

KHẢO SÁT VÙNG GEN 16S rDNA CỦA MỘT SỐ ĐỒNG VI KHUẨN CÓ KHẢ NĂNG CỐ ĐỊNH ĐẠM Ở ĐẤT VÙNG RỄ LÚA TỈNH ĐỒNG THÁP

Nguyễn Thị Pha¹ và Nguyễn Hữu Hiệp¹

ABSTRACT

Sixteen nitrogen fixing bacterial strains were isolated from paddy rhizosphere of four regions including Lai Vung, Thanh Binh, Tam Nong and Thap Muoi of Dong Thap province (each districts isolated four bacterial strains). These materials were used to extract DNA and then amplify 16S rDNA region by the primer pair of 27F and 1495R. The PCR products were then digested by four restriction enzymes consisting of MspI, SmaI, EcoRI and HinfI. The restriction enzyme which produced the highest polymorphism was MspI with PIC index of 0.9238, and the lowest polymorphism was EcoRI with PIC value of 0.6104. HinfI and SmaI produced 0.8298 and 0.7471 in PIC value, respectively. Clustering analysis using NTSYS PC2.0 showed that 16 bacterial strains were divided into six groups with dissimilarity of 0.65%. Bacterial strains isolated from the same districts also performed different pattern of DNA bands, and separated into distinct groups in the pedigree diagram. Four bacterial strains isolated from Lai Vung district provided dissimilarity of 1.87%, while the other four strains of Thanh Binh district gave 0.38% in dissimilarity percent. The dissimilarity of bacterial strains within groups of Tam Nong and Thap Muoi district were 1.70% and 1.21%, respectively. Eight bacterial strains isolated from aluminum soil of Tam Nong and Thap Muoi districts were separated into four groups, while the eight other bacterial strains from alluvial soil (Thanh Binh and Lai Vung districts) divided into three distinct groups.

Keywords: Nitrogen fixing bacterium, 16S rDNA region, polymorphism, restriction enzyme, polymorphism index content

Title: Study on 16S rDNA region of some nitrogen fixing bacteria isolated from paddy rhizosphere of Dong Thap province

TÓM TẮT

Mười sáu đồng vi khuẩn có khả năng cố định đạm được phân lập từ đất vùng rễ lúa được trồng tại bốn huyện thuộc Tỉnh Đồng Tháp là Lai Vung, Thanh Bình, Tam Nông và Tháp Mười (với 4 dòng ở mỗi Huyện) được phân tích vùng 16S rDNA bằng cặp mồi tổng 27F và 1495R, sản phẩm PCR được phân cắt bởi 4 enzyme cắt giới hạn (RE) là MspI, SmaI, EcoRI, HinfI. Kết quả enzyme MspI có mức đa hình cao nhất với chỉ số PIC là 0,9238, EcoRI có tỷ lệ đa hình thấp nhất với chỉ số PIC là 0,6104. Hai RE còn lại là HinfI và SmaI có chỉ số PIC lần lượt là 0,8298 và 0,7471. Kết quả phân nhóm bằng phần mềm NTSYS PC-2.1 cho thấy 16 dòng vi khuẩn được chia thành 6 nhóm ở mức khác biệt khảo sát là 0,654%. Các dòng vi khuẩn phân lập trong cùng một huyện cũng thể hiện sự khác biệt trên giản đồ phả hệ. Bốn dòng phân lập từ huyện Lai Vung có mức độ khác biệt 1,87%, huyện Thanh Bình khác biệt ở mức 0,38%, huyện Tam Nông là 1,70% và Tháp Mười là 1,21%. Tám dòng vi khuẩn thuộc nhóm đất phèn (huyện Tam Nông và huyện Tháp Mười) được phân thành 4 nhóm trong khi đó 8 dòng thuộc nhóm đất phù sa (huyện Thanh Bình và Lai Vung) phân bố trong 3 nhóm.

Từ khóa: chỉ số PIC, enzyme cắt giới hạn, sự đa hình, vi khuẩn cố định đạm, vùng gen 16S rDNA

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

1 GIỚI THIỆU

Phân bón được xem là yếu tố quyết định năng suất cây trồng nói chung và cây lúa nói riêng. Tuy nhiên việc sử dụng nhiều phân bón đặc biệt là phân bón hóa học không những làm tăng chi phí cho sản xuất nông nghiệp mà còn ảnh hưởng đến môi trường cũng như chất lượng gạo xuất khẩu. Trong khi đó, vi khuẩn cố định nitơ sống tự do quanh vùng rễ lúa là nguồn tài nguyên vô cùng quý giá. Trong đất nhóm vi sinh vật này cung cấp lượng nitơ tự nhiên cho lúa và các cây trồng khác. Tuy nhiên số lượng các vi sinh vật còn hạn chế và người trồng lúa vẫn phải sử dụng một lượng lớn phân hóa học. Các nghiên cứu mới đây cho thấy nhóm vi khuẩn này cũng khá đa dạng chúng bao gồm nhiều chủng như: *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Beijerinckii*, *Clostridium*, *Herbaspirillum*... Hiện tại những nghiên cứu về nhóm vi sinh vật này trên đất trồng lúa vùng đồng bằng sông Cửu Long nói chung và đất trồng lúa thuộc tỉnh Đồng Tháp nói riêng còn hạn chế. Vùng 16S rDNA từ lâu được biết như là thước đo về sự biến đổi trong hệ gen của các vi sinh vật. Do có số lượng nucleotide lý tưởng (khoảng 1500 cặp nu) vùng gen này đã được nhiều nghiên cứu ứng dụng nhằm tìm ra sự khác biệt di truyền của các chủng vi sinh vật. Những thông tin về sự khác biệt di truyền của các dòng vi khuẩn cố định đạm giúp các nhà khoa học có cơ sở để chọn lọc và phát triển những chế phẩm sinh học có hiệu quả cố định đạm cao ứng dụng trong sản xuất nông nghiệp nói chung và trong sản xuất gạo nói riêng. Nghiên cứu “*Khảo sát vùng gen 16S rDNA các dòng vi khuẩn có khả năng cố định đạm trên đất trồng lúa thuộc tỉnh Đồng Tháp*” được thực hiện nhằm góp phần chọn lọc các dòng vi khuẩn bản địa để sản xuất phân sinh học phục vụ cho mục tiêu phát triển một nền nông nghiệp sạch và bền vững trong tương lai.

2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu

Đất vùng rễ lúa thuộc bốn huyện Lai Vung, Thanh Bình, Tam Nông và Tháp Mười, tỉnh Đồng Tháp.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

Phân lập và khảo vùng gen 16S rDNA của các dòng vi khuẩn

a) Phân lập vi khuẩn

Cân 10g mẫu đất cho vào 90 ml nước cất vô trùng trong bình tam giác đã tiệt trùng, đặt bình bằng giấy bạc, để bình lên máy khuấy từ và khuấy trong 1 giờ, để lắng khoảng 30 phút, lấy dịch trong pha loãng các nồng độ khác nhau 10^{-1} , 10^{-2} 10^{-5} . Dùng micropipet hút 100 μ l mẫu nhỏ trên đĩa có sẵn môi trường Burk (1930) được Park *et al.* cải tiến năm 2005 (thành phần 1 lít bao gồm: Sucrose 10 g, KH_2PO_4 0.41 g, K_2HPO_4 0.52 g, , CaCl_2 0.2 g, Na_2SO_4 0.05 g, MgSO_4 0.1 g, $\text{FeSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$ 0.005 g, $\text{Na}_2\text{MoO}_4.2\text{H}_2\text{O}$ 0.0025 g, Agar 20 g, pH=7 chỉnh với NaOH). Dùng que gạt thủy tinh trải đều để phân phối dịch mẫu lên khắp mặt thạch, quấn parafin kín đĩa, ủ mẫu ở 30°C (úp ngược đĩa petri), theo dõi từng ngày và chọn khuẩn lạc có hình dạng khác nhau cấy chuyển cho đến rỗng.

b) Khảo sát vùng 16S rDNA

Ly trích DNA

Sử dụng quy trình ly trích DNA của Sambrook *et al.* (1989) cải tiến: Nuôi vi khuẩn trong 4 ml môi trường LB (Luria Broth) để thu sinh khối, cho 2 ml dung dịch vi khuẩn vào tuýp 2,2 ml, ly tâm 13.000 rpm trong 5 phút, thu cặn, hòa tan cặn với 250 µl dung dịch TE (10 mM Tris + 1 mM EDTA, pH 8), thêm 50 µl dung dịch 10% SDS và 10 µl Proteinase K (10 mg/l), ủ 65⁰C trong 20 phút, mỗi 5 phút đảo ngược tuýp một lần để trộn đều dung dịch, thêm 400 µl 10% CTAB/0,7 M NaCl, trộn đều, ủ ở 65⁰C trong 20 phút, thêm 600 µl chloroform: isoamyl alcohol (24:1), trộn đều và ly tâm ở 12.000 vòng/phút trong 10 phút, dùng pipet chuyển cẩn thận phần trong phía trên vào tuýp mới và thêm 1 ml isopropanol, lắc đều, giữ ở -20⁰C ít nhất 30 phút, ly tâm 13.000 vòng/phút trong 10 phút, giữ lại phần tủa, thêm 1 ml ethanol 70%, ly tâm ở 12.000 vòng/phút trong 5 phút, giữ phần tủa (làm 2 lần) mỗi lần đổ bỏ ethanol, sấy khô phần tủa trong máy sấy chân không ở 45⁰C trong 10 phút, hòa tan tủa trong 30 µl nước cất 2 lần đã khử trùng, trữ ở -20⁰C.

Khuếch đại vùng gen 16S rDNA

Vùng gen 16S rDNA được khuếch đại bằng cặp mồi tổng 27F và 1495R có trình tự 27F: 5' GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG 3'; 1495R: 5'CTA CGG CTA CCT TGT TAC GA 3' (Weisberg *et al.*, 1991). Thành phần 01 phản ứng PCR bao gồm: DNA tổng số ~ 30 ng, 5 µl buffer 1X (Tris 10 mM, KCl 50 mM, pH 9.0, 0.1% (v/v) Triton X-100), 2 mM MgCl₂, 20 ng cho mỗi dNTP, 0.2 µM mồi xuôi 27F, 0.2 µM mồi ngược 1495R, 0.5 unit Taq DNA polymerase. Chu kỳ nhiệt của phản ứng PCR như sau: 95⁰C trong 3 phút, sau đó lặp lại 35 chu kỳ với các bước như sau: Biến tính ở 95⁰C trong 1 phút, gắn mồi ở 54⁰C trong 1 phút, tổng hợp DNA ở 72⁰C trong 2 phút. Cuối cùng phản ứng được duy trì 72⁰C trong 10 phút. Sản phẩm PCR được phân tích trên gel agarose 1.5% trong dung dịch đệm TBE 1X ở 100V trong 90 phút và chụp bằng máy chụp hình gel Biorad UV 2000. Thang chuẩn 100 bp được mua từ công ty Fermentas.

Cắt vùng gen 16S rDNA bằng enzyme cắt giới hạn (RE)

Bốn RE sử dụng để cắt vùng gen 16S rDNA có trình tự nhận biết và nhiệt độ ủ như trong bảng 1, trong đó N là một nucleotide bất kỳ trong 4 loại A, T, G, C. Phản ứng cắt được thực hiện trong thể tích 20 µl bao gồm 8 µl sản phẩm PCR vùng gen 16S rDNA, 1 µl RE (10 unit), 2 µl buffer (chuyên biệt cho từng enzyme) và 9 µl nước cất tiệt trùng. Phản ứng cắt được ủ trong 2 giờ ở 37⁰C trừ RE SmaI ủ ở 30⁰C.

Bảng 1: Các enzyme cắt giới hạn được sử dụng

Tên enzyme	Trình tự nhận biết	Nhiệt độ ủ
<i>MspI</i>	5'...CCGG...3'	37 ⁰ C
<i>SmaI</i>	5'...CCCGG...3'	30 ⁰ C
<i>EcoRI</i>	5'....GAATTC.....3'	37 ⁰ C
<i>HinfI</i>	5'.....GANTC.....3'	37 ⁰ C

Sản phẩm cắt giới hạn được điện di trên agarose gel 2%, ở 60V trong 4 giờ chụp bằng máy chụp hình gel Biorad UV 2000.

Phân tích kết quả sản phẩm cắt với các enzyme cắt giới hạn

Sau khi điện di kết quả phản ứng cắt với 4 enzyme cắt giới hạn, các band thu được trên băng gel sẽ được tiến hành phân tích bằng phần mềm NTSYSpc 2.1. Các band được nhập vào chương trình theo quy tắc: Có band sẽ ghi là 1, không có band ghi là 0. Số liệu này sẽ được sử dụng để xây dựng ma trận tương đồng (Similarity matrix) hoặc ma trận khoảng cách (Distance matrix) và vẽ sơ đồ hình cây phản ánh mối quan hệ gần gũi hay cách xa nhau giữa các loài.

Các ma trận này biểu hiện cho mối quan hệ xa gần về mặt di truyền giữa các mẫu phân tích và được xây dựng trên công thức tính toán của Nei và Li (1979).

$$S_{xy} = 2xy/(x+y)$$

Trong đó:

xy : số band của hai mẫu

x : số band của mẫu x

y : số band của mẫu y

Từ S_{xy} ta tính được khoảng cách di truyền giữa x và y

$$D_{xy} = 1 - S_{xy}$$

Hàm lượng thông tin đa hình (Polymorphism information content = PIC) được xác định theo công thức:

$$PIC = 1 - \sum P_i^2$$

Trong đó P_i là sắc xuất band thứ i xuất hiện khi thực hiện phản ứng cắt. Phạm vi giá trị PIC từ 0 (không đa hình) tới 1 (đa hình hoàn toàn).

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

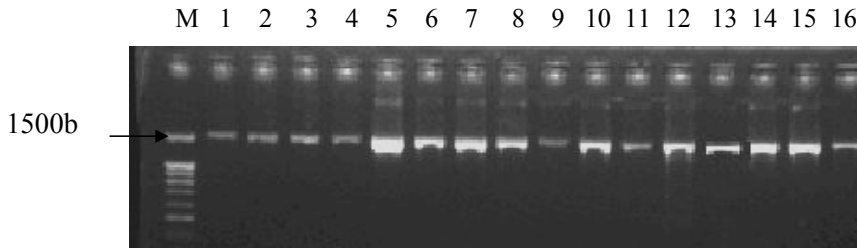
3.1 Phân lập vi khuẩn

Mười sáu dòng vi khuẩn được phân lập từ đất vùng rẫy của 4 huyện thu mẫu, với 4 dòng ở mỗi huyện. Các dòng vi khuẩn đều phát triển tốt trên môi trường không đậm Burk.

3.2 Khảo sát vùng 16S rDNA

Khuếch đại vùng 16S rDNA bằng cặp mồi tổng 27F và 1495R

Kết quả PCR 16 dòng vi khuẩn phân lập từ 4 huyện thuộc tỉnh Đồng Tháp thể hiện ở hình 1.



Hình 1: Phổ điện di vùng 16S rDNA của các dòng vi khuẩn phân lập được

M: thang chuẩn 100bp plus, 1-4 Mẫu vi khuẩn phân lập từ huyện Tháp Mười 5-8 Mẫu vi khuẩn phân lập từ huyện Lai Vung, 9-12 Mẫu vi khuẩn phân lập từ huyện Thanh Bình, 13-16 Mẫu vi khuẩn phân lập từ huyện Tam Nông

Nhìn chung các mẫu PCR với cặp mồi tổng 27F và 1495R cho kết quả khá tốt các mẫu đều có band với kích thước khoảng 1468 bp. 16S rDNA là vùng mã hóa các RNA ribosome được xác định là đoạn gen được bảo tồn nhất ở tất cả các tế bào. Trình tự các đoạn gen này ở các sinh vật có khoảng cách di truyền rất xa nhau vẫn tìm thấy có sự giống nhau. Tuy nhiên, đây cũng là vùng rất linh hoạt, sự thay đổi trình tự các nucleotide ở vùng này được ứng dụng nhiều trong khảo sát di truyền các dòng vi khuẩn.

Cặp mồi 27F và 1495R cũng đã được nhiều tác giả như Daniela *et al.* (2009) sử dụng để khảo sát vùng 16S rDNA của các dòng vi khuẩn nội sinh phân lập từ nho (*Vitis vinifera* L.). Lucia *et al.* (2004) sử dụng cặp mồi này khảo sát vùng 16S rDNA của họ vi khuẩn Azotobacteraceae gồm 7 loài thuộc chi *Azotobacter* và 3 loài thuộc chi *Azomonas*. Kết quả của các nghiên cứu này đều tạo được sản phẩm PCR rõ với kích thước phù hợp khoảng 1460bp.

Cắt vùng gen 16S rDNA bằng enzyme cắt giới hạn (RE)

Kết quả phân cắt với các RE thể hiện ở hình 2. Tất cả 4 RE đều cho kết quả đa hình. Theo bảng 2 và hình 2 enzyme *MspI* có tỷ lệ đa hình cao nhất với chỉ số PIC (Polymorphism information content) là 0,9238, tổng số phân đoạn (tổng band có kích thước khác nhau) là 12, tất cả các band đều có kích thước khác biệt, điều này làm cho enzyme *MspI* có phần trăm đa hình là 100%. Tỷ lệ đa hình cao xếp ở vị trí kế tiếp thuộc về enzyme *HinI* với chỉ số PIC là 0,8298, enzyme này tạo được 10 phân đoạn với 100% các phân đoạn tạo ra thể hiện đa hình. Enzyme *SmaI* tạo được 5 phân đoạn với 80% các phân đoạn thể hiện đa hình, chỉ số PIC của enzyme này đạt 0,7471. Tỷ lệ đa hình thấp nhất thuộc về enzyme *EcoRI* với chỉ số PIC là 0,6104, tổng số phân đoạn là 4 trong đó có 2 phân đoạn thể hiện sự đa hình hai phân đoạn còn lại gồm 1 không cắt và 1 là đơn hình. Qua kết quả phân tích cho thấy *MspI* và *HinI* là 2 enzyme có tỷ lệ đa hình và chỉ số PIC cao hơn 2 RE còn lại, điều này có thể là do vị trí nhận biết của các RE là không giống nhau. *MspI* và *HinI* tạo được sự khác biệt nhiều hơn do chúng có vị trí nhận biết là 4 cặp nu. (*HinI* có vị trí nhận biết là 5 cặp nu nhưng N có thể là 1 trong 4 loại A, T, G, C). Trong khi đó 2 RE còn lại là *SmaI* và *EcoRI* có vị trí nhận biết là 6 cặp nu (Bảng 1). Theo quy luật xác suất, các RE có vị trí nhận biết gồm 4 cặp nu thì tỷ lệ ngẫu nhiên trên đoạn DNA có chiều dài là 4^4 nu (trung bình khoảng mỗi 256 cặp nu) sẽ có 1 vị trí cắt. Tương tự đối với các RE có vị trí nhận biết là 6 cặp nu thì xác suất cắt ngẫu nhiên sẽ tạo ra đoạn DNA có chiều dài là 4^6 cặp nu, nghĩa là khoảng mỗi 4096 cặp nu trên phân tử DNA thì có 1 vị trí cắt. Như vậy với cùng một kích

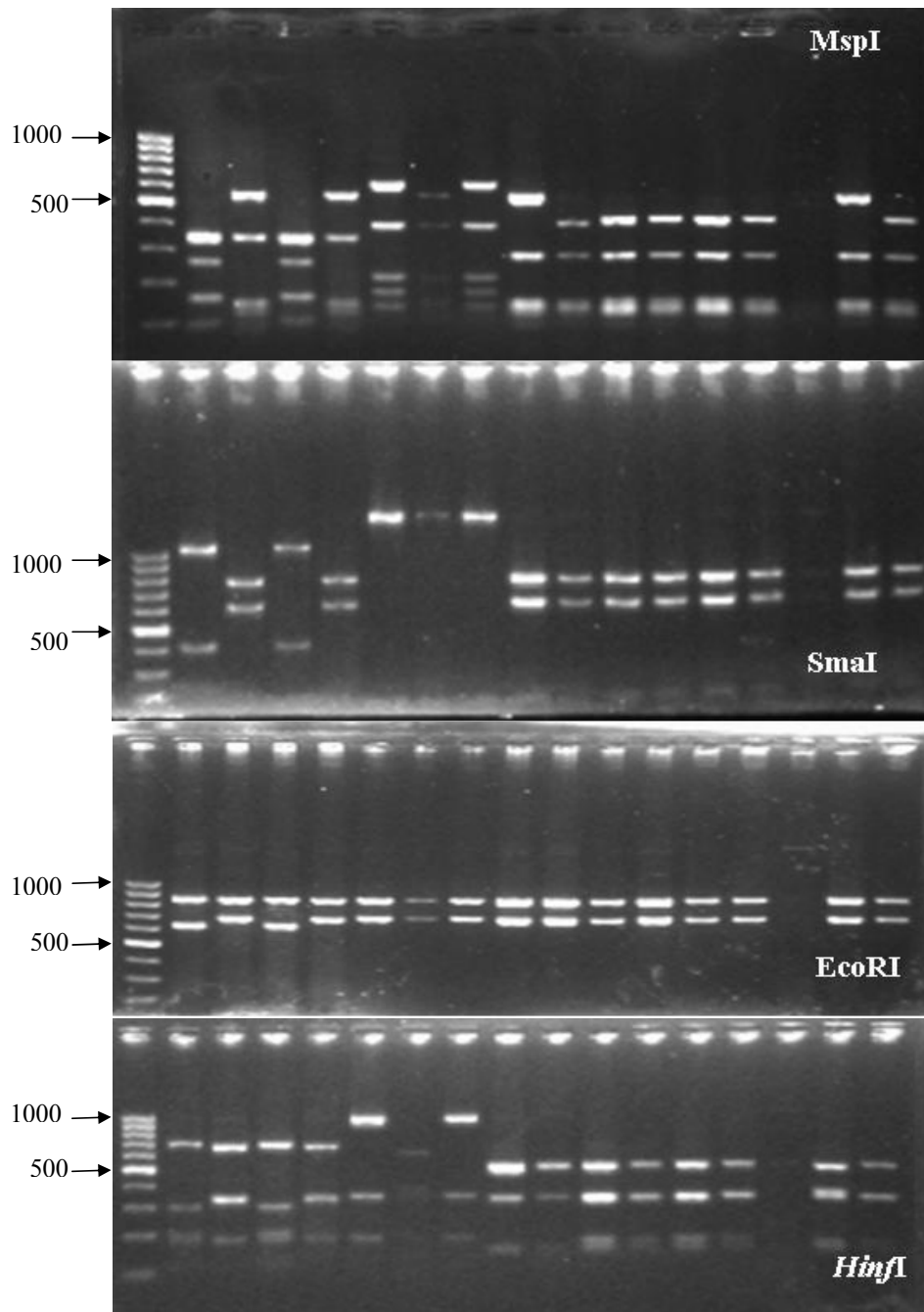
thước khoảng 1500 bp của đoạn gen 16S rDNA thì xác suất cắt của các RE có vị trí nhận biết là 4 cặp nu sẽ cao hơn so với các RE có vị trí nhận biết là 6 cặp nu.

Bảng 2: Sự đa hình các đoạn 16S rDNA của 16 dòng vi khuẩn phân lập cắt bởi các enzyme cắt giới hạn

Enzyme cắt	Tổng số phân đoạn	Số phân đoạn đa hình	Số phân đoạn đơn hình/không cắt	Phần trăm đa hình	Chỉ số PIC
<i>MspI</i>	12	12	0	100	0,9238
<i>SmaI</i>	5	4	1	80	0,7471
<i>EcoRI</i>	4	2	2	50	0,6104
<i>HinfI</i>	10	10	0	100	0,8298
Trung bình	7,75	7	0,75	82,5	0,7778

Nhằm khảo sát mối tương quan di truyền của 16 dòng vi khuẩn nghiên cứu, kết quả từ phản ứng cắt với 4 enzyme cắt giới hạn được chuyển qua hệ nhị phân để phân tích bằng phần mềm NTSYSpc 2.1.

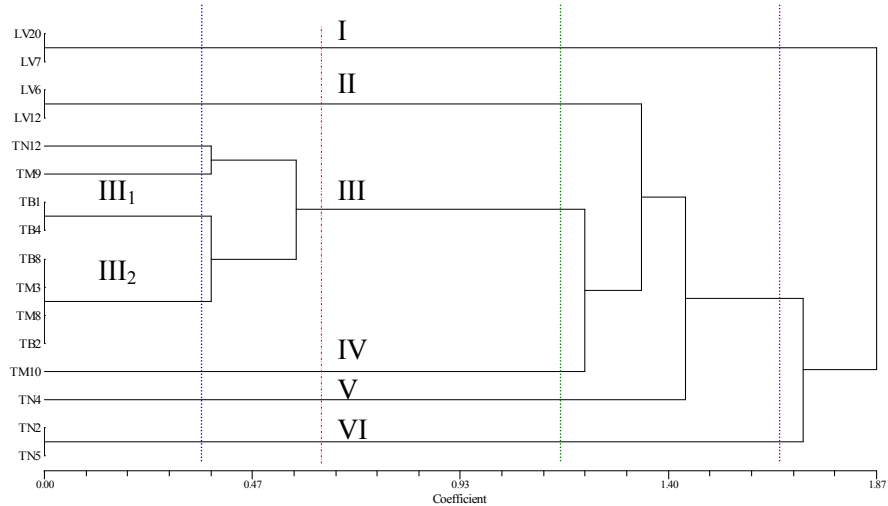
Kết quả (giản đồ phá hệ) hình 3 cho thấy, xét ở mức độ khác biệt 0,654% 16 dòng vi khuẩn khảo sát được chia thành 6 nhóm, trong đó nhóm III có tổng số dòng hiện diện cao nhất là 8 bao gồm: TN12, TM9, TB1, TB4, TB8, TM3, TM8, TB2 (Hình 3). Các nhóm I, II, VI với 2 dòng ở mỗi nhóm lần lượt là LV20, LV7; LV6, LV12; TN2, TN5. Hai nhóm còn lại là nhóm IV và nhóm V mỗi nhóm có một dòng lần lượt là TM10 và TN4. Ở mức độ khác biệt này, khảo sát sự phân nhóm của các dòng vi khuẩn theo địa điểm thu mẫu cho thấy, 4 dòng vi khuẩn phân lập từ huyện Lai Vung được chia là 2 nhóm (nhóm I và nhóm II) mỗi nhóm gồm 2 dòng với mức độ tương đồng của mỗi nhóm đạt 100%.



Hình 2: Kết quả phân cắt vùng 16S với *MspI*, *SmaI*, *EcoRI*, *HinfI*

1-4 Mẫu LV(20, 6,7,12); 5-8 TN (2, 4, 5, 12); 9-12, TB (1,8,4,2), 13-16 TM (8, 10, 9, 3)

So sánh độ tương đồng của 2 nhóm cho thấy khác biệt ở mức 1,87%. Trong khi đó bốn dòng vi khuẩn phân lập từ huyện Thanh Bình là TB1, TB2, TB4 và TB8 cùng phân bố trong nhóm III. Tuy nhiên, chúng được chia thành 2 nhóm nhỏ là III₁: TB1, TB4 và III₂: TB2 và TB8 với mức tương đồng ở mỗi nhóm là 100%. Khác biệt giữa 2 nhóm III₁ và III₂ thể hiện trên giản đồ ở mức 0,376%. Bốn dòng thu thập từ huyện Tam Nông được chia thành 3 nhóm là nhóm III, V, VI, với 2 dòng TN2, TN5 ở nhóm VI đạt mức tương đồng 100%, nhóm III có 1 dòng là TN12, và nhóm V là dòng TN4, sự khác biệt của 4 dòng trên giản đồ là khoảng 1,682%. Bốn dòng vi khuẩn phân lập từ huyện Tháp Mười được phân bố trong 2 nhóm là III và IV, trong đó nhóm III có 3 dòng là TM9, TM3 và TM8 với 2 dòng TM3 và TM8 có mức độ tương đồng đạt 100%. Nhóm IV có duy nhất 1 dòng TM10 khác biệt với các dòng còn lại ở mức 1,212%.



Hình 3: Giản đồ phả hệ 16 dòng vi khuẩn

Cũng ở mức khác biệt 0,654%, hai huyện Tháp Mười và Tam Nông với 8 dòng vi khuẩn phân lập trên đất nhiễm phèn nặng (pH từ 3,5-4,5), được xếp trong 4 nhóm là III, IV, V, và VI. Sự khác biệt của 8 dòng vi khuẩn thể hiện ở mức 1,682%. Trong khi đó 8 dòng phân lập từ 2 huyện là Lai Vung và Thanh Bình đại diện cho loại đất phù sa được phân bố trong 3 nhóm là I, II và III với mức khác biệt của 8 dòng ở mức 1,87%. Khảo sát trên giản đồ cho thấy có sự khác biệt giữa 2 nhóm vi khuẩn thuộc 2 nhóm đất khác nhau với hệ số khác biệt là 1,87%. Nhóm III được xem là trung gian khi có mặt cả dòng vi khuẩn phân lập từ đất phèn và dòng vi khuẩn phân lập ở đất phù sa với 4 dòng ở mỗi nhóm.

4 KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

4.1 Kết luận

Kết quả phân tích đa dạng di truyền 16 dòng vi khuẩn từ 4 huyện với 4 enzyme cắt giới hạn là *MspI*, *SmaI*, *EcoRI*, *HinI* cho thấy enzyme *MspI* có mức đa hình cao nhất với chỉ số PIC là 0,9238, *EcoRI* có tỷ lệ đa hình thấp nhất với chỉ số PIC là 0,6104. Hai RE còn lại là *HinI* và *SmaI* có chỉ số PIC lần lượt là 0,8298 và 0,7471.

Ở mức độ khác biệt 0,654% 16 dòng vi khuẩn chia thành 6 nhóm. Các dòng vi khuẩn có mức độ tương đồng 100% bao gồm LV20 và LV7; LV6 và LV12; TB1 và TB4; TB8, TB2, TM3 và TM8; TN2 và TN5. Cũng ở mức độ khác biệt này, 4 dòng vi khuẩn phân lập từ huyện Lai Vung chia thành 2 nhóm với mức độ khác biệt là 1,87%. Bốn dòng vi khuẩn phân lập từ huyện Thanh Bình cùng phân bố trong 1 nhóm khác biệt các dòng trong nhóm ở mức 0,376%. Bốn dòng thu thập từ huyện Tam Nông được chia thành 3 nhóm sự khác biệt của 4 dòng là khoảng 1,682%. Bốn dòng vi khuẩn phân lập từ huyện Tháp Mười được phân bố trong 2 nhóm khác biệt của các dòng ở mức 1,212%.

Khảo sát sự phân bố của 16 dòng vi khuẩn theo 2 nhóm đất là phèn và phù sa ở mức khác biệt 0,654% cho thấy: 8 dòng phân lập từ đất phù sa được phân bố trong 3 nhóm là I, II, III; 8 dòng phân lập từ đất phèn được phân bố trong 4 nhóm là III, IV V, VI. Nhóm III được xem là nhóm trung gian với sự có mặt của 4 dòng ở mỗi nhóm đất.

4.2 Đề nghị

Tiếp tục khảo sát sự đa dạng di truyền các dòng vi khuẩn còn lại và 16 dòng đã khảo sát với nhiều enzyme cắt giới hạn hơn nhằm tăng độ tin cậy cho sự phân nhóm di truyền.

Tiến hành kiểm tra hoạt tính cố định đạm của các dòng vi khuẩn để đưa vào ứng dụng thực tiễn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Burk, D. 1930. The influence of nitrogen gas upon the organic catalysis of nitrogen fix-ing by Azotobacter. *Journal Physical Chemistry*. 34: 1174-1194
- Daniela B., Paola C., Lorenzo B., Fabio Q., Milena B., Daniele D. and Piero A., B. 2009. Endophytic bacterial diversity in grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaves described by 16S rDNA gene sequence analysis and length heterogeneity-PCR. *The Journal of Microbiology*. Volume 47, 393-401.
- Lucia A., Ilaria M., Roberto P., Lucia C., and Francesca C. 2004. Amplified ribosomal DNA restriction analysis for the characterization of Azotobacteraceae: a contribution to the study of these free-living nitrogen-fixing bacteria. *Journal of Microbiological Methods* 57,197– 206.
- Nei, M. and Li, W.H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci USA* 76, 5269–5273.
- Park, M., C. Kim, J. Yang, H. Lee, W. Shin, Kim S., and T. Sa. 2005. Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. *Microbiological Research* 160: 127-133.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Weisberg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* 173: 697–703.