

PHÂN LẬP VÀ NHẬN DIỆN VI KHUẨN NỘI SINH TRONG CÂY CÚC XUYỀN CHI (*WEDELIA TRILOBATA* (L.) HITCHE.) BẰNG KỸ THUẬT PCR

Lương Thị Hồng Hiệp¹ và Cao Ngọc Diệp²

ABSTRACT

Wedelia trilobata (L.) Hitchc. is classified in family Asteraceae which has been planted in parks or medical herbage. Thirty seven bacterial isolates were isolated from roots and stems of the 44 *Wedelia trilobata* samples taken in 9 provinces of the Mekong Delta. Twenty seven isolates were identified as endophytes by PCR-16s-rDNA technique. Four of twenty seven isolates (Fa2, Rh, rd1, Il) were chosen to sequence, DNA sequencing was compared with Genbank database of NCBI by BLAST N software. The result showed that Fa2 isolate was similarity of 98% with EF528269.1 *Bacillus megaterium* CICCHLJ Q37; Rh isolate was a 99% similarity with EU081514.1 *Bacillus licheniformis* strain CMG M9, GU945225.1 *Bacillus licheniformis* strain B28, GU945226.1 *Bacillus licheniformis* strain W16; rd1 isolate was similarity of 99% with GQ375226.1 *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* strain CICC 10020, HQ283404.1 *Bacillus amyloliquefaciens* strain IPPBC_10A, HQ202724.1 *Bacillus amyloliquefaciens* strain LSSE-62, HQ286641.1 *Bacillus subtilis* Anctcri3, HQ286641.1 *Bacillus subtilis* Anctcri3 and Il isolate was 99% identity with DQ314740.1 *Acinetobacter antiviralis* KNF2022.

Keywords: endophyte, PCR technique, sequence, the Mekong Delta, *Wedelia trilobata*

Title: Isolation and identification of endophytic bacteria from *Wedelia trilobata* (L.) Hitchc

TÓM TẮT

Cúc Xuyên Chi (*Wedelia trilobata* (L.) Hitchc.) thuộc họ Cúc, mọc hoang hay được trồng làm thảm thực vật đôi khi được sử dụng như một vị thuốc Nam. Từ 44 mẫu rễ và thân cây Cúc Xuyên Chi thu ở các tỉnh An Giang, Đồng Tháp, Vĩnh Long, Bến Tre, Bạc Liêu, Hậu Giang, Sóc Trăng, Kiên Giang và thành phố Cần Thơ phân lập được 37 dòng vi khuẩn, 14 dòng được phân lập trên môi trường Nfb, 12 dòng được phân lập trên môi trường RMR và 11 dòng được phân lập trên môi trường LGI. Hai mươi bảy dòng vi khuẩn đã được xác định là vi khuẩn nội sinh bằng kỹ thuật PCR 16S-rDNA. Bốn dòng Fa2, Rh, rd1 và Il được lựa chọn giải trình tự đoạn 16s-rDNA. Kết quả cho thấy dòng Fa2 có tỉ lệ tương đồng với EF528269.1 *Bacillus megaterium* dòng CICCHLJ Q3 là 98%, dòng Rh có tỉ lệ tương đồng với EU081514.1 *Bacillus licheniformis* dòng CMG M9, GU945225.1 *Bacillus licheniformis* dòng B28, GU945226.1 *Bacillus licheniformis* dòng W16 là 99%, dòng rd1 có tỉ lệ tương đồng 99% với GQ375226.1 *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* dòng CICC 10020, HQ283404.1 *Bacillus amyloliquefaciens* dòng IPPBC_10A, HQ202724.1 *Bacillus amyloliquefaciens* dòng LSSE-62, HQ286641.1 *Bacillus subtilis* Anctcri3 và dòng Il có tỉ lệ tương đồng 99% với DQ314740.1 *Acinetobacter antiviralis* dòng KNF2022.

Từ khóa: Cúc Xuyên Chi, Đồng bằng Sông Cửu Long, giải trình tự, PCR, vi khuẩn nội sinh

¹ Sinh viên Công nghệ sinh học K32

² Viện NC & PT Công nghệ sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Vi khuẩn nội sinh là vi khuẩn sống trong mô thực vật được tìm thấy ở vùng rễ, rễ, thân, lá, quả của thực vật. Vùng rễ là nơi xuất phát nhiều vi khuẩn nội sinh chui vào rễ, thân, lá để sống nội sinh; sau khi xâm nhập vào cây chủ có thể tập trung tại vị trí xâm nhập hoặc di chuyển đi khắp nơi trong cây đến các hệ mạch của rễ, thân, lá, hoa (Zinniel *et al.*, 2002), thúc đẩy các quá trình chuyển hóa trong cây, sự phát triển lông rễ một cách mạnh mẽ và giảm sự kéo dài rễ (Harari *et al.*, 1988). Hiện nay các nhà nghiên cứu quan tâm nhiều đến những loài vi khuẩn nội sinh có đặc tính tốt như vi khuẩn có khả năng cố định nitơ trong không khí (Xu *et al.*, 1998), tổng hợp kích thích tố auxin (Barbieri *et al.*, 1986), giúp loại bỏ các chất gây ô nhiễm môi trường (Rosenblueth và Martinez, 2006), tăng hàm lượng các chất khoáng, tăng khả năng kháng bệnh (Fahey *et al.*, 1991), hòa tan lân khó tan cho cây trồng hấp thụ tốt chất dinh dưỡng (Lăng Ngọc Đậu *et al.*, 2007). Đã có nhiều nghiên cứu về vi khuẩn nội sinh trong các loại cây ở Việt Nam như Nguyễn Thị Thu Hà *et al.* (2008) đã phân lập được vi khuẩn nội sinh trong một số loại cỏ chăn nuôi, Cao Ngọc Điệp và Nguyễn Ái Chi (2009), Cao Ngọc Điệp và Nguyễn Thành Dũng (2010) phân lập vi khuẩn nội sinh trong cây khóm trồng trên đất phèn huyện Bến Lức, tỉnh Long An và huyện Vĩnh Thuận, tỉnh Kiên Giang. Cúc Xuyên Chi (*Wedelia trilobata* (L.) Hitchc.) là một đối tượng rất thích hợp để nghiên cứu về vi khuẩn nội sinh vì đây là một cây hoang dại, hoặc nếu được trồng làm thảm thực vật cũng không cần sử dụng phân bón, nhưng lại phát triển rất tốt, điều này cho thấy khả năng có vi khuẩn nội sinh bên trong cây Cúc Xuyên Chi là rất cao.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

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

Thu thập và xử lý mẫu

Mẫu được thu ở những nơi cây mọc hoang dại tại các tỉnh (Bảng 1) lúc sáng sớm hay chiều mát, thu toàn bộ cây rồi rửa thật sạch đất bám ở rễ, thân và lá; sau đó cắt rời rễ và thân cây ra. Để loại trừ các vi sinh vật có khả năng còn bám ở bề mặt, mẫu sau khi thu thập được tiến hành xử lý như sau: rửa sạch phần thân, rễ dưới vòi nước mạnh; tiếp tục rửa lại bằng nước cất vô trùng rồi cắt rễ và thân thành những đoạn nhỏ 1-2 cm, làm khô mẫu bằng giấy hút ẩm; sau đó lần lượt khử trùng mẫu (rễ, thân) bằng cồn 96% trong 3 phút, hypochloride 1% trong 3 phút, hydrogen peroxide 3% (H₂O₂) 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, lấy 200µl nước cất vô trùng đã rửa mẫu ở lần thứ 4 (lần cuối) chủng lên các đĩa môi trường Tryptone – Yeast extract – glucose – agar và ủ ở 30⁰C, nếu sau 24 giờ ủ các đĩa môi trường này không có sự xuất hiện các khuẩn lạc thì các mẫu đã khử trùng đạt yêu cầu.

Phân lập vi khuẩn nội sinh từ rễ và thân của cây Cúc Xuyên Chi

Chọn các mẫu rễ, thân đã khử trùng đạt yêu cầu cho vào các ống nghiệm chứa 10ml nước cất vô trùng, dùng đĩa thủy tinh đã khử trùng trên đèn cồn nghiền mịn mẫu. Lấy 200µl dịch nghiền của rễ, thân lần lượt cho vào các ống nghiệm chứa 3ml môi trường LGI, Nfb và RMR bán đặc (semi – solid) vì 3 môi trường này phát hiện nhiều nhóm vi khuẩn nội sinh (Cao Ngọc Điệp, 2010) rồi đem ủ ở 30⁰C trong

2-3 ngày, mỗi nghiệm thức được lập lại 3 lần, các thao tác còn lại được thực hiện theo mô tả của Nguyễn Thị Thu Hà et al. (2008) cho đến khi phân lập thành dòng thuần (isolate). Quan sát và mô tả các dạng khuẩn lạc phát triển trên từng loại môi trường đặc, quan sát hình dạng và sự chuyển động của dòng vi khuẩn phân lập được, chọn một vài dòng vi khuẩn nổi bật chụp hình ở kính hiển vi điện tử (SEM).

2.2 Nhận diện các dòng vi khuẩn nội sinh

Tách chiết DNA vi khuẩn theo mô tả của Neumann et al. (1992)

Nhận diện vi khuẩn sống nội sinh trong cây

Sử dụng các đoạn môi 16s-rDNA được thiết kế bởi Zinniel et al., (2002) vì các đoạn môi phát hiện hầu hết vi khuẩn nội sinh và thực hiện các phản ứng PCR các bước như mô tả của Cao Ngọc Điệp (2010). Nhận diện các dòng vi khuẩn nội sinh ở băng (band) 900 bp theo thang chuẩn 100bp.

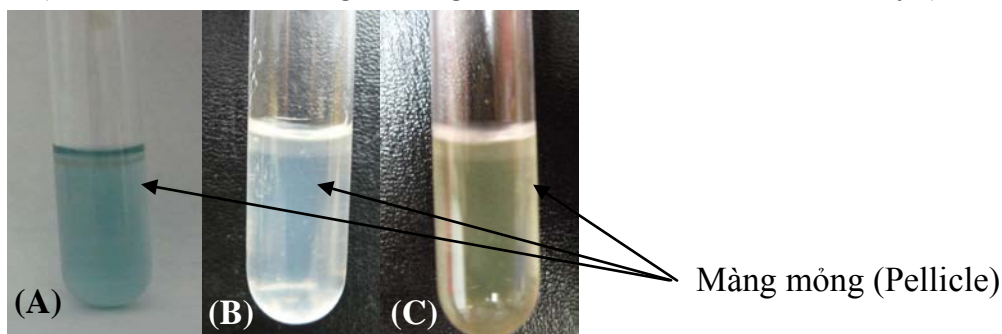
Giải trình tự một số dòng vi khuẩn nội sinh nổi bật

Chọn các dòng vi khuẩn nội sinh nổi bật, sử dụng sản phẩm PCR để giải trình tự bằng máy giải trình tự tự động ABI3130. Sử dụng chương trình BLAST N (Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool) để so sánh trình tự đoạn gen 16s-rDNA của các dòng vi khuẩn với trình tự gen 16s-rDNA của các loài vi khuẩn có trong ngân hàng dữ liệu của NCBI (National Center for Biotechnology Information).

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Phân lập và đặc điểm của các dòng vi khuẩn

Trên ba môi trường Nfb, LGI, RMR thu được 37 dòng vi khuẩn trong đó 14 dòng phân lập trên môi trường Nfb, 12 dòng phân lập trên môi trường RMR và 11 dòng phân lập trên môi trường LGI. Có 25 dòng phân lập từ rễ (trong đó 10 dòng được phân lập trên môi trường Nfb, 7 dòng được phân lập trên môi trường RMR và 8 dòng được phân lập trên môi trường LGI) chiếm 67,57% và 12 dòng phân lập từ thân (trong đó phân lập được trên môi trường Nfb là 4 dòng, trên môi trường RMR là 5 dòng và 3 dòng được phân lập trên môi trường LGI) chiếm 32,43% (Bảng 1). Các dòng vi khuẩn đều có đặc tính là sinh trưởng và phát triển trong điều kiện vi hiếu khí trong các môi trường bán đặc, chúng phát triển thành màng mỏng (pellicle) cách mặt môi trường khoảng 0,5 cm như các mô tả trước đây (Hình 1).



Hình 1: Vi khuẩn sau 36 giờ nuôi cấy trên môi trường bán đặc

(A) Môi trường Nfb; (B) Môi trường RMR; (C) Môi trường LGI

Trong 37 dòng vi khuẩn có 17 dòng có khuẩn lạc màu trắng đục, chiếm 45,95%; 15 dòng có khuẩn lạc màu trắng sữa chiếm 40,54%, 5 dòng có khuẩn lạc màu vàng chiếm 13,51%. Các dòng vi khuẩn đa số có khuẩn lạc hình tròn, 27/37 dòng vi khuẩn, chiếm 72,97%, các dòng vi khuẩn còn lại có khuẩn lạc dạng lan, 10 dòng, chiếm 27,03% (Hình 2).



Hình 2: Một số hình dạng, độ nổi, màu sắc... khuẩn lạc của vi khuẩn nội sinh trong môi trường Nfb và RMR

Có 24 dòng vi khuẩn có độ nổi lồi, chiếm 64,86%, 13 dòng vi khuẩn còn lại có độ nổi mô, chiếm 35,14%. Dạng bìa khuẩn lạc: chia ra dạng bìa nguyên chiếm 75,68% (28/37 dòng vi khuẩn), 9 dòng vi khuẩn còn lại có dạng bìa răng cưa, chiếm 24,32%. Kích thước khuẩn lạc: có 37 dòng khuẩn lạc có đường kính dao động từ 0,4 – 2,62 mm sau khi cấy trên môi trường đặc và ủ trong tủ ủ 24 giờ. Tất cả vi khuẩn phân lập được đều có dạng hình que ngắn (Hình 3) phù hợp với kết quả của Cao Ngọc Diệp và Nguyễn Ái Chi (2009) trong đó dạng que ngắn lớn có 16 dòng, chiếm 43,24%, 21 dòng còn lại có dạng que ngắn nhỏ chiếm 56,76%. Về khả năng di chuyển, tất cả các dòng vi khuẩn đều có khả năng di chuyển ngoại trừ dòng II.

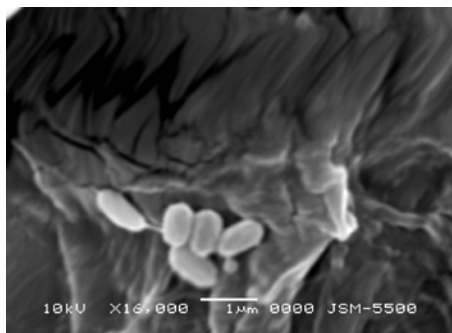
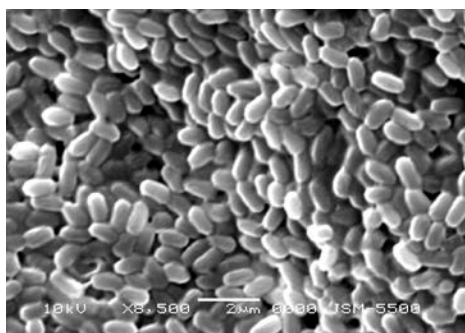
Bảng 1: Nguồn gốc các dòng vi khuẩn phân lập từ cây Cúc Xuyên Chi

Số TT	Dòng vi khuẩn	Môi trường phân lập	Vị trí phân lập	Nguồn gốc cây chủ
1	II	LGI	Rễ	Thị trấn Vĩnh Châu, Vĩnh Châu, Sóc Trăng
2	Ip	LGI	Rễ	Quận Ô Môn, Cần Thơ
3	Iq1	LGI	Rễ	Xuân Khánh, Ninh Kiều, Cần Thơ
4	Iq2	LGI	Rễ	Xuân Khánh, Ninh Kiều, Cần Thơ
5	Iq3	LGI	Rễ	Xuân Khánh, Ninh Kiều, Cần Thơ
6	Iw	LGI	Rễ	Cồn Khương, Cần Thơ
7	Ix1	LGI	Rễ	Thị trấn Tân Hiệp, Tân Hiệp, Kiên Giang
8	Ix2	LGI	Rễ	Thị trấn Tân Hiệp, Tân Hiệp, Kiên Giang
9	ij	LGI	Thân	Bình Minh, Vĩnh Long
10	iq	LGI	Thân	Xuân Khánh, Ninh Kiều, Cần Thơ
11	iv	LGI	Thân	Việt Mỹ, Châu Thành, Sóc Trăng
12	Fa1	Nfb	Rễ	Mỹ Luông, Chợ Mới, An Giang
13	Fa2	Nfb	Rễ	Mỹ Luông, Chợ Mới, An Giang
14	Fb1	Nfb	Rễ	Mỹ Luông, Chợ Mới, An Giang
15	Fb2	Nfb	Rễ	Mỹ Luông, Chợ Mới, An Giang
16	Fb3	Nfb	Rễ	Mỹ Luông, Chợ Mới, An Giang
17	Fc1	Nfb	Rễ	Mỹ Luông, Chợ Mới, An Giang
18	Fc2	Nfb	Rễ	Mỹ Luông, Chợ Mới, An Giang
19	Fd1	Nfb	Rễ	Thị trấn Chợ Mới, Chợ Mới, An Giang
20	Fp1	Nfb	Rễ	Quận Ô Môn, Cần Thơ
21	Fp2	Nfb	Rễ	Quận Ô Môn, Cần Thơ
22	fc1	Nfb	Thân	Mỹ Luông, Chợ Mới, An Giang

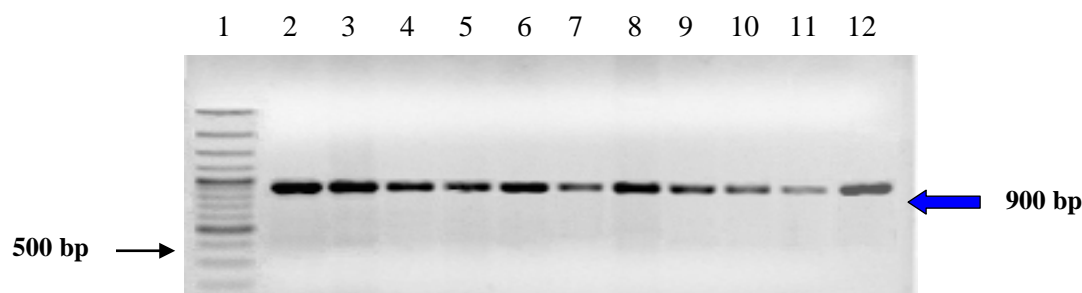
23	fc2	Nfb	Thân	Mỹ Luông, Chợ Mới, An Giang
24	fc3	Nfb	Thân	Mỹ Luông, Chợ Mới, An Giang
25	fp1	Nfb	Thân	Quận Ô Môn, Cần Thơ
26	Ra1	RMR	Rễ	Mỹ Luông, Chợ Mới, An Giang
27	Re	RMR	Rễ	Lai Vung, Đồng Tháp
28	Rg2	RMR	Rễ	Tích Thiện, Vĩnh Long
29	Rh	RMR	Rễ	Trà Ôn, Vĩnh Long
30	Rk1	RMR	Rễ	Giồng Trôm, Bến Tre
31	Rm2	RMR	Rễ	Giá Rai, Bạc Liêu
32	Rs	RMR	Rễ	Quận Ô Môn, Cần Thơ
33	rd1	RMR	Thân	Thị trấn Chợ Mới, Chợ Mới, An Giang
34	rd2	RMR	Thân	Thị trấn Chợ Mới, Chợ Mới, An Giang
35	rg1	RMR	Thân	Tích Thiện, Vĩnh Long
36	rg2	RMR	Thân	Tích Thiện, Vĩnh Long
37	Rt	RMR	Thân	Thanh Hòa, Phụng Hiệp, Hậu Giang

3.2 Nhận diện các dòng vi khuẩn nội sinh

Kết quả phân tích PCR với 3 đoạn môi 16S-rDNA (p515FPL, p-13B và PCR-1) để nhận diện vi khuẩn nội sinh cho thấy có 27/37 dòng cho băng DNA ở vị trí khoảng 900bp so với thang chuẩn, là vi khuẩn nội sinh (Hình 4). Các dòng còn lại không có băng hoặc có băng không ở vị trí 900bp thì không phải là vi khuẩn nội sinh. Trong 27 dòng vi khuẩn, có 6 dòng được phân lập trên môi trường Nfb, 10 dòng được phân lập trên môi trường RMR và 11 dòng được phân lập trên môi trường LGI.



Hình 3: Dòng vi khuẩn nội sinh (dòng Rg2) và (dòng Fa2) được chụp dưới kính hiển vi điện tử



1: thang chuẩn 100bp, 2-12 là các dòng Iq3, Ix2, Il, iv, Ip, Iw, Iq2, Ix1, ij, iq, Iq1

Hình 4: Phổ điện di sản phẩm PCR được nhân lên từ DNA của các dòng vi khuẩn nội sinh trên gel agarose với cặp môi 16s-rDNA

Dùng cặp môi chuyên biệt cho băng DNA trên agarose gel 1,2% khoảng 900bp đã sử dụng ở trên để khuếch đại đoạn DNA của các dòng vi khuẩn **Fa2**, **rd1**, **Rh** và **II**. Kết quả cho thấy trình tự dòng **Fa2** sau:

```
ATGTGACGCTTTCCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCACGGCTCAACCGGGGAGG
GTCATTGGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGAGAAAGCGGAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCA
GTGGCGAAGGCGGTTTGGTCTGTAAGTGCAGCTGAGCGCGGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCC
GTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGAGTACGGTGCGA
AGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCAACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTC
TTGACATCCTCTGACAACCTAGAGATAGAGCGTTCCCTTTCCGGGGACAGAGTGACGGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCG
AGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGAC
AAACCGGAGGAAGGTGGGTTGAGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACAGTGTACAATGGATGGTACAAAGGGCT
GCAAGACCGGAGGTCACACCAATCCCATAAACACCTCTCCATATCT
```

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
EU289450.1	Uncultured bacterium clone 1-7C 16S ribosomal RNA gene, partial s	1323	1323	96%	0.0	98%	
EF528269.1	Bacillus megaterium strain CICCHLJ Q37 16S ribosomal RNA gene,	1323	1323	96%	0.0	98%	
DQ666685.1	Bacillus megaterium 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1319	1319	97%	0.0	98%	

Đoạn DNA của dòng **Fa2** dài 768bp có tỉ lệ đồng hình 98% với trình tự DNA của EF528269.1 *Bacillus megaterium* dòng CICCHLJ Q37.

Trình tự đoạn DNA của dòng **rd1** là:

```
CGGGTACCATGTCCGGATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGT
CATTGGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGT
GGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTGCAGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT
AAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTTCCGCCCTTTAGTGTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGAGTACGGTTCGCAAG
ACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCAACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTT
GACATCCTCTGACAACCTAGAGATAGGACGTCCCTTCCGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGAG
TGTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACC
GGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAAACAAAGGGCAGCGAAA
CCGCGAGGTTAAGCCAATCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCG
CGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGGGCCATATCCATACTGACTTGATAAGTA
```

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Lin
GQ375226.1	Bacillus subtilis subsp. subtilis strain CICC 10020 16S ribosomal RNA ge	1537	1537	95%	0.0	99%	
HQ283404.1	Bacillus amyloliquefaciens strain IPPBC_10A 16S ribosomal RNA gene, p	1533	1533	95%	0.0	99%	
HQ202724.1	Bacillus amyloliquefaciens strain LSSE-62 16S ribosomal RNA gene, par	1533	1533	95%	0.0	99%	
HQ286641.1	Bacillus subtilis strain Anctcri3 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	1533	1533	95%	0.0	99%	

Đoạn DNA của dòng **rd1** dài 874bp có tỉ lệ đồng hình 99% với trình tự DNA của GQ375226.1 *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* dòng CICC 10020, HQ283404.1 *Bacillus amyloliquefaciens* dòng IPPBC_10A, HQ202724.1 *Bacillus amyloliquefaciens* dòng LSSE-62, HQ286641.1 *Bacillus subtilis* Anctcri3.

Trình tự đoạn DNA của dòng **Rh** là:

```
CATATGCGGTTGTCCGGATTATTGGGCGTAAAGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGG
TCATTGGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAG
TGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTGCAGCTGAGCGCGGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCG
TAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGAGTACGGTTCGCAA
GACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCAACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTC
TGACATCCTCTGACAACCTAGAGATAGGGCTTCCCTTCCGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCGTGTG
ATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAAC
CGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGACAGAAACAAAGGGCAGCGAA
GCCGCGAGGCTAAGCCAATCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCG
GCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGGGCCATTAAGTCTTGTGTTAGGGC
```

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
EU081514.1	Bacillus licheniformis strain CMG M9 16S ribosomal RNA gene, partial se	1546	1546	97%	0.0	99%	
GQ407194.1	Bacillus sp. DV9-50 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1541	1541	97%	0.0	99%	
GQ407169.1	Bacillus sp. DV9-24 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1541	1541	97%	0.0	99%	
GU945226.1	Bacillus licheniformis strain W16 16S ribosomal RNA gene, partial seque	1541	1541	97%	0.0	99%	
GU945225.1	Bacillus licheniformis strain B17 16S ribosomal RNA gene, partial seque	1541	1541	97%	0.0	99%	
GU945221.1	Bacillus licheniformis strain B28 16S ribosomal RNA gene, partial seque	1541	1541	97%	0.0	99%	

Đoạn DNA của dòng **Rh** dài 868bp có tỉ lệ đồng hình 99% với trình tự DNA với EU081514.1 *Bacillus licheniformis* dòng CMG M9, GU945226.1 *Bacillus licheniformis* dòng W16, GU945225.1 *Bacillus licheniformis* B28.

Trình tự đoạn DNA của dòng **II** là:

```
AGAGTGAGTTATCGGATTTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGCGGCTAATTAAGTCAAATGTGAAATCCCCGAGCTTAACTGGGAATTG
CATTGATACTGGTTAGCTAGAGTGTGGGAGAGGATGGTAGAATCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGAT
GGCGAAGGCAGCCATCTGGCCTAACACTGACCGCTGAGGTGCGAAAGCATGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGT
AAACGATGTCTACTAGCCGTTGGGGCCTTTGAGGCTTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTAGACCCCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGA
CTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTGGCCTTG
ACATACTAAGAACCTTTCTAGAGATAGATTGGTGCCTTCGGGAACCTTAGATACAGGTGCTGCATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTGCTGAGAT
GTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTTTCCTTACTTGCAGCATTTTCGGATGGGAACCTTAAGGATACCTCCAGTGACAAACT
GGAGGAAGGCGGGGACGACGTCAGTCAATCATATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGCTGCTACAATGGTTCGGTACAAAGGGTTGTCTAC
TAGCGATAGGATGCTAATCTCAAAAAGCCGATCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCG
CGGATCAGAATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGGGCCCT
```

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
DQ314740.1	Acinetobacter antiviralis strain KNF2022 16S ribosomal RNA gene, parti	1524	1524	98%	0.0	99%	
FM874549.1	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone MD03C05	1507	1507	98%	0.0	99%	
GQ206316.1	Uncultured Acinetobacter sp. clone A4H9M6 16S ribosomal RNA gene, p	1480	1480	98%	0.0	98%	

Đoạn DNA của dòng **II** dài 851bp có tỉ lệ đồng hình 99% với trình tự DNA của DQ314740.1 *Acinetobacter antiviralis* dòng KNF2022.

Theo nghiên cứu của Fernando *et al.* (2005), *Bacillus megaterium* và *B. subtilis* được phát hiện là vi khuẩn nội sinh trong cây cà phê. Ngoài ra, *B. subtilis* cũng đã được báo cáo là vi khuẩn nội sinh trong cây dẻ, giúp cây chống lại bệnh cháy lá do nấm *Cryphonectria parasitica* gây ra (Wilhelm *et al.*, 1998). Trong báo cáo của Wang *et al.* (2009), dòng *Bacillus subtilis* EB-28, một vi khuẩn nội sinh được phân lập từ *Speranskia tuberculata* (Bge.) Baill, có tác dụng kháng nấm *Botrytis cinerea* Pers. gây sự thối rữa một cách mạnh mẽ, đạt hiệu quả đến 71,1% trong điều kiện *in vitro* và 52,4% trong thí nghiệm ngoài đồng. *Bacillus subtilis*, được phân lập từ cây nho, có tác dụng ức chế bệnh Pierce (Kirkpatrick và Wilhelm, 2007). Aravind *et al.* (2009) cũng phát hiện vi khuẩn *Bacillus* nội sinh trong cây tiêu, đặc biệt dòng IISRBP 17 được xác định là *Bacillus megaterium* có hoạt tính mạnh chống lại *Phytophthora capsici*, một loại nấm gây ra bệnh thối rễ. *Bacillus licheniformis*, theo nghiên cứu của Bacon và Hinton (2002) về tiềm năng kiểm soát sinh học của vi khuẩn nội sinh, được xác định có tác dụng kháng lại nấm *Fusarium moniliforme*. Lee *et al.* (2009), tiến hành phân lập vi khuẩn từ rễ cây thuốc lá, đã nhận diện được dòng *Acinetobacter antiviralis* có tác dụng ức chế virus gây bệnh khảm thuốc lá (Tobacco mosaic virus). Kết quả thí nghiệm cho thấy nguồn vi khuẩn nội sinh phong phú trong các cây cỏ mọc hoang [không bón phân] giúp cho cây cỏ này phát triển tốt là nguồn tài nguyên quý giá cần nghiên cứu và ứng dụng.

4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1 Kết luận

- Phân lập được 37 dòng vi khuẩn; 14 dòng vi khuẩn được phân lập trên môi trường Nfb, 12 dòng vi khuẩn được phân lập trên môi trường RMR và 11 dòng được phân lập trên môi trường LGI.

- Có 27/37 dòng được xác định là vi khuẩn nội sinh (6 dòng phân lập trên môi trường Nfb, 10 dòng phân lập trên môi trường RMR, 11 dòng phân lập trên môi trường LGI) bằng kỹ thuật PCR 16s-rDNA, cho sản phẩm PCR được nhân lên từ DNA có kích thước 900bp dựa trên thang chuẩn 100bp.

- Bốn dòng vi khuẩn được xác định là dòng **Fa2** có tỉ lệ tương đồng với EF528269.1 *Bacillus megaterium* dòng CICCHLJ Q37 là 98%, dòng **rd1** có tỉ lệ tương đồng 99% với GQ375226.1 *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* dòng CICC 10020, HQ283404.1 *Bacillus amyloliquefaciens* dòng IPPBC_10A, HQ202724.1 *Bacillus amyloliquefaciens* dòng LSSE-62, HQ286641.1 *Bacillus subtilis* Anctcri3, dòng **Rh** có tỉ lệ tương đồng với EU081514.1 *Bacillus licheniformis* dòng CMG M9, GU945226.1 *Bacillus licheniformis* dòng W16, GU945225.1 *Bacillus licheniformis* B28 là 99% và dòng **II** có tỉ lệ tương đồng 99% với DQ314740.1 *Acinetobacter antiviralis* dòng KNF2022.

4.2 Đề nghị

Cần nghiên cứu thêm trên những cây cỏ mọc hoang nhưng phát triển tốt để bổ sung nguồn vi khuẩn nội sinh và chọn lọc dòng vi khuẩn nội sinh tốt để ứng dụng trong nhiều lãnh vực như phân sinh học, đối kháng...

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Aravind, R., A. Kumar, S.J. Eapen and K.V. Ramana, 2009. Endophytic bacterial flora in root and stem tissues of black pepper (*Piper nigrum* L.) genotype: isolation, identification and evaluation against *Phytophthora capsici*. *Letters in Applied Microbiology* 48,58–64.
- Bacon, C. W. and D. M. Hinton, 2002. Endophytic and Biological Control Potential of *Bacillus mojavensis* and Related Species. *Biological Control* 23,274–284.
- Barbieri, P., T. Zanelli, E. Galli and G. Zanetti, 1986. Wheat inoculation with *Azospirillum brasilense* Sp6 and some mutants altered in nitrogen fixation and indole-3-acetic acid production. *FEMS Microbiology Letters* 36,87-90.
- Cavalcante, V. A. and J. Dobereiner, 1988. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant Soil*, 108,23-31.
- Cao Ngọc Diệp và Nguyễn Ai 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, Vietnam. *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.
- Cao Ngọc Diệp, 2010. Vi khuẩn nội sinh thực vật, Nhà xuất bản Đại học.
- Fahey, J. W., M. B. Dimock, S. F. Tomasino, J. M. Taylor, and P. S. Carlson, 1991. Genetically engineered endophytes as biocontrol agents: a case study from industry. In *Microbial ecology of leaves*. Springer-Verlag, London, United Kingdom. pp. 401–411.
- Fernando, E. V, M. Pava-Ripoll, F. Posada and J.S. Buyer, 2005. Endophytic bacteria in *Coffea arabica* L. *J. Basic Microbiol.* 45, 371–380.
- Harari, A., J. Kigel and Y. Okon, 1988. Involvement of IAA in the interaction between *Azospirillum brasilense* and *Panicum miliaceum* roots. *Plant and Soil* 110, 275–282.

- Kirkpatrick, B. and M. Wilhelm, 2007. Evaluation of grapevine endophytic bacteria for control of Pierce's disease. University of California, pp. 203-207.
- Krieg, N. R. and R. Döbereiner, 1984. Genus *Azospirillum* Tarrand Krieg and Döbereiner 1979, 79AL (effective publication: Tarrand, Krieg and Döbereiner 1978, 978). In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 1, 94-104.
- Lăng Ngọc Đậu, Nguyễn Thị Xuân My và 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. trang 445- 448.
- Lee, Jung-Sook, K. C. Lee, K. K. Kim, I. C. Hwang, C. Jang, N. G. Kim, W. H. Yeo, B. S. Kim, Y. M. Yu and J. S. Ahn, 2009. *Acinetobacter antiviralis* sp. nov., from Tobacco Plant Roots. J. Microbiol. Biotechnol. 19(3), 250–256.
- Neumann, B., A. Pospiech and H. U. Schairrer, 1992. Rapid isolation of genomic DNA from Gram-negative bacteria. Trends Genet. 8,332-333.
- Nguyễn Thị Thu Hà, Hà Thanh Toàn và Cao Ngọc Điệp, 2009. Phân lập và đặc tính các dòng vi khuẩn nội sinh trong một số cây cỏ chăn nuôi. Tạp chí Công nghệ sinh học 7(2), 241-250.
- Rosenblueth M. and E. Martínez-Romero, 2006. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. Am. Phytopathol. Soc 19, 827-837.
- Xu, H., M. Griffith, C. L. Patten and B. R. Glick, 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.
- Wang, S., T. Hu, Y. Jiao, J. Wei and K. Cao, 2009. Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* EB-28, an endophytic bacterium strain displaying biocontrol activity against *Botrytis cinerea* Pers. Frontiers of Agriculture in China,3,247-252.
- Wilhelm, E., W. Arthofer, R. Schafleitner and B. Krebs, 1998. *Bacillus subtilis* an endophyte of chestnut (*Castanea sativa*) as antagonist against chestnut blight (*Cryphonectria parasitica*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 52,105–108
- Zinniel, D. K., P. Lambrecht, N. B. Harris, Z. Feng, D. Kuezmarski, P. Highley, C. Ishimaru, A. Arunakumari, G. R. Barletta and A. K. Vidaver, 2002. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. Appl. Environ. Microbiol. 59, 2198-2208