

PHÂN LẬP VÀ XÁC ĐỊNH ĐẶC TÍNH VI KHUẨN NỘI SINH TRONG CÂY KHÓM (*ANANAS COMOSUS* [L.] TRỒNG TRÊN ĐẤT PHÈN THỊ XÃ VỊ THANH, TỈNH HẬU GIANG

Cao Ngọc Diệp, Phan Thị Nhã

Viện Nghiên cứu và phát triển Công nghệ sinh học, Đại học Cần Thơ

TÓM TẮT

Cây Khóm (*Ananas comosus* L.) là một loại cây ăn quả nhiệt đới, trồng trên đất phèn ở đồng bằng sông Cửu Long rất phổ biến, năng suất cao nhưng nó phải cần nhiều phân bón hóa học nhất là phân đạm vô cơ, mục đích thí nghiệm là phân lập, tuyển chọn dòng vi khuẩn nội sinh có đặc tính tốt để sản xuất phân sinh học bón cho cây khóm trồng trên đất phèn. Kết quả cho thấy một trăm hai mươi một dòng vi khuẩn được phân lập từ rễ, thân, lá, cuống quả và quả cây khóm trồng trên đất phèn thị xã Vị Thanh, tỉnh Hậu Giang. Một trăm mười ba dòng vi khuẩn được xác định là vi khuẩn nội sinh bằng kỹ thuật PCR 16S-rDNA. Dùng các phép thử sinh hóa đã xác định được 45/113 dòng vi khuẩn nội sinh có ba đặc tính tốt như cố định đạm, hòa tan lân, tổng hợp IAA. Giải trình tự 2/45 dòng vi khuẩn nội sinh và sử dụng phần mềm BLAST N để so sánh trình tự các dòng vi khuẩn có trong ngân hàng dữ liệu NCBI. Kết quả cho thấy dòng L13; Dòng B3 có tỉ lệ đồng hình với dòng *Burkholderia tropica* NR_028965 là 99,4 và 99%, theo thứ tự trong đó dòng L13 có 3 vị trí không trùng với dòng chuẩn và dòng B3 có 5 vị trí không trùng với dòng chuẩn [*Burkholderia tropica* NR_028965]. Hai dòng vi khuẩn nội sinh này được đề nghị đưa vào sản xuất phân sinh học bón cho cây khóm.

Từ khóa: *Burkholderia tropica*, cố định đạm sinh học, hòa tan lân, IAA, vi khuẩn nội sinh

ĐẶT VẤN ĐỀ

Khóm (*Ananas comosus* L. Merr) hay còn gọi là dứa, là cây ăn quả nhiệt đới. Thịt quả có màu vàng đẹp, mùi thơm mạnh, vị ngọt, hơi chua và có các loại vitamin. Diện tích trồng khóm cả nước tính đến năm 2006 là 43.200 ha với sản lượng 534.300 tấn. Trong đó, Đồng Bằng Sông Cửu Long là 21.300 ha với sản lượng 305.600 tấn, chiếm khoảng 57,20% sản lượng khóm cả nước. Riêng Hậu Giang có khoảng 1.400 ha với sản lượng 14.600 tấn. Theo tính toán, trung bình trên mỗi ha trồng trọt, khóm lấy từ đất 86 kg N, 28 kg P₂O₅ và 437 kg K₂O cùng với các nguyên tố trung và vi lượng (Nguyễn Mạnh Chính, Nguyễn Đăng Nghĩa, 2006). Vi khuẩn nội sinh giúp tăng cường sinh trưởng của cây bằng cách tổng hợp kích thích tố auxin (IAA) và gibberellin (Bastian *et al.*, 1998), tăng năng suất, tăng hàm lượng chất khoáng, tăng khả năng kháng bệnh của cây, cố định đạm sinh học, giảm tính mầm cảm với mầm bệnh và sự thay đổi của thời tiết gây tổn hại cho cây (Park *et al.*, 2005), hòa tan lân dạng khó tan và các chất dinh dưỡng khác, loại bỏ chất ô nhiễm trong đất (Rosenblueth, Martinez-Romero, 2006). Để tiến tới một nền

nông nghiệp bền vững với một sản phẩm đạt tiêu chuẩn Global-GAP, cây khóm, với giống khóm CÀU ĐÚC nổi tiếng, trồng trên đất phèn như vùng đất Hòa Tiến, Hòa Lựu (Vị Thanh), Hậu Giang cần được nghiên cứu những vi khuẩn nội sinh, xác định và đánh giá một số đặc tính tốt như cố định đạm sinh học, hòa tan lân khó tan, sinh tổng hợp kích thích tố tăng trưởng thực vật như IAA của các dòng vi khuẩn nội sinh này để ứng dụng những vi khuẩn nội sinh tốt cho cây trồng như là dạng phân sinh học trong tương lai.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Cây khóm (*Ananas comosus* [L.] Merr) được thu mẫu từ các vùng chuyên canh thuộc hai xã Hòa Tiến và Hòa Lựu, thị xã Vị Thanh - tỉnh Hậu Giang.

Phân lập vi khuẩn

Để loại trừ các vi sinh vật có khả năng còn bám ở bề mặt, mẫu (thân, rễ, lá, hoa/trái) sau khi thu thập được xử lý như sau: tách bỏ lớp vỏ ngoài (bẹ lá) của phần thân, 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 h ở 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-50ml vô trùng. Lấy 200 μ l dịch mẫu nghiền cho vào các ống nghiệm chứa 3 ml môi trường LGI (Cavalcante, Dobreiner, 1988), Nfb (Krieg, Döbereiner, 1984) và BAZ bán đặc (Reis *et al.*, 2004) rồi đem ủ ở 30°C trong 2 - 3 ngày; mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần. Sau 2 - 3 ngày nuôi, quan sát thấy các ống nghiệm chứa các môi trường bán đặc LGI, Nfb và BAZ đã chủng dịch trích của mẫu xuất hiện một lớp màng mỏng cách mặt môi trường nuôi khoảng 0,5 cm chỉ thị độ sự hiện diện của vi khuẩn nội sinh. Lấy một ít vi khuẩn từ các màng mỏng của các môi trường bán đặc LGI, Nfb và BAZ lần lượt cấy chuyển sang các đĩa môi trường LGI, Nfb và BAZ 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 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. 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; Những khuẩn lạc có kích thước quá nhỏ thì sử dụng kính lúp để quan sát.

Tách chiết DNA vi khuẩn

Phương pháp trích DNA của vi khuẩn được giới thiệu trong bài báo này dựa trên qui trình chuẩn của Neumann và đồng tác giả (1992). Nuôi vi khuẩn trong 6 ml môi trường LB (Luria Broth) nuôi qua đêm. Chuyển 2 ml dung dịch vi khuẩn

vào tuyp 2,2 ml. Ly tâm 13.000 rpm trong 5 phút. Loại bỏ phần trong, hòa tan cặn với 250 μ l dung dịch TE pH8. Thêm 50 μ l dung dịch 10% SDS cộng 5 μ l Proteinase K (20mg/l). Ủ 20 phút trong 65°. Thêm 400 μ l 10% CTAB/0.7 M NaCl, trộn đều. Ủ ở 65° trong 20 phút. Thêm 600 μ l chloroform:isoamyl alcohol (24/1). Trộn đều và ly tâm ở 12.000 vòng trong 10 phút. Dùng pipet chuyển phần trong phía trên vào tuyp mới và thêm 1 ml isopropanol, lắc đều, giữ ở -20°C ít nhất 30 phút. Ly tâm trong 10 phút tại 13.000 rpm. Rửa với 1 ml ethanol 70%, ly tâm ở 12.000 rpm trong 5 phút, làm 2 lần. Phơi khô ADN ở nhiệt độ phòng trong 1 - 2 h. Hòa tan trong 30 μ l nước cất.

Phản ứng PCR

Zinniel và đồng tác giả (2002) đã sử dụng các đoạn mỗi 16S rDNA đặc trưng (vì có theo mỗi thứ 3) để nhận diện 853 vi khuẩn sống nội sinh trong 4 loại cây trồng và 27 loài cây đồng cỏ rất thành công, với trình tự như sau:

Mỗi 1: p515FPL: 5'- GTG CCA GCA GCC GCG GTA A -3' (Relman *et al.*, 1992);

Mỗi 2: p13B: 5'- AGG CCC GGG AAC GTA TTC AC -3' (Relman *et al.*, 1990);

Mỗi 3: PCR-1: 5'- AGT TTG ATC CTG GCT CAG GA -3'.

Phản ứng PCR: 94°C/4 phút; 35 chu kỳ: (94°C/45 giây, 55°C/45 giây, 72°C/1 phút); 72°C/7 phút.

Sản phẩm PCR sẽ hiện diện trên phở điện di agarose ở kích thước khoảng 900 bp.

Định lượng ammonium (khả năng cố định đạm)

Vi khuẩn được nuôi trong môi trường Burk's không có N lỏng (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 NH_4^+ được tạo ra bằng phản ứng so màu ở bước sóng 640 nm.

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.

Định lượng lần hòa tan

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

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 tinh sạch theo kit Invitrogen. Sản phẩm DNA này được sử dụng giải trình tự bằng hệ thống máy giải trình tự tự động ABI 3130. Sử dụng chương trình BLAST N 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).

KẾT QUẢ và THẢO LUẬN

Phân lập vi khuẩn nội sinh

Phân lập 121 dòng vi khuẩn từ 36 mẫu khóm (11 mẫu rễ, 11 mẫu thân, 7 mẫu lá, 3 mẫu cuống quả, 4 mẫu quả) trồng trên đất phèn thị xã Vị Thanh tỉnh Hậu Giang. Trong đó, 39 dòng được phân lập trên môi trường LGI, 40 dòng được phân lập trên môi trường NFb và 42 dòng được phân lập trên môi trường BAZ. Phần lớn vi khuẩn sống nội sinh trong rễ, một số ít phân tán ở thân và lá, phân tán rất ít ở cuống quả và quả khóm. 53/121 dòng vi khuẩn được phân lập từ rễ khóm (43,80%); 39/121 dòng vi khuẩn được phân lập từ thân khóm (32,23%); 21/121 dòng vi khuẩn được phân lập từ lá khóm (17,35%); 4/121 dòng vi khuẩn được phân lập từ cuống quả khóm (3,31%) và 4/121 dòng vi khuẩn được phân lập từ quả khóm (3,31%).

Đặc điểm khuẩn lạc và tế bào

Bốn ngày sau khi chủng dịch trích mẫu vào các ống nghiệm chứa môi trường LGI (hay NFb, hay BAZ) bán đặc và ủ ở 30°C, vi khuẩn phát triển và sinh trưởng trong điều kiện vi hiếu khí tạo thành một lớp màng mỏng (pellicle) cách bề mặt môi trường 2 - 4 mm.

Sau 6 - 8 ngày nuôi cấy, vi khuẩn tăng trưởng làm pH môi trường tăng lên chuyển dần màu môi trường (Bromothymol blue) sang màu xanh dương, mức độ đậm hay nhạt tùy thuộc vào

từng dòng vi khuẩn và pH của môi trường. Sự biến đổi màu môi trường nuôi cấy thể hiện rõ nhất trên môi trường NFb. Bên cạnh đó cũng có một số dòng vi khuẩn phát triển bình thường không làm thay đổi pH môi trường (L6, L36, B18, L23, B38, B33).

Một trăm phần trăm các dòng vi khuẩn phân lập được đều có dạng hình que ngắn và có khả năng chuyển động trong đó, 57/121 dòng vi khuẩn có khả năng chuyển động rất nhanh (chiếm 47,11%); 42/121 dòng vi khuẩn có khả năng chuyển động nhanh (chiếm 34,71%) và có 22/121 dòng vi khuẩn có khả năng chuyển động chậm (chiếm 18,18%),

Một số đặc tính của một số dòng vi khuẩn nội sinh trong cây khóm

Khả năng cố định đạm

Kết quả có 109/113 dòng phát triển trên môi trường Burk không đạm đặc (môi trường LGI có 36 dòng; môi trường NFb có 37 dòng; môi trường BAZ có 36 dòng). Chọn 15 dòng vi khuẩn phát triển mạnh trên 3 môi trường (Burk không đạm, NBRIP, LGI bổ sung tryptophan) đặc đem nuôi trong môi trường Burk không đạm lỏng. Đa số các dòng vi khuẩn được phân lập trên môi trường LGI có khả năng tổng hợp NH₄⁺ cao hơn rất nhiều so với các dòng vi khuẩn được phân lập trên môi trường NFb và BAZ. Hầu hết các dòng vi khuẩn tổng hợp đạm đạt mức cao nhất sau 4-6 ngày nuôi rồi giảm dần ở những ngày nuôi tiếp theo, tuy nhiên 6 dòng L1, L3, L5, L7, N13, B3 đạt mức cao nhất sau 2 ngày nuôi và sau đó giảm dần ở những ngày nuôi tiếp theo. Kết quả sau cùng cho thấy 16/45 dòng vi khuẩn nội sinh có khả năng cố định đạm tốt trong đó có 10 dòng được phân lập trên môi trường LGI (L1, L3, L4, L5, L6, L7, L10, L12, L13, L14), 3 dòng được phân lập trên môi trường NFb (N3, N7, N12) và 3 dòng được phân lập trên môi trường BAZ (B3, B4, B7).

Khả năng hòa tan lân khó tan

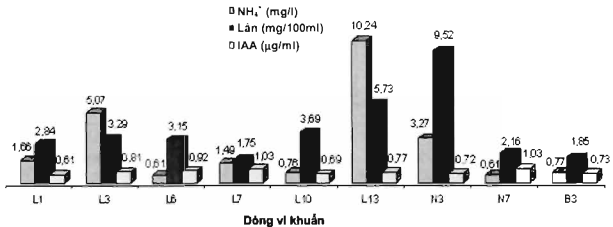
Sau khi xác định khả năng cố định đạm của 45 dòng vi khuẩn được chọn ở trên, tiếp tục nuôi các dòng vi khuẩn này trong môi trường NBRIP lỏng (Nautiyal, 1999); Phần lớn các dòng vi khuẩn có khả năng hòa tan lân khó tan tăng dần theo thời gian và đạt đỉnh cao nhất sau 5-10 ngày nuôi, sau đó giảm dần ở những ngày nuôi tiếp theo, chỉ riêng dòng N5 đạt đỉnh sau 15 ngày

nuôi. Kết quả cho thấy 15/45 dòng vi khuẩn nội sinh có khả năng hòa tan lân khó tan rất cao. Trong đó, 8 dòng được phân lập trên môi trường LGI (L2, L3, L4, L6, L9, L10, L13, L15), 2 dòng được phân lập trên môi trường NFb (N3, N5) và 5 dòng được phân lập trên môi trường BAZ (B5, B9, B10, B12, B14).

Khả năng tổng hợp indol-3-acetic acid (IAA)

Sau khi xác định khả năng cố định đạm và hòa tan lân khó tan của 45 dòng vi khuẩn được chọn ở trên, tiếp tục nuôi các dòng vi khuẩn này trong môi trường LGI, NFb, BAZ lỏng bổ sung tryptophan (100 mg/l), theo dõi và đo hàm lượng IAA được tạo ra ở thời điểm 2, 4, 6, 8 ngày. Kết quả là tất cả 45 dòng vi khuẩn nội sinh được

chọn khảo sát trong đó 25/45 dòng vi khuẩn nội sinh có khả năng tổng hợp IAA khá cao với 9 dòng được phân lập trên môi trường LGI (L3, L4, L5, L6, L7, L10, L11, L13, L15), 11 dòng được phân lập trên môi trường NFb (N1, N3, N4, N5, N6, N7, N9, N10, N12, N13, N15) và 5 dòng được phân lập trên môi trường BAZ (B1, B2, B3, B6, B12). Chọn lọc lần cuối có 9 dòng vi khuẩn nội sinh có khả năng cố định đạm tối nhất đồng thời các dòng vi khuẩn này cũng có khả năng hòa tan lân khó tan, tổng hợp IAA khá tốt so với các dòng vi khuẩn khác (Hình 1) bao gồm 6 dòng được phân lập trên môi trường LGI (L1, L3, L6, L7, L10, L13), 2 dòng được phân lập trên môi trường NFb (N3, N7) và 1 dòng được phân lập trên môi trường BAZ (B3).



Hình 1. Chín dòng vi khuẩn nội sinh có khả năng cố định đạm, hòa tan lân và tổng hợp IAA tốt.

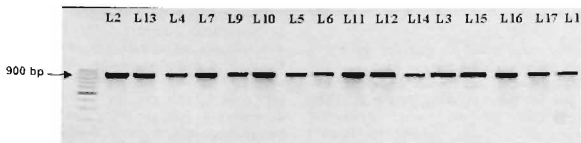
Thu nhận các phân đoạn 16S rDNA

Khi phân tích PCR với 3 đoạn mỗi 16S rDNA (p515FPL, p-13B và PCR-1) để nhận diện các dòng vi khuẩn nội sinh, 113 dòng vi khuẩn cho băng DNA ở vị trí khoảng 900 bp so với thang chuẩn (Hình 2), phù hợp với kết quả nghiên cứu của Zinniel và đồng tác giả (2002) khi nhận diện được 853 dòng vi khuẩn nội sinh trong 4 loại cây trồng và 27 loại cây đồng cỏ và những kết quả trước đây của chúng tôi nhận diện vi khuẩn nội sinh trong cây cỏ chăn nuôi (Nguyễn Thị Thu Hà *et al.*, 2009). Trong số 113 dòng vi khuẩn nội sinh đã nhận diện, có 39 dòng được phân lập trên môi trường LGI, 37 dòng

được phân lập trên môi trường NFb và 37 dòng được phân lập trên môi trường BAZ.

Nhận diện hai dòng vi khuẩn nội sinh tiêu biểu

Từ kết quả Hình 5, hai dòng L13 và B3 được chọn giải trình tự để định danh vi khuẩn đại diện trong cây khóm trồng trên đất phèn thị xã Vĩ Thanh tỉnh Hậu Giang. Các đoạn DNA của sản phẩm PCR được giải trình tự với kết quả dòng L13 (617 bp) tương đồng 99,4% và dòng B3 (516 bp) tương đồng 99% với trình tự DNA của vi khuẩn *Burkholderia tropica* NR28965 trong đó dòng L13 có 3 vị trí không trùng với dòng chuẩn và dòng B3 có 5 vị trí không trùng với dòng chuẩn (Hình 3).



Hình 2. Phổ điện di sản phẩm PCR được nhân lên từ DNA của các dòng vi khuẩn nội sinh phân lập trên môi trường LGI (Marker 100 bp)

```

                10      20      30      40      50      60
Burkholderia tropica NR_028965  GTAAAGACCGA TGTGAAATCC CCGGGCTCAA CCTGGGAACT GCATTGGTGA CTCGATCGCT
Dong L13
Dong B3

                70      80      90      100     110     120
Burkholderia tropica NR_028965  TGAGTATGGC AGAGGGGGGT AGAATTCAC  GTGTAGCAGT GAAATGCGTA GAGAT-GTGG
Dong L13
Dong B3

                130     140     150     160     170     180
Burkholderia tropica NR_028965  AGGAATACCG ATGGCGAAGG CAGCCCTCG  GGTCAATACT GACGCTCATG CACGAAAGCG
Dong L13
Dong B3

                190     200     210     220     230     240
Burkholderia tropica NR_028965  TGGGAGCAA  ACAGGATTAG ATACCTTGGT AGTCCAGCC  CTAACGATG  TCAACTGGTT
Dong L13
Dong B3

                250     260     270     280     290     300
Burkholderia tropica NR_028965  GTCGGGTCTT CATTGACTTG GTAACGTAGC TAACGGTGA  AGTTGACCG  CTCGGGAGTA
Dong L13
Dong B3

                310     320     330     340     350     360
Burkholderia tropica NR_028965  CCGTCGCAAG ATTAATAACTC AAAAGAAATG ACGGGGACCC GCACAAGCG  TGGATGATGT
Dong L13
Dong B3

                370     380     390     400     410     420
Burkholderia tropica NR_028965  GGATTAATTC GATGCAACGC GAAAACCTT  ACCTACCCTT GACATGTACG GAATTCGCT
Dong L13
Dong B3

                430     440     450     460     470     480
Burkholderia tropica NR_028965  GAGAGGTGGA AGTGCCCGAA AAGGAGCCGT AACACAGGTG CTGCATGGCT GTGTCAGCT
Dong L13
Dong B3

                490     500
Burkholderia tropica NR_028965  CGTGTCGTGA GATGTTGGGT TAAGTC
Dong L13
Dong B3
    
```

Hình 3. So sánh trình tự đoạn DNA của dòng L13 và B3 với dòng chuẩn *Burkholdena tropica* NR28965.

THẢO LUẬN

Như những nghiên cứu trước đây phát hiện vi khuẩn nội sinh sống trong mô thực vật, chúng không hại đến cây chủ chỉ thúc đẩy sự phát triển của thực vật mà chúng sống (Sturz *et al.*, 2000); nhiều loài có ích như *Azospirillum*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Burkholderia*, *Herbaspirillum*.... có khả năng cố định nitơ (Rheinold *et al.*, 1986; Cavalcante, Dobreiner, 1988; Weber *et al.*, 1999; Elbeltagy *et al.*, 2001). Kết quả mà chúng tôi phát hiện cũng phù hợp với nghiên cứu của một số tác giả (Sturz *et al.*, 1997; Weber *et al.*, 1999; Hernandez *et al.*, 2000; Cruz *et al.*, 2001; Rosenblueth, Martinez-Romero, 2004; 2006; Cao Ngọc Diệp *et al.*, 2007; Nguyễn Thị Thu Hà *et al.*, 2009). Chúng có thể không làm thay đổi pH môi trường hay làm chuyển hóa pH môi trường kiềm hơn tương tự với những mô tả của Baldani và đồng tác giả (2000), Cruz và đồng tác giả (2001), Cao Ngọc Diệp và đồng tác giả (2007), Nguyễn Thị Thu Hà và đồng tác giả (2009).

Bốn mươi lăm dòng vi khuẩn được khảo sát đều có khả năng cố định đạm, kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Weber và đồng tác giả (1999), Hernandez và đồng tác giả (2000), Cruz và đồng tác giả (2001). Chúng đều có khả năng hòa tan lân khó tan, kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Kuklinsky-Sobral và đồng tác giả (2004), Rashid và đồng tác giả (2004), Rajankar và đồng tác giả (2007) đồng thời chúng đều có khả năng tổng hợp IAA, kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Sturz và đồng tác giả (2000), Sridevi, Mallaiyah (2007). Những kết quả trước đây (Cao Ngọc Diệp *et al.*, 2007; Lăng Ngọc Đậu *et al.*, 2007; Nguyễn Thị Thu Hà *et al.*, 2009) đều nhận thấy các dòng vi khuẩn nội sinh hiện diện trong cây lúa mùa ở đồng bằng sông Cửu Long, cây có chân nuôi và có đặc tính tốt như cố định đạm, hòa tan lân, tổng hợp IAA, nay với kết quả này cho thấy vi khuẩn nội sinh hiện diện trong cây khóm, một loại cây trồng chỉ phát triển trong vùng đất chua phèn ở đồng bằng sông Cửu Long.

KẾT LUẬN

Một trăm hai một dòng vi khuẩn được phân lập từ trong cây khóm trồng trên đất phèn thị xã Vị Thanh tỉnh Hậu Giang, xác định 113/121 dòng vi khuẩn nội sinh được xác định bằng kỹ thuật PCR có sản phẩm ở kích thước khoảng 900 bp.

Bốn mươi lăm dòng vi khuẩn nội sinh trong 113 dòng được chọn từ 3 nhóm vi khuẩn phát triển trên môi trường LGI, Nfb và Baz đều có khả năng cố định đạm, hòa tan lân khó tan và tổng hợp IAA, và từ trong 45 dòng vi khuẩn này có 9 dòng vi khuẩn nổi bật. Hai dòng vi khuẩn được xác định kiểu gen thông qua giải trình tự nucleotide phân đoạn gen 16S-rRNA: dòng vi khuẩn L13 và dòng B3 có tỉ lệ đồng hình với dòng *Burkholderia tropica* NR_028965 với tỷ lệ 99,4 và 99%, theo thứ tự.

Lời cảm ơn: Các tác giả chân thành cảm ơn cô Nguyễn Thị Xuân Mỹ, Bộ môn Công nghệ sinh học Vi sinh vật, Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ sinh học, Đại học Cần Thơ đã giúp chuẩn bị các phản ứng PCR và giải trình tự các đoạn DNA. KS. Vũ Hải Chi, Viện Công nghệ sinh học đã giúp so sánh các trình tự DNA của 2 chủng vi khuẩn L13 và B3 với dòng vi khuẩn chuẩn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Baldani JI, Baldani VLD, Dobreiner J (2000) Inoculation of rice plant with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. *Biol Fertil Soils* 30: 485-491.
- Bastian F, Cohen A, Piccoli P, Luna V, Baraldi R (1998) Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A₁ and A₃ by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined cultures. *Plant Growth Regul* 24: 7-11.
- Cao Ngọc Diệp, Phạm Thị Khánh Vân, Lăng Ngọc Đậu (2007) Phát hiện vi khuẩn *Azospirillum lipoferum* nội sinh trong cây lúa mùa đặc sản (*Oryza sativa* L.) trồng ở vùng đồng bằng sông Cửu Long. *Tuyển tập báo cáo Khoa học Hội nghị Toàn quốc 2007 Nghiên cứu cơ bản trong Khoa học sự sống, Quy Nhơn 10/8/2007*. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật: 456-459.
- Cavalcante VA, Dobreiner J (1988) A new acid tolerant nitrogen fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant Soil* 108: 23-31.
- Cruz LM, Souza EM, Weber OB, Baldani JJ, Dobreiner J, Pedrosa FO (2001) 16S Ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from Banana (*Musa* spp.) and Pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.). *Appl Environ Microb* 67(5): 2375-2379.
- Hernandez TA, Cristales MRB, Salgado TJ, Mellado JC, Ramirez LEF (2000) Natural endophytic

occurrence of *Acetobacter diazotrophicus* in pineapple plants. *Microb Ecol* 39: 49-55.

Kneg NR, Döbereiner J (1984) Genus *Azospirillum* In: *Bergey's manual of systematic bacteriology* 1, Murray et al. (eds): 94-103.

Kuklinsky-Sobral J, Araujo WL, Mendes R, Geraldi IO, Pizzirani-Kleiner A, Azevedo JL (2004) Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environ Microbiol* 6:1244-1251.

Lăng Ngọc Đậu, Nguyễn Thị Xuân Mỹ, Cao Ngọc Diệp (2007) Khả năng cố định đạm, hòa tan lân và sinh tổng hợp IAA của vi khuẩn *Azospirillum lipoferum*. *Tuyển tập báo cáo Khoa học Hội nghị Toàn quốc 2007 Nghiên cứu cơ bản trong Khoa học Sự Sống, Quy Nhơn 10/8/2007*. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật: 445-448.

Nautiyal CS (1999) An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol Lett* 170: 265-270.

Neumann B, Pospiech A, Schairer HU (1992) Rapid isolation of genomic DNA from gram-negative bacteria. *Trends Genet: TIG*.

Nguyễn Mạnh Chinh, Nguyễn Đăng Nghĩa (2006) *Trồng - chăm sóc và phòng trừ sâu bệnh Dừa, Chuối, Dưa ấu*. Nhà xuất bản Nông Nghiệp, Hà Nội: 9-31.

Nguyễn Thị Thu Hà, Hà Thanh Toàn, Cao Ngọc Diệp (2009) Phân lập và đặc tính của các dòng vi khuẩn nội sinh trong một số cây có chân nuôi. *Tap chí Công nghệ Sinh học* 7(2):241-250.

Park M, Kim C, Yang J, Lee H, Shin W, Kim S, Sa T (2005) Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. *Microbiol Res* 160: 127-133.

Rashid M, Khalil S, Ayub N, Alam S, Latif F (2004) Organic acids production and phosphate solubilization by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) under in vitro conditions. *J Biol Sci* 7: 187-196.

Rajankar PN, Tambekar DH, Wate SR (2007) Study of phosphate solubilization efficiencies of fungi and bacteria isolated from saline belt of Purna river basin. *Res J Agricult Biol Sci* 3: 701-703.

Reinhold B, Hurek T, Niemann EG, Fendrik I (1986) Close association of *Azospirillum* and diazotrophic rods with different root zones of Kallar grass *Appl Environ Microbiol* 52: 520-526.

Reis VM, Estrada PDLS, Tenorio-Salgado S, Vogel J, Stoffels M, Guyon S, Mavingui P, Baldani VLD, Schmid M, Baldani J I, Balandreau J, Hartmann A, Caballero-Mellado J (2004) *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 54: 2155-2162.

Relman DA, Loutit JS, Schmidt TM, Falkow S, Tompkins LS (1990) The agent of bacillary angiomatosis. An approach to the identification of uncultured pathogen. *N Engl J Med* 323: 1573-1580.

Relman DA, Schmidt TM, MacDermott RP, Falkow S (1992) Identification of the uncultured bacillus of Whipple's disease. *N Engl J Med* 327: 293-301.

Rosenblueth M, Martinez-Romero E (2004) *Rhizobium* *elli* maize populations and their competitiveness for root colonization. *Arch Microbiol* 181: 337-344.

Rosenblueth M, Martinez-Romero E (2006) Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Am Phytopathol Soc* 19: 827-837.

Sridevi M, Mallaiiah KV (2007) Production of indole-3-acetic acid by *Rhizobium* isolates from *Sesbania* species. *Afr J Microbiol Res* 1(7): 125-128.

Sturz AV, Christie BR, Matheson BG, Nowak J (1997) Biodiversity of endophytic bacteria which colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on host growth. *Biol Fert Soils* 25: 13-19.

Sturz AV, Christie BR, Nowak J (2000) Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. *Crit Rev Plant Sci* 19: 1-30.

Weber OB, Baldani VLD, Teixeira KRS, Kirchof G, Baldani JJ, Döbereiner J (1999) Isolation and characterization of diazotrophic bacteria from banana and pineapple plants. *Plant Soil* 210: 103-113.

Zinniel DK, Lambrecht P, Harris NB, Feng Z, Kuczmariski D, Higley P, Ishimaru CA, Arunakumari A, Barletta RG, Vidaver AK (2002) Isolation and characterization of Endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. *Appl Environ Microbiol* 68: 2198-2208.

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF ENDOPHYTIC BACTERIA IN PINEAPPLE (*ANANAS COMOSUS* [L.]) CULTIVATED ON ACID SOIL OF VI THANH TOWN, HAU GIANG PROVINCE

Cao Ngọc Diệp*, Phan Thị Nhà

Biotechnology Research and Development Institute, Can Tho University

SUMMARY

Pineapple plant (*Ananas comosus* [L.]), a kind of tropical fruit, has been cultivated on acid sulphate soils of the Mekong Delta extensively, the pineapple had high fruit yield but it needed to be applied chemical fertilizers very much especially inorganic nitrogen fertilizer; the aim of study was isolation, selection good endophytes to produce to biofertilizer for pineapple cultivation on acid soils. The results showed that one hundred twenty-one bacterial isolates were obtained from roots, stems, leaves, fruit-stems and fruits of pineapple plants cultivated on acid soil of Vi Thanh town, Hau Giang province. Forty five endophytes showed high potential of nitrogen fixation, phosphate solubilization and indole-3-acetic acid (IAA) biosynthesis. Two isolates (L13 and B3) were chosen to characterize genotypically by analysis of the nucleotide sequences of 900 bp 16S-rDNA fragment; the results showed that L13 and B3 isolates were 99.4% and 99% of the identify with *Burkholderia tropica* NR_028965, respectively; three gaps of L13 strain and five gaps of B3 strain did not matche with standard strain [*Burkholderia tropica* NR_028965]. Two endophytes (L13 and B3) had the best composite characterization, they have been suggested for bio-fertilizer production.

Keywords: *Burkholderia tropica*, biological nitrogen fixation, endophytic bacteria, IAA, phosphate-solubilization

* Author for correspondence: Tel: 84-918287639; Fax: 84-73-3976775; E-mail: tphongtg@gmail.com