

PHÂN LẬP VÀ ĐẶC TÍNH VI KHUẨN NỘI SINH TRONG CÂY KHÓM (*ANANAS COMOSUS* [L.] TRỒNG TRÊN ĐẤT PHÈN HUYỆN TÂN PHƯỚC, TỈNH TIỀN GIANG

Trần Thanh Phong¹, Cao Ngọc Diệp²

¹Trung tâm Khuyến nông & Khuyến ngư tỉnh Tiền Giang

²Viện Nghiên cứu và Phát triển công nghệ sinh học, Đại học Cần Thơ

TÓM TẮT

Khóm là loại cây trồng có giá trị xuất khẩu cao, được trồng với một diện tích lớn (>14.000 ha) ở vùng đất phèn thuộc huyện Tân Phước, tỉnh Tiền Giang. Bốn mươi chín dòng vi khuẩn được phân lập từ rễ, thân, lá của cây khóm (*Ananas comosus* [L.] trồng trên đất phèn huyện Tân Phước, tỉnh Tiền Giang. Ba mươi ba dòng vi khuẩn được xác định là vi khuẩn nội sinh bằng kỹ thuật PCR 16S-rDNA và 19 dòng vi khuẩn nhận diện với cặp môi RB-RM. Giải trình tự 15/19 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 9 dòng có tỉ lệ đồng hình với dòng EM_PRO EF622219 *Burkholderia tropica* CICC_10348, EU72341 *Burkholderia tropica* Tat 0750 và EM_PRO AF164045 *Burkholderia tropicalis* AB98 là 99%, 99,1 và 100%, theo thứ tự, còn lại là các giống *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Laminoella* và *Acinetobacter*. Tất cả 9 dòng *Burkholderia* đều có cả 3 đặc tính tốt như cố định đạm, hòa tan lân và tổng hợp IAA nhưng hai dòng Bur.7 [dòng TL1-1R] và Bur.8 [dòng MP-L] là hai dòng vi khuẩn tốt nhất, đặc biệt tổng hợp nhiều enzyme nitrogenase trong cây khóm con cấy mô.

Từ khóa: *Burkholderia tropica*, *Burkholderia tropicalis*, 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. Ở nước ta khóm được trồng từ Bắc đến Nam: Kiên Giang, Tiền Giang, Cà Mau, Hậu Giang, Long An, Thanh Hóa, Nghệ An, Quảng Nam... 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 huyện Tân Phước, tỉnh Tiền Giang có khoảng 15.000 ha với sản lượng hơn 100.000 tấn (<http://fsiu.mard.gov.vn/data/trongtrot.htm>). Để có được sản lượng khóm đáp ứng nhu cầu trong nước và thế giới, tại vùng trồng khóm chuyên canh nông dân đã bón một lượng lớn phân hóa học 200 kg N/ha/năm (Weber *et al.*, 1999). Chính vì vậy, các nhà khoa học không ngừng tìm kiếm những loài vi khuẩn nội sinh với cây khóm giúp tăng cường sinh trưởng của cây đồng thời hạn chế ảnh hưởng xấu của phân hóa học đến đất đai và môi trường sinh thái. Vi khuẩn nội sinh giúp tăng cường sinh trưởng của cây bằng cách tổng hợp kích thích tố auxin (IAA) và gibberellin (Barbieri *et al.*, 1986), tăng năng suất, tăng hàm lượng chất khoáng, tăng khả năng kháng bệnh của cây (Bastian *et al.*, 1998), cố định đạm sinh học, giảm tính mẫn 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 (Rosenblueth, Martinez-Romero, 2006). Những thí nghiệm trước đây đã phát hiện vi khuẩn *Azospirillum lipoferum* trong cây lúa mùa đặc sản ở đồng bằng sông Cửu Long (Cao Ngọc Diệp *et al.*, 2007), trong cây cỏ chăn nuôi (Nguyễn Thị Thu Hà *et al.*, 2009). Để tiến tới một nền nông nghiệp bền vững với một sản phẩm đạt tiêu chuẩn Global-GAP, tỉnh Tiền Giang đã và đang đầu tư một dự án hỗ trợ cho nông dân trồng khóm ở vùng Tân Phước vì thế việc 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 nói chung và cây khóm nói riêng như là dạng phân sinh học trong tương lai.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Cây khóm (*Ananas comosus* [L.] Merr) được thu từ các ruộng khóm trồng lâu năm trong vùng chuyên canh thuộc mười hai xã trong huyện Tân Phước –

tỉnh Tiền Giang.

Phân lập vi khuẩn

Để loại trừ các vi sinh vật có khả năng còn bám ở bề mặt, mẫu (thân, rễ, lá) 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 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-50mL vô trùng. Lấy 200 μ l dịch mẫu nghiền cho vào các ống nghiệm chứa 3 ml môi trường LGI bán đặc (Cavalcante, Dobereiner, 1988) 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 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 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 đồng nhất (thuần nhất) thì cấy chuyển sang ống nghiệm chứa môi trường đặc tương ứng để trữ ở 4°C và được xem như là một dòng.

Khi cấy chuyển vi khuẩn trên đĩa môi trường phân lập đặc ta 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.

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 *et al.*, (1992). Nuôi vi khuẩn trong 6ml 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°C. Thêm 400 μ l 10% CTAB/0,7 M NaCl, trộn đều. Ủ ở 65°C 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 DNA ở nhiệt độ phòng trong 1–2 giờ. Hòa tan trong 30 μ l nước cất.

Phản ứng 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 sau:

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

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

Mồi 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.

Ngoài việc sử dụng đoạn mồi 16S rDNA trên và để nhận diện vi khuẩn *Gluconacetobacter diazotrophicus*, chúng tôi sử dụng cặp mồi RB và RM (Madhaiyan *et al.*, 2004):

RB (5'- ARAGTTTGATYMTGGCTCAG -3')

RM (5'- GGACTACCAGGGTATCTAATCC -3')

Phản ứng PCR: 95°C/10 phút; 35 chu kỳ: (92°C/60 giây, 52°C/2 phút, 72°C/2 phút); 72°C/8 phút. Sau đó điện di trên gel agarose và gel được chụp hình trên Gel-Doc để xác định băng theo thang chuẩn 100 bp.

Định lượng ammonium (khả năng cố định đạm)

Vi khuẩn được nuôi trong môi trường Burk's không có nitrogen 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 NH_4^+ được tạo

ra bằng phản ứng so màu ở bước sóng 640 nm vào các thời điểm 2, 4, 6 và 8 ngày sau khi chủng vi khuẩn. Đồng thời các mẫu vi khuẩn cũng được chủng vào cây khóm con (cây mô) trồng trong ống nghiệm chứa môi trường khoáng không nitrogen và đo lượng Acetylene Reduction Assay (ARA) để biết được lượng nitrogenase tạo được thông qua quan hệ giữa cây khóm con và vi khuẩn.

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 vào các thời điểm 2, 4, 6 và 8 ngày.

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 vào các thời điểm 5, 10, 15 và 20 ngày.

Giải trình tự DNA

Những chủng vi khuẩn đã nhận diện vi khuẩn nội sinh như đã mô tả ở phần trên, chúng tôi sử dụng đoạn mồi RB hay RM (Madhaiyan *et al.*, 2004) để giải trình tự đoạn DNA có chiều dài 800 bp.

Sản phẩm PCR được tinh sạch theo kit Invitrogen. Sản phẩm DNA này được sử dụng giải trình tự với đoạn mồi RB 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 các dòng vi khuẩn với trình tự DNA của bộ gen ở các loài vi khuẩn chuẩn có trong ngân hàng gen (NCBI) và sử dụng phần mềm BioEdit để so sánh trình tự của các dòng vi khuẩn nội sinh.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân lập vi khuẩn nội sinh

Bốn mươi chín (49) dòng vi khuẩn phân lập được từ 42 mẫu khóm trồng trên đất phèn của 12 xã của huyện Tân Phước, tỉnh Tiền Giang, trong đó có 21/49 dòng vi khuẩn được phân lập từ rễ khóm (chiếm 42,85%); 8/49 dòng vi khuẩn được phân lập từ thân khóm (chiếm 16,33%); và 20/49 dòng vi khuẩn được phân lập từ lá khóm (40,82%), kết quả trên cho thấy số lượng vi khuẩn nội sinh phân lập được ở rễ và lá tương đương nhau trong khi số lượng vi khuẩn nội sinh trong thân khóm chiếm tỉ lệ thấp.

Đặc điểm khuẩn lạc và tế bào

Bốn ngày sau khi chủng dịch trích mẫu vào các ống nghiệm chứa môi trường LGI 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. Tiếp tục cấy chuyển sang môi trường LGI đặc và làm thuần; vi khuẩn phát triển trên môi trường LGI sau 6 - 8 ngày nuôi cấy, vi khuẩn tăng trưởng và khuẩn lạc có màu vàng sáng rất đặc biệt, khuẩn lạc dạng tròn, bìa nguyên, kích thước từ 0,5 mm đến 2 mm.

Một trăm phần trăm các dòng vi khuẩn phân lập được đều có dạng hình que ngắn và có khả năng chuyển động, tất cả 40 dòng vi khuẩn có khả năng chuyển động rất nhanh (chiếm 81,61%); 9/49 dòng vi khuẩn có khả năng chuyển động nhanh (chiếm 8,39%).

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

Khi phân tích PCR với 3 đoạn mồi 16S rDNA (p51FPL, p-13B và PCR-1) để nhận diện các dòng vi khuẩn nội sinh, 33 dòng vi khuẩn cho băng DNA ở vị trí khoảng 900 bp so với thang chuẩn (không dẫn hình), phù hợp với kết quả nghiên cứu của và đồng tác giả (2002).

Trong số 33 dòng vi khuẩn được nhận diện là vi khuẩn nội sinh với cặp mồi 16S rDNA (p51FPL, p-13B và PCR-1), chúng tôi tiếp tục thực hiện các phản ứng PCR với cặp mồi RB-RM, kết quả cho thấy chỉ có 19 trong số 33 dòng vi khuẩn cho băng 800 bp (không dẫn hình).

Trong số 19 dòng vi khuẩn nội sinh được nhận diện ở cặp mồi RM-BM và giải trình tự 15/19 dòng vi khuẩn, kết quả có 9 dòng vi khuẩn được xác định là *Burkholderia tropica* hay *B. tropicalis*, còn lại 6 dòng vi khuẩn được phân bố trong các giống *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Lamoniella*.....Mười lăm dòng vi khuẩn này xây dựng trong cây phả hệ (Hình 1) cho thấy cả 9 dòng vi khuẩn *Burkholderia* nằm trong một nhánh riêng biệt với các giống vi khuẩn còn lại.

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

Khả năng cố định đạm

Chọn 9 dòng vi khuẩn *Burkholderia* nuôi trong môi trường LGI không đậm lỏng, kết quả là cả 9 dòng vi khuẩn có khả năng tổng hợp NH_4^+ cao hơn

rất nhiều so với đối chứng. Hầu hết các dòng vi khuẩn tổng hợp đạm đạt mức cao nhất vào ngày 4 rồi giảm dần ở những ngày nuôi tiếp theo. Tuy nhiên kết quả phân tích ARA của 9 dòng vi khuẩn nội sinh có khả năng cố định đạm tốt chủng trên cây khóm con (cây mô) cho thấy chỉ có dòng Bur.7 (dòng TL1-1R)

có hàm lượng nitrogenase cao nhất trong đó có 3 dòng vi khuẩn chỉ có một lượng nitrogenase rất ít hình thành. Như vậy, có thể các dòng vi khuẩn nội sinh vào cây khóm sẽ có kết quả khác so với vi khuẩn nội sinh sống tự do trong môi trường không có nitrogen (Bảng 1).

Bảng 1. Khả năng tổng hợp nitrogenase (thông qua phản ứng ARA) của 9 dòng vi khuẩn *Burkholderia*.

Tên dòng vi khuẩn	Trong dung dịch không N (µM/ml khí)	Trong cây khóm cây mô trong 24 h (µM/ml khí)
Bur.1 (TM-L2.1)	300	198
Bur.2 (LT2-R)	420	215
Bur.3 (TM-TT-Ra)	100	799
Bur.4 (THT-R2)	0,12	143
Bur.5 (TP2-Ra)	0,12	4
Bur.6 (TL2)	10	4
Bur.7 (TL1-1R)	240	5569
Bur.8 (MP-L)	150	4895
Bur.9 (TM-L2.2)	120	4
Đối chứng	0	0

Khả năng hòa tan lân khó tan

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 10 ngày nuôi, sau đó giảm dần ở những ngày nuôi tiếp theo. Kết quả cho thấy dòng Bur.5 (TP2-Ra) và Bur.7 (TL1-1R) cho hàm lượng lân dễ tiêu cao nhất trong thời điểm 10 ngày sau khi ủ trong môi trường NBRIP lỏng (Hình 2).

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

Chín dòng vi khuẩn trong giống *Burkholderia* được nuôi trong môi trường LGI 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 9 dòng vi khuẩn nội sinh *Burkholderia* được chọn khảo sát có khả năng tổng hợp IAA khá cao và thời điểm tổng hợp IAA cao nhất vào ngày thứ 4 sau khi ủ trong đó dòng Bur.5 (TP5-Ra) có lượng IAA cao nhất và khác biệt rất có ý nghĩa với các dòng vi khuẩn còn lại.

Từ các kết quả trên, có thể chọn được dòng vi khuẩn Bur.7 (dòng TL1-1R) có lượng ammonium và lượng nitrogenase tổng hợp cũng như cả lượng lân hòa tan và lượng IAA đều cao, kể đến là dòng Bur. 8 (dòng MP-L) cũng cho lượng ammonium, lân hòa tan và IAA khá.

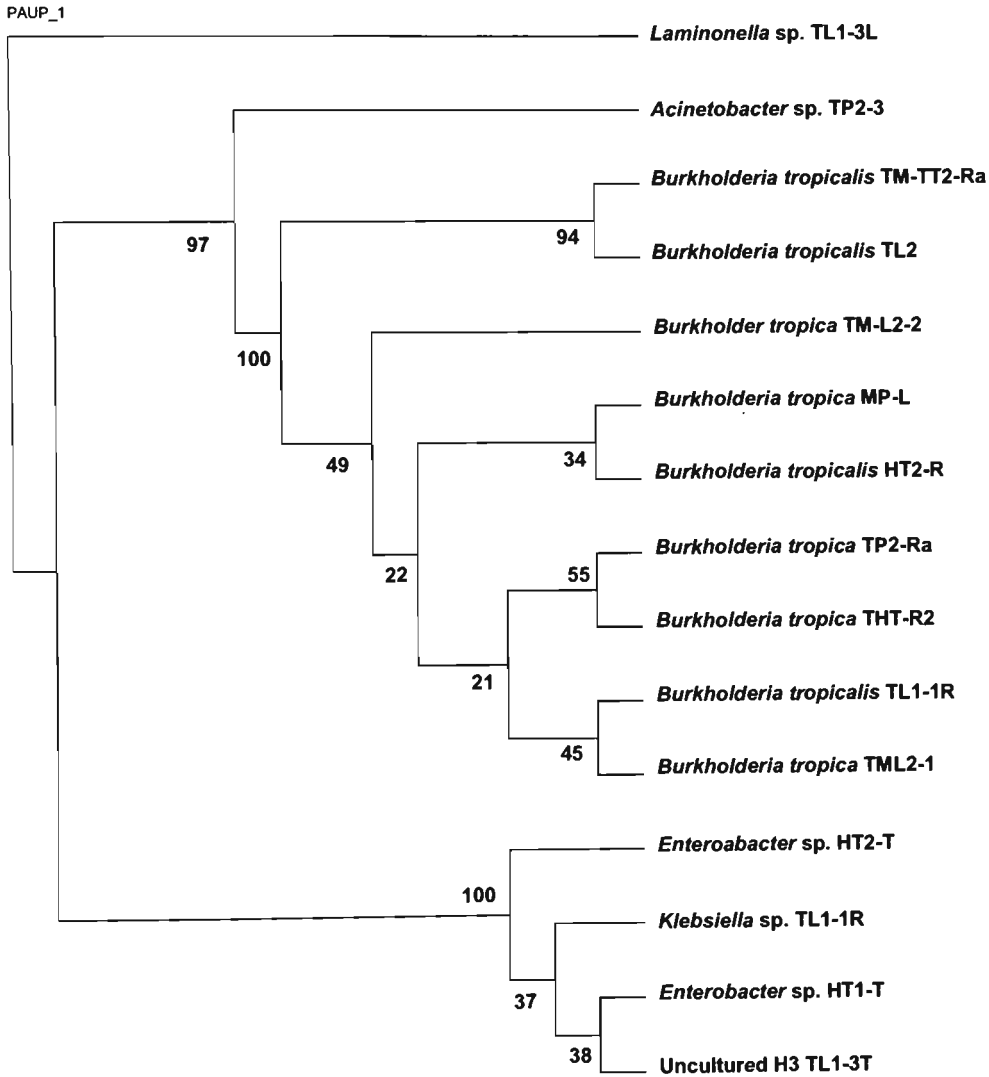
THẢO LUẬN

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 (Stuz *et al.*, 2000); nhiều loài có ích như cố định đạm như *Azospirillum*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Burkholderia*, *Herbaspirillum*..... (Rheinold *et al.*, 1986; Cavalcante, Dobereiner, 1988, Weber *et al.*, 1999; Elbeltagy *et al.*, 2001). Kết quả mà chúng tôi phát hiện cũng phù hợp với nghiên cứu của Weber *et al.* (1999), Hernandez *et al.* (2000), những tác giả này đã tìm thấy những vi khuẩn nội sinh trong cây khóm trồng ở Nam Mỹ.

Điều đặc trưng là khuẩn lạc của những dòng vi khuẩn nội sinh có khuẩn lạc màu vàng sáng đẹp như mô tả của Madhaiyan *et al.* (2004), chúng có thể làm thay đổi pH môi trường từ pH trung tính xuống pH khoảng 4,5 - 5. Trong 49 dòng vi khuẩn phân lập từ cây khóm (rễ, thân và lá), 33 dòng vi khuẩn nội sinh được xác định với cặp môi 16S rDNA bổ sung môi thứ 3 (PCR-1)(Zinniel *et al.*, 2002, mà các tác giả này cho biết rất hữu dụng để nhận diện 853 vi khuẩn nội sinh trong 4 loài cây

trồng và 27 loài cây đồng cỏ), tuy nhiên kết quả nhận được 15 dòng vi khuẩn nội sinh có kích thước 800 bp với cặp mồi RM-BM nhưng khi giải trình tự 15 dòng vi khuẩn này là vi khuẩn *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*.....trong đó nổi bật có 9/15 dòng là *Burkholderia tropica* và/hoặc *Burkholderia tropicalis*, những loài vi khuẩn nội sinh mới được Reis *et al.*, (2004) phát hiện, mô tả và công bố trên

thế giới. Trước đây một loài *Burkholderia vietnamensis* được phân lập từ trong đất của vùng rẫy lúa trồng trong huyện Châu Thành, tỉnh Tiền Giang đã được công bố (Van *et al.*, 1994) điều này cho thấy sự phong phú của giống *Burkholderia*, đặc biệt là loài *B. tropica* và *B. tropicalis* là hai loài cùng với *B. vietnamensis* là những loài vi khuẩn nội sinh có lợi cho nông nghiệp.



Hình 4. Cây phả hệ (phylogenetic tree) phân tích mối quan hệ của 15 dòng vi khuẩn nội sinh.

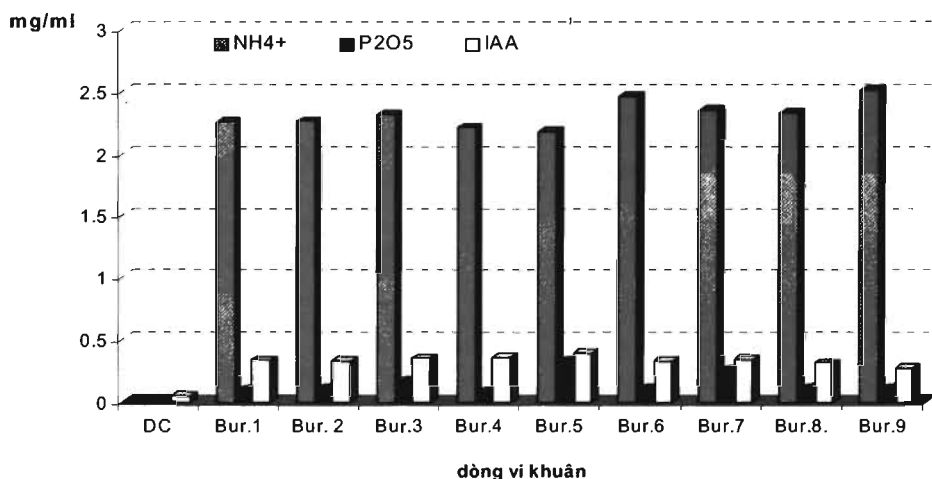
Tất cả 9 dòng vi khuẩn *Burkholderia* đều có khả năng cố định đạm, hòa tan lân khó tan, kết quả này

phù hợp với nghiên cứu của một số tác giả (Kuklinsky-Sobral *et al.*, 2004; Rashid *et al.*, 2004;

Rajankar *et al.*, 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, Mallaiah (2007). Những kết quả trước đây của chúng tôi (Cao Ngọc Diệp *et al.*, 2007; Lăng Ngọc Dầu *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. 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, mở ra triển vọng ứng dụng các chủng vi khuẩn tốt cho những cây trồng chỉ mọc được ở vùng đất khắc nghiệt và góp phần hạn chế được phân hóa học phải bón cho cây trồng đó ví dụ như cây khóm chẳng hạn.

Đồng thời kết quả cho thấy phương pháp nghiên cứu vi khuẩn nội sinh này, một lần nữa, đã được chứng minh tính chính xác, thích hợp và phương pháp nghiên cứu này sẽ sử dụng để nghiên cứu các vi khuẩn nội sinh trong các loại cây trồng khác hay những loài thực vật mọc hoang dại trong tự nhiên.



Hình 2. Chín dòng vi khuẩn nội sinh *Burkholderia tropica* có khả năng cố định đạm, hòa tan lân và tổng hợp IAA. DC=đôi chứng, Bur.1=TM-L2-1, Bur.2=HT2-R, Bur.3=TM-TT2-Ra, Bur.4=THT-R2, Bur.5=TP2-Ra, Bur.6=TL2, Bur.7=TL1-1R, Bur.8=MP-L, Bur.9=TM-L2-2.

KẾT LUẬN

Từ 49 dòng vi khuẩn được phân lập từ trong cây khóm trồng trên đất phèn huyện Tân Phước, tỉnh Tiền Giang có 33 dòng vi khuẩn nội sinh bằng kỹ thuật PCR cho sản phẩm DNA 16S rDNA có kích thước khoảng 900 bp và 15 dòng vi khuẩn nội sinh với cặp môi RB-RM có kích thước khoảng 800 bp.

Từ 9 dòng vi khuẩn *Burkholderia tropica*/B. *tropicalis* nội sinh tốt trong môi trường LGI đều có khả năng cố định đạm, hòa tan lân khó tan và tổng hợp IAA, và từ trong 9 dòng vi khuẩn nổi bật và 2 dòng vi khuẩn nội sinh Bur.7 (TL-T1) và Bur.5 (TP5-Ra) được giải trình tự với kết quả có tỉ lệ đồng hình với dòng EU72341 *Burkholderia tropica* Tat 0750, EM_PRO EF622219 *Burkholderia tropica* CICC 10348 và dòng EM_PRO AF 164045

Burkholderia tropicalis AB98 với tỷ lệ 99,1 và 100%, 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.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Barbieri P, Zanelli T, Galli E, Zanetti G (1986) Wheat inoculation with *Azospirillum brasilense* Sp6 and some mutants altered in nitrogen fixation and indole-3-acetic acid production. *FEMS Microbiol* 36: 87-90.

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.
- Boddey RM, Urquiaga S, Reis VM, Dobereiner J (1991) Biological nitrogen fixation associated with sugarcane. *Plant and Soil* 137: 111-117.
- 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, Dobereiner J (1988) A new acid tolerant nitrogen fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant Soil* 108: 23-31.
- Elbeltagy A, Nishioka K, Tadashisato H, Suzuki H, Ye B, Hamada T, Isawa T, Mitsui H, Minamisawa K (2001) Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. *Appl Environ Microbiol* 38: 5285-5293.
- Hernandez TA, Cristales MRB, Salgado TJ, Mellado JC, Ramirez LEF (2000) Natural endophytic occurrence of *Acetobacter diazotrophicus* in pineapple plants. *Microbiology Ecol* 39: 49-55.
- Kuklinsky-Sobral J, Araujo WL, Mendes R, Gerdal 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 My, 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.
- Madhaiyan M, Saravanan VS, Bhakiya SSJ, Lee D, Thenmozhi H, Hari R, Sa T (2004) Occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in tropical and subtropical plants of Western Ghats, India. *Microbiol Res* 159: 233-243.
- 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 in Genetics: TIG*.
- 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 cỏ chăn nuôi. *Tạp 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 Sciences* 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 Agri 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 PDL, 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 on 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, Martínez-Romero E (2006) Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Am Phytopathol Soc* 19: 827-837.
- Sridevi M, Mallaiah KV (2007) Production of indole-3-acetic acid by *Rhizobium* isolates from Sesbania species. *Afr J Microbiol* 1: 125-128.
- 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.
- Van TV, Mavingui P, Berge O, Balandreau J, Heulin T (1994) Promotion de croissance du riz inoculé par une bactérie fixatrice d'azote, *Burkholderia vietnamiensis*, isolated in soil acid Viet Nam. *Agronomie* 14: 697-707.
- Weber OB, Baldani VLD, Teixeira KRS, Kirchoff G, Baldani JJ, Dobereiner 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, Kuczmarski D, Hingley 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 PLANTS (*ANANAS COMOSUS* [L.]) CULTIVATED ON ACID SOIL OF TAN PHUOC DISTRICT, TIEN GIANG PROVINCE

Tran Thanh Phong¹, *, Cao Ngoc Diep²

¹Tien Giang Agriculture and Fishery Extension Center

²Biotechnology Research and Development Institute, Can Tho University

SUMMARY

Pineapple, cultivated in large area (more 14,000 ha) of acid soil in Tan Phuoc district, Tien Giang province. Forty-nine bacterium isolations were isolated from roots, stems, leaves of pineapple plants (*Ananas comosus* [L.]) on acid soil of Tan Phuoc district, Tien Giang province. Thirty-three isolated bacteria were identified as endophytic bacteria by PCR 16S-rDNA technique and 15 endophytes were determined by PCR technique with RB-RM primers. All of 15 endophytic isolated bacteria were by sequencing and online comparison; The results showed that 9 strains were 99.1% and 100% of the identify with EU72341 *Burkholderia tropica* Tat 0750, EM_PRO 623219 *Burkholderia tropica* CICC 10348 and EM_PRO AF 164045 *Burkholderia tropicalis* AB98, respectively. The nine *Burkholderia* strains are belonging to the endophytes with three good characteristics such as nitrogen fixation, phosphate solubilization and indole-3-acetic acid (IAA) biosynthesis and two strains (Bur.7 [TL1-1R] and Bur.8 [MP-L]) are the two best strains, especially plantlets from *in vitro* culture synthesize many nitrogenase in baby pineapple plants (culture-tissue).

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

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