

Khảo sát sự hiện diện của vi khuẩn liên quan đến quá trình hình thành củ ở cây yacon (*Smallanthus sonchifolius*)

Bùi Thị Thu Vân*, Nguyễn Ngọc Quỳnh Như, Trần Thị Thanh Hiền, Vũ Thị Lan Hương



Use your smartphone to scan this QR code and download this article

TÓM TẮT

Cây yacon (*Smallanthus sonchifolius*), còn được gọi là sâm đất, có nguồn gốc từ vùng núi Andes, hiện đang được quan tâm đưa vào trồng trọt tại Việt Nam. Rễ củ yacon có khả năng tích trữ hàm lượng cao carbohydrate dạng fructooligosaccharide. Đây là polysaccharide không thể tiêu hóa, được biết đến là một "prebiotic" có thể hỗ trợ điều trị bệnh tiểu đường, béo phì và ung thư ruột kết nên rễ củ yacon được đánh giá có tiềm năng ứng dụng trong điều trị các bệnh này. Hiện nay, có rất ít nghiên cứu về tác động của vi sinh vật trong quá trình tạo củ của cây. Để tìm hiểu mối liên hệ này, bài báo trình bày việc định lượng tổng số vi khuẩn hiếu khí ở vùng rễ của cây yacon qua hai giai đoạn hình thành rễ củ: giai đoạn trước khi tượng củ và giai đoạn tượng củ bằng phương pháp MPN (Most Probable Number). Ở giai đoạn tượng củ có sự thay đổi đáng kể số lượng vi khuẩn ưa sử dụng carbohydrate so với giai đoạn trước khi tượng củ. Ở rễ tượng củ, số lượng vi khuẩn ưa sử dụng carbohydrate ($9,3 \times 10^5$ MPN/mL) cao hơn so với vi khuẩn dinh dưỡng đạm ($9,3 \times 10^3$ MPN/mL). Kết quả phân lập đã thu nhận được 22 chủng vi khuẩn hiếu khí khác nhau ở rễ cây yacon. Phân tích phát sinh loài đoạn trình tự gene mã hóa 16S rRNA với mỗi 800R xác định các vi khuẩn này thuộc 10 chi gồm *Burkholderia*, *Caulobacter*, *Myroides*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Kosakonia*, *Rhizobium*, *Enterobacter* và *Klebsiella*. Sự hiện diện của vi khuẩn thuộc các chi này không giống nhau giữa các phần khác nhau của vùng rễ cây và cũng có sự khác biệt giữa giai đoạn trước tượng củ và giai đoạn tượng củ.

Từ khóa: MPN, quá trình tạo củ, *Smallanthus sonchifolius*, sự hiện diện của vi khuẩn, trình tự 16S rDNA

Khoa Sinh học và Công nghệ Sinh học,
Trường Đại học Khoa học Tự nhiên,
ĐHQG-HCM

Liên hệ

Bùi Thị Thu Vân, Khoa Sinh học và Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

Email: bttthuvan@hcmus.edu.vn

Lịch sử

- Ngày nhận: 23-3-2022
- Ngày chấp nhận: 23-8-2022
- Ngày đăng: 30-9-2022

DOI: 10.32508/stdjns.v6i3.1174



Bản quyền

© ĐHQG Tp.HCM. Đây là bài báo công bố mở được phát hành theo các điều khoản của the Creative Commons Attribution 4.0 International license.



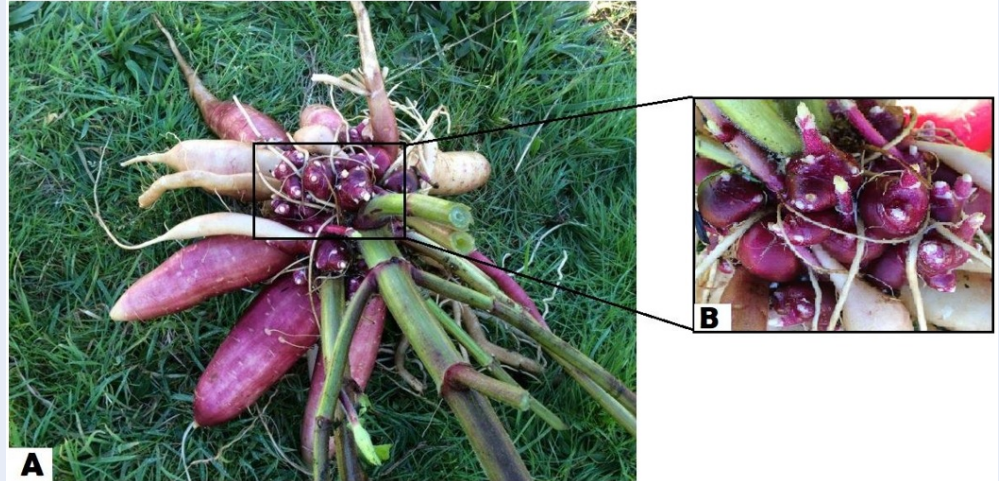
MỞ ĐẦU

Yacon, *Smallanthus sonchifolius* (Poepp. et Endl.), là loài bán thuần hóa được tìm thấy tại vùng núi Andes, có rễ phát triển như bộ phận lưu trữ dinh dưỡng ở những loài đa bội. Cũng giống như những loài cây đa bội khác¹, yacon được nhân giống nhờ vào thân rễ (Hình 1)^{2,3}. Phần rễ của cây sẽ phình to ra và phát triển như một bộ phận dự trữ dinh dưỡng của cây (hay còn được biết đến là củ), được mô tả tương tự như khoai lang về mặt hình thái nhưng mọng nước, có vị ngọt và không chứa nhiều tinh bột⁴. Ở rễ củ, yacon dự trữ hầu hết các carbohydrate ở dạng fructan, cụ thể hơn là fructooligosaccharide (FOS) và inulin chiếm 40–70% trọng lượng khô của rễ. Một vài carbohydrate khác như sucrose, fructose và glucose chiếm 15–40% trọng lượng khô⁴. Một nghiên cứu của Guigoz⁵ đã cho thấy sự tiêu thụ FOS có thể điều chỉnh các vi khuẩn đường ruột và có lợi trong việc nâng cao sức khỏe. Do đó, FOS được xem là một "prebiotic" có thể được sử dụng như thành phần chức năng hỗ trợ trong điều trị các bệnh về hệ tiêu hóa và các bệnh mạn tính như tiểu đường và béo phì. Cây

yacon có khả năng thích nghi ở các nước như Brazil, Nhật Bản, Hàn Quốc, Mê-xi-cô, New Zealand, Mỹ, Nga, Estonia và Đài Loan⁶. Yacon có khả năng thích nghi với nhiều điều kiện khí hậu và môi trường khác nhau vì thế có thể sản xuất khai thác ở các nước nhiệt đới. Ở Việt Nam, cây được trồng tại Đức Trọng (Lâm Đồng).

Chu trình phát triển của cây từ lúc nảy mầm đến lúc ra lá, củ, hoa, lão suy kéo dài khoảng 6–10 tháng. Sau 22 ngày kể từ lúc nảy mầm (giai đoạn t=0), cây bắt đầu hình thành cặp lá đầu tiên và phát triển lá (giai đoạn t = 1), giai đoạn này kéo dài khoảng 16 ngày. Đến ngày thứ 40, cây bắt đầu phân nhánh (giai đoạn t = 2) và cần 20 ngày để toàn thân đều phân nhánh. Trong 14 ngày tiếp theo (giai đoạn t = 3), cây tăng trưởng mạnh và mở rộng độ che phủ. Giai đoạn hình thành rễ tượng củ (giai đoạn t = 4) bắt đầu từ ngày thứ 40, rễ bắt đầu phình to và dự trữ chất dinh dưỡng. Ở thời điểm 80 ngày, cây bước vào giai đoạn hình thành củ rễ và hình thành chồi (giai đoạn t = 5). Tại 122 ngày, cây bắt đầu ra hoa (giai đoạn t=6) và sau 16 ngày, cây kết thúc sự ra hoa của cụm hoa đầu tiên. Sau 140 ngày kể từ lúc nảy mầm, cây hình thành và tăng trưởng quả bế (giai

Trích dẫn bài báo này: Vân B T T, Như N N Q, Hiền T T T, Hương V T L. **Khảo sát sự hiện diện của vi khuẩn liên quan đến quá trình hình thành củ ở cây yacon (*Smallanthus sonchifolius*).** *Sci. Tech. Dev. J. - Nat. Sci.*; 2022, 6(3):2222-2232.



Hình 1: Phần rễ (A) và phần thân rễ (B) của *S. smallanthus*²

đoạn t=5,6) và tiến vào pha lão suy (giai đoạn t = 9) (Hình 2)⁷.

Trong quá trình canh tác tại Việt Nam, có những ghi nhận về nốt rễ ở vùng rễ cây yacon. Giả thuyết đưa ra là có sự tồn tại nhóm vi khuẩn ảnh hưởng đến quá trình phát triển cây, đặc biệt là nhóm vi khuẩn nội sinh. Tuy nhiên, chưa có nhiều tài liệu nghiên cứu về sự đa dạng và những ảnh hưởng của vi sinh vật trong sự phát triển của cây yacon. Reina và cs đã thực hiện nghiên cứu khảo sát sự đa dạng vi sinh vật trong sự lên men tự phát của củ yacon⁸. Sau khi được khử trùng và lột vỏ, củ yacon được cho lên men trong các lọ thủy tinh vô trùng với nồng độ muối duy trì ở 2%. Kết quả ghi nhận những nhóm vi sinh vật phân lập được từ củ yacon chủ yếu bao gồm những vi khuẩn ưa ấm ($6,27 \pm 0,30$ Log CFU/mL), *Enterobacteriaceae* ($5,04 \pm 0,6$ Log CFU/mL) và một số chủng nấm men ($3,24 \pm 0,28$ Log CFU/mL). Phần lớn vi khuẩn ưa ấm hiện diện trong củ thuộc nhóm vi khuẩn lactic (chủ yếu là 3 chủng thuộc chi *Leuconostoc*: *L. mesenteroides*, *L. pseudomesenteroides* và *L. citreum*) với mật độ $5,11 \pm 1,00$ Log CFU/mL và tăng dần theo thời gian đến mật độ 8,00 Log CFU/mL sau 3 ngày lên men. Lượng vi khuẩn *Enterobacteriaceae* giảm sau 48 giờ lên men do độ pH giảm và lượng nấm men được ghi nhận thấp nhất trong tổng số. Đồng thời, chỉ ghi nhận được chủng *Staphylococcus waneri* hiện diện trong củ yacon tươi (thời điểm lên men t = 0)⁸. Trong khi đó, các vi khuẩn nội sinh có khả năng giúp thúc đẩy quá trình chuyển hóa của cây, tăng cường sự phát triển rễ hoặc giảm sự kéo dài rễ. Ngoài việc tăng cường sự phát triển của thực vật, chúng còn có khả năng bảo vệ thực vật khỏi các mầm bệnh và stress thông qua một loạt các cơ chế trực tiếp và gián tiếp⁹.

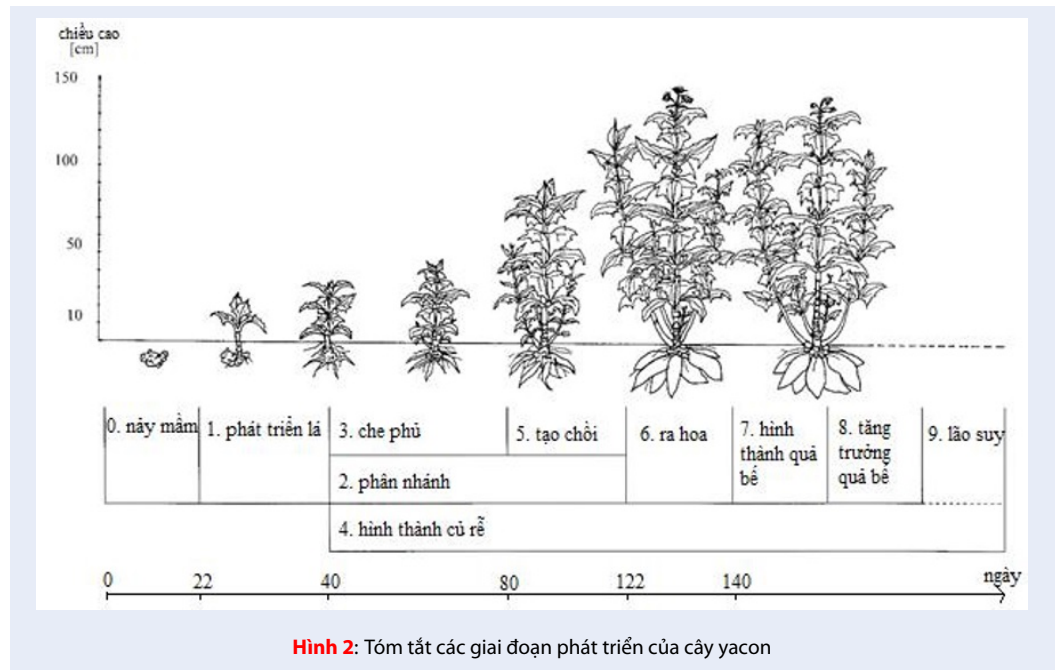
Trong khi đó, vi khuẩn nội sinh có nhiều ứng dụng trong nông nghiệp, y học và các ngành công nghiệp khác: cải thiện sự phát triển của thực vật, thúc đẩy khả năng đề kháng đối với các stress sinh học và phi sinh học, tạo ra các chất chuyển hóa thứ cấp có tiềm năng làm thuốc. Sự phân bố và cấu trúc quần thể của các vi khuẩn nội sinh chịu ảnh hưởng của đặc điểm di truyền và tình trạng của cây ký chủ cũng như môi trường sinh thái¹⁰. Ek-Ramos và cs cho rằng cây được liệu chịu tác động mạnh mẽ bởi mối quan hệ nội cộng sinh với vi khuẩn chuyên biệt ngày càng được công nhận¹¹. Hiểu được vai trò của vi khuẩn nội sinh có thể giúp ứng dụng để nâng cao năng suất và chất lượng cây dược liệu¹⁰.

Nghiên cứu xác định thành phần vi sinh vật có trong cây yacon *S. sonchifolius* trồng thực nghiệm theo các giai đoạn phát triển nhằm đánh giá sự hiện diện của vi sinh vật, phân lập và định danh đến cấp độ chi của một số vi khuẩn, đặt nền tảng cho các nghiên cứu ảnh hưởng của vi khuẩn nội sinh đến hoạt tính sinh học củ yacon; khảo sát các điều kiện tác động đến hệ vi khuẩn nội sinh nhằm nâng cao trữ lượng và năng suất của cây yacon.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Trồng và thu mẫu

Cây yacon được trồng trong vườn thực nghiệm của Bộ môn Sinh lý thực vật, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Tp. HCM. Điều kiện nuôi trồng ở nhiệt độ 32–36 °C, ánh sáng tự nhiên, tưới mỗi ngày 1 lần vào 9 giờ sáng, bón phân hữu cơ mỗi tháng 1 lần. Cây được trồng từ thân rễ (củ mầm) vào tuần thứ 1 của tháng 3/2019 và được lấy mẫu ở 2 giai



đoạn. Giai đoạn 1: giai đoạn phân nhánh (giai đoạn trước khi tạo củ t = 2; mẫu được lấy vào tuần thứ 2 của tháng 3/2019), bao gồm mẫu thân rễ và chóp rễ. Giai đoạn 2: giai đoạn tượng củ (t = 4; mẫu được lấy vào tuần thứ 2 của tháng 4/2019), bao gồm mẫu thân rễ, chóp rễ và rễ tượng củ (Hình 3).

Định lượng tổng số vi khuẩn hiếu khí

Mẫu sau khi thu được rửa sạch với nước cất vô trùng từ 2–3 lần, lắc đều khử trùng bằng ethanol 70%, trong 5 phút, rửa sạch cón bằng nước cất vô trùng từ 3–4 lần. Mẫu vật được nghiền nát điều kiện vô trùng và nuôi cấy tăng sinh vi khuẩn trên môi trường Cp (0,3% cao thịt, 1% pepton, 0,5% NaCl) và môi trường GE (2% glucose, 0,3% ethanol, 0,3% cao nấm men, 0,3% peptone,) có bổ sung nystatin (125 IU/5mL).

Vi khuẩn hiếu khí hiện diện trong mẫu được định lượng bằng phương pháp MPN (Most Probable Number) của Mac Crady nhằm đánh giá số lượng vi sinh vật theo xác suất lớn nhất có thể có trong một đơn vị thể tích mẫu (MPN/mL)¹².

Phân lập và khảo sát các đặc điểm hình thái vi khuẩn từ mẫu rễ củ yacon

Huyền phù vi khuẩn sau bước định lượng tổng số vi sinh vật hiện diện được cấy rìa 1 vòng dịch khuẩn trên đĩa thạch môi trường tương ứng là Cp và GE có bổ sung 0,7% CaCO₃, ủ ở 30 °C trong vòng 24 h¹³. Tiếp theo, những dạng khuẩn lạc khác nhau được lựa chọn để làm thuần và quan sát các đặc điểm hình thái khuẩn

lạc (dạng khuẩn lạc, kích thước khuẩn lạc, mặt cắt ngang, bề mặt khuẩn lạc, màu sắc khuẩn lạc) và đặc điểm hình thái tế bào (hình dạng, kích thước, trạng thái Gram)¹⁴.

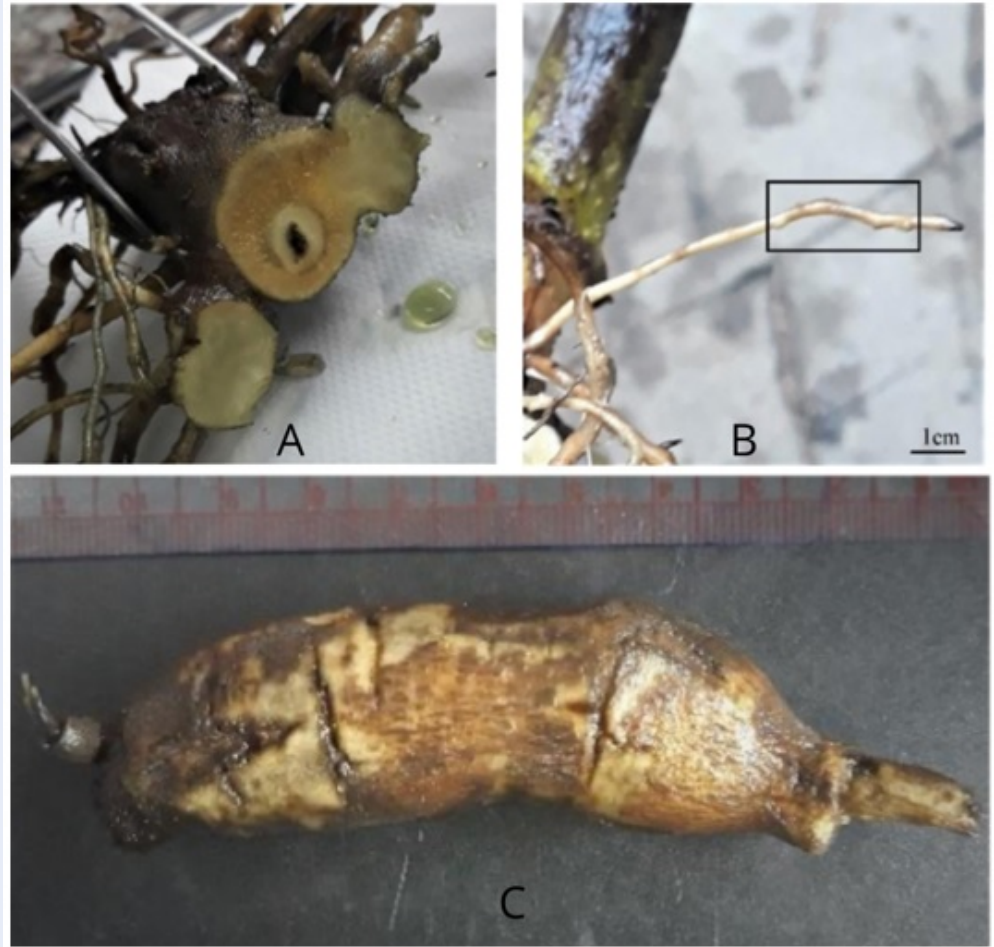
Phân tích mối quan hệ phát sinh loài dựa trên vùng trình tự gene mã hóa 16S rRNA

Các chủng sau khi được xác định các đặc điểm khuẩn lạc và đặc điểm tế bào được thực hiện tách chiết và thu nhận DNA bộ gene. Sản phẩm PCR được giải mã một phần trình tự vùng 16S rDNA bằng mỗi 800R (5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3'). Tiếp theo, trình tự DNA của từng chủng được gắn với nhau theo nguyên tắc bổ sung nhờ vào công cụ sắp giống từng cặp (pair-wise alignment). Trình tự của chủng khảo sát được sắp giống bằng phần mềm BioEdit¹⁵. Cây phát sinh loài được xây dựng bằng chương trình MEGA phiên bản 7.01 với 1.000 lần lặp lại theo phương pháp Neighbor – Joining của Saitou và Nei (1987)¹⁶.

Thống kê, xử lý số liệu

Số liệu được xử lý, thống kê bằng phần mềm MS – Excel phân tích kết quả Anova nhằm xem xét mức ý nghĩa thống kê. Sự khác biệt có ý nghĩa ở mức xác suất p = 0,05.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN



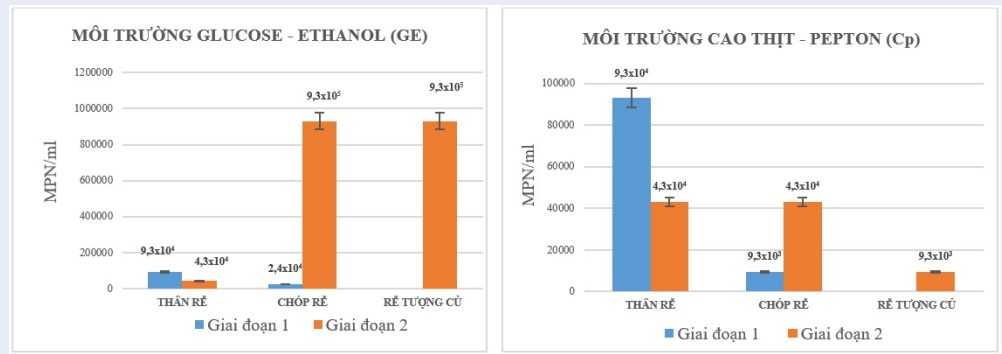
Hình 3: Ảnh mẫu được thu làm thí nghiệm: (A) mặt cắt ngang mẫu thân rễ ở giai đoạn 1, (B) mẫu chóp rễ ở giai đoạn 1 và (C) mẫu rễ tượng củ ở giai đoạn 2

Tổng số vi khuẩn hiếu khí hiện diện ở hai giai đoạn hình thành rễ củ yacon

Hình 4 cho thấy có sự thay đổi về tổng số vi sinh vật hiếu khí ở từng giai đoạn và các bộ phận khác nhau của phần rễ. Trên môi trường GE, tổng số vi khuẩn hiếu khí ghi nhận ở rễ tượng củ ($9,3 \times 10^5$ MPN/mL) cao hơn hẳn trên môi trường Cp ($9,3 \times 10^3$ MPN/mL). Điều này chứng tỏ có sự khác biệt về mật độ vi khuẩn giữa các nhóm vi khuẩn khác nhau hiện diện ở rễ tượng củ. Môi trường GE, ngoài nguồn đạm, còn được bổ sung nguồn carbon bao gồm glucose và ethanol, đây là môi trường phù hợp cho các nhóm vi khuẩn có khả năng chuyển hoá glucose và ethanol thành các acid hữu cơ, đặc biệt là các nhóm vi khuẩn có khả năng kích thích tăng trưởng thực vật. Điều kiện này cũng tương đồng với thành phần dinh dưỡng được của cây yacon. Trong đó, thành phần chính của sinh khối rễ yacon là nước, chiếm trên

70% trọng lượng tươi. Rễ củ chỉ chứa 0,3–3,7% protein nhưng 70–80% chất khô bao gồm saccharide, chủ yếu là dạng fructan chiếm từ 40% đến hơn 70% trọng lượng khô, bao gồm FOS và inulin, ngoài ra một vài carbohydrate khác như sucrose, fructose và glucose chiếm khoảng 15–40% trọng lượng khô^{4,17}. Rễ củ yacon còn chứa polyphenol (2.030 mg/kg) với chlorogenic acid chiếm ưu thế ($48,5 \pm 12,9$ mg/kg). Trong số các acid amin, tryptophan được định lượng với hàm lượng cao ($14,6 \pm 7,1$ mg/kg)¹⁸. Tryptophan được biết đến là tiền chất của các con đường sinh tổng hợp các hợp chất chất điều hoà sinh trưởng ở thực vật và một số loại vi khuẩn¹⁹.

Ở giai đoạn trước tượng củ, tổng số vi khuẩn hiếu khí hiện diện trong chóp rễ ghi nhận được trên môi trường GE là $2,4 \times 10^4$ MPN/mL đến $9,3 \times 10^5$ MPN/mL trên môi trường GE; từ $9,3 \times 10^3$ MPN/mL đến $4,3 \times 10^4$ MPN/mL trên môi trường Cp. Trong khi



Hình 4: Tổng số vi khuẩn định lượng bằng phương pháp MPN trên môi trường GE và Cp hiện diện trong mẫu rễ củ yacon

đó, chỉ số này ghi nhận ở thân rễ trên môi trường GE và Cp lần lượt là $9,3 \times 10^4$ MPN/mL và $9,3 \times 10^4$ MPN/mL. Có thể thấy, tổng số vi khuẩn hiếu khí hiện diện trong thân rễ nhiều hơn tổng số vi khuẩn ghi nhận được trên chóp rễ trong giai đoạn phân nhánh ở cây yacon. Ở giai đoạn tượng củ, tổng số vi khuẩn hiếu khí trên mẫu chóp rễ có xu hướng tăng từ $2,4 \times 10^4$ MPN/mL đến $9,3 \times 10^5$ MPN/mL trên môi trường GE; từ $9,3 \times 10^3$ MPN/mL đến $4,3 \times 10^4$ MPN/mL trên môi trường Cp. Trong khi đó, đối với mẫu thân rễ, tổng số vi khuẩn hiếu khí lại giảm từ $9,3 \times 10^4$ MPN/mL xuống còn $4,3 \times 10^4$ MPN/mL trên cả hai môi trường GE và Cp. Đây là giai đoạn rễ bắt đầu tượng củ và diễn ra các hoạt động sinh tổng hợp và tích trữ các nguồn carbohydrate. Kết quả cho thấy sự hiện diện của vi khuẩn nội sinh có sự thay đổi giữa các vị trí khác nhau trên cây và giữa hai giai đoạn. Theo Itaya và cs (2002), hoạt động của các enzyme sucrose 1-fructosyl transferase, fructan 1-fructosyl transferase và fructan 1-exohydrolase trong thân rễ và rễ củ của cây yacon trong quá trình sinh trưởng dưới điều kiện đồng ruộng ghi nhận cao hơn khi cây bắt đầu tạo củ (cây 3 tháng tuổi) và ở giai đoạn ra hoa (cây 7 tháng tuổi). Việc phân tích các hoạt tính của enzyme góp phần tìm ra vị trí và giai đoạn thích hợp để cho hàm lượng FOS cao từ cây yacon. Nghiên cứu cũng chỉ ra rằng các hoạt động sinh tổng hợp diễn ra mạnh hơn ở giai đoạn đầu và cao hơn ở thân cây so với ở rễ củ yacon, trong khi hoạt động thủy phân chiếm ưu thế ở giai đoạn sau, chủ yếu khi 1-kestose và nystose được sử dụng làm cơ chất²⁰. Như vậy, có thể sự hiện diện của các vi khuẩn nội sinh có mối quan hệ tương quan với hoạt động biến dưỡng của cây yacon, đặc biệt là giai đoạn bắt đầu hình thành rễ củ.

Phân lập và khảo sát đặc điểm hình thái các chủng vi khuẩn thu nhận được từ các mẫu rễ củ yacon

Kết quả phân lập thu được 22 chủng thuần từ mẫu thân rễ, chóp rễ ở giai đoạn 1 (giai đoạn trước tạo củ) và từ mẫu thân rễ, chóp rễ và rễ tượng củ ở giai đoạn 2 (giai đoạn tượng củ) (Bảng 1).

Đa số các chủng vi khuẩn phân lập được có dạng tròn, bề mặt khuẩn lạc trơn, bóng (tuy nhiên có 6 chủng có khả năng tạo nhầy chỉ thu nhận được trên môi trường GECA: YC-II-G-A, YC-III-G-1a, YC-III-G-1b, YC-IV-G2, YC-V-G2, YC-VI-G), kích thước khuẩn lạc đơn đo được từ 0,1–2,0 mm (riêng chủng YC-III-G-1a có kích thước lên đến 4 mm), mép khuẩn lạc nguyên, màu sắc cơ bản: trắng đục và màu be (đặc biệt khuẩn lạc chủng YC-II-Cp-B2 có màu vàng) (Hình 5). Đồng thời, kết quả nhuộm Gram ghi nhận 22 chủng đều có đặc điểm Gram âm, tế bào có dạng hình que (Hình 6A) và que chẻ (Hình 6B).

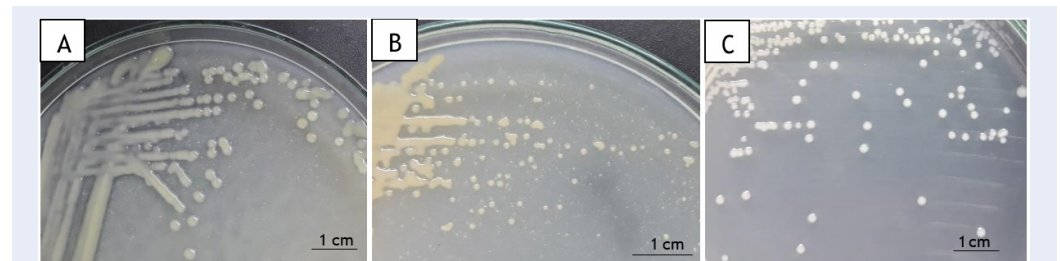
Phân tích trình tự vùng gene mã hóa 16S rRNA

Hai mươi hai đoạn trình tự gene mã hóa 16S rRNA với mỗi 800R được thu nhận. Các trình tự gene được tiếp tục phân tích và tiến hành xây dựng cây phát sinh loài với các loài chuẩn trên ngân hàng gene của NCBI theo phương pháp Neighbor – Joining.

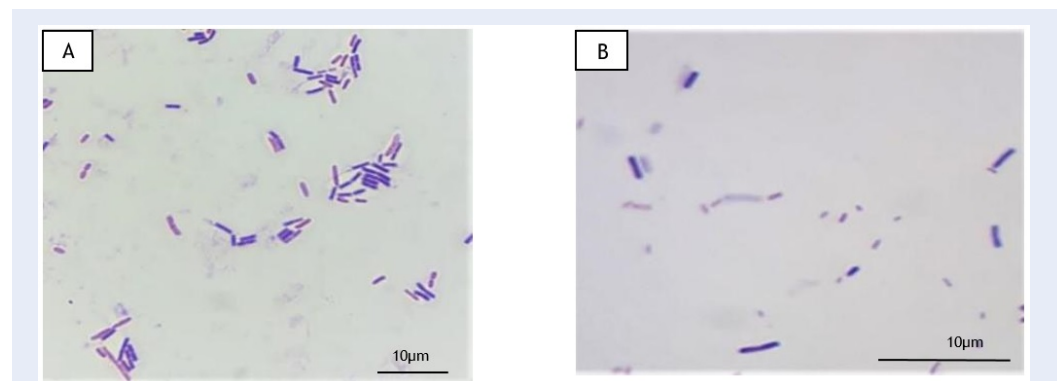
Kết quả xác định 22 chủng vi khuẩn thu nhận thuộc 10 chi: *Burkholderia* (YC-I-G và YC-V-G1) (Hình 7), *Caulobacter* (YC-IV-G2) (Hình 8), *Myroides* (YC-II-Cp-B2) (Hình 9), *Pantoea* (YC-II-G-A) (Hình 10), *Pseudomonas* (YC-I-Cp3 và YC-II-Cp-2b) (Hình 11), *Stenotrophomonas* (YC-V-Cp và YC-I-Cp2) (Hình 12), *Kosakonia* (YC-I-Cp1 và YC-V-G2) (Hình 13), *Rhizobium* (YC-II-G-A) (Hình 14), *Enterobacter* (YC-II-Cp-B1 YC-II-Cp-A2, YC-III-G.1a,

Bảng 1: Các chủng vi khuẩn phân lập được từ các mẫu rễ củ yacon ở 2 giai đoạn phát triển của cây

Giai đoạn	Mẫu yacon	Tên chủng
Giai đoạn 1	Thân rễ	YC-I-G, YC-I-Cp1, YC-I-Cp2, YC-I-Cp3, YC-II-Cp-B1, YC-II-Cp-B2
	Chóp rễ	YC-II-G.A, YC-II-Cp-A1, YC-II-Cp-A2
Giai đoạn 2	Củ rễ	YC-III-G-1a, YC-III-G-1b, YC-IV-G1, YC-IV-G2, YC-III-Cp-1a, YC-III-Cp-1b, YC-III-Cp-2b
	Thân rễ	YC-V-G1, YC-V-G2, YC-V-Cp
	Chóp rễ	YC-VI-G, YC-VI-Cp1, YC-VI-Cp2



Hình 5: Khuẩn lạc 1 ngày tuổi của 3 chủng: (A) YC-V-G2 trên môi trường GECA, (B) YC-IV-G2 trên môi trường GECA và (C) YC-I-Cp1 trên môi trường Cp



Hình 6: Hình ảnh nhuộm Gram của chủng YC-II-G-A (A) và chủng YC-I-Cp1 (B) với chủng với chủng đối chứng *B. subtilis*

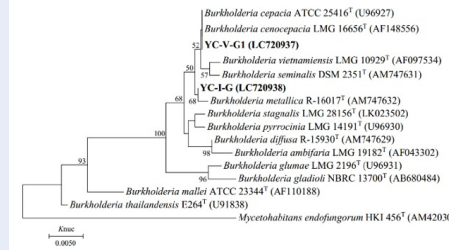
YC-III.G-1b, YC-VI-G và YC-VI-Cp2) (Hình 15) và *Klebsiella* (YC-III-Cp-1a, YC-III-Cp-1b, YC-VI-Cp1 và YC-II-Cp-A1) (Hình 16).

Dựa trên 10 cây phát sinh loài được xây dựng bằng phương pháp Neighbor – Joining của Saitou và Nei theo kết quả giải trình tự gene vùng 16S rDNA, thu nhận được 20 chủng thuộc 10 chi (Bảng 2). Trong đó, ghi nhận được 2 chủng thuộc chi *Bulkhoderia*, 1 chủng thuộc chi *Caulobacter*, 1 chủng thuộc chi *Myroides*, 1 chủng thuộc chi *Pantoea*, 2 chủng thuộc chi *Pseudomonas*, 2 chủng thuộc chi *Stenotrophomonas*, 2 chủng thuộc chi *Kosakonia*, 1 chủng thuộc chi *Rhi-*

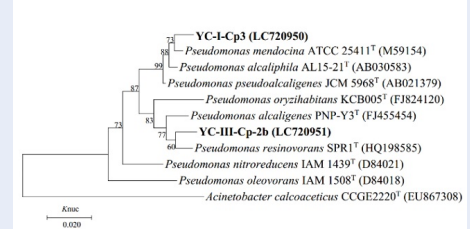
zobium, 5 chủng thuộc chi *Enterobacter* và 3 chủng thuộc chi *Klebsiella*. Hầu hết các chi đã định danh đều được ghi nhận trong các công bố trước đây về vi khuẩn nội sinh ở một số cây trồng khác. Cụ thể, *Klebsiella pneumoniae* giúp gia tăng năng suất chất khô, hàm lượng N tổng của chồi cây cỏ lúa mì (*Triticum aestivum*)²¹. Vi khuẩn *Enterobacter* và *Burkholderia* được phân lập từ vùng rễ cây hoa hướng dương có khả năng phân giải lân thông qua việc tạo ra siderophore và các hợp chất indole²². Hong và cs đã tìm thấy *Stenotrophomonas maltophilia* và *Bacillus* sp. trên củ nhân sâm (*Panax ginseng*), loại thực vật có chứa được

Bảng 2: Sự phân bố các chi vi khuẩn định danh từ vùng rễ cây yacon ở 2 giai đoạn phát triển

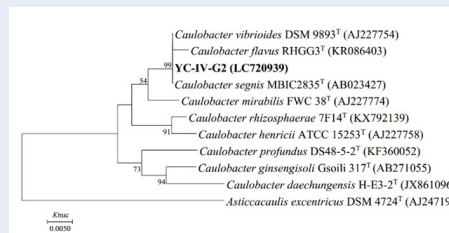
GIẢI ĐOẠN 1 (giai đoạn trước khi tạo củ, 20 ngày tuổi)	GIẢI ĐOẠN 2 (giai đoạn tượng củ, 40 ngày tuổi)
Thân rễ	Thân rễ
Chóp rễ	Chóp rễ
<i>Burkholderia</i> sp.	<i>Burkholderia</i> sp.
<i>Kosakonia</i> sp.	<i>Kosakonia</i> sp.
<i>Stenotrophomonas</i> sp.	<i>Stenotrophomonas</i> sp.
<i>Pseudomonas</i> sp.	
<i>Enterobacter</i> sp.	
<i>Myroides</i> sp.	
	Thân rễ
	Chóp rễ
	<i>Enterobacter</i> sp.
	<i>Klebsiella</i> sp.
	<i>Rhizobium</i> sp.
	<i>Caulobacter</i> sp.
	<i>Klebsiella</i> sp.
	<i>Pseudomonas</i> sp.
	Rễ tượng củ
	<i>Enterobacter</i> sp.



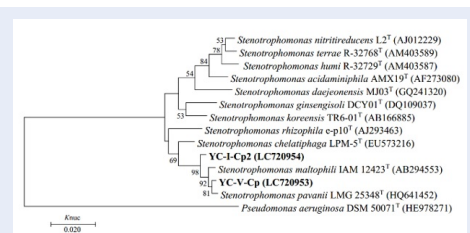
Hình 7: Mối quan hệ phát sinh loài của 2 chủng YC-I-G và YC-V-G1. Cây phát sinh loài được xây dựng dựa trên đoạn trình tự gene mã hóa 16S rDNA có độ dài 675 bp theo phương pháp Neighbor – Joining.



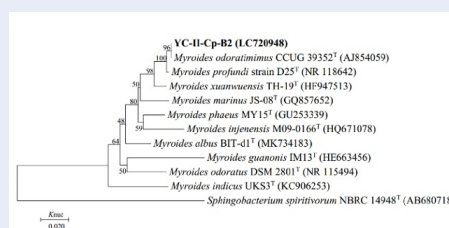
Hình 11: Mối quan hệ phát sinh loài của 2 chủng YC-I-Cp3 và YC-III-Cp-2b. Cây phát sinh loài được xây dựng dựa trên đoạn trình tự gene mã hóa 16S rDNA có độ dài 646 bp theo phương pháp Neighbor – Joining.



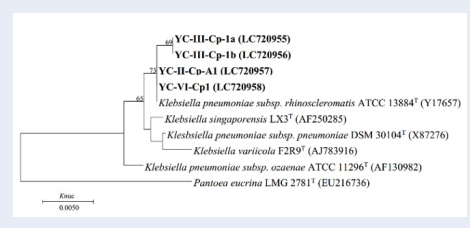
Hình 8: Mối quan hệ phát sinh loài của chủng YC-IV-G2. Cây phát sinh loài được xây dựng dựa trên đoạn trình tự gene mã hóa 16S rDNA có độ dài 638 bp theo phương pháp Neighbor – Joining.



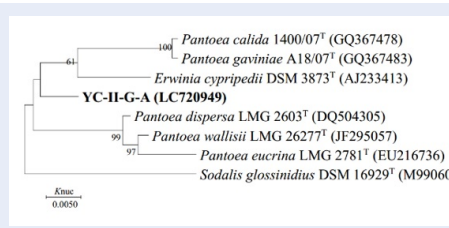
Hình 12: Mối quan hệ phát sinh loài của 2 chủng YC-V-Cp và YC-I-Cp2. Cây phát sinh loài được xây dựng dựa trên đoạn trình tự gene mã hóa 16S rDNA có độ dài 657 bp theo phương pháp Neighbor – Joining.



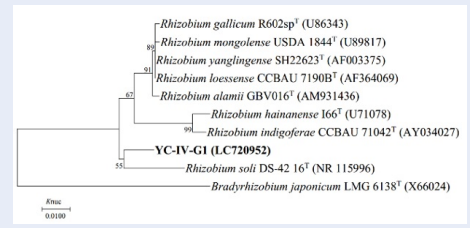
Hình 9: Mối quan hệ phát sinh loài của chủng YC-II-Cp-B2. Cây phát sinh loài được xây dựng dựa trên đoạn trình tự gene mã hóa 16S rDNA có độ dài 638 bp theo phương pháp Neighbor – Joining.



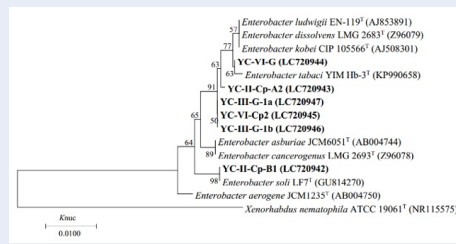
Hình 13: Mối quan hệ phát sinh loài của 2 chủng YC-V-G2 và YC-I-Cp1. Cây phát sinh loài được xây dựng dựa trên đoạn trình tự gene mã hóa 16S rDNA có độ dài 637 bp theo phương pháp Neighbor – Joining.



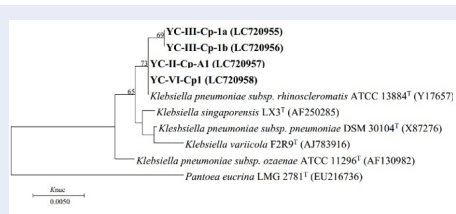
Hình 10: Mối quan hệ phát sinh loài của chủng YC-II-G-A. Cây phát sinh loài được xây dựng dựa trên đoạn trình tự gene mã hóa 16S rDNA có độ dài 619 bp theo phương pháp Neighbor – Joining.



Hình 14: Mối quan hệ phát sinh loài của chủng YC-II-G-A. Cây phát sinh loài được xây dựng dựa trên đoạn trình tự gene mã hóa 16S rDNA có độ dài 636 bp theo phương pháp Neighbor – Joining.



Hình 15: Mối quan hệ phát sinh loài của 6 chủng YC-II-Cp-B1, YC-II-Cp-A2, YC-III-G-1a, YC-III-G-1b, YC-VI-G và YC-VI-Cp2. Cây phát sinh loài được xây dựng dựa trên đoạn trình tự gene mã hóa 16S rDNA có độ dài 643 bp theo phương pháp Neighbor – Joining.



Hình 16: Mối quan hệ phát sinh loài của 4 chủng YC-III-Cp-1a, YC-III-Cp-1b, YC-VI-Cp1 và YC-II-Cp-A1. Cây phát sinh loài được xây dựng dựa trên đoạn trình tự gene mã hóa 16S rDNA có độ dài 636 bp theo phương pháp Neighbor – Joining.

liệu quý gọi là ginsenosides. Các vi khuẩn này đã được xác định có vai trò ức chế sự phát triển của nấm sợi gây bệnh trên rễ cây nhân sâm²³. Trong khi đó, *Pseudomonas fluorescens* được tìm thấy trên rễ cây đinh lăng đen (*Atractylodes lancea*), một loại cây thảo dược của Trung Quốc với vai trò quan trọng trong kích thích tăng trưởng rễ, cung cấp carbohydrate cho cây, tăng cường khả năng quang hợp và tích lũy hàm lượng sesquiterpenoid, một chất được nghiên cứu có hoạt tính kháng viêm, ức chế sự phát triển của khối u...²⁴. Trong một nghiên cứu về hệ vi khuẩn nội sinh trên sâm ngọc linh (*Panax ginseng*), Fu và cs đã xác định các vi khuẩn *Burkholderia* sp. có khả năng giúp tăng cường hàm lượng ginsenoside Rg3, là hoạt chất chính thành phần của nhân sâm chống oxy hóa, chống ung thư, quá trình chống viêm và điều hòa sinh học²⁵. Năm 2020, hai chủng vi khuẩn thuộc chi *Rhizobium* gồm S-93T và S-62 đã được phân lập từ hai loài khoai mỡ nước (*Dioscorea alata* L. và *Dioscorea esculenta* L.) trồng trong điều kiện đất kiềm, nghèo dinh dưỡng trên đảo Miyako, Okinawa, Nhật Bản. Các chủng vi khuẩn nội sinh này đã được xác định có khả năng có

định đạm²⁶. Bên cạnh đó, nhóm tác giả Nguyễn Thị Tâm và cs đã phân lập được 45 chủng từ các bộ phận thân rễ, lá và cuống lá cây sâm (*Panax vietnamensis*) thu ở Quảng Nam, trong số đó, chủng SK32 thuộc chi *Enterobacter* có hoạt độ β -glucosidase cao vượt trội làm tiền đề cho các nghiên cứu chuyển hóa ginsenoside Rb1 thành Rd và Rg3 tiếp theo²⁷. Ngoài ra, Takada và cs đã phân lập các chủng vi khuẩn cố định đạm từ các mẫu thân và rễ của cây khoai mỡ nước và định danh các chủng thuộc các chi *Bacillus*, *Cohnella*, *Rhizobium*, *Kosakonia*, *Azospirillum*, *Pantoea*, *Dyella*, *Enterobacter* và *Ralstonia*²⁸.

KẾT LUẬN

Sự hiện diện của vi khuẩn được ghi nhận có sự thay đổi giữa các mẫu thân rễ, chóp rễ và rễ tượng củ cũng như giữa "giai đoạn trước tượng củ" và "giai đoạn tượng củ" ở cây yacon. Trong đó, mật độ vi khuẩn ghi nhận cao hơn ở giai đoạn tượng củ và các vi khuẩn ưa sử dụng nguồn dinh dưỡng carbohydrate chiếm ưu thế hơn các vi khuẩn ưa sử dụng nguồn đạm. Từ các mẫu này, 22 chủng vi khuẩn được phân lập và định danh dựa trên phân tích vùng trình tự 16S rDNA thuộc 10 chi, bao gồm *Burkholderia*, *Caulobacter*, *Myroides*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Kosakonia*, *Rhizobium*, *Enterobacter* và *Klebsiella*. Hầu hết các chi vi khuẩn này đã được tìm thấy và ghi nhận có vai trò trên một số cây trồng khác.

DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT

MPN: Most Probable Number
 FOS: fructooligosaccharide
 RNA: ribonucleic acid
 DNA: deoxyribonucleic acid
 16S: ribosome 16S
 cs: cộng sự

ĐẠO ĐỨC TRONG CÔNG BỐ

Các tác giả đồng ý không có bất kỳ xung đột lợi ích nào liên quan đến các kết quả đã công bố.

ĐÓNG GÓP CỦA TÁC GIẢ

Bùi Thị Thu Vân lên kế hoạch, thu thập các dữ liệu, thảo luận các kết quả nghiên cứu, viết bản thảo.

Nguyễn Ngọc Quỳnh Như thực hiện thí nghiệm, xử lý số liệu, hình ảnh.

Trần Thị Thanh Hiền cung cấp mẫu và thông tin cây yacon.

Vũ Thị Lan Hương định hướng, xử lý dữ liệu trình tự, thảo luận kết quả nghiên cứu, hoàn chỉnh bản thảo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Hermann M. Arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft). In: Hermann M, Heller J, editors, *Andean Roots and Tubers: ahupa, arracacha, maca and yacon*. Plant Genetics Resources Institute; 1997. p. 75-172;.
- Cultivariable, *Yacon* (*Smallanthus sonchifolius*) (truy cập ngày 20 tháng 5 năm; 2022); 2019; Available from: <https://www.cultivariable.com/instructions/andean-roots-tubers/how-to-grow-yacon/>.
- Manrique I, Párraga A, Hermann M 2005. *Yacon syrup: principles and processing*. [Series: Conservación y uso de la biodiversidad de raíces y tubérculos andinos]. Una década de investigación para el desarrollo (1993-2003). No. 8B. International Potato Center, Universidad Nacional Daniel Alcides Carrión, Erbacher Foundation. Swiss Agency for Development and Cooperation. Lima, Peru. 31 p;.
- Coll Aráoz MV, Kortsarz González AM, Mercado MI, Ponessa GI, Grau A, Catalán CAN. Ontogeny and total sugar content of yacon tuberous roots and other three *Smallanthus* species (*Heliantheae*, *Asteraceae*), insights on the development of a semi-domesticated crop. *Genet Resour Crop Evol*. 2014;61(1):163-72; Available from: <https://doi.org/10.1007/s10722-013-0022-0>.
- Guigoz Y, Rochat F, Perruisseau-Carrier G, Rochat I, Schiffrin EJ. Effects of oligosaccharide on the faecal flora and non-specific immune system in elderly people. *Nutr Res*. 2002;22(1-2):13-25; Available from: [https://doi.org/10.1016/S0271-5317\(01\)00354-2](https://doi.org/10.1016/S0271-5317(01)00354-2).
- Fernandez CE, Viehmannová I, Bechyně M, Lachman J, Milella L, Martelli G. The cultivation and phenological growth stages of yacon [*Smallanthus sonchifolius* (Poepp. et Endl.)] H. Robinson. *Agricultura Tropica et Subtropica*. 2007;40(3):71-7;.
- Fernández E, Viehmannová I, Lachman J, Milella L. *Yacon* [*Smallanthus sonchifolius* (Poepping & Endlicher) H. Robinson]: a new crop in the central Europe. *Plant Soil Environ*. 2006;52(12):564; Available from: <https://doi.org/10.17221/3548-PSE>.
- Reina LD, Pérez-Díaz IM, Breidt F, Azcarate-Peril MA, Medina E, Butz N. Characterization of the microbial diversity in yacon spontaneous fermentation at 20 C. *Int J Food Microbiol*. 2015;203:35-40; PMID: 25777679. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.007>.
- Dimkpa C, Weinand T, Asch F. Plant-rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. *Plant Cell Environ*. 2009;32(12):1682-94; PMID: 19671096. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.02028.x>.
- Wu W, Chen W, Liu S, Wu J, Zhu Y, Qin L et al. Beneficial relationships between endophytic bacteria and medicinal plants. *Front Plant Sci*. 2021;12:646146; PMID: 33968103. Available from: <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.646146>.
- Ek-Ramos MJ, Gomez-Flores R, Orozco-Flores AA, Rodríguez-Padilla C, González-Ochoa G, Tamez-Guerra P. Bioactive products from plant-endophytic gram-positive bacteria. *Front Microbiol*. 2019;10:463; PMID: 30984118. Available from: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00463>.
- Nga NTQ. Phân lập và định danh vi khuẩn sinh acid acetic có khả năng cố định đạm ở cây lúa và khảo sát một số đặc tính có vai trò trong kích thích tăng trưởng ở thực vật, Khoa luận cử nhân Sinh học, Trường Đại học Khoa Học Tự Nhiên-ĐHQG TPHCM; 2011;.
- TCVN 4884-1:2015, Vi sinh vật trong chuỗi thực phẩm - Phương pháp định lượng vi sinh vật;.
- Dũng NL dịch 1983. *Thực tập Vi sinh vật học*. NXB Đại Học và Trung Học Chuyên Nghiệp Hà Nội. Trang 154-87;.
- Hall T. BioEdit: an important software for molecular biology. *GERF Bull Biosci*. 2011;2:60-1;.
- Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*. 1987;4(4):406-25; Available from: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>.
- Goto K, Fukai K, Hikida J, Nanjo F, Hara Y. Isolation and structural analysis of oligosaccharides from yacon (*Polymnia sonchifolia*). *Biosci Biotechnol Biochem*. 1995;59(12):2346-7; Available from: <https://doi.org/10.1271/bbb.59.2346>.
- Valentová K, Frček J, Ulřichová J. *Yacon* (*Smallanthus sonchifolius*) and *Maca* (*Lepidium meyenii*), traditional Andean crops as new functional foods on the European market. *Chem Listy*. 2001;95:594-601. (In Czech);.
- Kravchenko LV, Azarova TS, Makarova NM, Tikhonovich IA. The effect of tryptophan present in plant root exudates on the phyto-stimulating activity of rhizobacteria. *Microbiology*. 2004;73(2):156-8; Available from: <https://doi.org/10.1023/B:MICL.0000023982.76684.9d>.
- Itaya NM, Machado de Carvalho MA, De Cássia Leone Figueiredo-Ribeiro R. Fructosyl transferase and hydrolase activities in rhizospheres and tuberous roots upon growth of *Polymnia sonchifolia* (*Asteraceae*). *Physiol Plant*. 2002;116(4):451-9; Available from: <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2002.1160403.x>.
- Haahtela K, Kari K. The role of root-associated *Klebsiella pneumoniae* in the nitrogen nutrition of *Poa pratensis* and *Triticum aestivum* as estimated by the method of 15N isotope dilution. *Dev Plant Soil Sci Nitrogen Fixation with Non-Legumes*. 1986;21; Available from: https://doi.org/10.1007/978-94-009-4378-0_19.
- Ambrosini A, Beneduzi A, Stefanski T, Pinheiro FG, Vargas LK, Passaglia LMP. Screening of plant growth promoting rhizobacteria isolated from sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Soil*. 2012;356(1-2):245-64; Available from: <https://doi.org/10.1007/s11104-011-1079-1>.
- Hong CE, Jo SH, Jo I, Park JM. Diversity and antifungal activity of endophytic bacteria associated with panax ginseng seedlings. *Plant Biotechnol Rep*. 2018;12(6):409-18; Available from: <https://doi.org/10.1007/s11816-018-0504-9>.
- Zhou JY, Sun K, Chen F, Yuan J, Li X, Dai CC. Endophytic *Pseudomonas* induces metabolic flux changes that enhance medicinal sesquiterpenoid accumulation in *Atractylodes lancea*. *Plant Physiol Biochem*. 2018;130:473-81; PMID: 30081324. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.07.016>.
- Fu Y, Yin ZH, Yin CY. Biotransformation of ginsenoside Rb1 to ginsenoside Rg3 by endophytic bacterium *Burkholderia* sp. GE 17-7 isolated from panax ginseng. *J Appl Microbiol*. 2017;122(6):1579-85. doi: 10.1111/jam.13435, PMID 28256039; PMID: 28256039. Available from: <https://doi.org/10.1111/jam.13435>.
- Ouyabe M, Tanaka N, Shiwa Y, Fujita N, Kikuno H, Babil P et al. *Rhizobium dioscoreae* sp. nov., a plant growth-promoting bacterium isolated from yam (*Dioscorea* species). *Int J Syst Evol Microbiol*. 2020;70(9):5054-62; PMID: 32804605. Available from: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004381>.
- Tâm NT, Tâm NP, Nguyễn VTH, Hùng NK, Huy CN, Ngọc PB, Hà CH, Tiến PQ. Phân lập, sàng lọc, vi khuẩn nội sinh có khả năng sinh tổng hợp β -glucosidase trong cây sâm ngọc linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.). 2018; Tạp chí Sinh học; 40(2):153-61;.
- Takada K, Tanaka N, Kikuno H, Babil P, Onjo M, Park BJ et al. Isolation of nitrogen-fixing bacteria from water (*Dioscorea alata* L.). *Trop Agric Dev*. 2019;63(4):198-203;.

Determination of the bacteria present along with the tuberous root formation in yacon - *Smallanthus sonchifolius*

Bui Thi Thu Van*, Nguyen Ngoc Quynh Nhu, Tran Thi Thanh Hien, Vu Thi Lan Huong



Use your smartphone to scan this QR code and download this article

ABSTRACT

Yacon (*Smallanthus sonchifolius*), a plant traditionally grown in the Northern and Central Andes, is recently cultivated in Vietnam. The edible storage roots of yacon contain a large amount of carbohydrate during the form of indigestible fructooligosaccharide (FOS), which functions as a prebiotic and gives positive effect during the treatment of obesity, diabetes, and colorectal cancer. Thus, yacon root is expected to be a good dietary supplement for patients with these diseases. There has been limited research about the impacts of microorganisms on the tuberous root formation of yacon. Therefore, this paper presents the enumeration of aerobic bacteria in the root area at the two growing stages, before and in the early stage of the tuberous root formation, of yacon by MPN (Most Probable Number) method. The obtained results show a significant change on the amount carbohydrate metabolism bacteria presence in yacon roots between the two growing stages. Besides, there are more carbohydrate metabolism bacteria ($9,3 \times 10^5$ MPN/mL) in tuberous root than protein metabolism bacteria ($9,3 \times 10^3$ MPN/mL). The isolation of aerial bacteria from yacon roots found 22 strains, which are assigned into the 10 genera including *Burkholderia*, *Caulobacter*, *Myroides*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Kosakonia*, *Rhizobium*, *Enterobacter*, and *Klebsiella* based on the phylogenetic analysis of the so-called 800R 16S rRNA gene sequences. The appearance of those genera in different parts of yacon root is not the same. The presence of different genera is also shown in the roots at the two growing stages.

Key words: bacterial presence, MPN, *Smallanthus sonchifolius*, tuberous root formation, 16S rDNA sequence

Faculty of Biology and Biotechnology,
University of Science, VNU-HCM,
Vietnam

Correspondence

Bui Thi Thu Van, Faculty of Biology and
Biotechnology, University of Science,
VNU-HCM, Vietnam

Email: btthuvan@hcmus.edu.vn

History

- Received: 23-3-2022
- Accepted: 23-8-2022
- Published: 30-9-2022

DOI : 10.32508/stdjns.v6i3.1174



Copyright

© VNUHCM Press. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.



Cite this article : Van B T T, Nhu N N Q, Hien T T T, Huong V T L. **Determination of the bacteria present along with the tuberous root formation in yacon - *Smallanthus sonchifolius*.** *Sci. Tech. Dev. J. - Nat. Sci.*; 2022, 6(3):2222-2232.