2010) và Nguyễn Thị Thu Hà và *ctv.* (2009). Lớp màng mỏng hình thành trong môi trường bán đặc này có màu hơi trắng hoặc hơi vàng (Perin *et al.*, 2006).



Hình 1: Vi khuẩn sau 4-6 ngày nuôi cấy trong môi trường LGI bán đặc

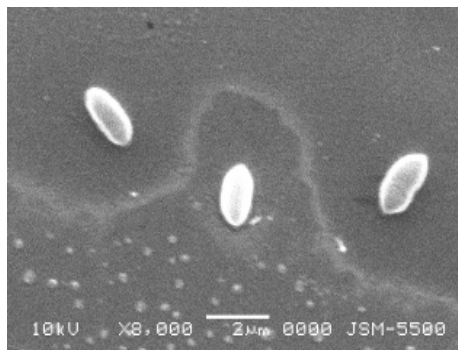
3.1.1 Đặc điểm các dòng vi khuẩn phân lập được

Các đặc điểm khuẩn lạc của các dòng vi khuẩn đã phân lập được mô tả sau 48 giờ cấy trên môi

trường phân lập LGI. Màu sắc khuẩn lạc của các dòng vi khuẩn phân lập được có màu trắng trong và trắng đục với tỉ lệ bằng nhau: trắng trong là 18 dòng, chiếm tỉ lệ 50% và trắng đục là 18 dòng, chiếm tỉ lệ 50%. Tất cả các dòng vi khuẩn phân lập được đều tạo khuẩn lạc dạng tròn chiếm tỉ lệ 100%. Phần lớn khuẩn lạc đều có độ nổi mô với 35 dòng chiếm tỉ lệ 97,2%; chỉ có dòng KL30a cho khuẩn lạc có độ nổi lồi chiếm tỉ lệ 2,8%. Tất cả khuẩn lạc đều có dạng bìa nguyên chiếm tỉ lệ 100%. Kích thước khuẩn lạc: Đường kính khuẩn lạc của 36 dòng vi khuẩn đã phân lập dao động từ 0,2-3,5 mm sau khi cấy trên môi trường đặc và ủ ở 30°C trong 24 giờ.

100% các dòng vi khuẩn phân lập được đều có dạng hình que và chuyển động trong đó vi khuẩn có dạng que ngắn chiếm phần lớn với 33/36 dòng chiếm tỉ lệ 91,7%; vi khuẩn có dạng que dài chiếm số lượng rất ít với 3/36 dòng chiếm tỉ lệ 8,3% (Hình 2).

Tất cả 36 dòng vi khuẩn phân lập được từ rễ cây khoai lang ở huyện Hòn Đất, tỉnh Kiên Giang đều có khả năng cố định đạm, hòa tan lân khó tan và tổng hợp IAA (Bảng 2). Có 10/36 dòng cố định đạm cao đó là các dòng KL4, KL9, KL11, KL30a, KL32b, KL35b, KL36b, KL38, KL39a, KL39b. Dòng vi khuẩn hòa tan lân khó tan cao có 10/36 dòng đó là các dòng KL6, KL9, KL11, KL20b, KL30b, KL31, KL33, KL36a, KL39a, KL39b. Có 9/36 dòng có khả năng tổng hợp IAA cao đó là các dòng KL9, KL30a, KL31, KL32a, KL11, KL20b, KL39a, KL39b, KL42b.



Hình 2: Dòng vi khuẩn KL9 ở độ phóng đại 6.000 lần và dòng vi khuẩn KL39b ở độ phóng đại 8.000 lần

Bảng 2: Khả năng tổng hợp NH₄⁺, hòa tan lân khó tan và tổng hợp IAA của các dòng vi khuẩn phân lập được

TT	Nhiệm thức	NH ₄ ⁺ (mg/L)	P ₂ O ₅ (mg/L)	IAA (mg/L)	TT	Nhiệm thức	NH ₄ ⁺ (mg/L)	P ₂ O ₅ (mg/L)	IAA (mg/L)
1	DC	0,000 o	0,00 l	0,000 m	20	KL36a	0,175 f	37,81 b	3,925 e
2	KL1	0,051 m	26,44 e	2,352 k	21	KL36b	0,265 c	16,06 h	3,530 fg
3	KL3	0,080 l	24,75 e	4,008 e	22	KL37	0,111 k	22,66 f	3,213 h
4	KL4	0,465 a	29,55 d	3,817 e	23	KL38	0,207e	19,72 g	3,690 f
5	KL5	0,054 m	18,98 g	3,863 e	24	KL42a	0,185 f	31,04 d	3,077 h
6	KL9	0,251 d	46,35 a	4,913 c	25	KL39b	0,289 b	39,42 b	5,222 b
7	KL6	0,125 h	38,29 b	3,429 g	26	KL22a	0,135 h	13,01 m	2,556 k
8	KL31	0,184 f	36,83 bc	5,266 b	27	KL22b	0,142 gh	25,70 e	2,423 k
9	KL32a	0,137 h	22,33 f	5,311 b	28	KL24	0,032 n	19,96 g	3,842 e
10	KL32b	0,220 e	17,28 gh	3,640 f	29	KL27	0,153 g	23,12 f	2,868 h
11	KL33	0,101 k	37,76 b	3,168 h	30	KL30a	0,208 e	15,11 k	5,097 bc
12	KL35a	0,155 g	16,93 h	2,526 k	31	KL30b	0,043 mn	35,73 c	2,630 k
13	KL35b	0,210 e	17,93 gh	1,869 l	32	KL40a	0,149 gh	22,64 f	2,990 h
14	KL11	0,209 e	39,57 b	4,673 cd	33	KL40b	0,100 k	29,50 c	3,727 f
15	KL12	0,131 h	28,67 d	3,842 e	34	KL41	0,105 k	15,92 f	2,870 h
16	KL18a	0,178 f	27,27 d	3,091 h	35	KL39a	0,248 d	47,15 a	5,741 a
17	KL18b	0,142 gh	28,79 d	3,394 gh	36	KL42b	0,064 m	18,19 g	4,447 d
18	KL20a	0,156 g	28,22 d	2,952 h	37	KL14	0,118 k	15,57 k	2,540 k
19	KL20b	0,134 h	35,97 bc	4,857 c		C.V (%)	10,60	10,07	9,40

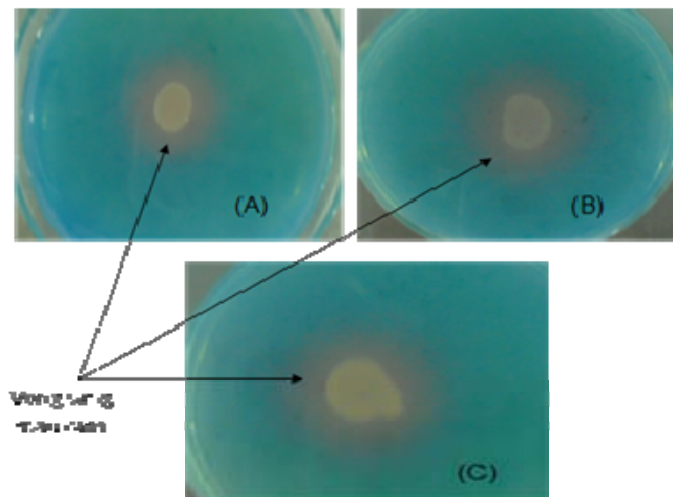
*Những số theo sau cùng một chữ không khác biệt ý nghĩa thống kê ở mức độ 1%

Căn cứ vào kết quả khảo sát các đặc tính tốt của 36 dòng vi khuẩn (cổ định đậm, hòa tan lân khó tan và tổng hợp IAA), chọn 4 dòng có cả 3 đặc tính trên đó là dòng KL9, KL11, KL39a và KL39b tiếp tục khảo sát khả năng sản xuất siderophores và giải trình tự đoạn 16S-rDNA.

Khả năng sản xuất siderophores

Trong số bốn dòng vi khuẩn có 3 dòng tạo được

vòng sáng và làm đổi màu môi trường CAS đó là dòng KL9, KL39a và KL39b với đường kính vòng sáng lần lượt là 1,8 cm, 2,5 cm và 2 cm (Hình 3); còn dòng KL11 không tạo vòng sáng trên môi trường CAS. Như vậy, ngoài các đặc tính tốt như cổ định đậm, hòa tan lân, tổng hợp IAA thì các dòng KL9, KL39a và KL39b còn có khả năng đối kháng thông qua sự cạnh tranh Fe₃⁺ với các vi sinh vật gây bệnh.



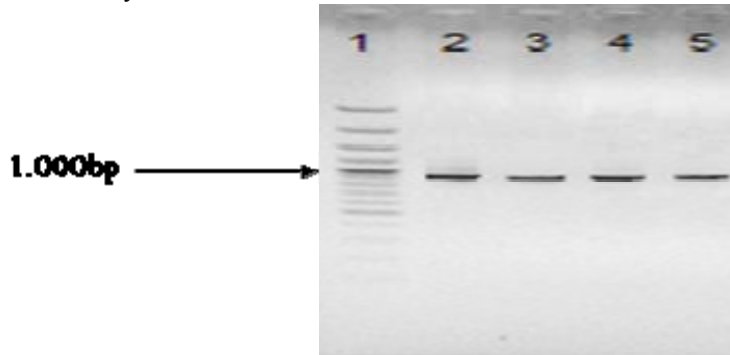
Hình 3: Khả năng sản xuất siderophores của các dòng vi khuẩn (mẫu chụp ngày 27.2.2014)

Dòng vi khuẩn KL9; (B) Dòng vi khuẩn KL39a; Dòng vi khuẩn KL39b

3.2 Nhận diện các dòng vi khuẩn nội sinh bằng 16S rDNA

Các dòng vi khuẩn KL9, KL11, KL39a, KL39b được ly trích DNA và tiến hành phản ứng PCR với 3 đoạn mồi 16S-rDNA (p515FPL, p13B và PCR-1) để nhận diện các dòng vi khuẩn này là vi khuẩn nội

sinh. Kết quả cho thấy cả 4 dòng vi khuẩn trên đều cho bank DNA ở vị trí khoảng 900 bp so với thang chuẩn 100 bp-plus, phù hợp với các kết quả nghiên cứu trước đây (Zinniel *et al.* 2002; Nguyễn Thị Thu Hà *et al.* 2009; Cao Ngọc Diệp và Nguyễn Thành Dũng, 2010) (Hình 4).



Hình 4: Phổ điện di DNA của các dòng vi khuẩn nội sinh

1: thang chuẩn 100 bp-plus; 2: dòng KL9; 3: dòng KL39a; 4: dòng KL39b; 5: dòng KL11

Kết quả giải trình tự và Blast các dòng vi khuẩn trên hàng gen của NCBI

Từ kết quả thực hiện phản ứng PCR và điện di trên agarose 1,2%, các sản phẩm PCR được tiến hành giải trình tự để nhận diện các dòng vi khuẩn KL9, KL11, KL39a, KL39b. Các trình tự gen này được so sánh với trình tự tương đồng trong ngân hàng gen của NCBI (Bảng 3).

Các loài *Burkholderia* sp. nhất là *Burkholderia vietnamiensis* là loài sống trong rễ lúa trồng ở Việt Nam (Gallis *et al.* 1995) và có khả năng cố định đạm giúp tăng năng suất lúa (Tran Van Van *et al.* 2000). *Burkholderia vietnamiensis* cũng được Ngô Thanh Phong và *ctv* (2010) phân lập và nhận diện trong đất vùng rễ lúa ở Kiên Giang và bằng phương pháp khử acetylen đã xác định khả năng cố định đạm của loài vi khuẩn này. Dòng vi khuẩn

Enterobacter cloacae, *Klebsiella pneumoniae* cũng được nhận diện là vi khuẩn nội sinh trong một số loài cỏ chăn nuôi (Nguyễn Thị Thu Hà *et al.* 2009) và có các đặc tính tốt như cố định đạm, hòa tan lân khó tan và tổng hợp kích thích tố thực vật từ đó kích thích sự tăng trưởng cây trồng; trong cây khóm trồng trên đất phèn ở Kiên Giang và Tiền Giang (Cao Ngọc Diệp và Nguyễn Thành Dũng, 2010; Trần Thanh Phong và Cao Ngọc Diệp, 2011). Các dòng vi khuẩn này có khả năng cố định đạm sinh học, hòa tan lân khó tan, tổng hợp IAA và đã được nghiên cứu để sản xuất phân hữu cơ-vi sinh bón cho cây khóm rất hiệu quả (Trần Thanh Phong và Cao Ngọc Diệp, 2011). Việc xác định trình tự gen *nifH* ở *Klebsiella pneumoniae* nội sinh trong cây khoai lang ở Châu Phi cho thấy khả năng cố định đạm của dòng vi khuẩn này (Reiter *et al.* 2003).

Bảng 3: Mối liên hệ di truyền giữa 4 dòng vi khuẩn đã phân lập với các dòng vi khuẩn trong ngân hàng gene của NCBI trên cơ sở gene 16S-rDNA bằng phần mềm BLAST N

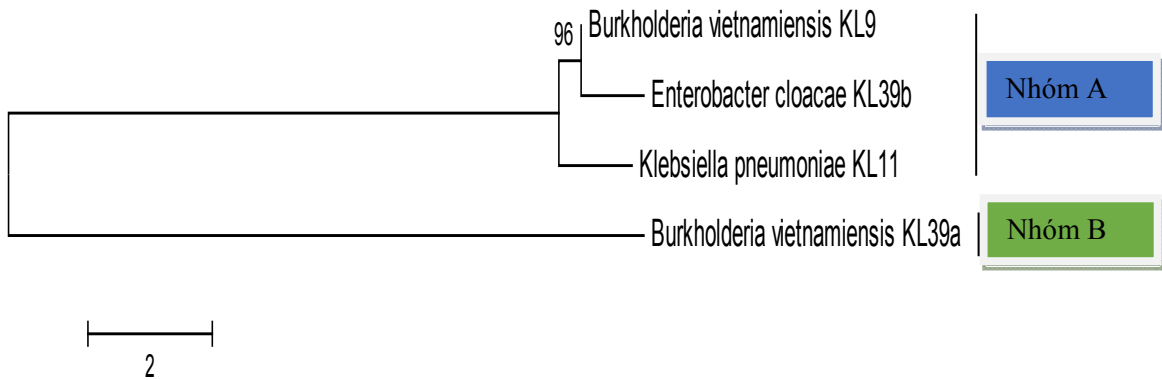
Dòng vi khuẩn phân lập	Dòng vi khuẩn đồng hình	Tỉ lệ đồng hình (%)
KL9	KF770980 <i>Burkholderia spreintiae</i> strain CPB PS	99
	JF922108 <i>Burkholderia vietnamiensis</i> strain C09V	99
KL39a	KF475832 <i>Burkholderia ambifaria</i> strain IHB B 1065	99
	KF114029 <i>Burkholderia vietnamiensis</i> strain AU4i	99
KL39b	KF724149 <i>Enterobacter ludwigii</i> strain PRFR10	99
	HF584967 <i>Enterobacter cloacae</i> , isolate BFDP-E22	99
KL11	JN384131 <i>Klebsiella pneumoniae</i> strain Q13	99
	HQ154568 <i>Klebsiella pneumoniae</i> strain R6-3A	99

Phân tích 4 chủng vi khuẩn này trong cây phá hệ cho thấy các dòng KL9, KL39b, KL11 cùng

nằm trên một nhánh của cây phá hệ nên có mối quan hệ gần gũi với nhau về mặt di truyền (nhóm

(cluster) A, Hình 5). Dòng KL39a ở một nhánh riêng trên phả hệ (nhóm B) chứng tỏ dòng này không có quan hệ gần gũi với các dòng trên. Hai dòng KL39a và KL39b tuy cùng có một nguồn gốc cây chủ ở xã Mỹ Hiệp Sơn và có khoảng cách địa

lý tương đối xa với hai dòng KL9, KL11 cùng ở xã Mỹ Thái nhưng 2 dòng này nằm ở 2 nhánh khác nhau của cây phả hệ và dòng KL39b lại ở cùng một nhánh với dòng KL9 và KL11



Hình 5: Cây phả hệ trình bày mối liên hệ di truyền của 4 dòng vi khuẩn với nhau dựa vào trình tự gene 16S-rDNA bằng phần mềm MEGA 6.06 (phương pháp Maximum -likelihood với 1500 lần lặp lại [bootstrap])

4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

4.1 Kết luận

Ba mươi sáu dòng vi khuẩn được phân lập từ các mẫu rễ cây khoai lang trồng trên đất phèn ở huyện Hòn Đất, tỉnh Kiên Giang. Tất cả đều có dạng hình que và có khả năng di động. Các dòng vi khuẩn này đều có khả năng tổng hợp ammonium, hòa tan lân khó tan và tổng hợp IAA. Ba dòng KL9, KL39a và KL39b còn có khả năng sản xuất siderophores.

Bằng kỹ thuật giải trình tự đoạn 16S-rDNA các dòng vi khuẩn KL9, KL39a, KL39b, KL11 tương đồng với các dòng *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia sprentiae*, *Burkholderia ambifaria*, *Enterobacter ludwigii*, *Enterobacter cloaca* và *Klebsiella pneumoniae* ở mức độ 99%.

4.2 Đề xuất

Xác định khả năng cố định đạm, hòa tan lân khó tan, tổng hợp IAA và sản xuất siderophores của các dòng vi khuẩn nội sinh trên cây khoai lang ở điều kiện nhà lưới hay ngoài đồng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Cao Ngọc Diệp và Nguyễn Thành Dũng. 2010. Đặc tính vi khuẩn nội sinh phân lập trong cây khóm trồng trên đất phèn Vĩnh

Thuận, tỉnh Kiên Giang. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ 15a: 54-63.

2. Cavalcante, Vladimir A. and J. Döbereiner. 1988. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant and Soil* 108: 23-31.
3. Gallis M., Tran Van V., Bardin R., Goor M., Hebbar P., William A., Segers P., Kersters, Heulin T., Fernander MP. 1995. Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. Nov. for N₂-fixing isolates from rice in Vietnam. *Int Syst Bacteriol*, 45: 274-289.
4. Lê Văn Khoa và Trần Bá Linh. 2013. Bạc màu đất và bảo tồn tài nguyên đất. Nhà xuất bản Đại học Cần Thơ. Trang 55-56.
5. Mai Thạch Hoàn và Nguyễn Công Vinh. 2003. Giống và kỹ thuật thâm canh cây có củ. Nhà xuất bản Nông nghiệp. Hà Nội. Trang 5-15.
6. Nautiyal, C.S. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 170: 265-270.
7. Ngô Thanh Phong, Nguyễn Thị Minh Thu và Cao Ngọc Diệp, 2010. Phân lập và nhận

- diện vi khuẩn cố định đạm vùng rễ lúa trồng trên đất phù sa tỉnh Kiên Giang. Tạp chí Công nghệ Sinh học. Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 8(3A): 1015-1020.
8. Nguyễn Thị Thu Hà, Hà Thanh Toàn và Cao Ngọc Diệp. 2009. Phân lập và đặc tính của những dòng vi khuẩn nội sinh trong một số cây cỏ chăn nuôi. Tạp chí Công nghệ sinh học 7(2): 241-250.
 9. Park, M., Kim, C., Yang, J., Lee, H., Shin, W., Kim, S. and Sa, T. 2005. Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. Microbiological Research, 160: 127-133.
 10. Perin, L., L. Martinez-Aguilar, R. Castro-Gonzalez, P. Estrada-de los Santos, T. Cabellos-Avelar, H. V. Guedes, V. M. Reis and J. Caballero-Mellado. 2006. Diazotrophic *Burkholderia* Species Associated with Field-Grown Maize and Sugarcane. Applied and Environmental Microbiology, 72(5): 3103-3110.
 11. Reiter, B., Burgmann, H., and Burg, K. 2003. Endophytic gene diversity in African sweet potato. Can J. Microbiol, 49: 549-555.
 12. Schwyn, B., and J.B. Neilands. 1987. Universal chemical assay of the detection and determination of siderophores. Analytical Biochem, 160: 47-56.
 13. Thái Hà và Đặng Mai. 2011. Kỹ thuật trồng và chăm sóc khoai lang. Nhà xuất bản Hồng Đức. Hà Nội. Trang 51-52.
 14. Trần Thanh Phong và Cao Ngọc Diệp. 2011. Hiệu quả của phân hữu cơ-vi sinh bón cho cây khóm trồng trên đất phèn huyện Tân Phước tỉnh Tiền Giang. Tạp chí Khoa học của Trường Đại học Cần Thơ, 19b: 179-186.
 15. Tran Van Van., Berge O., Ngo Ke S., Balandreau J., Heulin T., 2000. Repeated beneficial effects of rice inoculation with a strain of *Burkholderia vietnamiensis* on early and late yield components in low fertility sulphate acid of Vietnam. Plant Soil, 218: 273-284.
 16. Zinniel K.D., Lambrecht P., Haris N.B., Feng Z., Kuczmarski D., Higley P., Ishimaru C., Arunakumari A., Barletta G.R. and Vidaver A.K. 2002. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants, *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 2198-2208.