

DOI:10.22144/ctu.jvn.2021.179

PHÂN LẬP VÀ NHẬN DIỆN VI KHUẨN NỘI SINH CÓ KHẢ NĂNG CỐ ĐỊNH ĐẠM, HÒA TAN LÂN VÀ TỔNG HỢP IAA TRONG CÂY ĐẬU PHỘNG (LẠC) (*Arachis hypogaea* L.) TRỒNG TẠI 03 HUYỆN MIỀN NÚI TỈNH BÌNH ĐỊNH

Bùi Thanh Đạo^{1*}, Ngô Thanh Phong² và Cao Ngọc Điệp³

¹Trung tâm Thông tin - Ứng dụng Khoa học và Công nghệ Bình Định

²Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

³Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Bùi Thanh Đạo (email: daobt29@gmail.com)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 09/06/2021

Ngày nhận bài sửa: 24/07/2021

Ngày duyệt đăng: 25/12/2021

Title:

Isolation and identification of endogenous bacteria from peanuts cultivated in Binh Dinh province

Từ khóa:

Cố định đạm, đậu phộng, hòa tan lân, tổng hợp IAA, vi khuẩn nội sinh

Keywords:

Endophytic bacteria, IAA biosynthesis, nitrogen fixation, peanut, phosphate solubilization

ABSTRACT

One hundred and ninety-one bacterial isolates were isolated from ninety-three samples of nodules, roots and stems peanut plants cultivated in three mountainous districts of Binh Dinh province (Van Canh, Vinh Thanh, An Lao). The isolates all formed thin films (pellicles) and were able to fix nitrogen, solubilize phosphate and synthesize IAA. PCR technique was used for identifying fifteen selected good isolates. The result showed that these fifteen isolates were all endogenous bacteria. The identified bacterial isolates belong to six genera, include *Acinetobacter* (5 isolates), *Bacillus* (4 isolates), *Burkholderia* (2 isolates), *Klebsiella* (2 isolates), *Enterobacter* (1 isolate), and *Sphingomonas* (1 isolate) with the DNA homology rate from ninety-eight to ninety-nine percent.

TÓM TẮT

Một trăm chín mươi một dòng vi khuẩn được phân lập từ 93 mẫu nốt sần, rễ, thân cây đậu phộng (lạc) trồng tại 03 huyện miền núi tỉnh Bình Định (Vân Canh, Vĩnh Thạnh, An Lão). Các dòng vi khuẩn phân lập được đều tạo màng mỏng (pellicle), đều có khả năng cố định đạm, hòa tan lân và tổng hợp IAA. Trong nghiên cứu, 15 dòng vi khuẩn có đặc tính tốt được tuyển chọn để nhận diện bằng kỹ thuật PCR. Kết quả cho thấy 15 dòng này đều là vi khuẩn nội sinh. Các dòng vi khuẩn được nhận diện thuộc 6 chi, bao gồm chi *Acinetobacter* (5 dòng), chi *Bacillus* (4 dòng), chi *Burkholderia* (2 dòng), chi *Klebsiella* (2 dòng), chi *Enterobacter* (1 dòng) và chi *Sphingomonas* (1 dòng) với tỷ lệ tương đồng DNA từ 98-99%.

1. GIỚI THIỆU

Đậu phộng (lạc, đậu phụng) (*Arachis hypogaea* L.) là loài cây thực phẩm thuộc họ đậu (Fabaceae). Đậu phộng là loại cây trồng dùng để cải tạo đất vì sau vụ đậu sẽ để lại lượng đạm rất lớn cho đất khoảng 50-100 kgN/ha (Nguyễn Hữu Hiệp & Trần Thị Tuyết Linh, 2009). Bên cạnh vi khuẩn nốt sần,

hiều kết quả nghiên cứu cho thấy bên trong hệ thống mô của cây đậu phộng có chứa hệ vi khuẩn nội sinh. Vi khuẩn nội sinh đã được chứng minh giúp tăng cường sự sinh trưởng của cây trồng (Barbieri et al., 1986), thúc đẩy các quá trình chuyển hóa, kích thích phát triển lông rễ (Harari et al., 1988), tăng hàm lượng các chất khoáng, tăng khả năng kháng nhiều nguồn bệnh (Bandara et al., 2006;

Fahey et al., 1991), giúp cố định đạm sinh học, giảm tính mẫn cảm với mầm bệnh và sự thay đổi của thời tiết gây tổn hại cho cây (Xu et al., 1998) và hòa tan lân khó tan (Lăng Ngọc Đậu và ctv., 2007).

Bình Định thuộc vùng sinh thái Duyên hải Nam Trung bộ, toàn tỉnh có 11 huyện, thị, thành phố trong đó có 3 huyện miền núi cách xa nhau về mặt địa lý (Vân Canh, Vĩnh Thạnh, An Lão). Tại tỉnh Bình Định, những giống đậu phộng được trồng phổ biến là HL25, Mỏ Két, Sè, L14 và LDH09 với mùa vụ chính là vụ Đông Xuân (từ tháng 11 đến tháng 4 dương lịch). Thời gian của một vụ trồng đậu phộng từ lúc gieo hạt đến khi thu hoạch khoảng 100 ngày. Phần lớn đất trồng đậu phộng tại ba huyện miền núi của tỉnh Bình Định thuộc nhóm đất xám bạc màu. Những năm qua, nghiên cứu liên quan đến cây đậu phộng tại tỉnh thường tập trung vào các hướng như nghiên cứu chọn lọc giống đậu phộng, nghiên cứu các biện pháp kỹ thuật trồng cây đậu phộng, nghiên cứu mô hình xen canh đậu phộng với các loại cây trồng khác. Phân lập, tuyển chọn vi khuẩn nội sinh có khả năng cố định đạm, hòa tan lân và tổng hợp IAA đã được nghiên cứu nhiều ở trong và ngoài nước, tuy nhiên tại tỉnh Bình Định thì chưa có nghiên cứu nào được tiến hành. Kết quả nghiên cứu của đề tài sẽ cung cấp nguồn giống vi khuẩn bản địa có đặc tính tốt về khả năng cố định đạm, hòa tan lân và tổng hợp IAA để ứng dụng cho việc nghiên cứu và sản xuất phân vi sinh dùng trong sản xuất cây đậu phộng trồng tại tỉnh Bình Định và là nguồn tài liệu, thông tin mới bổ sung vào cơ sở dữ liệu về lĩnh vực nông học tỉnh Bình Định.

Để tiến tới một nền nông nghiệp bền vững, đậu phộng trồng tại tỉnh Bình Định cần được nghiên cứu về những vi khuẩn nội sinh, xác định và đánh giá một số đặc tính tốt như cố định đạm, hòa tan lân, sinh tổng hợp kích thích tố tăng trưởng thực vật như IAA để ứng dụng những vi khuẩn nội sinh tốt cho cây trồng nói chung và cây đậu phộng nói riêng. Ba huyện miền núi của tỉnh Bình Định đã được lựa chọn làm địa điểm nghiên cứu phân tích tính đa dạng, mối quan hệ của các chủng vi sinh vật nội sinh đã phân lập và khảo sát hoạt tính.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Phương pháp thu thập, xử lý mẫu và phân lập các dòng vi khuẩn

2.1.1. Thu thập và xử lý mẫu

Mẫu được thu tại 3 huyện miền núi của tỉnh Bình Định bao gồm: Vân Canh, Vĩnh Thạnh, An Lão.

Cây đậu phộng được chọn đang ở giai đoạn tăng trưởng mạnh. Mẫu được thu cả phần đất xung quanh

với đường kính là 15 cm, sâu 15 cm. Cây đậu phộng được cắt bỏ lá và thân từ độ cao trên 10cm. Mẫu được rửa thật sạch dưới vòi nước mạnh để loại bỏ đất, bụi bẩn, để ráo tự nhiên. Các bộ phận (nốt sần, rễ, thân) không có dấu hiệu bệnh sẽ được chọn. Mẫu được cắt thành từng đoạn ngắn (2 - 3 cm), để riêng từng loại mẫu trong từng ống Falcon có ghi nhãn. Phần rễ và thân đậu phộng được cắt thành từng đoạn ngắn khoảng 1 cm. Nốt sần của rễ được lựa chọn là những nốt sần màu hồng, khỏe mạnh và được dùng kéo cắt ra khỏi rễ. Mẫu của phần rễ, phần thân và nốt sần được cho vào các bình tam giác 250 mL tương ứng. Dung dịch ethanol 70° được cho vào bình tam giác vừa ngập mẫu, lắc nhẹ trong thời gian 10 phút. Mẫu được rửa sạch lại bằng nước cất vô trùng 3 lần (5 phút/lần). Hợp chất calcium hypochloride 2% được cho vào bình tam giác và lắc nhẹ trong 10 phút. Mẫu được rửa sạch bằng nước cất vô trùng 4 lần (5 phút/lần). Nước rửa lần thứ 4 được hút 100 100 µL và chủng trên các đĩa chứa môi trường TYGA (tryptone – yeast extract – glucose – agar), ủ ở 30°C. Sau 24 - 48 giờ quan sát, nếu thấy trên các đĩa môi trường này không xuất hiện khuẩn lạc thì mẫu đã đạt yêu cầu khử trùng.

2.1.2. Phân lập các dòng vi khuẩn

Vi khuẩn nội sinh của thân và rễ cây đậu phộng được phân lập trên môi trường PDA (potato - dextrose - agar). Vi khuẩn nội sinh của nốt rễ được phân lập trên môi trường G₆ (G₆ là môi trường YEMA (yeast - extract – manitol – agar) được thay thế manitol thành glycerol. Đây là môi trường được sử dụng để phân lập vi khuẩn nội sinh và phân lập cả vi khuẩn nốt sần). Tất cả 93 mẫu đều được khử trùng. Mẫu đã khử trùng được cho vào cối chày vô trùng, giã nhuyễn, cho thêm 1 mL nước cất vô trùng vào cối. Mẫu được khuấy đều và hút 100 µL dịch trích cho vào các ống nghiệm chứa môi trường bán đặc (mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần). Các ống nghiệm được đậy kín và ủ ở 30°C khoảng 2 - 4 ngày. Các ống nghiệm được quan sát nếu thấy có một lớp màng mỏng (pellicle) gần bề mặt môi trường thì chứng tỏ có sự hiện diện của vi khuẩn nội sinh. Kim cấy đã khử trùng được dùng đâm xuyên qua màng pellicle và cấy vào đĩa môi trường đặc tương ứng, ủ ở 30°C. Sau 24 - 48 giờ, các khuẩn lạc khác nhau mọc trên bề mặt môi trường được tiếp tục cấy chuyển sang các đĩa môi trường tương ứng vài lần đến khi các khuẩn lạc xuất hiện trên đường cây rời nhau và hình thái khuẩn lạc thuần nhất. Kiểm tra độ rỗng bằng cách quan sát dưới kính hiển vi bằng phương pháp giọt ép. Khi thấy vi khuẩn đã thật sự rỗng (thuần nhất) thì cấy chuyển sang ống nghiệm chứa môi

trường đặc trưng ứng để trừ ở 4°C và được xem như một chủng (isolate) thuần (Cao Ngọc Diệp, 2011).

2.2. Khảo sát đặc tính cố định đạm, hòa tan lân và tổng hợp IAA

2.2.1. Định lượng ammonium (khả năng cố định đạm)

Vi khuẩn được nuôi trong môi trường Burk's không đạm, lỏng (Park et al., 2005), đặt ở nhiệt độ phòng và lắc với tốc độ 120 vòng/phút. Thực hiện định lượng ammonium hình thành trong mẫu bằng phương pháp Phenol Nitroprusside sodium hypochloride để xác định hàm lượng NH₄⁺ được tạo ra ở các ngày nuôi cấy 2, 4, 6 và 8 bằng phản ứng so màu ở bước sóng 636 nm.

2.2.2. Định lượng lân hòa tan

Vi khuẩn được nuôi trong môi trường NBRIP lỏng (Nautiyal, 1999), đặt ở nhiệt độ phòng và lắc với tốc độ 120 vòng/phút. Thực hiện định lượng lân hòa tan bằng thuốc thử acid ascorbic - ammoniummolybdate - potassium antinomol tartrate theo nguyên tắc lân sau khi được hòa tan trong môi trường sẽ tác dụng với ammoniummolybdate trong môi trường acid tạo hợp chất phosphomolybdate màu vàng. Phương pháp so màu Oniani ở bước sóng 880 nm ở các ngày 5, 10, 15 và 20 ngày nuôi được sử dụng để kiểm tra hàm lượng lân được hòa tan.

2.2.3. Định lượng IAA

Vi khuẩn được nuôi trong môi trường phân lập lỏng có bổ sung 100 mg/L tryptophan, đặt ở nhiệt độ phòng và lắc với tốc độ 120 vòng/phút 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 nuôi.

2.3. Nhận diện các dòng vi khuẩn

2.3.1. Kỹ thuật PCR

Quy trình tách chiết DNA vi khuẩn được thực hiện theo Nguyễn Thị Thu Hà và ctv. (2009).

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

2.3.2. Giải trình tự DNA

Sử dụng đoạn mồi 1 p515FPL (5'-GTGCCAGCAGCCGCGTAA-3') 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 gửi đến công ty MACROGEN (Hàn Quốc) để thực hiện giải trình tự. Sử dụng chương trình BLAST N và BioEdit 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).

Kỹ thuật PCR và giải trình tự DNA được dùng để nhận diện vi khuẩn nội sinh. Sau khi được định danh, dựa trên kết quả nghiên cứu của các nhà khoa học trước đây về khả năng cố định đạm, hòa tan lân và tổng hợp IAA của từng dòng vi khuẩn kết hợp với kết quả khảo sát *in vitro* của nghiên cứu này để tuyển chọn những dòng vi khuẩn cho thí nghiệm khảo sát tại nhà lưới.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập vi khuẩn nội sinh

Từ 93 mẫu (31 mẫu thân, 31 mẫu rễ và 31 mẫu nốt sần), 191 dòng được thu, trong đó có 134 dòng phân lập trên môi trường PDA, 57 dòng phân lập trên môi trường G₆; 58 dòng phân lập từ rễ chiếm 30,36%, 76 phân lập từ thân chiếm 39,79% và 57 phân lập từ nốt rễ chiếm 29,84% (Bảng 1).

Bảng 1: Kết quả phân lập các dòng vi khuẩn trên hai môi trường PDA và G₆

Môi trường phân lập	Nguồn gốc	Số lượng	Tỷ lệ (%)
PDA	Thân	76	39,79
	Rễ	58	30,36
G ₆	Nốt rễ	57	29,84

Các dòng vi khuẩn phân lập được đều có chung một đặc tính là sinh trưởng và phát triển ở điều kiện vi hiếu khí trong các môi trường bán đặc, chúng phát triển thành lớp màng mỏng cách mặt môi trường nuôi khoảng 2 – 5 mm. Kết quả này phù hợp với báo cáo của Weber et al. (1999), theo nghiên cứu của Perin et al. (2006) thì lớp màng mỏng hình thành cách mặt môi trường là 4 mm, kết quả của Santos et al. (2001) là khoảng 1 – 4 mm và theo báo cáo của Nguyễn Thị Thu Hà và ctv. (2009) thì lớp màng cách mặt môi trường từ 0,5 – 1 cm. Lớp màng mỏng hình thành trong môi trường bán đặc này có màu hơi trắng hoặc hơi vàng phù hợp với kết quả nghiên cứu của Santos et al. (2001) và Perin et al. (2006).

Bảng 1 cho thấy các dòng vi khuẩn nội sinh phân bố đều trong các bộ phận thân, rễ, nốt rễ của cây. Số lượng dòng vi khuẩn được phân lập trung bình là hai dòng trên một mẫu.

3.2. Một số đặc tính của các dòng vi khuẩn nội sinh phân lập được

3.2.1. Khả năng cố định đạm

Tất cả 191 dòng vi khuẩn được khảo sát đều có khả năng tạo NH₄⁺ cây trên môi trường Burk đặc (agar) không đạm. Hàm lượng đạm sinh ra được đo vào ngày thứ 2, 4, 6, 8 sau nuôi cấy, trong đó dòng GN49a cố định đạm cao nhất với hàm lượng trung bình là 2,25 mg/L.

3.2.2. Khả năng hòa tan lân khó tan

Tất cả 191 dòng vi khuẩn được khảo sát đều có khả năng hòa tan lân khó tan trong môi trường NBRIP. Lượng lân hòa tan được đo vào các ngày 5, 10, 15, 20 sau nuôi cấy, dòng GN54b hòa tan được nhiều lân nhất với hàm lượng trung bình là 367,34 mg/L.

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

Tất cả 191 dòng vi khuẩn nuôi cấy trong môi trường phân lập tương ứng có bổ sung 100 mg/L tryptophan được khảo sát đều có khả năng tổng hợp IAA. Lượng IAA tổng hợp được đo vào các ngày 2, 4, 6, 8 sau nuôi cấy, dòng PR49a có khả năng tổng hợp IAA cao nhất với hàm lượng trung bình là 5,54 µg/L.

Kết quả khảo sát của nghiên cứu cho thấy 191 dòng đều có khả năng cố định đạm, hòa tan lân và tổng hợp IAA. Từ kết quả khảo sát, nhóm nghiên cứu đã chọn ra 15 dòng có đặc tính tốt (Bảng 2) để tiến hành nhận diện bằng kỹ thuật PCR và giải trình tự DNA.

Bảng 2. Các dòng vi khuẩn có đặc tính tốt về cố định đạm, hòa tan lân và tổng hợp IAA

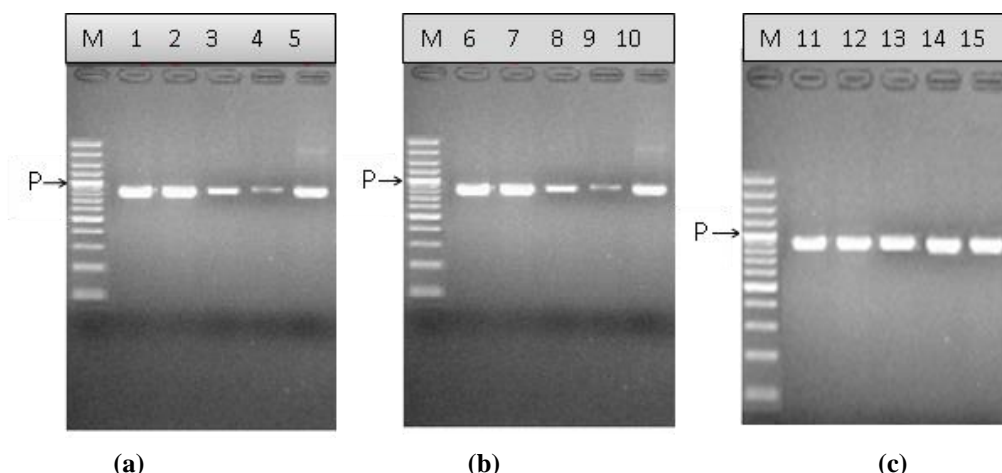
Stt	Dòng vi khuẩn	Lượng đạm cố định trung bình (mg/L)	Lượng lân hòa tan trung bình (mg/L)	Lượng IAA tổng hợp trung bình (µg/L)
1	GN49a	2,25	163,47	2,86
2	GN53c	1,71	185,45	2,06
3	GN54b	0,47	367,34	1,71
4	PR52b	0,82	151,88	2,57
5	PR49a	0,21	114,54	5,54
6	PR66b2	0,31	229,61	0,60
8	PR68a	0,08	360,56	0,42
9	PT67	0,08	172,37	0,63
10	GN74c	0,62	248,09	2,02
11	T104a	0,28	129,46	0,11
12	T103b	0,37	96,39	0,23
13	T102a	0,29	94,10	0,21
14	R96b	1,16	127,36	0,17
15	R100a	0,32	157,52	0,09

Mười lăm dòng vi khuẩn trên được chọn từ 3 huyện, mỗi huyện chọn 5 dòng với tiêu chí tuyển chọn là dòng có khả năng cố định đạm cao nhất, dòng có khả năng hòa tan lân cao nhất và dòng có khả năng tổng hợp IAA cao nhất đều được chọn, bên cạnh đó dòng có hai đặc tính tốt (cố định đạm và hòa tan lân đều cao hoặc cố định đạm và tổng hợp IAA đều cao) sẽ được chọn. Bảng 2 cho thấy 15 dòng vi khuẩn nội sinh được chọn lọc đều có khả năng cố định đạm với hàm lượng từ 0,08 đến 2,25 mg/L, hòa

tan lân với hàm lượng từ 94,10 đến 360,56 mg/L và tổng hợp IAA với hàm lượng 0,11 đến 5,54 µg/L.

3.3. Nhận diện các dòng vi khuẩn bằng kỹ thuật PCR

Khi phân tích PCR với 3 đoạn mồi 16S rDNA (p515FPL, p-13B và PCR-1) để nhận diện các dòng vi khuẩn đã chọn lọc đều là vi khuẩn nội sinh, 15/15 dòng cho băng DNA ở vị trí khoảng 900 bp so với thang chuẩn (Hình 1a, 1b, 1c), phù hợp với kết quả nghiên cứu trước đây của Zinniel et al. (2002).



Hình 1. Phổ điện di sản phẩm PCR được nhân lên từ DNA của các dòng vi khuẩn nội sinh trên gel agarose 1,5%

(Ghi chú: P: Vị trí 900bp, M: thang chuẩn, 1: GN49a, 2: GN53c, 3: GN54b, 4: PR52b, 5: PR49a, 6: PR66b2, 7: PR67, 8: PR68a, 9: PT67, 10: GN74c, 11: T104a, 12: T103b, 13: T102a, 14: R96b, 15: R100a)

3.4. Kết quả giải trình tự DNA của một số dòng vi khuẩn

Sản phẩm PCR (với cặp mồi p515FPL – P13B – PCR1) của 15 dòng vi khuẩn được sử dụng để giải trình tự DNA và sử dụng phần mềm Blast N để so sánh với trình tự DNA của các dòng vi khuẩn có

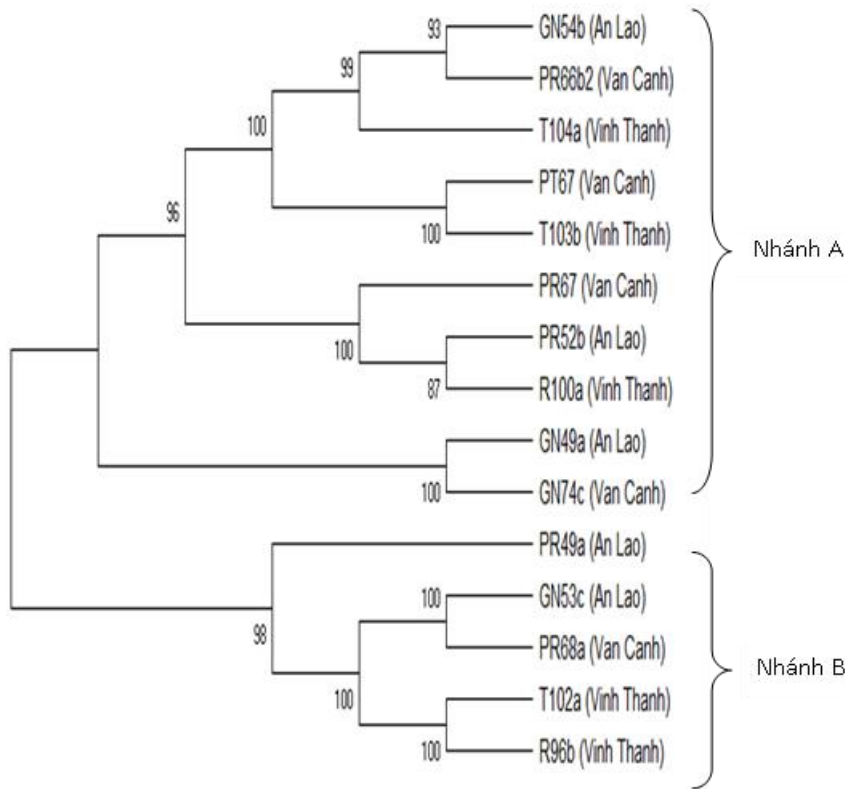
trong ngân hàng dữ liệu NCBI. Kết quả cho thấy trình tự các dòng vi khuẩn có độ tương đồng với trình tự gen của dòng vi khuẩn trên ngân hàng dữ liệu rất cao 98-99% và các dòng vi khuẩn tương đồng đều là các chi thuộc vi khuẩn nội sinh (Bảng 3).

Bảng 3. Tổng hợp kết quả so sánh trình tự DNA của các dòng vi khuẩn trên NCBI

Dòng Vi Khuẩn	Chiều dài (bp)	Các loài quan hệ	Mã số	Tương đồng (%)
GN49a	854	<i>Burkholderia</i> sp.strain HR5	MG818726	99
GN53c	847	<i>Bacillus flexus</i> strain 3811	KM374754	99
GN54b	860	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> strain IITG-ORWB3	MH036346	99
PR52b	858	<i>Klebsiella</i> sp. SCU_B84	KM590521	99
PR49a	853	<i>Sphingomonas pituitosa</i> strain C_G_AE-1	KJ186947	98
PR66b2	848	<i>Acinetobacter</i> sp. 3JJ_W5-01	JF722673	99
PR67	842	<i>Enterobacter cloacae</i> strain SS3(5)	MH488987	99
PR68a	843	<i>Bacillus megaterium</i> strain TIL_CHIN_81	KT998828	99
PT67	843	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> strain petra-09	GQ141870	99
GN74c	836	<i>Burkholderia ambifaria</i> strain YL-CS2	MF419183	99
T104a	847	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> strain JO_1	KF374680	99
T103b	838	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> strain petra-09	GQ141870	99
T102a	844	<i>Bacillus axarquiensis</i> WSH8	KX343936	99
R96b	836	<i>Bacillus subtilis</i> strain MC26	KZ225442	99
R100a	846	<i>Klebsiella</i> sp. strain FH-1	MH250202	99

Bảng 3 cho kết quả 15 dòng vi khuẩn thuộc 6 chi, trong đó chi *Acinetobacter* (5 dòng), chi *Bacillus* (4 dòng), chi *Burkholderia* (2 dòng), chi *Klebsiella* (2 dòng), chi *Enterobacter* (1 dòng) và chi *Sphingomonas* (1 dòng). Tất cả đều là vi khuẩn nội sinh và có khả năng tổng hợp đạm, hòa tan lân khó tan, tổng hợp chất kích thích sinh trưởng IAA.

Cây phả hệ của 15 dòng vi khuẩn được xây dựng dựa theo phần mềm MEGA 6,06, với chỉ số bootstrap 1000. Phương pháp Maximum-Likelihood (liên kết các dòng tương cận) được chọn để xây dựng cây phả hệ.



Hình 2. Cây phả hệ (phylogenetic tree) trình bày mối quan hệ di truyền của 15 dòng vi khuẩn nội sinh

Hình 2 cho thấy các dòng vi khuẩn nội sinh của 3 huyện có quan hệ di truyền gần gũi nhau, mặc dù chúng được phân làm 2 nhánh. Điều này có nghĩa có sự giao thoa về mặt di truyền giữa các dòng vi khuẩn nội sinh giữa 3 huyện và có thể lý giải là do vi khuẩn được phân tán theo nguồn giống (giống sử dụng tại huyện Vân Canh được sử dụng từ nguồn giống của huyện Vĩnh Thạnh hoặc An Lão hoặc ngược lại).

4. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

Nghiên cứu đã phân lập được 191 dòng vi khuẩn, trong đó dòng GN49a có định đạm cao nhất với hàm lượng trung bình là 2,25 mg/L, dòng GN54b hòa tan được nhiều lân nhất với hàm lượng trung bình là 367,34 mg/L, dòng PR49a có khả năng tổng hợp IAA cao nhất với hàm lượng trung bình là 5,54 µg/L. Mười lăm dòng vi khuẩn có những đặc tính tốt được tuyển chọn để nhận diện bằng phương pháp PCR và giải trình tự DNA cho kết quả cả 15 dòng đều là vi khuẩn nội sinh và thuộc 6 chi, chi *Acinetobacter* (5 dòng), chi *Bacillus* (4 dòng), chi *Burkholderia* (2 dòng), chi *Klebsiella* (2 dòng), chi

Enterobacter (1 dòng) và chi *Sphingomonas* (1 dòng) với tỷ lệ tương đồng DNA từ 98-99%.

4.2. Đề nghị

Việc đánh giá ngoài đồng những dòng vi khuẩn nội sinh có đặc tính tốt đã được định danh, tiến tới nghiên cứu và sử dụng nguồn vi khuẩn nội sinh tốt làm phân sinh học để ứng dụng cho cây trồng là cần thiết.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bandara, W. M., Gamini Seneviratne, M. S., & Kulasooriya, S. A. (2006). Interactions among endophytic bacteria and fungi: effects and potentials. *J. Biosci*, 31, 645-650. <https://doi.org/10.1007/BF02708417>

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 Microbiology Letters*, 36(1), 87-90. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1986.tb01672.x>

- Cao Ngọc Điệp. (2011). *Vi khuẩn nội sinh thực vật (Endophytic bacteria)*. Nhà xuất bản Đại học Cần Thơ, Cần Thơ.
- Cao Ngọc Điệp & Nguyễn Ái Chi. (2009). *Phân lập và đặc tính của vi khuẩn nội sinh trong cây Khóm trồng trên đất phèn huyện Bến Lức, tỉnh Long An, Việt Nam*. Tuyển tập công trình nghiên cứu của hội nghị Công nghệ sinh học năm 2009 tổ chức tại thành phố Hồ Chí Minh, 23-24, tháng 10 năm 2009, trang 69-73.
- Cục Thống kê Bình Định. (2017). *Niên giám Thống kê tỉnh Bình Định (Bìnhđinh statistical yearbook)*. Nhà xuất bản Thống kê - 2018.
- Fahey, J. W., Dimock, M. B., Tomasino, S. F., Taylor, J. M., & Carlson, P. S. (1991). *Genetically engineered endophytes as biocontrol agents: a case study from industry*. In *Microbial ecology of leaves*. Springer-Verlag, London, United Kingdom. 401-411. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-3168-4_20
- Harari, A., J. Kigel, J., & Okon, Y. (1988). *Involvement of IAA in the interaction between Azospirillum brasilense and Panicum milliaceum roots*. *Plant and Soil*, 110, 275-282. <https://doi.org/10.1007/BF02226808>
- Lăng Ngọc Đậu, Nguyễn Thị Xuân Mỹ & Cao Ngọc Điệp. (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 10-08-2007. NXB KH-KT. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x>
- Nguyễn Hữu Hiệp & Trần Thị Tuyết Linh. (2009). Hiệu quả của vi khuẩn cố định đạm và hòa tan lân lên năng suất đậu phộng trồng trên đất cát tỉnh Trà Vinh. *Tạp chí Khoa học trường Đại học Cần Thơ*, 11b, 134 – 145.
- Nguyễn Thị Thu Hà, Hà Thanh Toàn & Cao Ngọc Điệp. (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.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2004.10.003>
- Perin, L., Martinez-Aguilar, L., Castro-Gonzalez, R., Estrada-de los Santos, P., Cabellos-Avelar, T., Guedes, H. V., Reis, V. M., & Caballero-Mellado, J., (2006). Diazotrophic Burkholderia Species Associated with Field-Grown Maize and Sugarcane. *Applied and environmental microbiology*, 72(5), 3103-3110. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.5.3103-3110.2006>
- Santos, Paulina Estrada-De Los, Doci'o Bustillos-Cristales & Jesús Caballero-Mellado (2001). Burkholderia, a genus Rich in Plant-Associated Nitrogen Fixers with Wide Environmental and Geographic Distribution. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 2790-2798. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.6.2790-2798.2001>
- Viện Quy hoạch và Thiết kế nông nghiệp, Phân viện QH&TKNN Miền Trung. (2005). *Chương trình điều tra bổ sung, chỉnh lý xây dựng bản đồ đất tỷ lệ 1/50.000 – 1/100.000 các tỉnh Duyên hải Nam Trung bộ*. Báo cáo bản đồ đất tỉnh Bình Định.
- Weber, O.B, Baldani V.L.D, Teixeira K.R.S, Kirchof G., Baldani J.I. & Dobereiner J. (1999). Isolation and characterization of diazotrophic bacteria from banana and pineapple plants. *Plant and Soil*, 210, 03-113. <https://doi.org/10.1023/A:1004623523179>
- Xu, H., Griffith, M., Patten, C. L., & Glick, B. R., (1998). Isolation and characterization of an antifreeze protein with ice nucleation activity from the plant growth promoting rhizobacterium Pseudomonas putida GR12-2. *Can. J. Microbiol*, 44, 64-73. <https://doi.org/10.1139/cjm-44-1-64>
- Zinniel, K. D., Lambrecht, P., Harris, N. B., Feng, Z., Kuczmarshki, D., Higley, P., Ishimaru, C. A., Arunakumari, A., Barletta R. G., & Vidaver, A. K., (2002). Isolation and characterization of endophytic bacteria from agronomic crops and Prairie plants. *Appl. Environ. Microbiol*, 68, 2198-2208. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.5.2198-2208.2002>