

Nguyễn Xuân Hồng

Ứ CỐ ĐỊNH NITƠ CỦA *Klebsiella oxytoca* VỚI *Enterobacter cloacae* ĐÃ ĐƯỢC CẢI TIẾN TRONG MỐI LIÊN KẾT VỚI GIỐNG LÚA T65

ĐẶT VẤN ĐỀ

Sự cố định nitơ ở vùng rễ lúa đã gây nên mối quan tâm lớn đối với các nhà nghiên cứu nông học bởi vì lúa là một trong những cây lương thực chủ yếu của thế giới. Sự cố định nitơ trong mối liên kết lúa - vi khuẩn ở điều kiện ngập nước đã cho phép một số loài vi khuẩn khác nhau có khả năng tạo nên hoạt tính cố định nitơ của vùng rễ lúa [7, 11, 13, 14]

K. oxytoca NG13 đã được phân lập từ vùng rễ lúa ở Trại thí nghiệm của Viện di truyền học Quốc gia, Mishima, Nhật Bản và *E. cloacae* E26 đã được phân lập từ vùng đất lúa của tỉnh Quảng Ngãi, Trung Quốc. Cả hai nòi đều có hoạt tính cố định nitơ trong mối liên kết hội sinh với lúa.

Đã có thông báo dùng NG13 gây nhiễm cho lúa đã tạo thành hoạt tính cố định nitơ cao ở vùng rễ trong điều kiện thí nghiệm *in vitro* [12]. Còn công việc này của chúng tôi là cải tiến sự cố định nitơ liên kết của vi khuẩn với lúa ngay trên đất ruộng tự nhiên. Các nòi vi khuẩn đã được cải tiến là NG13 hoặc E mang các plasmid chứa *nifA* và chúng đã được dùng để gây nhiễm cho ruộng đất ruộng không được khử trùng.

Chúng tôi xin thông báo ở đây về kết quả nghiên cứu sự cố định nitơ bằng cách gây nhiễm *oxytoca* và *E. cloacae* trong mối liên kết với giống lúa địa phương T thuộc loại hình Japonica ở Nhật Bản. *K. oxytoca* 1389 và *E. cloacae* E262 là các đột biến *nif⁻* từ NG13 và E26. *K. oxytoca* NG13/pMC 71A và *E. cloacae* E26/pMC 73A là hai nòi vi khuẩn mới được tạo ra bằng cách đưa các plasmid pMC 71A và pMC 73A chứa *nifA* vào NG13, và tương ứng, vào E26. Hai nòi mới này đều cố định nitơ khi có amoni trong môi trường, trong khi hoạt tính cố định nitơ của nòi đại lai bị kìm hãm bởi điều kiện này.

Trong thí nghiệm này, chúng tôi đã dùng phương pháp đồng vị ^{15}N pha loãng để đo sự cố định nitơ của hệ thống lúa - vi khuẩn tích lũy được qua thời gian sinh trưởng cùng với phép thử *axetylen* như một chỉ tiêu của hoạt tính cố định nitơ.

Công việc này đã được tiến hành tại Viện di truyền học Quốc gia, Mishima, Nhật Bản, dưới hướng dẫn của cố Giáo sư Tiến sĩ Y. Hirota và Giáo sư Tiến sĩ S. Iyama.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Đất

Đất (lấy từ ruộng thí nghiệm của Viện di truyền học Quốc gia, Mishima) được phơi khô và sàng qua rây (loại mắt 2 mm). Đất sau đó được xáo trộn cho thật đều. Mỗi một cốc nhựa con

đường kính 7,2 cm chứa 100g đất và 90ml dung dịch gồm $(^{15}\text{NH}_4)\text{SO}_4$ (12,5 mg 70,4% nguyên tố ^{15}N) và KH_2PO_4 (100mg/cốc).

2. Các giống lúa

Giống lúa T65 (loại hình Japonica) đã được sử dụng. Mạ được gieo cấy trong chậu nước nhiệt độ 30°C trong 30 ngày.

3. Các nòi vi khuẩn

Klebsiella pneumoniae UNF 931/pMC 73A đã nhận từ phòng thí nghiệm của Giáo sư R. A. Dixon [4]. ADN plasmid của pMC 73A đã được tách chiết và làm sạch từ UNF 931/pMC 71A và tương ứng 931/pMC 73A theo phương pháp hòa tan bằng kiềm [10]. ADN plasmid pMC 71A và pMC 73A sau đó đã được đưa vào NG13, và tương ứng, E26 bằng biến nạp theo Lederberg và Cohen [13]. Các nòi *nif⁻* của *K. oxytoca* (NG1389) và *E. cloacae* (E262) đã được gây tạo bằng N-methyl-N-nitro-soguanidine theo như cách đã có báo cáo trước đây [1]. Vi khuẩn xử lý được cấy ra đĩa trên môi trường glucô Davis tối thiểu [5] và ủ ở 30°C trong 2 ngày. Các khuẩn lạc mọc lên trong điều kiện yếm khí trên môi trường này sau đó đã được đóng dấu ra đĩa trên môi trường NFDM và ủ ở 30°C trong 3 ngày. Các khuẩn lạc không mọc trên môi trường NFDM tối thiểu nhưng mọc trên NFDM có chứa amoni đã được tách và thử hoạt tính cố định nitơ. Đã thu được một số đột biến, một số trong số chúng được đặt tên là NG1389, hoặc tương ứng là E262. Các nòi vi khuẩn mới *K. oxytoca* NG13/pMC 71A và *E. cloacae* E26/pMC 73A đã nhận được theo các trên đây đã được dùng để gây nhiễm cho lúa.

4. Gây nhiễm vi khuẩn cho lúa

Vi khuẩn nuôi cấy trên môi trường NFDM được bổ sung thêm 10mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ở 30°C trong 24 giờ. Các tế bào được rửa sạch và hòa trong dung dịch saline 0,85%. Sáu nhóm m 30 ngày tuổi (10 cây mỗi nhóm) đã được dùng làm thí nghiệm. Rễ của 60 cây mạ được ngâm trong 60ml dung dịch vi khuẩn chứa gần $5 \cdot 10^8$ /ml NG1389, NG13, NG13/pMC 71A, và tương ứng E262, E26 và E26/pMC 3A trong 24 giờ. Mạ đã gây nhiễm sau đó được đem cấy vào cốc (mỗi cốc một cây) mà đất được chuẩn bị theo như cách trình bày trên đây. Phần dung dịch vi khuẩn còn lại được đổ thêm vào đất dùng để cấy lúa. Hàng ngày lúa được tưới nước cất với một lượng xấp xỉ dung tích của cốc để giữ cho đất luôn được làm ngập. Tất cả các cốc đã được giữ trong nhà kính với nhiệt độ tự nhiên khoảng từ 20 đến 30°C .

5. Phép thử hoạt tính của nitrogenaza

Như đã có thông báo trước đây [13], một loạt phép thử đã được dùng để đo sự cố định nitơ hội sinh qua quãng thời gian dài của lúa và vi khuẩn. Đối với mỗi một cốc dùng để trồng lúa đã tiến hành bốn phép đo sau đây: để tính toán khả năng cố định nitơ: phép thử khử axetylen, sinh khối của mỗi cây, xác định nitơ tổng số của các cây và nồng độ ^{15}N pha loãng trong cây. Các phép đo này đã thực hiện vào thời điểm 120 ngày sau khi cấy lúa. Cứ 10 cốc của một lô xử lý là một điểm số liệu. Phép thử hoạt tính khử C_2H_2 của cây để nguyên với đất đã được xác định bằng sắc ký khí như đã trình bày trước đây [8, 12, 13]. Cây sau đó được tách riêng khỏi đất để tính trọng lượng khô và nghiền nhỏ thành bột.

Nitơ tổng số của đất, cây và nồng độ ^{15}N trong cây đã được xác định kết hợp với máy phân tích CN (nhãn hiệu MT500 Yanaco Co., Ltd., Japan). Khí nitơ từ máy phân tích CN đã trực tiếp đi qua máy khối phổ và tỷ lệ ^{14}N và ^{15}N đã được xác định như đã mô tả trước đây [13].

KẾT QUẢ

Việc gây nhiễm NG13/pMC 71A và E26/pMC 73A đã làm tăng một cách rõ rệt khả năng định nitơ ở vùng rễ lúa. Kết quả của các phép đo đối với các cây được gây nhiễm với NG13, NG13/pMC 71A, E26 và E26/pMC 73A so với đối chứng là lô được gây nhiễm với NG 1389 (*nif⁻*) và E262 (*nif⁻*) đã chỉ ra rằng hiệu quả của sự cố định nitơ giữa các lô có sự phân biệt lớn, đặc biệt việc gây nhiễm với NG13/pMC 71A và E26/pMC 73A đã làm tăng trông thấy hoạt tính của thống liên kết lúa-vi khuẩn.

Hoạt tính khử axetylen của vùng rễ nơi lúa được gây nhiễm với NG13 hoặc E26 sau 120 ngày sinh trưởng kể từ lúc gây nhiễm là 199,1 nmol/h/cây và tương ứng là 141 nmol/h/cây. Hoạt tính khử axetylen cao nhất đã đạt được là 322,3 nmol/h/cây và 192 nmol/h/cây chính là của các cây được gây nhiễm với NG13/pMC 71A và tương ứng, E26/pMC 73A.

Nitơ tổng số của cây được gây nhiễm với NG13, NG13/pMC 71A hoặc E26, E26/pMC 73A cao hơn so với nitơ tổng số của cây được gây nhiễm với NG1389 (*nif⁻*) và E262 (*nif⁻*).

Kết quả của phương pháp ¹⁵N pha loãng cũng đã đưa ra những bằng chứng trùng hợp về hiệu quả cố định nitơ của hệ thống lúa-vi khuẩn dưới tác dụng gây nhiễm của NG13, NG13/pMC 71A hoặc E26 và E26/pMC 73A. Kết quả này chứng minh rằng giống lúa T65 được gây nhiễm với NG13/pMC 71A và E26/pMC 73A đã nhận được 2,59 mg, và tương ứng, 2,07 mg hay 35,6% tương ứng, 16,9% nitơ tổng số lấy từ nitơ không khí.

BÀN LUẬN

Chúng tôi đã đưa plasmid pMC 71A và pMC 73A vào *K. oxytoca* NG13, và tương ứng, *E. coli* E26 bằng biến nạp. Các nòi mới được tạo này là NG13/pMC 71A và E26/pMC 73A có khả năng cố định nitơ trong môi trường có amoni. Hơn nữa, mới đây cũng đã tạo được hai nòi biến *nif⁻* là NG1389 và E262 dùng để làm đối chứng cho thí nghiệm gây nhiễm.

Trong thí nghiệm trước đây, nhóm nghiên cứu cố định nitơ ở vùng rễ lúa của Viện di truyền Quốc gia, Mishima, Nhật Bản, đã chứng minh được rằng, việc gây nhiễm giống lúa C5444 (loại hình Indica và giống lúa T65 thuộc loại hình Japonica với NG/pMC 71A và E26/pMC 73A đã có hiệu quả cố định nitơ trông thấy (Fujii và tập thể, 1987).

Các kết quả trong báo cáo này đồng thời chứng tỏ hiệu quả có độ tin cậy lớn của việc gây nhiễm lúa với NG13/pMC 71A hoặc E26/pMC 73A được trồng trên đất không khử trùng, trong các chỉ tiêu của sự cố định nitơ đã được thể hiện rõ ràng như khả năng khử axetylen, sinh khối và hàm lượng nitơ tổng số của cây tăng lên. Đặc biệt kết quả phân tích ¹⁵N đã mang lại bằng chứng đầy thuyết phục.

Dựa trên các căn cứ đã nêu chúng tôi kết luận rằng, hoàn toàn có thể sử dụng hiệu quả cố định nitơ của tổ hợp lúa-vi khuẩn nhờ vào việc gây nhiễm với các nòi cố định nitơ đã được cải thiện về mặt di truyền. Ý nghĩa quan trọng của việc ứng dụng thực tiễn hiệu quả cố định nitơ liên kết của các vi khuẩn này là lợi ích của các đột biến *Klebsiella* và thành tựu của kỹ thuật cloning tái tổ hợp ADN mà chúng ta có thể dùng để tăng cường hoạt động cố định nitơ trong điều kiện sinh tự như của các nòi khác tìm được ở vùng rễ lúa một khi cơ chế điều chỉnh hoạt động của gen *nif* ở *Klebsiella* đã được nghiên cứu một cách kỹ lưỡng [4, 6].

Hướng nghiên cứu tiếp theo của đề tài này là sự đòi hỏi khai thác gấp rút các vi khuẩn cố định nitơ ở vùng rễ lúa nhằm phát hiện ra những tổ hợp có hiệu suất cao hơn giữa vi khuẩn và các giống lúa khác nhau.

Chúng tôi rất hy vọng các bạn đồng nghiệp trong và ngoài nước sẽ tiếp tục bổ sung và đóng góp cho hướng đi tiếp sau trong lĩnh vực này bằng những nỗ lực và thành tựu mới, giúp phát triển kỹ nghệ di truyền học nước nhà nói riêng và nền nông nghiệp Việt Nam nói chung mà trong những năm tới đây chắc chắn sẽ đạt được nhiều kết quả rực rỡ và to lớn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. E. A. Adelberg, M. Mandel and G. C. C. Chen. 1965. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1: 788-795.
2. F. M. Ausubel, S. E. Brown, F. J. Debrujine, D. W. Ow, G. E. Riedel, G. B. Ruvkin and V. Sundaresan. 1982. *In: J. K. Setlow and A. Hollaender (eds.). Genetic Engineering. Vol. Plenum Press, New York: 168-198.*
3. J. Balandreau, G. Rinardo, I. Fres-Hamad and Y. Dommergues. 1975. *In W. D. Steward (ed.) Nitrogen fixation by freeliving microorganisms. Cambridge Univ. Press, Cambridge: 53-70.*
4. V. Buchanan-Wollaston, M. C. Cannon, J. I. Beynon, F. C. Cannon. 1981. *Nature (London)* 294: 776-778.
5. B. D. Davis and E. S. Mingioli. 1950. *J. Bacteriol.* 60: 17-28.
6. R. A. Dixon, R. P. Eady, G. Epsin, S. Hill, M. Iaccatino, D. Kahn and M. Merrick. 1981. *Nature* 286: 128-132.
7. R. Eady, R. Issack, C. Kenedy, J. R. Postgate and H. D. Rateliffe. 1978. *J. Gen. Microbiol.* 104: 277-285.
8. Y. Hirota, T. Fujii, Y. Sano and S. Iyama. 1978. *Nature* 276: 416-417.
9. E. M. Lederberg and S. N. Chen. 1974. *J. Bacteriol.* 119: 1072-1074.
10. T. Maniatis, E. F. Fritsch and J. Sambrook. 1982. *Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory.*
11. Y. S. Qiu, S. Zhou, X. Mo, S. Ye, Cai, C. Y. Chen, S. He and R. Deng. 1981. *Acta Microbiologica Sinica.* 21: 473-476.
12. Y. Sano, T. Fujii, S. Iyama, Y. Hirota and K. Komagata. 1981. *Crop Sci.* 21: 758-761.
13. Y. Yoo, T. Fujii, Y. Sano, K. Komagata, T. Yoneyama, S. Iyama and Y. Hirota. 1986. *Crop Sci.* 26: 297-301.
14. J. B. Zhu, G. Q. Yu, Y. Q. Jiang, I. W. Wang and S. C. Shen. 1983. *Scientia Sinica (Series B)* 26: 1258-1268.

Nguyen Xuan Hong

IMPROVED ASSOCIATIVE DINITROGEN FIXATION BY *Klebsiella oxytoca* OR *Enterobacter cloacae* IN ASSOCIATION WITH RICE VARIETY T65

It was reported that the reestablishment of N_2 -fixation of rice-bacterium association using an improved *Klebsiella oxytoca* or *Enterobacter cloacae* obtained from the rhizosphere of rice plant has been demonstrated.

A possible to enhance N_2 -fixation of rice-bacterium complex by inoculation with the improved N_2 -fixing microbes was considered and discussed.

Khoa sinh học - ĐHTH Hà Nội