ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI
VIỆN VI SINH VẬT VÀ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Nguyễn Thị Hiếu Thu

NGHIÊN CỨU VI KHUẨN NỘI SINH Ở MỘT SỐ GIỐNG LÚA VÀ KHẢ NĂNG ĐỐI KHÁNG *XANTHOMONAS ORYZAE* PV. *ORYZAE* GÂY BỆNH BẠC LÁ CỦA CÁC CHỦNG TUYỂN CHỌN

LUẬN ÁN TIẾN SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Hà Nội - 2025

ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI
VIỆN VI SINH VẬT VÀ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Nguyễn Thị Hiếu Thu

NGHIÊN CỨU VI KHUẨN NỘI SINH Ở MỘT SỐ GIỐNG LÚA VÀ KHẢ NĂNG ĐỐI KHÁNG *XANTHOMONAS ORYZAE* PV. *ORYZAE* GÂY BỆNH BẠC LÁ CỦA CÁC CHỦNG TUYỂN CHỌN

Chuyên ngành: Công nghệ sinh học

Mã số: 9420201

LUẬN ÁN TIẾN SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Người hướng dẫn khoa học: GS. Vittorio Venturi

PGS. TS. Đinh Thuý Hằng

Hà Nội - 2025

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan:

Đây là công trình nghiên cứu của tôi và một số kết quả cộng tác cùng các cộng sự khác.

Các số liệu trình bày trong luận án là trung thực, một phần đã được công bố trên các tạp chí khoa học chuyên ngành với sự đồng ý của các đồng tác giả.

Phần còn lại chưa được công bố trong bất kỳ một công trình nào khác.

Tác giả luận án

Nguyễn Thị Hiếu Thu

LỜI CẢM ƠN

Luận án này được thực hiện tại Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học, ĐHQGHN, Việt Nam và phòng Vi khuẩn học, Trung tâm Quốc tế về Kỹ thuật di truyền và Công nghệ sinh học (ICGEB), Trieste, Italy.

Lời đầu tiên, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành và sâu sắc nhất tới PGS. TS. Đinh Thuý Hằng, người thầy, người đồng nghiệp đã đồng hành nhiều năm với tôi từ bậc cao học cũng như trong quá trình công tác tại Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học, người đã tận tình hướng dẫn, chỉ bảo và tiếp thêm động lực cho tôi hoàn thành luận án.

Tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành đến GS. Vittorio Venturi, người đã định hướng nghiên cứu và có những thảo luận, trao đổi học thuật rất giá trị và bổ ích.

Để hoàn thành được luận án này, tôi chân thành cảm ơn các đồng nghiệp trước đây tại Phòng Sinh thái Vi sinh vật ứng dụng, Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học đã giúp tôi hoàn thành nhiều thí nghiệm và động viên tôi trong quá trình thực hiện luận án cũng như trong công việc nghiên cứu.

Tôi xin chân thành cảm ơn thủ trưởng và các đồng nghiệp tại Phân viện Công nghệ sinh học, Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga đã động viên và tạo điều kiện thuận lợi cho tôi hoàn thành luận án này.

Tôi xin chân thành cảm ơn đề tài NĐT.ITA.34/17 đã tài trợ cho nội dung nghiên cứu metagenome hệ vi khuẩn nội sinh lúa và đề tài NVQG-2021/ĐT.07 đã tài trợ cho nội dung nghiên cứu các chủng vi khuẩn nội sinh kiểm soát bệnh bạc lá. Tôi cũng đã nhận được học bổng dành cho nghiên cứu sinh do Quỹ VINIF, Vingroup tài trợ trong quá trình thực hiện luận án. Tôi rất trân trọng những sự hỗ trợ vô cùng quý giá này.

Tôi xin trân trọng cảm ơn TS. Nguyễn Huỳnh Minh Quyên cùng các thầy, cô giáo tại Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học đã truyền đạt những kiến thức quý báu trong thời gian tôi học tập tại Viện cũng như hỗ trợ tôi về các thủ tục hành chính trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu luận án.

Cuối cùng, tôi xin biết ơn sự ủng hộ, quan tâm và động viên của gia đình và người thân, bạn bè giúp tôi có thời gian và động lực hoàn thành luận án.

Hà Nội, ngày 20 tháng 7 năm 2025

Nguyễn Thị Hiếu Thu

MỤC LỤC

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

Chữ viết tắt	Viết đầy đủ tiếng Anh	Viết đầy đủ tiếng Việt
.cs		cộng sự
ACC	1-aminocyclopropane-1-carboxylate	
CTTN		Công thức thí nghiệm
DNA	Deoxyribonucleic acid	
ĐC		Đối chứng
$ĐC_{KS}$		Đối chứng kiểm soát
GA	Gibberellin	
IAA	Indole-3-acetic acid	
ISR	Induced system resistance	Tính kháng hệ thống
NMDS	Non-metric multidimension scaling	Chia tỷ lệ đa chiều không theo hệ mét
NRP	Non-ribosomal peptide	
NSLT		Năng suất lý thuyết
NSTT		Năng suất thực tế
OTU	Operational taxonomic unit	Đơn vị phân loại
PCR	Polymerase chain reaction	Phản ứng chuỗi trùng hợp
T6SS	Type 6 secretion system	Hệ thống bài tiết loại 6
TLTK		Tài liệu tham khảo
VKBS		Vi khuẩn biểu sinh
VKNS		Vi khuẩn nội sinh
VOC	Volatile organic compound	Hợp chất hữu cơ bay hơi
VSV		Vi sinh vật
Xoo	*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*	Vi khuẩn gây bệnh bạc lá

DANH MỤC HÌNH

DANH MỤC BẢNG

MỞ ĐẦU

Tính cấp thiết của đề tài

Lúa gạo là cây lương thực chính và đóng vai trò thiết yếu trong việc cung cấp nguồn dinh dưỡng cho gần một nửa dân số thế giới. Do đó, việc đảm bảo sự ổn định và gia tăng về năng suất và chất lượng lúa mang ý nghĩa rất quan trọng đối với an ninh lương thực tại nhiều quốc gia. Tuy nhiên, canh tác nông nghiệp đang phải đối mặt với những thách thức nghiêm trọng. Cụ thể, sự khai thác quá mức đất canh tác cùng với việc sử dụng thiếu kiểm soát phân bón vô cơ và thuốc bảo vệ thực vật hóa học đã gây ra tình trạng thoái hóa đất trên diện rộng. Đất trồng không chỉ cạn kiệt về hàm lượng dinh dưỡng mà còn bị suy thoái về hệ vi sinh vật (VSV). Đồng thời, mầm bệnh có xu hướng tích lũy qua nhiều vụ canh tác, trở thành một thực trạng phổ biến trên phạm vi toàn cầu. Bên cạnh đó, hiện tượng biến đổi khí hậu đang diễn ra với tốc độ ngày càng nhanh hơn, phức tạp hơn. Kết quả là, cây trồng phải đối mặt với những mối đe dọa nghiêm trọng từ các điều kiện bất lợi, bao gồm cả yếu tố phi sinh học và sinh học.

Sản xuất nông nghiệp hiện nay có xu hướng gia tăng sự phụ thuộc vào các loại hóa chất nông nghiệp, bao gồm phân bón hóa học, thuốc diệt cỏ, thuốc diệt nấm và thuốc trừ sâu hóa học. Tuy nhiên, phương pháp canh tác này tiềm ẩn nhiều mối nguy hại đối với sức khỏe con người và môi trường. Hơn nữa, quá trình sản xuất hóa chất nông nghiệp ở quy mô công nghiệp đòi hỏi tiêu thụ một lượng đáng kể năng lượng và các nguồn tài nguyên không thể tái tạo. Trong bối cảnh đó, việc phát triển và ứng dụng các chế phẩm sinh học sử dụng VSV, đặc biệt là vi khuẩn nội sinh (VKNS), là một cách tiếp cận khả thi nhằm từng bước giảm thiểu sự phụ thuộc vào hóa chất trong sản xuất nông nghiệp. Các chế phẩm này có khả năng kích thích sinh trưởng thực vật, nâng cao hiệu quả hấp thu dinh dưỡng và/hoặc kiểm soát các tác nhân gây bệnh thực vật.

Các nghiên cứu về VKNS đã được khởi xướng từ đầu thế kỷ 20. Các nghiên cứu tiếp theo đã cung cấp bằng chứng chứng minh khả năng của VKNS trong việc cải thiện sinh trưởng thực vật và đối kháng các tác nhân gây bệnh. Trong những thập kỷ gần đây, nghiên cứu về VKNS chủ yếu tập trung vào việc làm rõ các tác

dụng có lợi của chúng cũng như mối tương tác phức tạp với cây chủ. Các chủng VKNS có tiềm năng thúc đẩy sinh trưởng thực vật, tăng cường sức khỏe của cây trồng và cải tạo đất canh tác đã thu hút sự quan tâm lớn cho ứng dụng trong sản xuất các chế phẩm sinh học phục vụ nông nghiệp hữu cơ. Song song với đó, sự tiến bộ vượt bậc của công nghệ giải trình tự gen thế hệ mới, kết hợp với các công cụ tin sinh hiện đại và kỹ thuật metagenomics, đã tạo điều kiện thuận lợi cho việc phân tích và làm rõ mức độ đa dạng cũng như vai trò cụ thể của hệ VKNS thực vật đối với cây chủ. Nhiều phát hiện mới về mối tương tác giữa thực vật và VKNS đã được công bố. Đáng chú ý, các bằng chứng khoa học gần đây cũng đã làm sáng tỏ về sự hình thành của hệ vi sinh vật gây bệnh (còn được gọi là pathobiome) ở thực vật.

Lúa là cây lương thực quan trọng của nước ta với diện tích canh tác hàng năm khoảng 8 triệu hecta. Bệnh bạc lá lúa do vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) gây tổn hại nặng đến năng suất lúa, hiện chưa có biện pháp phòng trừ nào được đánh giá là an toàn, hiệu quả và kinh tế. Phương pháp kiểm soát sinh học sử dụng các VSV có ích trong đó có VKNS hiện đang được quan tâm nghiên cứu do tính an toàn và thân thiện với môi trường. Đề tài ***"Nghiên cứu vi khuẩn nội sinh ở một số giống lúa và khả năng đối kháng Xanthomonas oryzae pv. oryzae gây bệnh bạc lá của các chủng tuyển chọn***" được thực hiện nhằm hiểu biết sâu hơn về hệ VKNS của một số giống lúa ở Việt Nam, đồng thời tìm kiếm các chủng VKNS có tiềm năng ứng dụng trong phòng trừ bệnh bạc lá lúa do vi khuẩn *Xoo* gây ra.

Mục tiêu của đề tài

1. Nghiên cứu hệ VKNS trên cây lúa ở Việt Nam bằng công cụ metagenomic và đánh giá vai trò của chúng đối với bệnh bạc lá.

2. Nghiên cứu ứng dụng VKNS lúa trong phòng trừ bệnh bạc lá do *Xoo* gây ra.

Ý nghĩa khoa học – thực tiễn của đề tài

- Nghiên cứu đã cung cấp thông tin về hệ VKNS ở hai giống lúa quan trọng là Bắc thơm 7 và IR4625, làm sáng tỏ mối liên hệ giữa hệ VKNS và bệnh bạc lá lúa.

- Nghiên cứu đã chứng minh VKNS có tiềm năng ứng dụng tốt trong kiểm soát sinh học phòng trừ bệnh bạc lá, hướng tới giảm thiểu thuốc bảo vệ thực vật và phân bón hóa học trong canh tác lúa hữu cơ.
- Kết quả nghiên cứu của đề tài là tài liệu tham khảo hữu ích cho những nghiên cứu khác về hệ VKNS thực vật và ứng dụng phát triển các chế phẩm sinh học phòng trừ bệnh hại ở cây trồng do VSV gây ra.

Tính mới của luận án

- Luận án là công trình đầu tiên tại Việt Nam thực hiện nghiên cứu so sánh metagenome của hệ VKNS ở hai giống lúa quan trọng, Bắc thơm 7 (mẫn cảm với bệnh bạc lá) và IR4625 (kháng bệnh bạc lá), trên cơ sở đó đánh giá mối liên quan giữa hệ VKNS và bệnh bạc lá lúa. Nghiên cứu đã chỉ ra sự có mặt của *Acholeplasma* spp. trong hệ VKNS ở giống lúa IR4625 có thể là tác nhân dẫn đến tính kháng bệnh bạc lá ở giống lúa này.
- Nghiên cứu đã chứng minh chủng VKNS lúa *Bacillus velezensis* VY03 ức chế *Xoo* bằng hai con đường (i) sinh hoạt chất kháng khuẩn tiết ra ngoài tế bào và (ii) cạnh tranh không gian sinh trưởng. Chủng VY03 thể hiện hiệu quả kiểm soát bệnh bạc lá tốt trong thí nghiệm ở điều kiện nhà lưới và điều kiện đồng ruộng, là tác nhân kiểm soát sinh học tiềm năng cho nền nông nghiệp hữu cơ.

CHƯƠNG I. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. HỆ VI SINH VẬT THỰC VẬT

1.1.1. Hệ vi sinh vật thực vật

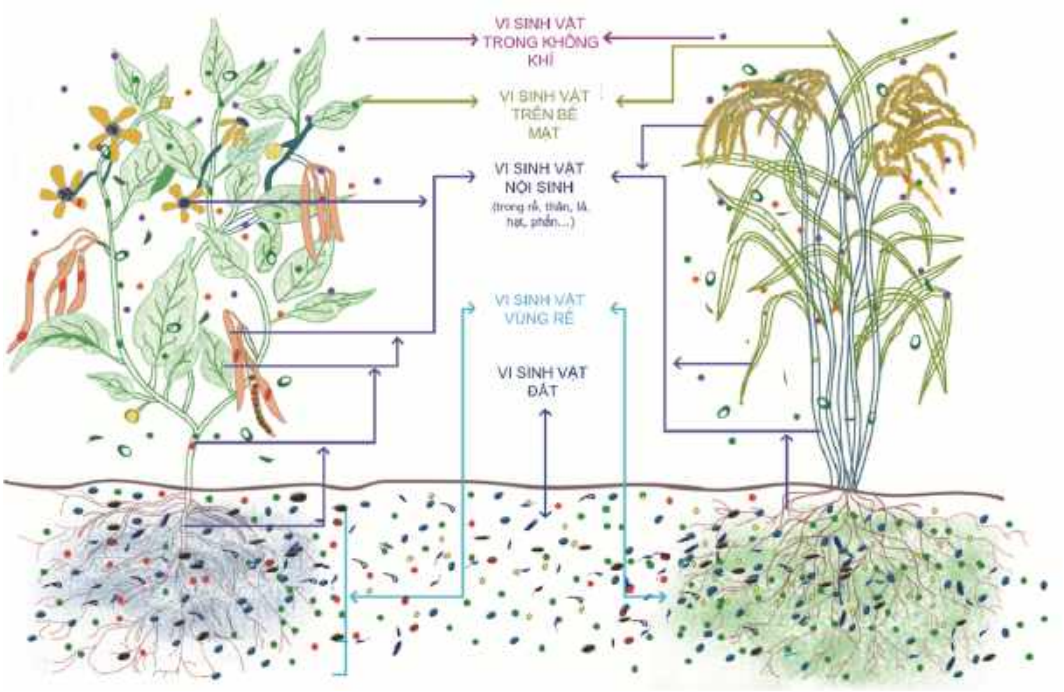
Hệ VSV thực vật (plant microbiome) bao gồm tất cả các VSV liên kết với thực vật và đóng vai trò quan trọng đối với sinh trưởng, phát triển và khả năng thích nghi với môi trường của thực vật (Hình 1.1) (Gopal & Gupta, 2016). Hệ VSV thực vật là một tập hợp năng động, đa dạng và bị ảnh hưởng bởi các yếu tố như loài thực vật, điều kiện môi trường và giai đoạn phát triển (Dastogeer et al., 2020; Zhang et al., 2023). Cấu trúc hệ VSV thực vật theo các ổ sinh thái (niche) bao gồm:

(i) Hệ VSV vùng rễ (trong đất quanh rễ-rhizosphere, hoặc bám trên bề mặt rễ-rhizoplane): là các VSV sinh trưởng trong khu vực xung quanh rễ cây, chịu ảnh hưởng mạnh mẽ của các chất tiết từ rễ. Các VSV vùng rễ chủ yếu là kết quả chọn lọc từ đất, do vậy cấu trúc hệ VSV đất là yếu tố quan trọng xác định cấu trúc hệ vi khuẩn vùng rễ, hơn là đặc điểm di truyền của loài thực vật (Vandenkoornhuyse et al., 2015). Các ngành vi khuẩn thường được tìm thấy trong vùng rễ bao gồm Proteobacteria, Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Verrucomicrobia, Planctomycetes, Chloroflexi, Firmicutes và Gemmatimonatedes (Compant et al., 2019). Các ngành nấm phổ biến bao gồm *Nectriaceae, Ulocladium, Alternaria, Mortierella, Microdochium, Ascomycota, Chytridiomycota, và Basidiomycota* (Olanrewaju, et al., 2024). Các VSV vùng rễ đóng vai trò quan trọng trong việc tăng cường khả năng hấp thụ nước và khoáng chất của cây (Trivedi et al., 2020).

(ii) Hệ VSV biểu sinh nằm trên bề mặt các cơ quan trên mặt đất (phylosphere): thành phần hệ VSV biểu sinh chủ yếu bị ảnh hưởng bởi các yếu tố môi trường. Ở bề mặt lá, hệ VSV thường bao gồm vi khuẩn và nấm (Compant et al., 2019). Diện tích bề mặt thực vật lớn gấp ~ 2 lần diện tích bề mặt trái đất, có nghĩa là số VSV biểu sinh rất lớn. Tuy nhiên môi trường biểu sinh có tính khắc nghiệt cao, như nhiệt độ, tia cự tím, cạnh tranh về không gian sinh trưởng giữa các nhóm VSV… VSV biểu sinh thích nghi bằng cách hình thành tập hợp tế bào, tạo

biofilm, sản sinh chất hoạt động bề mặt sinh học, sử dụng hiệu quả cơ chất từ thực vật (Vorholt et al., 2012).

(iii) Hệ VSV nội sinh sống bên trong các mô thực vật bao gồm rễ, thân, lá, hoa và hạt (endosphere): Hệ VSV nội sinh rễ đa dạng và chủ yếu có nguồn gốc từ đất, một số trường hợp xâm nhập qua thân/lá hay có sẵn trong hạt từ cây mẹ. VSV nội sinh xâm nhập vào mô rễ thông qua các quá trình thụ động và chủ động sau đó di chuyển lên các bộ phận khác của cây. Hệ VSV nội sinh chịu ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố sinh học và phi sinh học. Gần đây, vi khuẩn liên kết với hạt cũng được nghiên cứu và chủ yếu bao gồm Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes và Firmicutes. Hệ VSV hạt có liên quan đến hệ VSV đất cũng như hoa và quả (Compant et al., 2019).



Hình 1. 1. Hệ vi sinh vật của thực vật (Gopal & Gupta, 2016)

Thực vật thu hút các VSV nội sinh một cách có chọn lọc để thúc đẩy sự sinh trưởng và thích nghi của mình với các tác nhân môi trường bất lợi, ví dụ nhờ các hợp chất tiết ra từ rễ để tuyển chọn các VSV có lợi trong đất (Liu et al., 2021). Sản phẩm quang hợp của thực vật là nguồn carbon dồi dào nuôi dưỡng hệ VSV, gồm các nhóm có lợi như vi khuẩn cộng sinh, nấm rễ, VSV nội sinh hoặc vi khuẩn hội sinh và cả VSV gây bệnh thực vật (Compant et al., 2019). Mặt khác, VSV cũng có

thể giải phóng các hợp chất điều chỉnh quá trình tiết dịch của thực vật (Pereira et al., 2023). Tương tác thực vật - VSV đóng vai trò quan trọng đối với việc hình thành hệ VSV cũng như ảnh hưởng đến biểu hiện gen thực vật và các chức năng sống quan trọng của thực vật.

Hệ VSV thực vật mang lại nhiều lợi ích cho thực vật bao gồm thúc đẩy sinh trưởng và tăng khả năng chống chịu các yếu tố bất lợi, do đó, quyết định tình trạng sức khỏe của thực vật (Compant et al., 2024). Các VSV giúp kích thích sinh trưởng thực vật nhờ sinh hormone thực vật và tăng cường hấp thu dinh dưỡng nhờ khả năng cố định đạm, hoà tan phosphate…. VSV có thể cải thiện cấu trúc hệ thống rễ của cây chủ, do đó tăng khả năng hấp thụ nước và khoáng chất của rễ (Trivedi et al., 2020). VSV liên kết với thực vật cũng được chứng minh có thể cải thiện khả năng chống chịu của cây đối với các bất lợi phi sinh học như hạn hán, ngập lụt, mặn, nhiệt độ cực đoan và ô nhiễm kim loại/hữu cơ (Compant et al., 2019). Một số VSV có thể làm thay đổi đáng kể đặc tính và kiểu hình của cây chủ (Trivedi et al., 2022).

Hệ VSV thực vật có vai trò kép trong bệnh lý thực vật, một số loài có thể gây bệnh, một số loài khác lại có khả năng bảo vệ cây chủ trước sự tấn công của các mầm bệnh. Nhiều VSV có lợi trong vùng rễ đã được chứng minh giúp tăng cường khả năng phòng vệ của cây thông qua kích kháng hệ thống (induced system resistance, ISR) (Schlaeppi & Bulgarelli, 2015). Các tác nhân kiểm soát sinh học như *Pseudomonas fluorescens* và *Bacillus amyloliquefaciens* được chứng minh có thể kích hoạt các phản ứng phòng vệ của cây. Các VSV có lợi cũng có thể cạnh tranh trực tiếp với mầm bệnh về nguồn dinh dưỡng và không gian sinh trưởng, hoặc sản sinh chất kháng khuẩn để ức chế mầm bệnh (Trivedi et al., 2020). Hệ VSV đất còn có khả năng kiểm soát các mầm bệnh trong đất theo cơ chế ức chế tổng quát và/hoặc ức chế đặc hiệu (Li et al., 2021). Thực vật cũng có thể lựa chọn tiếp nhận các VSV có lợi từ vùng rễ để chống lại sự tấn công của mầm bệnh, ngay cả khi mầm bệnh tấn công các bộ phận trên mặt đất (Li et al., 2021).

Như vậy, hệ VSV thực vật không chỉ mang lại lợi ích mà còn chứa đựng các VSV có khả năng gây hại. Việc khám phá sâu hơn về mặt bệnh học của mối quan hệ phức tạp này đã dẫn đến sự hình thành khái niệm "Hệ VSV gây bệnh thực vật"

hay "Pathobiome", một bước chuyển dịch quan trọng từ quan điểm truyền thống "một mầm bệnh – một bệnh" sang một cách tiếp cận toàn diện hơn về sức khỏe thực vật.

1.1.2. Hệ vi sinh vật gây bệnh thực vật

Các VSV gây bệnh thực vật là mối đe dọa đối với sản xuất nông nghiệp, gây ra tổn thất khoảng 16% sản lượng cây trồng toàn cầu (Dastogeer et al., 2022). Xuất phát từ quan niệm "1 vi sinh vật - 1 bệnh", trước đây các nghiên cứu hầu như chỉ tập trung vào tương tác giữa thực vật và tác nhân gây bệnh mà ít chú ý đến các VSV khác cùng có mặt tại các vị trí nhiễm bệnh (Bez et al., 2021). Gần đây, mối quan hệ ba bên thực vật - tác nhân gây bệnh - các VSV khác đã thay đổi cách nhìn nhận của các nhà khoa học về bệnh ở thực vật như là kết quả của mối quan hệ này trong các điều kiện khác nhau (Trivedi et al., 2022). Sự tương tác giữa tác nhân gây bệnh và các VSV khác của hệ VSV có thể ảnh hưởng tích cực hoặc tiêu cực đến độc lực của tác nhân gây bệnh, quyết định mức độ biểu hiện bệnh. Một số tác nhân gây bệnh khi xâm nhập vào thực vật sẽ gây ra thay đổi về thành phần và sự phong phú của hệ VSV thực vật. Dastogeer và cs. (2022) đã báo cáo nấm *Magnaporthe oryzae* gây bệnh đạo ôn khi nhiễm vào cây lúa làm thay đổi cấu trúc hệ VSV của mô lá và hạt tại vị trí nhiễm với sự gia tăng của vi khuẩn *Rhizobium* và sự suy giảm của một số nấm *Tylospora, Clohesyomyces* và *Penicillium*. Rễ cây lúa nhiễm nấm *M. oryzae* chỉ chứa 17% VNKS có nguồn gốc từ đất, trong khi ở rễ cây lúa khỏe mạnh tỷ lệ này là 71%. Một số tác nhân gây bệnh thực vật có thể liên kết với các tác nhân gây bệnh khác hoặc các vi khuẩn cộng sinh ở thực vật, dẫn đến tương tác đa loài phức tạp, làm tăng mức độ nghiêm trọng của bệnh (Bez et al., 2021).

Việc phát hiện ra các bệnh thực vật liên quan đến nhiều hơn một tác nhân gây bệnh đã dẫn đến hình thành thuật ngữ "hệ VSV gây bệnh thực vật" hay "pathobiome", tức là tác nhân gây bệnh tích hợp với môi trường sinh học của vật chủ. Hệ VSV gây bệnh thực vật là một phần của hệ VSV thực vật, tập hợp các VSV gây bệnh, bao gồm các sinh vật nhân chuẩn, VSV và virus. Những VSV này được phân biệt với các thành phần khác của hệ VSV thực vật dựa trên khả năng gây hại cho mô thực vật thông qua sự phát triển tạm thời dưới những điều kiện cụ thể. Hệ

VSV gây bệnh thực vật còn bao gồm các tương tác đa loài quyết định tình trạng sức khỏe của cây (Nemchinov et al., 2023).

Sự hiểu biết sâu sắc về các tương tác phức tạp này trong hệ VSV gây bệnh thực vật là điều cần thiết để phát triển các giải pháp quản lý bệnh hiệu quả và bền vững hơn. Tuy nhiên, không phải tất cả VSV sống bên trong cây đều gây hại. Nhiều loài trong số đó là VSV nội sinh, mang lại lợi ích đáng kể cho cây chủ mà không gây ra bất kỳ triệu chứng bệnh nào.

1.1.3. Hệ vi sinh vật nội sinh thực vật

Định nghĩa đầu tiên về VSV nội sinh (endophyte) được De Bary (1866) đề xuất là "bất kỳ sinh vật nào phát triển bên trong mô thực vật", phân biệt với loài biểu sinh sống trên bề mặt của thực vật. Năm 1904, Darnelin đã khởi xướng nghiên cứu đầu tiên về VSV nội sinh của loài cỏ dại *Agrostemma githago* L.. Kể từ năm 1940, đã có rất nhiều báo cáo về VSV nội sinh cư trú trong mô của nhiều loại thực vật khác nhau bao gồm hạt, noãn, củ, rễ, thân lá và quả (Kumar et al., 2020). Cho đến nay đã có nhiều định nghĩa về VSV nội sinh được đưa ra. Năm 1991, Petrini đã mở rộng thêm định nghĩa của Carroll (1986) là “tất cả các sinh vật xâm chiếm bên trong mô thực vật trong một phần vòng đời của chúng và không gây ra các triệu chứng bệnh nhiễm trùng cho cây chủ, bao gồm cả các mầm bệnh tiềm ẩn, được gọi là VSV nội sinh”. Hiện nay định nghĩa của Petrini thường được sử dụng trong hầu hết các nghiên cứu về VSV nội sinh (Xia et al., 2022).

VSV nội sinh vật bao gồm nấm nội sinh, VKNS và xạ khuẩn nội sinh (Dubey et al., 2020). Các thành viên chính của nấm nội sinh bao gồm Ascomycota, Zygomycota và Basidiomycota. VKNS rất đa dạng từ vi khuẩn Gram dương đến Gram âm và là thành phần chính của hệ VSV thực vật, với các ngành chủ yếu là Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria, Firmicutes Acidobacteria và Chloroflexi (Michl et al., 2023). Xạ khuẩn nội sinh thường được phân lập từ nhiều loại thực vật, đặc biệt là từ cây ngập mặn và cây thuốc trong rừng mưa nhiệt đới. Nhìn chung, số lượng và loài VKNS trong rễ cây nhiều hơn so với các bộ phận khác của cây, phần lớn VKNS còn chưa được khám phá và xác định (Xia et al., 2022).

Trong số các thành phần đa dạng của hệ VSV nội sinh, VKNS là một nhóm đặc biệt được quan tâm do đóng vai trò nổi bật trong việc thúc đẩy sinh trưởng thực vật và bảo vệ cây khỏi các yếu tố gây hại.

1.2. VI KHUẨN NỘI SINH THỰC VẬT

Nhiều loài VKNS đã được chứng minh có ảnh hưởng tích cực lên cây chủ nhờ sản sinh ra các chất kích thích sinh trưởng thực vật, giúp cây trồng tăng khả năng hấp thu dinh dưỡng. Một số VKNS có thể sinh các hoạt chất kháng các tác nhân gây bệnh và hỗ trợ hệ miễn dịch của cây chủ (Watts et al., 2023). Gần đây, một số nghiên cứu đã chứng minh hiệu quả của VKNS trong việc tăng cường khả năng chống chịu của thực vật đối với các điều kiện môi trường bất lợi như hạn hán, lạnh giá và nhiễm mặn (Cui et al., 2024). Do đó, VKNS ngày càng được quan tâm nghiên cứu và ứng dụng trong thực hành nông nghiệp, đặc biệt khi biến đổi khí hậu trên toàn cầu ngày càng phức tạp.

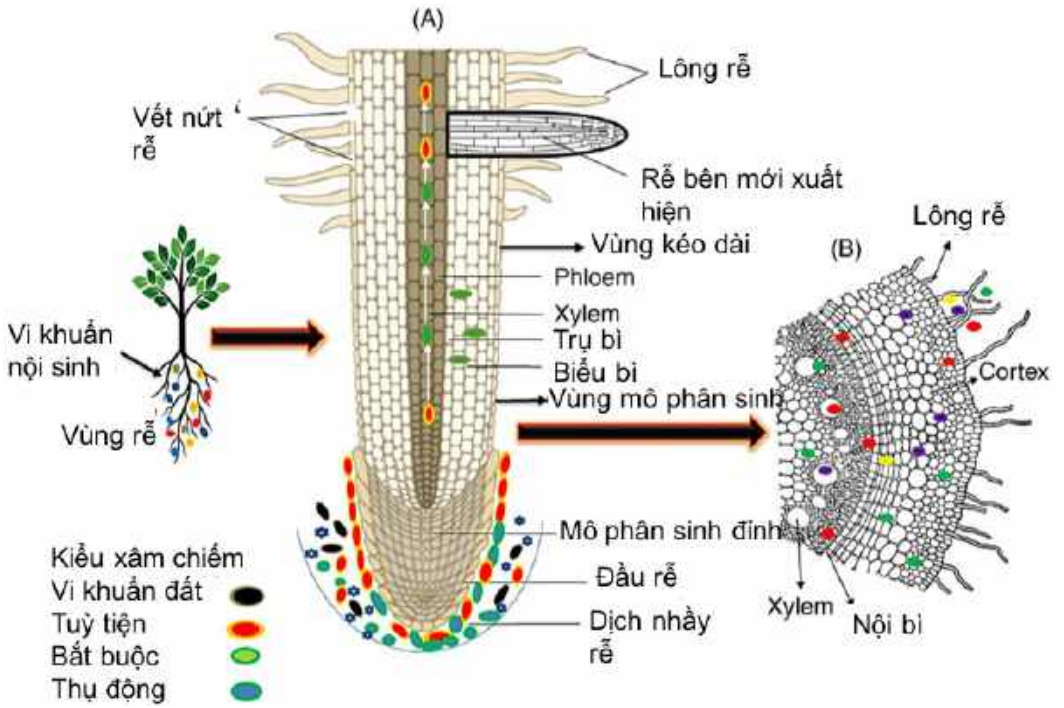
1.2.1. Nguồn gốc và sự phân bố của vi khuẩn nội sinh thực vật

Vi khuẩn nội sinh thực vật được cho là có nguồn gốc chủ yếu từ đất, sau đó di chuyển lên thân và lá thông qua hợp bào trong các mạch gỗ (Kumar et al., 2020a). Các VKNS trong lá/chồi cây được chứng minh có sự trùng lặp đáng kể với VKNS trong rễ ở cả cấp độ phân loại và chức năng (Liu et al., 2017). Ngoài nguồn gốc từ đất, VKNS có thể là các loài biểu sinh trên bề mặt các cơ quan trên mặt đất (phyllosphere) của thực vật hoặc từ hạt.

Ở thực vật, các rễ bên nhô ra xuyên qua lớp biểu bì, vỏ, lớp nội bì, dải casparian (dải xung quanh lớp nội bì) và trụ bì, do đó tạo thành một con đường cho vi khuẩn xâm nhập một cách tự nhiên từ các vị trí này (Compant et al., 2019). Vi khuẩn cũng có thể xâm nhập ở đầu rễ, lông rễ và các vết nứt rễ. Từ các vị trí đó, vi khuẩn có thể tiếp tục xâm nhập vào các mạch phloem và xylem (Hình 1.2). Vi khuẩn cư trú bên trong các mô dẫn của rễ có thể tiếp tục di chuyển đến chồi và lá do sự thoát hơi nước của cây. Ngoài ra, VKNS cũng có thể xâm nhập vào cây thông qua các vết thương như đứt rễ, rách lá do động vật ăn cỏ, côn trùng hoặc tổn thương cơ học khác (Compant et al., 2019).

Bên trong thân cây, một số loài VKNS xâm chiếm hầu hết các khoảng gian bào, các khoảng nội bào, hệ thống mạch, trong lớp nhu mô cũng như bên trong lớp biểu bì. Ở lá, vi khuẩn có thể cư trú trong các tế bào biểu bì trên lá, các tế bào thịt lá, các mạch xylem cũng như khoảng trống giữa các tế bào mô thịt lá xốp (spongy mesophyll cell) (Compant et al., 2021).

Ở hoa, nhiều loại vi khuẩn khác nhau được phát hiện xâm chiếm ở lớp biểu bì, mạch gỗ, bầu nhụy, noãn và đầu nhụy cũng như các bộ phận khác như: cánh hoa, đài hoa, bao phấn cùng với các sợi và phấn hoa. Trong quả, vi khuẩn cũng được chứng minh là xâm chiếm vỏ quả ngoài, vỏ quả giữa và vỏ quả trong. Các mô hạt chứa vi khuẩn sinh sống là các phần vỏ bên ngoài và bên trong của hạt, trục rễ dưới lá mầm của phôi, lá mầm và nội nhũ (Glassner et al., 2018).



Hình 1.2. Sơ đồ biểu diễn sự xâm nhập và phân bố của VKNS trong nội quyển của rễ cây. (A) Sự xâm nhập của vi khuẩn vào cây qua một số vị trí trên rễ. (B) Sự xuất hiện của các vi sinh vật nội sinh tại vị trí xâm nhập hoặc bên trong mô rễ (Kumar et al., 2020a).

Ở VKNS, khả năng chuyển động, hoá hướng động, sản sinh các enzyme phân hủy thành tế bào thực vật và sinh lipopolysaccharide ngoại bào là một số đặc điểm quan trọng giúp vi khuẩn lây nhiễm và thích nghi với cuộc sống bên trong thực vật (Piromyou et al., 2015). Ngoài ra, VKNS có thể điều chỉnh sự biểu hiện gen khi lây

nhiễm và xâm chiếm thực vật. Coutinho và cs. (2015) đã quan sát thấy biểu hiện của các gen mã hóa các protein liên quan đến vận động, hóa hướng động và bám dính của vi khuẩn *Burkholderia kururiensis* M130 khi có mặt dịch chiết xuất từ cây lúa trong môi trường nuôi cấy. Lông roi có thể làm tăng khả năng nội sinh của vi khuẩn bằng cách giúp vi khuẩn di chuyển hướng hóa và neo vào bề mặt thực vật (Buschart et al., 2012). Các gen mã hóa pili loại IV (Type IV Pili) trên bề mặt tế bào được phát hiện trong hệ gen của chủng VKNS *Burkholderia phytofirmans* PsJN (Mitter et al., 2013).

Các enzyme phân hủy thành tế bào rất quan trọng đối với VKNS thực vật để sinh trưởng nội sinh (Kumar et al., 2020a). Các gen mã hóa cellulase, xylanase, cellobiohydrolase, endoglucanase và protein liên kết với cellulose thực vật được phát hiện với số lượng lớn copy trong hệ gen của quần thể VKNS ở rễ lúa (Sessitsch et al., 2012). Để có thể xâm nhập vào bên trong tế bào và di chuyển trong hợp bào, VKNS còn tiết ra enzyme pectinase phá vỡ tấm gian bào ngăn giữa các tế bào thực vật. Pectinase được chứng minh là một yếu tố quan trọng quyết định sự lây nhiễm ban đầu của VKNS *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 trên cây lúa, trong đó biểu hiện gen mã hoá cho pectin esterase được điều hòa tăng lên sau khi xâm nhập vào cây lúa (Piromyou et al., 2015).

Siderophore, các chất chuyển hóa có hoạt tính sinh học và hệ thống bài tiết ở VKNS có thể đóng vai trò nhất định đối với sự xâm chiếm nội sinh. Mosquito và cs. (2020) báo cáo thể đột biến của chủng VKNS *Kosakonia* sp. thiếu hệ thống bài tiết loại 6 (type 6 secretion system, T6SS) và bị giảm khả năng xâm chiếm vùng rễ.

1.2.2. Tính đa dạng của hệ vi khuẩn nội sinh thực vật

Mọi loài thực vật phát triển trong môi trường tự nhiên đều có hệ VKNS. Nghiên cứu về sự đa dạng của hệ VKNS đã được thực hiện thông qua phân lập truyền thống, và trong những năm gần đây được hỗ trợ mạnh mẽ bằng công cụ "omics". Hiện nay, hơn 200 chi thuộc 16 ngành VKNS đã được báo cáo ở nhiều loài thực vật khác nhau, bao gồm các loài có thể nuôi cấy được và không thể nuôi cấy được. Chiếm ưu thế nhất là các ngành Proteobacteria, Actinobacteria,

Firmicutes và Bacteroidetes với các chi vi khuẩn phổ biến như *Pseudomonas, Bacillus, Burkholderia, Enterobacter* và *Serratia* (Kumar et al., 2020b).

Theo hướng tiếp cận nuôi cấy truyền thống, VKNS được xác định có mặt với mật độ khác nhau trong các bộ phận của thực vật, trong đó rễ có mật độ cao nhất là 10^4 - 10^8 CFU/g rễ và cũng đa dạng nhất, tiếp theo là lá và thân 10^3 - 10^4 CFU/g, hoa, quả và hạt 10^2 - 10^3 CFU/g (Bulgarelli et al., 2013). Mật độ VKNS trong hạt lúa dao động từ 10^3 - 10^6 CFU/g trọng lượng tươi (Walitang et al., 2019). Mật độ VKNS trong cây lúa canh tác ở vùng đất khô là 10^4 – 10^6 CFU/g và vùng ngập nước là 10^3 – 10^7 CFU/g mô thực vật. Các mô rễ có số lượng VKNS cao nhất 10^6 – 10^7 CFU/g ở cả 3 giai đoạn phát triển (đẻ nhánh, làm đòng, trổ bông), trong đó các chi vi khuẩn chiếm ưu thế là *Pantoea, Bacillus, Microbacterium, Curtobacterium* và *Pseudomonas* (Bertani et al., 2016).

Tính đa dạng của hệ VKNS thực vật đã được nghiên cứu một cách chi tiết hơn nhờ sử dụng kỹ thuật metagenomics (Bảng 1.1). Metagenomics là sự phân tích DNA đa hệ gen (DNA metagenome) của tất cả các VSV thu nhận trực tiếp từ mẫu môi trường tự nhiên không thông qua nuôi cấy. Trong phương pháp này, đoạn gen chỉ thị (marker gene) 16S rDNA chứa 1 - 2 vùng biến đổi của toàn bộ hệ VSV trong mẫu thực vật sẽ được khuếch đại và giải trình tự. Trình tự thu được sẽ được xử lý bằng các công cụ tin sinh hiện đại và sử dụng các cơ sở dữ liệu thống kê đã được phát triển để đánh giá thành phần và chức năng của hệ VSV có trong mẫu (Oulas et al., 2015). Các nghiên cứu sử dụng kỹ thuật này đã xác định ngành Proteobacteria chiếm ưu thế lớn nhất trong quần thể VKNS lúa (10 - 70%), thậm chí có thể chiếm tới 99%, tiếp theo là Bacteroidetes, Firmicutes hoặc Actinobacteria (Kunda et al., 2018; Kumar et al., 2021). Ở cây ngô, ngành Proteobacteria chiếm ưu thế nhất (39,30 - 79,12%) trong đó lớp Gammaproteobacteria chiếm tỷ lệ cao nhất (14,94 - 46,28%). Tiếp theo là các ngành Actinobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes và Spirochaetes (Correa-Galeote et al., 2018). Trong mô rễ chuối, Proteobacteria (72,64%), Actinobacteria (16,64%), Bacterioidetes (10,67%), Firmicutes (1,97%) và Acidobacteriota (0,08%) được xác định là các ngành chiếm ưu thế (Tran & Nguyen, 2024).

Bảng 1.1. Tính đa dạng của hệ vi khuẩn nội sinh ở cây lúa

Giống lúa	Bộ phận	Nhóm chiếm ưu thế		TLTK
		Ngành/lớp	Họ/Chi	
RVT (Việt Nam)	Rễ	Proteobacteria (89,39%) Spirochaetota (4,75%) Firmicutes (2,23%)	Comamonadaceae (31,48%) Burkholderiaceae (16,34%) Oxalobacteraceae (10,7%) Rhodocyclaceae (6,29%) Micropepsaceae (5,38%) Xanthobacteraceae (5,02%) Spirochaetaceae (4,68%) Alcaligenaceae (3,22%)	Tran & Nguyen, 2023
Kalonunia và Dehradun Basmati (Indonesia)	Rễ, ngọn và mô sẹo	Proteobacteria (49,37%) Actinobacteria (28,66%) Firmicutes (4,11%) Bacteroidetes (0,94%) Ngành chiếm tỷ lệ nhỏ và không xác định (14,06%)	**Rễ:** *Sphingomonas* (9,23%) *Caulobacter* (7,69%) *Methylobacterium* (3,07%) *Microbacterium* (3,07%) **Ngọn:** *Sphingobium* (3,75%), *Sphingomonas* (8,33%), *Corynebacterium* (6,25%) **Mô sẹo:** *Vibrio* (28,75%) *Sphingomonas* (12,11%) *Methylobacterium* (5,71%) *Pseudomonas* (5,54%) *Corynebacterium 1* (14,94%) *Micrococcus* (2,81%) *Brevundimonas* (2,73%)	Krishna-moorthy et al., 2021
Pionero FL 2010 và DANAC SD20A (Venezuela)	Rễ	Proteobacteria (76,67%), Bacteroidetes (20%) Verrucomicrobia (3,33%)	*Cellvibrio*, *Opitutus*, *Agrobacterium*, *Pedobacter*, *Devosia*, *Shewanella*.	Moronta-Barrios et al., 2018
Nipponbare và Kasalath (Nhật Bản)	Chồi	α-proteobacteria (51,1-52,4%); Actinobacteria (11,3- 14,5%); γ-proteobacteria (8,6–9,7%) β-proteobacteria (4,5-10,1%)		Okubo et al., 2014

1.2.3. Các yếu tố ảnh hưởng đến hệ vi khuẩn nội sinh thực vật

Cấu trúc của hệ VKNS phụ thuộc vào hệ sinh thái của thực vật và đất, tương tác bên trong mô cây chủ và các yếu tố môi trường ngoại sinh, bao gồm loài thực vật, kiểu gen, loại cơ quan thực vật, giai đoạn phát triển, mùa vụ, vị trí địa lý, loại

đất, tình trạng dinh dưỡng của cây chủ, phương thức canh tác và phân bón (Liu et al., 2017).

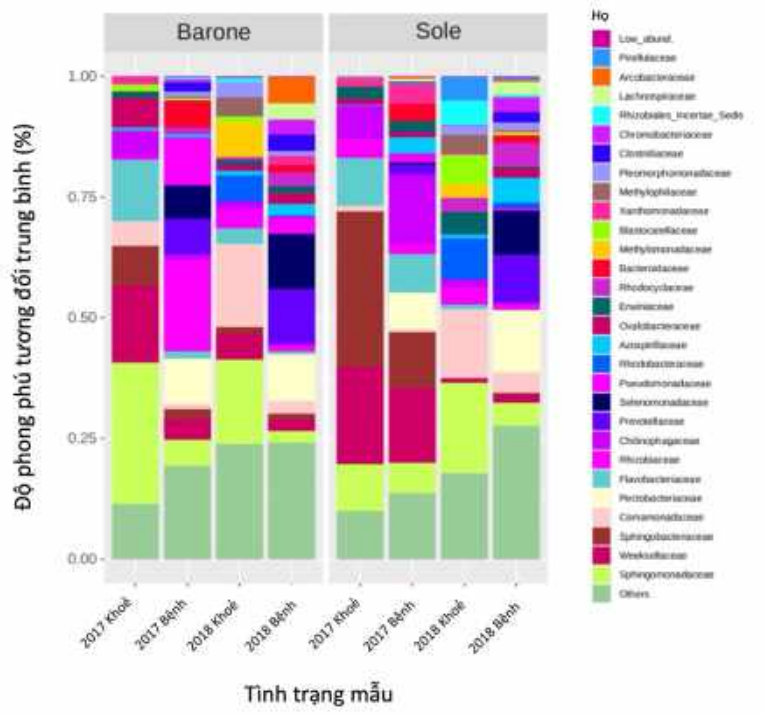
Đất là nguồn cung cấp VSV phong phú cho rễ, các đặc tính của đất có thể ảnh hưởng đến sinh lý thực vật và sự tiết dịch của rễ, qua đó ảnh hưởng lớn đến cấu trúc của hệ VKNS ở rễ. Hệ VKNS trong các cơ quan trên mặt đất như thân, quả hoặc hạt cũng được chứng minh là bị ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố, trong đó có môi trường đất (Rodríguez et al., 2020). Đối với cây thân gỗ thì nội mô thân có hệ VKNS phong phú nhất, trong khi cây thân thảo có hệ VKNS giàu nhất ở rễ (Harrison & Griffin, 2020). Bên trong lá, các tập hợp VKNS khác nhau đã được tìm thấy tùy thuộc vào các yếu tố bên ngoài như khí hậu và vi khí hậu, cũng như các loài thực vật và kiểu gen (Mina et al., 2020). Kumar và cs. (2021) đã phân tích hệ VKNS lá của các giống lúa thơm và lúa thường được trồng ở vùng núi và cao nguyên của Ấn Độ và chỉ ra rằng vị trí địa lý có ảnh hưởng lớn hơn so với kiểu gen đối với việc hình thành hệ VKNS. Trong nghiên cứu khác, de Almeida Lopes và cs. (2016) đã cho thấy các giống đậu tương biến đổi gen (kháng glyphosate) có hệ VKNS có thể nuôi cấy đa dạng hơn so với các giống cây dại.

Các yếu tố sinh học hoặc phi sinh học, ví dụ như hàm lượng CO_2 và O_2 trong không khí, mực nước hay nhiệt độ, cũng có thể dẫn đến sự thay đổi tính đa dạng của hệ VKNS (Compant et al., 2021). Ren và cs. (2015) đã báo cáo cấu trúc của hệ VKNS lá lúa ở giai đoạn đẻ nhánh và làm đòng bị ảnh hưởng bởi nồng độ CO_2 tăng cao, nhưng ở giai đoạn hạt chín không bị ảnh hưởng. Mức ảnh hưởng này còn phụ thuộc vị trí lá khác nhau trên cây (lá trên hoặc lá dưới) và tương quan với mức độ bón đạm. Nồng độ oxy cũng tác động lên các hệ VKNS lúa, đặc biệt là nhóm vi khuẩn cố định đạm. Tương quan với mức nước trong ruộng lúa, Gammaproteobacteria chiếm ưu thế khi nước cạn và Betaproteobacteria chiếm ưu thế khi nước ngập (Ferrando & Scavino, 2015). Như vậy, có sự tái cấu trúc hệ VKNS thực vật khi các yếu tố môi trường thay đổi.

Sự đa dạng của hệ VKNS có thể liên quan đến khả năng phòng vệ của thực vật. Upreti và Thomas (2015) quan sát thấy giống cà chua Arka Abha kháng bệnh héo xanh có hệ VKNS đa dạng hơn so với giống Arka Vikas nhạy cảm. Các chủng

VKNS được phân lập từ giống kháng héo có khả năng sinh nhiều chất kháng khuẩn hơn, như siderophores và hydro cyanua (HCN), so với các chủng phân lập từ giống nhạy cảm. Sự xâm chiếm của VKNS đã kích hoạt các con đường truyền tín hiệu phòng vệ ở cây chủ và từ đó có thể làm thay đổi cấu trúc hệ VSV theo hướng tương tác có lợi cho cây trồng. Chen và cs. (2020a) đã nghiên cứu xác định con đường truyền tín hiệu hormone kiểm soát sự xâm nhập của chủng VKNS *Azoarcus olearius* BH72 và vi khuẩn gây bệnh bạc lá *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* PXO99 (*Xoo*) trên cây lúa. Kết quả cho thấy, VKNS *A. olearius* đã kích hoạt con đường truyền tín hiệu jasmonate có lợi cho cây chủ, ngược lại, *Xoo* kích hoạt con đường salicylic acid. Như vậy, thực vật tăng cường truyền tín hiệu hormone để hạn chế sự xâm nhập của vi khuẩn vào trong các mô, và đây có thể là một chiến lược để kiểm soát sự đa dạng và duy trì mật độ vi khuẩn trong các mô ở mức có lợi nhất cho cây trồng.

Trạng thái sức khỏe của cây chủ cũng ảnh hưởng đến đặc tính và chức năng của hệ VKNS thực vật. Tian và cs. (2015) đã báo cáo tuyến trùng gây bệnh sưng rễ cà chua đã có ảnh hưởng đáng kể tới hệ VKNS rễ. Các gen liên quan đến phân hủy polysaccharide thực vật, chuyển hóa carbohydrate/protein và cố định N_2 đã tăng lên rất nhiều do VKNS rễ tăng sinh và chuyển sang hoại sinh sau khi cây bị nhiễm tuyến trùng sưng rễ. Kõiv và cs. (2015) cũng chứng minh rằng các bệnh thực vật có thể ảnh hưởng đến thành phần của hệ VKNS. Trong củ khoai tây (*Solanum tuberosum*) bị nhiễm bệnh thối nhũn (do *Pectobacterium atrosepticum*) có quần xã *Clostridia* phân giải kỵ khí đặc biệt phong phú và sự cạn kiệt oxy có thể là nguyên nhân của sự thay đổi này. Bez và cs. (2021) đã báo cáo về sự hình thành hệ vi sinh vật gây bệnh (pathobiome) liên quan đến tình trạng bệnh thối thân do *Dickey zeae* ở cây lúa (Hình 1.3). Các chi *Prevotella, Propionispira, Clostridium sensu stricto 1* và *Azospirillum* được phát hiện có tương tác tích cực với sự có mặt của *Dickeya* spp. và tình trạng bệnh. Ngoài ra, các thí nghiệm đồng nuôi cấy *in vitro* và *in planta* giữa chủng *Burkholderia* phân lập từ mẫu lúa bệnh và *D. zeae* cho thấy mật độ chủng *Burkholderia* trong nội mô lúa cao hơn khi có mặt *D. zeae.*



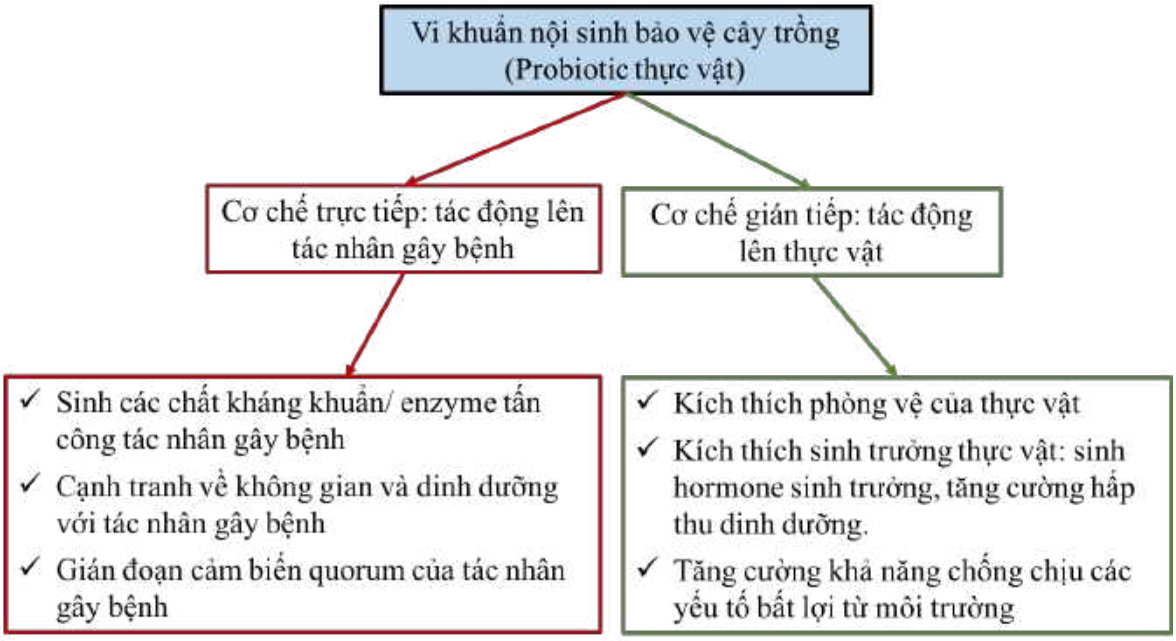
Hình 1.3. Sự thay đổi về thành phần và độ phong phú (relative abundance, %) của các họ vi khuẩn nội sinh ở cây khỏe và cây bị nhiễm bệnh thối thân do *Dickeya zeae* của hai giống lúa Barone và Sole (Bez et al., 2021)

Nhìn chung, việc hình thành hệ VKNS thực vật không chỉ là kết quả của tương tác thực vật - vi khuẩn, mà còn là kết quả của các tương tác phức tạp khác giữa các nhóm VSV khác nhau như cạnh tranh và hợp tác, cũng như tương tác của thực vật với các yếu tố môi trường.

1.3. VAI TRÒ CỦA VI KHUẨN NỘI SINH TRONG BẢO VỆ CÂY TRỒNG TRƯỚC SỰ TẤN CÔNG CỦA MẦM BỆNH VÀ CÁC YẾU TỐ BẤT LỢI

Vi khuẩn nội sinh có khả năng xâm chiếm cây chủ tương tự như mầm bệnh thực vật và sinh sống ổn định, lâu dài bên trong mô thực vật mà không ảnh hưởng đến cây chủ, do đó có tiềm năng ứng dụng to lớn trong kiểm soát sinh học các bệnh ở cây trồng thông các qua cơ chế trực tiếp và gián tiếp (Watts et al., 2023) (Hình 1.4). VKNS ức chế trực tiếp các mầm bệnh chủ yếu nhờ tổng hợp các hoạt chất kháng khuẩn như kháng sinh, hydro cyanua (HCN), siderophore (Fadiji & Babalola, 2020). Theo cơ chế gián tiếp, các VKNS kích thích hệ thống miễn dịch của cây hay tăng cường sức khoẻ của cây nhờ sinh các chất điều hoà sinh trưởng và thúc đẩy hấp thu chất dinh dưỡng từ môi trường (Dubey et al., 2020). Ngoài ra, VKNS còn

giúp cây trồng chống chịu với các điều kiện bất lợi phi sinh học do sự biến đổi khí hậu (Cui et al., 2024).



Hình 1.4. Các cơ chế bảo vệ thực vật của vi khuẩn nội sinh (Watts et al., 2023)

1.3.1. Cơ chế trực tiếp bảo vệ cây trồng kháng bệnh thực vật

1.3.1.1. Sinh các hoạt chất đối kháng mầm bệnh

Nhiều chủng VKNS có khả năng đối kháng các tác nhân gây bệnh thực vật gồm nấm, vi khuẩn, virus, tuyến trùng… VKNS đối kháng tác nhân gây bệnh nhờ khả năng tổng hợp các chất kháng sinh (antibiotic), các hợp chất hữu cơ bay hơi (volatile organic compound - VOC) bao gồm ketone, rượu, ester, terpene, aldehyde, các hợp chất lưu huỳnh, lactone (Fadiji & Babalola, 2020) (Bảng 1.2).

Chủng VKNS *Pseudomonas poae* RE*1-1-14 phân lập từ rễ củ cải đường sinh lipopeptide poaeamide có khả năng ức chế nấm bệnh *Rhizoctonia solani* (Zachow et al., 2015). Vi khuẩn nội sinh phổ biến nhất được sử dụng để kiểm soát mầm bệnh thực vật là *Bacillus* spp. do có khả năng sinh các lipopeptide có tác dụng thủy phân sợi nấm (Fazle-Rabbee & Baek, 2020). Haldar và Sengupta (2023) đã báo cáo các chủng VKNS *Pseudomonas fluorescens* và *Pseudomonas aeruginosa* sản sinh các hoạt chất 2,4-diacetylphloroglucinol, penazine-1-carboxylic acid, pyoleutirin, pyrrolnitrin hoặc hydrogen cyanide với hoạt tính kháng nấm cao. Chủng VKNS *Enterobacter aerogenes* sinh VOC 2,3-butanediol (2,3-BD) khi nhiễm vào cây ngô

giúp tăng khả năng kháng bệnh bạc lá do nấm *Setosphaeria turcica* gây ra. Bên cạnh tác dụng ức chế mầm bệnh, nhiều hợp chất VOC từ VKNS còn kiểm soát mối quan hệ cộng sinh với cây chủ trong môi trường có tính cạnh tranh cao do VOC có thể kích thích sự nhân lên của các VSV nội sinh nhưng không kích thích sự lan truyền của mầm bệnh (Fadiji & Babalola, 2020).

Bảng 1.2. Các hoạt chất đối kháng vi sinh vật gây bệnh thực vật của một số vi khuẩn nội sinh

Chủng VKNS	Nguồn phân lập	Hoạt chất được sản sinh	Tác dụng
Bacillus subtilis BERA 71	Cây họ Đậu	Hoạt chất chống nấm Iturin (lipopeptide)	Thúc đẩy tăng trưởng thực vật và ức chế nấm bệnh *Macrophomina phaseolina*
B. velezensis OEE1	Cây Ô liu	Chất kháng khuẩn surfactin và chất kháng nấm (fengycin, plipastatin)	Ức chế nấm bệnh *Phytophthora* spp., *Fusarium* spp., *Botrytis cinerea*, *Cladosporium cladosporioides*
B. subtilis C9	Cỏ nhung *Zoysia*	Đồng phân của acetyl butanediol	Ức chế sự xâm chiếm của *Rhizoctonia solani* trong cỏ nhung và tăng cường sự phát triển của thực vật. Kích hoạt tính kháng hệ thống của thực vật
Pseudomonas stutzeri E25 *Stenotrophomonas maltophilia* CR71	Cây họ Cà *Physalis ixocarpa*	Các VOC	Ức chế sự phát triển của nấm bệnh *Botrytis cinerea*
Streptomyces sp. DSM 1175	Cây họ Bạch dương *Alnus glutinosa*	Alnumycin (quinone)	Kháng khuẩn
B. velezensis BR-01	Thổ bối mẫu (Bolbostemmatis rhizoma)	Siderophore, surfactin, iturin và fengycin	*Magnaporthe oryzae, Ustilaginoidea virens, Fusarium fujikuroi, Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola, Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

1.3.1.2. Cạnh tranh về không gian sinh trưởng và nguồn dinh dưỡng

Vi khuẩn nội sinh cạnh tranh với các mầm bệnh thực vật về không gian sinh trưởng và nguồn dinh dưỡng bên trong mô thực vật. VKNS thường xâm chiếm cây chủ sớm và nhanh hơn các mầm bệnh, do đó có lợi thế về chiếm hữu vị trí xâm

nhập, không gian sinh trưởng và sử dụng nguồn dinh dưỡng so với VSV gây bệnh (Xia et al., 2022). Chủng VKNS *Bacillus subtilis* đã làm giảm sự xâm nhập và tích tụ độc tố của nấm *Fusarium moniliforme* nhờ cạnh tranh cùng hốc sinh thái trong cây ngô. Blumenstein và cs. (2015) đã phát hiện sự đan xen kéo dài giữa các ổ VKNS và nấm *Ophiostoma novoulmi* gây bệnh trên cây du Hà Lan, tuy nhiên VKNS có thể cạnh tranh tốt hơn mầm bệnh do sử dụng nguồn carbon hiệu quả hơn.

Tuyến trùng rễ *Meloidogyne* spp. rất khó kiểm soát do có khả năng tạo các hốc đặc biệt trong ống mạch rễ của cây trồng, gây thiệt hại nghiêm trọng cho nông nghiệp trên toàn cầu. Vi khuẩn nội sinh *Bacillus* có tiềm năng lớn trong kiểm soát sinh học tác nhân gây bệnh này ở cây cà chua do có khả năng diệt ấu trùng, xâm chiếm rễ nhanh và ổn định (Hu et al., 2017). Việc nhiễm chủng VKNS lên rễ cà chua đã làm tăng tỷ lệ ức chế hình thành nốt sần (81,2%) và khối lượng trứng tuyến trùng (75,6%) và làm tăng đáng kể chiều dài thân, trọng lượng tươi cây cà chua.

1.3.1.3. Sinh siderophore

Việc sinh ra siderophore, peptide có ái lực cao với sắt, là bằng chứng rõ ràng cho sự kiểm soát sinh học bằng cạnh tranh nguồn dinh dưỡng. Trong điều kiện thiếu sắt, vi khuẩn giải phóng siderophore là phức hợp có ái lực cao với sắt để lấy sắt từ các dạng khó tan bằng cách hình thành các phức Fe^{3+}- siderophore. Ion Fe^{3+} sẽ được khử thành Fe^{2+} tại màng tế bào và giải phóng vào trong tế bào bởi các cơ chế vận chuyển chủ động. Vi khuẩn nội sinh có hoạt tính siderophore giúp cây trồng phát triển tốt ở vùng đất có hàm lượng sắt thấp. Sharma và cs. (2003) đã báo cáo tác dụng của chủng VKNS *Pseudomonas* sp. GRP3 trên cây đậu xanh (*Vigna radiate)* với việc giảm các triệu chứng bệnh úa vàng, đồng thời tăng hàm lượng sắt, chlorophyll a và chlorophyll b. Trong các nghiên cứu metagenome, số lượng bản sao các gen mã hóa quá trình sinh tổng hợp siderophore, tiếp nhận siderophore và lưu trữ sắt đã được phát hiện với số lượng đáng kể trong mô rễ lúa (Sessitsch et al., 2012). Siderophore cũng kích thích tính kháng hệ thống của thực vật để làm giảm độc tính của các kim loại vết (Rana et al., 2020). Nhờ sản sinh siderophore nên VKNS có thể tiếp nhận đủ sắt từ đất và cung cấp cho cả cây chủ, trong khi mầm bệnh phải chịu điều kiện thiếu sắt, cũng là một cơ chế cạnh tranh dẫn đến tiêu diệt

mầm bệnh. Siderophore cũng có thể ức chế trực tiếp sự phát triển của sợi nấm và sự nảy mầm của bào tử nấm bệnh (Zeng et al., 2018).

1.3.1.4. Sinh các enzyme thuỷ phân

Nhiều loài VKNS đã được báo cáo sản sinh các enzyme thuỷ phân khác nhau như chitinase, cellulase, protease, hemicellulose, β-1,3-glucanase, pectinase, glucanase và amylase. Các enzyme này đóng vai trò quan trọng trong quá trình xâm chiếm tế bào cây chủ của VKNS thông qua sự hình thành màng sinh học polysaccharide và protein. Đồng thời, các enzyme này cũng tác động đến các mầm bệnh thực vật một cách gián tiếp do tác dụng phân huỷ các liên kết glycosidic trên thành tế bào nấm bệnh hoặc ức chế sự nảy mầm của bào tử (Xia et al., 2022). Đây là một cách hiệu quả để ngăn chặn các tác nhân gây bệnh thực vật và giúp bảo vệ cây chủ khỏi các bất lợi sinh học. Enzyme chitinase ngoại bào phân lập từ chủng *Pseudomonas aeruginosa* đã ức chế vi khuẩn *Xanthomonas campestris* gây bệnh thối đen ở các loại rau họ Cải. Chủng *Bacillus cereus* nội sinh cây họ Cải có khả năng sinh chitinase cao cũng được chứng minh kiểm soát tốt bệnh thối rễ do *Rhizoctonia solani* gây ra trên cây bông (Eid et al., 2021). *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Paenibacillus*, *Streptococcus*, *Curtobacterium*, *Chryseobacterium*, *Bacillus* nội sinh một số loài hào thảo được báo cáo sinh các enzyme lipase, protease, amylase, cellulase, pectinase, xylanase (Xia et al., 2022).

1.3.1.5. Ngăn chặn đường truyền tín hiệu của mầm bệnh thực vật

Các mầm bệnh thực vật sử dụng đường truyền tín hiệu (quorum sensing) để điều khiển các yếu tố tạo độc lực như hình thành màng sinh học, sản xuất độc tố, kháng kháng sinh, sinh exopolysaccharides (EPS) hay tiết exoenzyme phân hủy. Cơ chế này diễn ra thông qua các phân tử truyền tín hiệu khuếch tán (diffusible signaling molecule) được gọi là chất tự cảm ứng (autoinducer) như các homoserine lactone đã acyl hóa (acylated homoserine lactone AHL) để giao tiếp khi tạo độc lực (Mansfield et al., 2012). Việc ngăn chặn đường truyền tín hiệu có thể được thực hiện bằng cách ức chế tổng hợp các phân tử tín hiệu, xúc tác các enzyme phân hủy và biến đổi các phân tử tín hiệu (Zhang et al., 2021).

Trong nghiên cứu của Akabari-Kiarood và cs. (2020), hai chủng VKNS *Bacillus cereus* Si-Ps1 và *Pseudomonas azotoformans* La-Pot3-3 phân lập từ lá cây có múi đã ngăn chặn việc truyền tín hiệu qua N-acyl homoserine ở chủng vi khuẩn gây bệnh *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (*Pss*), nhờ đó ức chế quá trình sản xuất màng sinh học và di chuyển của mầm bệnh. Dịch chiết thô của vi khuẩn nội sinh *B. cereus* Si-Ps1 đã ức chế sự hình thành màng sinh học của chủng *Pss* 3289 đạt 58% sau 96 giờ nuôi cấy, đồng thời gen mã hóa cho enzyme AHL-lactonase *aiiA* đã được tìm thấy trong hệ gen chủng nội sinh này.

1.3.2. Cơ chế gián tiếp bảo vệ cây trồng kháng bệnh thực vật

1.3.2.1. Tăng cường khả năng phòng vệ của thực vật

Các nghiên cứu cho thấy VKNS giúp thực vật có phản ứng phòng vệ nhanh hơn và mạnh mẽ hơn trước sự tấn công của mầm bệnh (He et al., 2024). VKNS có thể tạo ra tính kháng hệ thống ở thực vật, kích thích phản ứng phòng vệ tại chỗ và toàn thân của thực vật, nhờ đó bảo vệ cây chủ chống lại sự tấn công của mầm bệnh. Chủng VKNS *Bacillus velezensis* YC7010 tạo ra tính kháng hệ thống ở cây họ Cải *Arabidopsis* chống lại rệp đào xanh (*Myzus persicae)* gây hại (Rashid et al., 2017). Chủng VKNS *Bacillus amyloliquefaciens* YN201732 có khả năng kiểm soát sinh học tích cực chống lại bệnh phấn trắng ở cây thuốc lá thông qua các cơ chế kích kháng cảm ứng (Jiao et al., 2020). He và cs. (2024) đã báo cáo chủng *Bacillus velezensis* CSUFT-BV4 nội sinh lá cây chè dầu (*Camellia oleifera)* có hoạt tính đối kháng hiệu quả chống lại 5 loài nấm *Colletotrichum* spp. gây bệnh thán thư với tỷ lệ ức chế lên tới 73,2% nhờ kích thích sinh trưởng và kích thích sản sinh các enzyme bảo vệ khác nhau như superoxide effutase, phenylalanine aminotransferase và polyphenol oxidase thuộc hệ thống phòng vệ của thực vật.

1.3.2.2. Sinh các phytohormone

Phytohormone hay chất điều hòa sinh trưởng thực vật là các hợp chất hữu cơ làm biến đổi, ức chế hoặc thúc đẩy sự sinh trưởng và phát triển của thực vật ở nồng độ rất thấp (<1 mM). Sản sinh phytohormone là đặc điểm chung của nhiều loài VKNS để thúc đẩy tăng trưởng thực vật và tăng khả năng chống chịu các điều kiện

bất lợi của thực vật. VKNS sản sinh các phytohormone chính bao gồm: auxin, cytokinin, abscisic acid, ethylene, brassinosteroid, gibberellin (GA), strigolactone và jasmonate (Eid et al., 2021) (Bảng 1.3).

Bảng 1. 3. Một số vi khuẩn nội sinh có khả năng sinh tổng hợp các phytohormone

Phytohormone	Chủng vi khuẩn nội sinh	Cây chủ	Chức năng
Cytokinin	*Bacillus subtilis*	Xà lách	Tăng 30% trọng lượng chồi và rễ
Gibberellin	*B. amyloliquefaciens* RWL-1	Lúa	Kích thích sinh trưởng, điều hoà hormone
Abscisic acid	*Azospirillum lipoferum*	Ngô	Giảm tác động do hạn hán
Auxin	*B. amyloliquefaciens* B14, *Bacillus* sp. B19, *Bacillus* sp. P12	Đậu cove	Kích thích sinh trưởng, nảy mầm hạt
Indole-3-acetic acid (IAA)	*B. amyloliquefaciens, B. cereus, Bacillus subtilis*	Ớt	Kiểm soát bệnh thán thư, kích thích sinh trưởng, tăng sinh khối
	B. subtilis NA-108	Dâu tây	Kích thích sinh trưởng
	Bradyrhizobium sp., *Acinetobacter calcoaceticus*, *B. amyloliquefaciens*, *Enterobacter cloaca*, *Peudomonas putida*	Đậu tương	Kích thích sinh trưởng
	Aci. guillouiae *Arthrobacter sulfonivorans*	Lúa mì	Kích thích sinh trưởng
IAA, gibberellin, cytokinin	*Aci. braumalli*, *Enterobacter asburiae*, *P. fulva*, *P. lini; P. montelli*, *P. putida*, *P. thivervalensis*, *Sinorhizobium meliloti*	Ngô	Kích thích sinh trưởng, giảm tác động do hạn hán, kiểm soát sinh học

IAA do VKNS sinh tạo ra có khả năng làm tăng chiều dài và diện tích bề mặt rễ, từ đó giúp cây tiếp cận tốt hơn với các chất dinh dưỡng trong đất. Việc sản sinh IAA còn giúp mở rộng thành tế bào vi khuẩn và tăng tiết dịch nhờ đó cung cấp thêm chất dinh dưỡng để tăng cường sự phát triển của các vi khuẩn có lợi khác có trong vùng rễ. Các chi vi khuẩn nội sinh sinh IAA phổ biến bao gồm: *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Alcaligenes*, *Herbaspirillum*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Pantoea*, *Bacillus*, *Acetobacter*, và *Rhodococcus* (Dubey

et al., 2020). Các gen mã hóa protein sinh tổng hợp IAA, cytokinin và gibberellin đã được tìm thấy trong hệ gen của quần thể VKNS thực vật (Shahzad et al., 2016). Một số chủng *Pseudomonas* nội sinh cây lúa mùa nước nổi tại An Giang (Việt Nam) có khả năng sinh IAA đạt 27,35 mg/L sau 8 ngày nuôi cấy (Lý Ngọc Thanh Xuân & Phạm Duy Tiến, 2018).

1.3.2.3. Chuyển hóa nitơ

Một số VKNS mang gen cố định đạm, thực hiện chuyển hóa khí nitơ (N_2) thành dạng nitơ ammonium hữu dụng cho cây (Bảng 1.4) (Eid et al., 2021).

Bảng 1. 4. Các loài vi khuẩn nội sinh có khả năng cố định nitơ và mang các đặc tính có lợi khác cho thực vật

Chủng VSV nội sinh	Cây chủ	Phương pháp xác định	Đặc tính có lợi khác
Acinetobacter calcoaceticus, *Enterobacter cloacae,* *Pseudomonas putida*, *Bacillus cereus,* *B. amyloliquefaciens*	Đậu tương	Khuếch đại gen *nifH*	Ức chế nấm gây bệnh *Phytophthora sojae*
Arthrobacter, *Rhizobium,* *Bacillus* spp.	Ngô, lúa mì, kê, cao lương, lúa	Phương pháp Kjeldahl	Sinh siderophore, IAA và hoà tan phosphate
Herbaspirillum sp.	Cây chè	Khuếch đại gen *nifH*	Sinh siderophore, IAA, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase (ACC deaminase) và hoà tan phosphate
Paenibacillus kribbensis HS-R01 *Bacillus subtilis* CB-R05	Lúa	Khuếch đại gen *nifH*	Tăng sinh khối khô và tươi của cây lúa. Sinh siderophore, IAA, kháng *Fusarium oxysporum*
Bacillus spp., *Enterobacter* sp.	Ngô	Khuếch đại gen *nifH* Phương pháp khử acetylene	Tăng thể tích rễ 39-44% và tỷ lệ hạt nảy mầm 47%-56%; Sinh siderophore, IAA và enzyme
Pseudomonas spp., *Caballeronia sordidicola*, *Rhizobium herbae,* *Rathayibacter tanaceti*, *Frigoribacterium endophyticum*, *Herbiconiux solani* *Flavobacterium aquidurense*	Cây thông *Pinus contorta* var. *latifolia*	Khuếch đại gen *nifH* Phương pháp khử acetylene Xét nghiệm pha loãng đồng vị ^{15}N	Cung cấp nitơ (từ khí quyển) cho cây (23-53%) Tăng chiều dài (31-64%) và sinh khối (100-311%) của cây thông

Cùng có khả năng cố định nitơ, VKNS được chứng minh có hiệu quả tốt hơn vi khuẩn vùng rễ trong việc thúc đẩy sự phát triển và kiểm soát sức khỏe của cây trồng, đồng thời giúp cây trồng phát triển mạnh trong đất thiếu hụt nguồn nitơ. Cây thông được nhiễm các chủng VKNS có hoạt tính nitrogenase cao đã làm tăng nitơ tự do trong cây lên >200% và giúp cây có thể phát triển mạnh trong đất nghèo dinh dưỡng (Puri et al., 2018). Chủng VKNS rễ mía *Klebsiella variicola* DX120E được chứng minh có khả năng thúc đẩy sự phát triển của giống mía GT21 và tăng cường sự hấp thu nitơ, phospho và kali của cây mía trong điều kiện nhà kính (Wei et al., 2014).

Tại Việt Nam, Hoàng Thị Như Thuỷ và cs. (2022) đã báo cáo 03 chủng VKNS lúa TQP1, THC1, RKL3 có khả năng cố định đạm cao, với lượng NH_4^+ đạt lần lượt là 23,8; 14,3 và 10,43 mg/L sau 8 ngày nuôi cấy. Nguyễn Văn Phượng và cs. (2020) đã công bố bộ sưu tập gồm 77 chủng VKNS phân lập từ rễ lúa giống Bắc Thơm 7 trồng ở Hải Dương và khảo sát các hoạt tính sinh học quý. Kết quả cho thấy 74 chủng sinh ammonia, 65 chủng sinh IAA, 67 chủng tổng hợp siderophore, 77 chủng phân giải phosphate vô cơ, 72 chủng có khả năng ức chế sự sinh trưởng của nấm *Magnaporthe oryzea* gây bệnh đạo ôn.

1.3.2.4. Hòa tan phosphate khó tan

Vi khuẩn nội sinh hoà tan phosphate vô cơ trong đất thông qua việc sản sinh ra các axit hữu cơ, sinh siderophore, trao đổi ion, hoặc có thể tiết ra các enzyme hòa tan phosphate như phosphatase, phytase và C-P lyase (Singh et al., 2020). Việc tiết ra các axit hữu cơ như axit citric, axit lactic, axit malonic, axit gluconic, axit oxalic, axit acetic… được coi là cơ chế chính liên quan đến quá trình hòa tan phosphate, đồng thời giảm giá trị pH của môi trường. Loại axit được sản sinh và giá trị pH thay đổi trong quá trình sinh trưởng tùy theo loài vi khuẩn (Eid et al., 2021). Chủng VKNS *Pantoea dispersa* thúc đẩy khả năng hấp thụ phosphor ở cây sắn nhờ sản sinh axit salicylic và axit benzeneacetic (Chen et al., 2014).

Nhiều loại VKNS được phân lập từ các loại đậu, xương rồng, dâu tây và hướng dương có khả năng hòa tan phosphate hiệu quả (Liu et al., 2017). Hoạt tính hòa tan phosphate rất cao, đồng thời hòa tan muối kẽm và kali không tan đã được

ghi nhận ở các chủng VKNS *Bacillus megaterium* và *B. amyloliquefasciens* (Verma et al., 2015). Tại Việt Nam, Bùi Thanh Đạo và cs. (2021) đã nghiên cứu VKNS phân lập từ nốt sần, rễ, và thân cây lạc. Một số chủng Vi khuẩn thuộc các chi *Acinetobacter, Bacillus, Burkholderia, Klebsiella, Enterobacter, Sphingomonas* thể hiện khả năng hoà tan phosphate cao, đạt 367,34 mg/L. Hoàng Thị Như Thuỷ và cs. (2022) đã báo cáo các chủng VKNS lúa có hoạt tính hòa tan lân đạt tới 129,77 mg/L PO_4^{3-}. Ứng dụng chủng VKNS *Kosakonia radicincitans* DSM16656T để xử lý ngô cho kết quả giảm lượng phân lân cần thiết trong khi tăng năng suất lên tới 50% (Cruz-Barrera et al., 2020). Xạ khuẩn nội sinh cũng có vai trò quan trọng trong việc hòa tan phosphate và tăng tính khả dụng của phosphate đối với thực vật nhờ sản sinh phytase, sinh chất tạo phức, sinh axit hay thay đổi mức oxy hóa khử của phosphate hữu cơ (Singh et al., 2020).

1.3.2.5. Tăng cường khả năng chống chịu các yếu tố bất lợi từ môi trường

Biến đổi khí hậu trên toàn cầu đã dẫn đến xuất hiện một số yếu tố sinh học và phi sinh học bất lợi, ước tính làm giảm 30 - 50% năng suất nông nghiệp trên toàn thế giới. Những yếu tố bất lợi phi sinh học chính bao gồm nhiệt độ tăng, hạn hán, nhiễm mặn, nhiễm kim loại nặng, thoái hóa đất do thiếu hụt chất dinh dưỡng. Các yếu tố bất lợi phi sinh học làm tăng tính nhạy cảm của cây trồng đối với các tác nhân gây bệnh và làm giảm khả năng cạnh tranh với cỏ dại, dẫn đến thay đổi sự tương tác giữa thực vật và sâu bệnh. Theo chiều ngược lại, một số tác nhân gây hại gồm bệnh hại do vi sinh vật, côn trùng hoặc tuyến trùng có thể làm thay đổi phản ứng của thực vật trước các yếu tố bất lợi phi sinh học (Cui et al., 2024).

Từ lâu, VSV nội sinh đã được biết đến có khả năng giúp cây trồng chống chịu các yếu tố bất lợi bằng cách kích hoạt ngay lập tức các hệ thống phản ứng chống lại yếu tố bất lợi một cách trực tiếp, ví dụ như sản sinh các chất chuyển hóa giúp cây khỏe mạnh, kích hoạt các phản ứng miễn dịch bảo vệ cây tốt hơn dưới tác động của các áp lực khác nhau (Cui et al., 2024) (Bảng 1.5). Một số VKNS sinh enzyme ACC deaminase phân giải tiền chất của ethylene là ACC tạo thành ammonium và α-ketobutyrate, theo đó làm giảm căng thẳng do nồng độ ethylene, đồng thời cung cấp nguồn carbon và nitơ cho cây. Theo cơ chế tương tự, chủng VKNS *Pseudomonas*

brassicacearum SVB6R1 được chứng minh giúp tăng khả năng chịu mặn của cây cao lương, cây dừa cạn (*Catharanthus roseus*), tăng khả năng chịu áp lực thẩm thấu của cây tiêu, và khả năng chịu đồng của cây cải dầu (Santoyo et al., 2016; Gamalero et al., 2020).

Bảng 1.5. Vai trò của vi khuẩn nội sinh trong việc làm giảm tác động của các yếu tố bất lợi phi sinh học đối với thực vật

Điều kiện bất lợi	Chủng VSV	Đối tượng thực vật	Chức năng
Hạn hán	*Burkholderia phytofirmans* PsJN *Enterobacter sp.* PsJN	Ngô	- Giảm thiểu tác động của hạn hán - Tăng 30% hàm lượng nước trong lá - Giảm sự gây hại lá liên quan đến tính thấm tương đối của màng - Tăng sinh khối chồi, sinh khối rễ, diện tích lá, hàm lượng diệp lục, quang hợp và hiệu suất quang hóa
	Pantoea alhagi	Lá cây họ đậu *Alhagi sparsifolia*	- Tăng cường sản sinh IAA, siderophore, đường hòa tan, ammonium, EPS, enzyme protease - Giảm tích lũy malonyldialdehyde - Giảm sự phân hủy chất diệp lục
	Bacillus sp. Acb9 *Providencia* sp. Acb11 *Staphylococcus* sp. Acb12/Acb13/Acb14	Dứa	- Tăng chiều dài chồi/rễ, số lượng rễ - Sản xuất IAA/Cố định đạm/Tổng hợp ACC-deaminase. - Chất chuyển hóa có hoạt tính kháng nấm
Mặn	*Pseudomonas pseudoalcaligenes*	Lúa	Gây ra sự tích tụ nồng độ cao hơn của các hợp chất đóng vai trò quan trọng trong quá trình điều chỉnh áp suất thẩm thấu nội bào thực vật
	Bacillus subtilis BERA 71	Cây họ đậu *Acacia gerrardii*	- Tăng cường sản xuất sinh khối thực vật; tăng cường sắc tố quang hợp; - Giảm gốc oxy hoá hoạt động; tăng cường enzyme chống oxy hóa - Tăng hàm lượng phenol tổng số; giảm tích tụ natri; tăng tích lũy N, K, Ca, Mg; và proline
Kim loại nặng (Cd, Zn, Pb, Cu)	*Mesorhizobium loti* HZ76, *Agrobacterium radiobacter* HZ6	Cây họ đậu *Robinia pseudoacacia*	- Sản sinh IAA - Tổng hợp ACC-deaminase, siderophore - Tăng cường sản xuất sinh khối thực vật

Subramanian và cs. (2015) đã báo cáo cây cà chua khi được nhiễm các chủng VKNS chịu lạnh *Pseudomonas vancouverensis* OB155 và *P. frederiksbergensis* OS261 có thể chống chịu tốt hơn với nhiệt độ thấp (10 - 12^{o}C) với biểu hiện giảm tổn thương màng tế bào và tăng hoạt tính chống oxy hóa so với cây đối chứng. VKNS cũng có thể làm tăng khả năng chịu hạn của thực vật thông qua việc sản sinh các hợp chất dễ bay hơi, axit abscisic, ACC-deaminase và IAA. Chủng VKNS *Burkholderia phytofirmans* PsJN ở cây khoai tây đã điều chỉnh tăng phiên mã các gen liên quan đến điều hòa phiên mã, cân bằng môi trường trong tế bào và loại bỏ các gốc oxy hóa mạnh (reactive oxygen species) trong điều kiện hạn hán (Sheibani-Tezerji et al., 2015). Điều này cho thấy các VKNS cảm nhận được những thay đổi sinh lý ở thực vật và điều chỉnh biểu hiện gen để thích nghi với môi trường mới. Chen và cs. (2020b) đã phân lập từ cây liễu bách (*Tamarix chinensis*) ba chủng VKNS *Stenotrophomonas* sp. S20, *Pseudomonas* sp. P21 và *Sphingobium* sp. S42 có khả năng dung nạp niken với nồng độ cao 50 - 400 mg/L. Thử nghiệm ứng dụng chủng *Sphingobium* sp. S42 đã cho kết quả phục hồi sự phát triển của cây liễu bách ở điều kiện nồng độ Ni cao (200 mg/L) (Chen et al., 2020b).

1.3.3. Phát triển chế phẩm sinh học từ VKNS

Nhiều chủng VKNS đã được ứng dụng để sản xuất và thương mại dưới dạng phân bón sinh học (biofertilizer) và chế phẩm sinh học (bioinoculant) giúp tăng cường sự phát triển và năng suất của cây trồng. Trong những năm gần đây nghiên cứu phát triển chế phẩm sinh học trong nông nghiệp đã dịch chuyển từ đơn chủng sang hướng sử dụng hỗn hợp chủng, thậm chí là hệ VSV (Tosi et al., 2020). Trên cơ sở thông tin tổng quát metagenome của hệ VKNS, các tổ hợp VSV có thể được thiết lập từ bộ chủng phân lập để đạt được hiệu quả mong muốn (Vorholt et al., 2017). Khi được đưa vào áp dụng trong thực tế, các tổ hợp VSV như vậy có thể đảm bảo ở mức cao là sẽ có một hoặc một số chủng sống sót, cạnh tranh tốt và duy trì hiệu quả lâu dài. Các sản phẩm phân bón sinh học và chế phẩm sinh học sử dụng một số VKNS làm thành phần chính được trình bày trong Bảng 1.6 (Kuźniar et al., 2019).

Bảng 1.6. Một số chế phẩm sinh học thương mại từ VKNS thực vật

Tên sản phẩm	Nguồn gốc	VSV nội sinh sử dụng	Tác dụng
Kiểm soát sinh học (Biocontrol)			
Phytosporin-M	Nga	*Bacillus subtilis* 26D	Loại bỏ nấm gây bệnh và kích thích sự phát triển của cây
Albit	Nga	*B. subtilis* 2604D + *B. subtilis* 2605D + terpene axit, các nguyên tố đa lượng và vi lượng	
Vitaplan	Brasil	*B. subtilis* 2604D + *B. subtilis* 2605D	
Alirin-B	Nga	*B. subtilis*	Giảm số lượng vi nấm
Amylo-X	Italia	*Bacillus amyloliquefaciens*	Phòng trị bệnh do nấm trên các loại rau
Cedomon EO	Đức	*Pseudomonas chlororaphis* MA 342	Bảo vệ hạt lúa mạch chống lại *Pyrenophora graminea, Fusarium* spp. và *Bipolaris sorokiniana*
Symbion-N	Ấn Độ	*Azospirillium lipoferum*	Hạn chế khả năng gây bệnh của nấm *Fusarium solani* và *Rhizoctonia solani*. Hỗ trợ sự phát triển và sức sống của cây
Symbion-NG		*Gluconacetobacter diazotrophicus*	
Symbion-NR		*Rhizobium phaseoli*	
Bio-cure B		*Pseudomonas fluorencese*	
Bio-health WGP		*Bacillus megatherium Trichoderma larizianum*	
Rhizo-N		*Bacillus subtilis*	
Serenade	Đức	*Bacillus subtillis*	Phòng trị bệnh do nấm trên đào, dâu tây, cà chua.
Vi sinh vật bón cây (Bioinnoculant)			
BiotaMax	CustomBi, India	*Bacillus* spp. *Paenibacillus* spp. *Trichoderma* spp.	Tăng dinh dưỡng, kích thích sinh trưởng cho cây, cải tạo đất.
Cropaid	Anh	*Thiobacillus thiooxidans, T. thioparus, T. ferrooxidans* và trên 60 khoáng chất	Kích thích sản xuất protein và axit amin làm tăng khả năng chống chịu của cây đối với thiệt hại do lạnh và sương giá

Chế phẩm sinh học là các sản phẩm có nguồn gốc từ sinh vật sống hoặc các chất chuyển hóa của chúng. Chế phẩm sinh học được dùng trong canh tác hữu cơ nhờ tác dụng làm tăng năng suất cây trồng và giảm tác động của các yếu tố môi trường bất lợi bao gồm: chống lại các tác nhân gây bệnh, tăng khả năng chống chịu của cây trồng với nhiệt độ, bảo vệ hạt giống, tăng cường hấp thụ chất dinh dưỡng của cây trồng và cải thiện sức sống của cây trồng. Cho đến nay, các chủng *Bacillus*, *Thiobacillus* đã được ứng dụng trong hầu hết các chế phẩm sinh học có bán trên thị

trường. Tuy nhiên, các chủng VKNS như *Pseudomonas, Azospirillum, Rhizobium* và *Gluconacetobacter* đã được chứng minh là có hiệu quả khi sử dụng trong thành phần của các chế phẩm sinh học. Các chủng VKNS cũng đã được thử nghiệm và được khuyến cáo làm phân bón sinh học, giúp giảm sự phụ thuộc vào phân bón hóa học. Phân bón sinh học được định nghĩa là các vật chất chứa các sinh vật sống, khi được bón vào hạt giống, bề mặt cây trồng hoặc đất, sẽ xâm chiếm vùng rễ hoặc bên trong cây và thúc đẩy sự phát triển của cây bằng cách tăng nguồn cung cấp hoặc khả năng cung cấp các chất dinh dưỡng chính cho cây chủ (Kuźniar et al., 2019).

1.4. BỆNH BẠC LÁ LÚA VÀ CÁC BIỆN PHÁP PHÒNG TRỪ

Cây lúa (*Oryza sativa* L.) là một loài thực vật thuộc họ Poaceae (Hòa thảo), có nguồn gốc từ khu vực Đông Nam Á và hiện được xem là cây lương thực chủ đạo của hơn một nửa dân số thế giới. Với hệ thống rễ chùm phát triển mạnh trong điều kiện ngập nước và cơ chế sinh trưởng ngắn ngày, lúa thích nghi tốt với hệ sinh thái ruộng nước nhiệt đới. Cây lúa dễ bị tác động bởi nhiều tác nhân gây bệnh, đặc biệt là các sinh vật gây hại như nấm, vi khuẩn, virus và côn trùng truyền bệnh dẫn tới không chỉ ảnh hưởng đến sinh trưởng mà còn gây tổn thất lớn về năng suất và chất lượng sản phẩm. Các bệnh hại chính trên lúa bao gồm bệnh đạo ôn, khô vằn, bạc lá, vàng lùn và lùn xoắn lá… trong đó bạc lá được xếp vào một trong mười bệnh do vi khuẩn trên thực vật nghiêm trọng nhất thế giới (Mansfield et al., 2012).

1.4.1. Hiện trạng bệnh bạc lá lúa và tác nhân gây bệnh

Bạc lá lúa (bacterial leaf blight) là bệnh hại nghiêm trọng do vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) gây ra, xuất hiện ở hầu khắp các vùng trồng lúa trên thế giới (Mansfield et al., 2012). Các đợt bùng phát dịch bệnh phổ biến nhất vào mùa gió mùa ở Đông Nam Á và Ấn Độ, làm tổn thất năng suất lúa tới 60%, thậm chí 100% ở những vùng khí hậu khắc nghiệt (Zhang & Wang, 2013). Cây lúa có thể bị nhiễm bệnh bạc lá ở tất cả các giai đoạn trong quá trình sinh trưởng, đặc biệt trong giai đoạn đẻ nhánh đến ra đòng, trổ bông. Khi bệnh mới nhiễm, các mép lá bị héo xanh, sau đó lan dần vào trong phiến lá và từ trên xuống dưới, thường các lá bánh tẻ bị bệnh trước sau đó lan lên các lá non. Khi bệnh nặng, toàn bộ lá bị héo

khô và mất khả năng quang hợp, dẫn tới giảm năng suất. Bệnh đặc biệt phát triển mạnh ở khí hậu ấm, ẩm 28 – 34^{o}C. Nguồn lây nhiễm chính của *Xoo* là nước tưới, hạt giống và gốc rạ mang mầm bệnh từ vụ mùa trước. *Xoo* lây lan nhờ gió, mưa và thường xâm nhập vào lá lúa thông qua các lỗ thông khí (khí khổng) và các vết thương trên lá (Chukwu et al., 2019).

Xoo là vi khuẩn gram âm, tế bào hình que với đầu tròn, kích thước 0,8-1 µm ×0,4-0,7 µm, có màng nhầy bao quanh. *Xoo* sản sinh nhiều loại yếu tố gây độc cho cây chủ, bao gồm exopolysaccharide (EPS), các enzyme ngoại bào, và các protein giúp chúng tăng khả năng nhiễm bệnh và tránh được đáp ứng miễn dịch của cây chủ. Việc sản sinh một lượng lớn EPS được gọi là xanthan ở *Xoo* là một trong những yếu tố gây độc quan trọng nhất của loài này (Hình 1.5).

Hình 1.5. Hình ảnh lúa không nhiễm bệnh, lá mới nhiễm bệnh với các giọt tiết vi khuẩn trên mặt lá (A) và lá bị nhiễm bệnh khiến phần mô lá bị khô vàng dọc theo gân lá (B). Hình ảnh tế bào và khuẩn lạc của vi khuẩn *Xoo* (C) (Nino-Liu et al., 2006).

Xanthan tạo cấu trúc màng sinh học (biofilm) bền vững giúp bảo vệ vi khuẩn khỏi các tác động bất lợi từ môi trường, như mất nước, sự tấn công bởi hệ miễn dịch của cây chủ, kháng lại thuốc bảo vệ thực vật (Husain et al., 2019). Hệ quả là sinh khối *Xoo* và EPS có thể lấp kín các mạch dẫn, làm tắc nghẽn con đường vận chuyển nước và các chất dinh dưỡng tới các tế bào, dẫn đến lá bị khô héo (Hình 1.5), gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến năng suất lúa (Chukwu et al., 2019).

Ở Việt Nam, bệnh bạc lá lúa được phát hiện ở nhiều nơi trên cả nước, đặc biệt là ở khu vực miền Bắc. Theo số liệu thống kê của Trung tâm Bảo vệ thực vật phía Bắc (Cục Bảo vệ thực vật, Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn), bệnh bạc

lá diễn ra thường xuyên hàng năm với mức độ nhiễm bệnh và thiệt hại về năng suất ngày càng tăng, tập trung chủ yếu ở vụ mùa của các tỉnh phía Bắc (Bảng 1.7) (Báo cáo tổng kết tình hình phát sinh và gây hại của dịch hại trên một số cây trồng chính ở các tỉnh phía bắc năm 2023, Trung tâm Bảo vệ thực vật phía Bắc).

Bảng 1.7. Tỷ lệ hại và diện tích nhiễm bệnh bạc lá giai đoạn 2019-2023 ở các tỉnh phía Bắc

Năm	Tỷ lệ bệnh (%)			Diện tích nhiễm (ha)		
	Phổ biến	Cao	Cục bộ	Tổng	Nặng	Giảm >70% năng suất
Vụ xuân						
2019	3-5	10-20	40-80	11.851	1.749	0,2
2020	1-3	8-15	30-70	4.552	282	0
2021	1-7	10-20	40-70	3.951	319	0
2022	1-3	7-15	30-50	4.661	135	0
2023	5-7	10-30	50-70	1.654	98	0
Vụ mùa						
2019	3-5	10-30	50-80	11.114	927	0
2020	3-5	10-20	50-70	6.295	319	0
2021	3-5	10-30	50-80	8.457	990	0
2022	2-7	20-30	40-90	10.159	731	0
2023	1-5	10-30	50-80	5.917	267	0

Năm 2019, diện tích nhiễm bệnh bạc lá lúa ở miền Bắc là 22.965 ha, trong đó diện tích nhiễm nặng là 2.676 ha, đặc biệt trên các diện tích bón thừa đạm, bón đạm muộn. Năm 2022 và 2023, tổng diện tích lúa nhiễm bệnh bạc lá lần lượt là 14.820 và 7.571 ha. Vụ Đông Xuân 2022-2023, bệnh bạc lá gây hại chủ yếu trên các giống nhiễm như Bắc thơm 7, LC25, TBR225, Đài Thơm 8, Nhị ưu 838, Tạp giao...với tỷ lệ phổ biến 5-7%, cao 10-30%, cục bộ có nơi lên tới 50-70% số lá, tập trung ở các tỉnh/thành gồm: Hải Phòng, Hà Nội, Phú Thọ, Bắc Ninh, Bắc Giang, Hưng Yên, Ninh Bình, Sơn La, Nam Định, Hà Nam…). Đối với vụ mùa, bệnh phát sinh từ cuối tháng 7 trên trà lúa cực sớm - sớm, tăng nhanh từ cuối tháng 8 đến cuối vụ. Bệnh gây hại chủ yếu các giống lúa như Bắc thơm 7, Bắc ưu 903, Nhị ưu 838, BC15, T10, Thiên ưu 8, Hương thơm 1... tỷ lệ phổ biến 1-5%, cao 10-30%, cá biệt 50-80% số lá, tập trung tại các tỉnh Thái Bình, Điện Biên, Nam Định, Hưng Yên, Hải Phòng, Hà Nội, Quảng Ninh, Bắc Ninh, Yên Bái, Lai Châu...).

1.4.2. Các biện pháp phòng trị bệnh bạc lá lúa

1.4.2.1. Cải tiến kỹ thuật canh tác

Bệnh bạc lá lúa có thể được kiểm soát bằng một số biện pháp canh tác như: sử dụng hạt giống sạch bệnh, dọn dẹp cỏ dại, tàn dư của vụ trước; khoảng cách cấy phù hợp; bón phân hợp lý, tránh dư thừa đạm, bón cân đối N-P-K; xây dựng hệ thống cấp thoát nước tốt trong ruộng... Phương pháp này đơn giản, dễ thực hiện và ít tốn kém nhưng hiệu quả chưa cao. Các biện pháp vật lý như ngâm hạt giống trong dung dịch agrimycin 0,07% trong 12 giờ và hấp cách thủy ở 54^{o}C trong 30 phút có thể loại trừ được 95-100% vi khuẩn *Xoo*. Ngoài ra, phương pháp xử lý hạt giống 30 phút ở 52^{o}C trước khi ngâm hạt 8-10 giờ cũng có hiệu quả phòng bệnh đáng kể (Shekhar et al., 2020).

1.4.2.2. Sử dụng thuốc bảo vệ thực vật hóa học

Kiểm soát bệnh bạc lá bằng chất hóa học trên ruộng lúa bắt đầu vào những năm 1950 với việc áp dụng hỗn hợp Bordeaux (vôi tôi và đồng sunfat) để phòng ngừa và thử nghiệm một số loại thuốc kháng sinh, hợp chất thủy ngân và đồng. Vào những năm 1960, nhiều loại hóa chất nông nghiệp khác nhau đã được phát triển từ các thử nghiệm thực địa và được sản xuất ở quy mô thương mại lớn, chủ yếu ở Nhật Bản. Các hóa chất này chủ yếu là L-chloramphenicol, nickel-dimethyldithio-carbamate, dithianon và fentiazon (Gnanamanickam et al., 2009). Các loại hóa chất khác nhau đã được thử nghiệm và việc sử dụng Streptocycline (streptomycin sulphat:tetracycline hydrochloride, 9:1) 0,5% + đồng oxychloride 2,5% có hiệu quả nhất trong việc chống lại bệnh bạc lá lúa do vi khuẩn (Shekhar et al., 2020)

Bệnh bạc lá lúa thường được phòng trừ bằng các loại thuốc bảo vệ thực vật phổ biến nhất như Sasa (saikuzuo 25%), Xanthomix (bismerthiazol 20%) dùng khi bệnh mới xuất hiện, hoặc Bactocide 12 WP, Staner (oxolinic acid 200 g/kg), Kasumin (kasugamycin 2% w/w từ xạ khuẩn *Streptomyces kusagaensis*), Physan (quatemary ammonium salt: 20%), Beam (tricyclazole 75%) khi bệnh nặng (https://vaas.vn/kienthuc/Caylua/10/074_bacla.htm). Hiệu quả bảo vệ của các loại thuốc hóa học là khá cao, mặc dù vậy, phun thuốc hoá học thường không đạt hiệu quả mong muốn khi bệnh đã lây lan rộng. Tác dụng phụ lớn nhất của thuốc bảo vệ thực vật hóa học là gây ô nhiễm môi trường và làm thoái hóa đất canh tác. Ngoài ra, sử dụng thuốc lâu dài có thể dẫn đến hình thành các nòi kháng thuốc, đặc biệt với tính

đa dạng cao của các nòi *Xoo* trong môi trường canh tác, làm cho thuốc sau một thời gian sử dụng không còn hiệu quả và làm trầm trọng hơn tình trạng dịch bệnh (Shekhar et al., 2020).

1.4.2.3. Tạo giống lúa kháng bệnh bạc lá

Lai tạo giống lúa kháng bệnh bạc lá được coi là phương pháp hiệu quả nhất để đạt được mục tiêu quản lý bệnh bạc lá trên đồng ruộng bền vững và kinh tế Nền tảng quan trọng cho lai tạo giống lúa kháng bệnh nằm ở việc khám phá các gen kháng bệnh ở lúa và làm sáng tỏ các cơ chế phân tử cơ bản của khả năng kháng *Xoo*. Trong 30 năm qua, nhiều gen kháng *Xoo* phổ rộng quan trọng cũng như các cơ chế kháng bệnh tương ứng và ứng dụng của chúng đã được báo cáo rộng rãi. Cho đến nay, đã có hơn 46 gen kháng *Xa/xa* ở lúa mang lại khả năng kháng phổ rộng hoặc đặc hiệu theo nòi *Xoo* được dự đoán và xác định. Tổng cộng 16 gen *Xa* đã được tách dòng và mô tả bởi các nhóm nghiên cứu khác nhau, bao gồm 12 gen trội (*Xa1, Xa2, Xa3, Xa4, Xa7, Xa10, Xa14, Xa21, Xa23, Xa27, Xa31* và *Xa45*) và 4 gen lặn (*xa5, xa13, xa25* và *xa41*) (Ji et al., 2025).

Tại Trung Quốc và Ấn Độ, nhờ ứng dụng chỉ thị phân tử trong chọn tạo giống, các nhà nghiên cứu đã quy tụ được nhiều gen kháng vào trong một giống để mở rộng phổ tác động kháng lại sự đa dạng của các nòi *Xoo* gây bệnh. Lu và cs. (2022) đã chuyển một gen kháng mới là *Xa47* vào giống lúa JG30 tạo cây chuyển gen có tính kháng phổ rộng với 9 nòi *Xoo* khác nhau. Các nhà khoa học Việt Nam cũng đã nhận diện các gen kháng bệnh bạc lá, kết hợp với chọn giống dựa trên đánh giá kiểu hình và chỉ thị kiểu gen đích đã tạo được giống lúa thơm kháng bạc lá HDT10 có năng suất cao, thời gian sinh trưởng ngắn, được công nhận cho sản xuất thử tại các tỉnh phía Bắc từ năm 2017 (Dương Xuân Tú và cs., 2017). Chỉ thị xa5FM liên kết với gen kháng bạc lá *xa5* đã được sử dụng trong quá trình lai trở lại và chọn lọc cá thể phân ly của giống lúa Bắc thơm 7, tạo con lai BT7KBL ở thế hệ BC5F5 có triển vọng cao về năng suất, chất lượng và hiệu quả kháng bạc lá (Phạm Thiên Thành và cs., 2020). Các công nghệ CRISPR/Cas9, TALEN hiện đang được sử dụng trong nhiều nghiên cứu về chỉnh sửa gen SWEET liên quan đến tính kháng bệnh bạc lá trên lúa (Jun et al., 2019). Những nỗ lực nghiên cứu trên đã mang lại một số thành tựu bước đầu trong chọn tạo giống lúa kháng bạc lá phổ rộng, tuy nhiên, đa phần những nghiên cứu này đòi hỏi đầu tư nhiều thời gian và kinh phí do phải tiến hành

quá trình lai tạo kết hợp với chọn lọc trong thời gian khá dài.

1.4.2.4. Kiểm soát sinh học bệnh bạc lá lúa

Kiểm soát sinh học được cho là một giải pháp có hiệu quả trong việc ngăn ngừa bệnh bạc lá lúa và thân thiện với môi trường. Các nghiên cứu liên quan đến lĩnh vực này phần lớn đề cập đến ứng dụng vi sinh vật, trong đó có VKNS, làm tác nhân kiểm soát sinh học. Gnanamanickam và cs. (2009) ở Ấn Độ và Philippines đã phân lập chủng *Pseudomonas fluorescens* và một số chủng *Bacillus* từ vùng rễ lúa, có khả năng ức chế mạnh sự phát triển của *Xoo* trong phòng thí nghiệm. Các chủng vi khuẩn này được sử dụng để xử lý hạt giống và phun trên lá lúa vào ngày thứ 35 và 45 sau khi cấy, làm giảm chiều dài trung bình của tổn thương lá lúa do *Xoo* đến hơn 50% khi xử lý với *Bacillus* sp. và 64% khi xử lý bằng *P. fluorescens* PTB9 so với các cây đối chứng. Hoạt chất kháng *Xoo* do *Bacillus* sp. sinh ra được xác định là kanosamine và hoạt chất kháng *Xoo* do chủng *P. fluorescens* PTB9 sinh ra được xác định là 2,4-diacetylphloroglucinol. Năm 2008, Ji và cs. công bố chủng *Lysobacter antibioticus* được phân lập từ rễ cây lúa ở tỉnh Vân Nam, Trung Quốc, có khả năng ức chế nhiều loại nấm và vi khuẩn gây bệnh thực vật, trong đó có *Xoo*. Trong các năm gần đây, các hoạt chất kháng *Xoo* được xác định do các chủng vi khuẩn *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp. sinh ra như dificidin, bacilysin… đã cho thấy tiềm năng ứng dụng hiệu quả của biện pháp sinh học trong phòng trị bệnh bạc lá (Wu et al., 2015; Li et al., 2016).

Báo cáo về hoạt tính kháng *Xoo* của VKNS ngày càng tăng trong những năm gần đây. Chủng *Bacillus oryzicola* YC7007 nội sinh rễ lúa được chứng minh kháng hiệu quả hai loài vi khuẩn gây bệnh trên lúa là *Xoo* và *Burkholderia glumae* (Chung et al., 2015). Resti và cs. (2020) đã báo cáo tổ hợp các chủng VKNS *Bacillus* và *Serratia marcescens* có hiệu quả đối kháng tốt với *Xoo* và thúc đẩy sinh trưởng của cây lúa. Các chủng VKNS lá và rễ lúa gồm *Geobacillus thermoparaffinivorans* và *Bacillus subtilis* thể hiện hoạt tính đối kháng cao với *Xoo* (đường kính vòng kháng > 33 mm), cho hiệu quả giảm tỷ lệ bệnh bạc lá tương ứng là 83,49% và 81,56% ở điều kiện nhà kính (Halim et al., 2020). Ooi và cs. (2022) cũng báo cáo hiệu quả kháng bệnh bạc lá 52,1 - 85,3% của các chủng *Bacillus* spp. nội sinh rễ lúa.

Ở Việt Nam, một số nghiên cứu về việc sử dụng vi khuẩn đối kháng để phòng trị bệnh bạc lá lúa đã được công bố. Trần Vũ Phến và cs. (2014) đã sàng lọc được

bốn chủng *Bacillus* spp. có hoạt tính đối kháng cao với *Xoo* từ 233 chủng *Bacillus* phân lập được trên ruộng lúa ở tỉnh Hậu Giang. Một chế phẩm sinh học đã được tạo ra từ các chủng vi khuẩn đối kháng trên kết hợp với dẫn xuất từ chitosan để ứng dụng trong phòng trị một số bệnh hại trên lúa, đồng thời kích thích tăng trưởng của cây lúa. Trong một nghiên cứu khác, 17 chủng xạ khuẩn được phát hiện có khả năng kháng cả 10 nòi *Xoo* phổ biến ở Việt Nam. Thử nghiệm đồng ruộng sử dụng dịch nuôi cấy của chủng xạ khuẩn *Streptomyces toxytricini* VN-08-A12 đối với hai giống lúa SS1 và KD18 cho kết quả giảm chiều dài tổn thương do *Xoo* tương ứng là 38,3% và 29,8% và hoạt chất kháng *Xoo* sinh ra bởi chủng này được xác định là factumycin (Hoa et al., 2014). Phạm Thị Tố Oanh đã nghiên cứu sản xuất chế phẩm vi sinh phòng trị bệnh bạc lá chứa các chủng *Steptomyces* sp. và *Bacillus* spp. (Phạm Thị Tố Oanh, 2020).

Cho đến nay hầu như có rất ít nghiên cứu trong nước báo cáo về các chủng vi khuẩn nội sinh thực vật nói chung và nội sinh lúa nói riêng có khả năng đối kháng *Xoo* và phòng trừ bệnh bạc lá. Nghiên cứu của Nguyễn Văn Phượng và cs. (2020), một trong số rất ít các công bố về VKNS lúa, đã báo cáo bộ 77 chủng VKNS phân lập từ giống lúa Bắc thơm 7 với các hoạt tính sinh học quý như sinh IAA, ammonia, tổng hợp siderophore, phosphate vô cơ, và kháng nấm *Magnaporthe oryzea* gây bệnh đạo ôn. Có thể thấy rằng lĩnh vực nghiên cứu này cần được quan tâm hướng tới mục tiêu tạo ra chế phẩm sinh học từ các chủng VKNS phục vụ công tác kiểm soát bệnh bạc lá một cách hiệu quả và an toàn.

Sử dụng các biện pháp kiểm soát sinh học trong phòng trừ các bệnh thực vật nói chung và bạc lá nói riêng là xu hướng chung của sản xuất nông nghiệp bền vững trên thế giới và ở Việt Nam. VKNS có ảnh hưởng tích cực đến sự sinh trưởng và sức khỏe của cây trồng thông qua các cơ chế khác nhau nhờ khả năng kích thích sinh trưởng và đối kháng mầm bệnh. Việc tìm kiếm các chủng vi khuẩn có lợi trong đó có VKNS là hướng đi tiềm năng để phục vụ phát triển nông nghiệp hữu cơ. Nghiên cứu về hệ VKNS ở thực vật nói chung và ở cây lúa nói riêng, cũng như tương tác của chúng đối với các VSV gây bệnh ở cây chủ giúp giải đáp được nhiều câu hỏi về cơ chế gây bệnh ở thực vật, làm cơ sở cho việc ứng dụng trong phòng trừ bệnh hiệu quả.

CHƯƠNG II. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. NGUYÊN VẬT LIỆU

2.1.1. Mẫu lúa

Hạt lúa giống Bắc thơm 7 được cung cấp bởi Công ty cổ phần Tập đoàn Giống cây trồng Thái Bình.

Cây lúa giống Bắc thơm 7 (ký hiệu TB) và IR4625 (ký hiệu LA) ở giai đoạn làm đòng được thu hái trong vụ Hè Thu 2018. Giống lúa Bắc thơm 7 trồng tại huyện Vũ Thư, tỉnh Thái Bình (20°21'28.8"N, 106°17'15.8" E). Giống Bắc thơm 7 được trồng rộng rãi ở đồng bằng sông Hồng, mẫn cảm cao với bệnh bạc lá. Giống lúa IR4625 trồng tại huyện Thủ Thừa, tỉnh Long An (10°34'27.6" N, 106°21'57.2" E). Giống LA là giống lúa nếp, phổ biến hơn ở đồng bằng sông Cửu Long và có tính kháng bệnh bạc lá khá cao.

Bảng 2.1. Thông tin về các mẫu lúa được thu thập sử dụng cho nghiên cứu

Giống lúa	Đặc điểm	Địa điểm	Số lượng (cây)	Thời kỳ sinh trưởng	Thời gian thu thập
Bắc thơm 7 (TB)	Giống lúa mẫn cảm với *Xoo*	Thái Bình	15	Làm đòng	05/2018
IR4625 (LA)	Giống lúa ít nhiễm *Xoo*	Long An	15	Làm đòng	06/2018
Tổng			**30**		

Cây lúa nhiễm bệnh bạc lá và cây lúa khỏe mạnh được thu thập trên cùng một ruộng. Những cây nhiễm bệnh được lựa chọn dựa trên biểu hiện các triệu chứng bệnh bạc lá điển hình, những cây khỏe mạnh được chọn ngẫu nhiên, hoàn toàn không có triệu chứng bệnh (Phụ lục 1).

2.1.2. Chủng vi sinh vật

Chủng *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) nòi R5 (VTCC 12280) phân lập từ mẫu lá lúa nhiễm bệnh bạc lá được lưu giữ tại Trung tâm Nguồn gen Vi sinh vật Quốc gia, Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội.

2.1.3. Oligonucleotide

Các mồi sử dụng trong các phản ứng chuỗi trùng hợp (polymerase chain reaction, PCR) được tổng hợp tại Bảng 2.2.

Bảng 2.2. Các mồi sử dụng trong nghiên cứu

Mồi	Trình tự (5' – 3')	Tài liệu tham khảo
16S_Amplicon_PCR_Fw	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAA GAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG	Klindworth et al., 2013
16S_Amplicon_PCR_Rv	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTAT AAGAGACAGGACTACHVGGGTATC TAATCC	
27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Weisberg et al., 1991
1492R	ACGGCTACCTTGTTACGACTT	
rpoB-2292f	GACGTGGGATGGCTACAACT	Rooney et al., 2009
rpoB-3354r	ATTGTCGCCTTTAACGATGG	

2.1.4. Hoá chất

Taq DNA polymerase, thang chuẩn DNA 1,0 kb, bộ kit tách chiết DNA tổng số từ vi khuẩn Genomic DNA Extraction and Purification, bộ kit tách chiết DNA hệ gen từ mẫu lúa DNeasy PowerSoil DNA Pro Kit được đặt mua từ hãng Thermo Scientific, New England Biolabs, Qiagen (Mỹ). Các hóa chất, vật tư sử dụng để tạo thư viện 16S rDNA cho phân tích metagenomics (hạt AMPure XP, bộ kit Nextera XT Index) được đặt mua từ hãng Illumina (Mỹ). Hóa chất cơ bản sử dụng trong nghiên cứu đều có tiêu chuẩn chất lượng cao từ các hãng cung cấp lớn như Merck (Đức), Sigma (Mỹ), Wako (Nhật Bản), Biobasic (Canada).

2.1.5. Thiết bị

Nghiên cứu sử dụng các thiết bị chuyên môn dùng trong VSV học, sinh học phân tử và hóa phân tích đạt tiêu chuẩn quốc tế.

Thiết bị nghiên cứu VSV học: kính hiển vi phản pha và huỳnh quang (Zeiss, Đức), máy đo quang phổ UV – Vis (Eppendorf, Đức), tủ cấy an toàn sinh học cấp 2

(Nuaire, Mỹ), tủ ấm (Binder, Đức), nồi khử trùng (Hirayama, Nhật Bản), máy lắc ổn nhiệt (Amerex, Mỹ), tủ lạnh -20^{o}C (Panasonic, Nhật Bản), tủ lạnh sâu -80^{o}C (Nuaire, Mỹ), máy ly tâm lạnh (Eppendorf, Đức), máy đo pH (Horiba, Nhật), cân kỹ thuật (Precisa,Thụy Sĩ), cân phân tích (Shimadzu, Nhật).

Thiết bị nghiên cứu sinh học phân tử: máy đo nồng độ DNA BioPhotometer (Eppendorf, Đức) và Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Mỹ), máy PCR (Eppendorf, Đức), máy điện di (Nyx Technik, Mỹ), máy soi gel GelDoc (BioRad, Mỹ), máy kiểm tra kích thước DNA Bioanalyzer (Agilent, Mỹ), máy định lượng huỳnh quang Qubit 2 (Invitrogen, Mỹ).

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Phân tích hệ vi khuẩn nội sinh lúa bằng phương pháp metagenomic

2.2.1.1. Tách chiết DNA hệ gen từ rễ/thân/lá lúa

Các mẫu rễ/thân lúa được cắt ở các vị trí tương đương trên cây lúa khoẻ và cây nhiễm bệnh bạc lá. Đối với các mẫu lá nhiễm bệnh bạc lá, cắt phần lá màu xanh cách rìa vùng có biểu hiện bệnh 1 - 2 cm và cắt mẫu ở vị trí tương tự đối với mẫu lá của cây khoẻ. Các mẫu lúa được rửa kỹ bằng nước máy, sau đó rửa sạch bằng nước cất vô trùng và để khô trong không khí. Các mẫu này được cắt nhỏ và nghiền mịn trong nitơ lỏng bằng cối và chày vô trùng. DNA hệ gen từ mẫu lúa được tách chiết sử dụng bộ kit DNeasy PowerSoil DNA Pro theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Nồng độ DNA được phân tích trên thiết bị BioPhotometer và Nanodrop. Độ tinh sạch của mẫu DNA tương ứng được xác định bởi tỷ lệ A_{260}/A_{280} (DNA/protein) cần đạt >1,7 và A_{260}/A_{230} (DNA/humic acid) cần đạt >2 (Tanveer, 2016). Các mẫu DNA được chuẩn về nồng độ 7 ng/µL và sử dụng cho phản ứng PCR tạo thư viện gen 16S rDNA.

2.2.1.2. Tạo thư viện gen 16S rDNA

Thư viện gen 16S rDNA được tạo ra nhờ phản ứng PCR khuếch đại vùng siêu biến V3-V4 sử dụng cặp mồi 16S_Amplicon_PCR_Fw và 16S_Amplicon_PCR_Rv có gắn mã vạch (kích thước sản phẩm khoảng 550 bp) (Bảng 2.5). Kiểm tra kích thước sản phẩm PCR bằng thiết bị Bioanalyzer và tinh sạch sản phẩm PCR bằng hạt

AMPure XP theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Index PCR: sử dụng các sản phẩm PCR lần 1 đã được tinh sạch làm khuôn cho phản ứng PCR lần 2 để gắn Adapter và Index sử dụng bộ kit Nextera XT Index. Sản phẩm PCR tiếp tục được tinh sạch bằng hạt AMPure XP. Kích thước, tính nguyên vẹn và độ tinh khiết của các đoạn khuếch đại được kiểm tra bằng thiết bị Bioanalyzer và kiểm tra nồng độ trên thiết bị định lượng huỳnh quang Qubit 2. Trình tự metagenome được đọc bằng công nghệ Illumina MiSeq (kiểu đọc trình tự 250 bp paired-end) với các thông số cho phép tạo file FastQ riêng của các trình tự gắn index.

Bảng 2.3. Thành phần và chu trình nhiệt của các phản ứng PCR tạo thư viện gen 16S rDNA

Thành phần	Thể tích (µL)	Chu trình nhiệt
PCR vùng V3-V4 gen 16S rDNA	**25**	
DNA 16S_Amplicon_PCR_Fw 1 µM 16S_Amplicon_PCR_Rv 1 µM 2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix	2,5 5 5 12,5	95°C, 3 phút 95°C, 30 giây 55°C, 30 giây 72°C, 30 giây 72°C, 5 phút 4°C (25 chu kỳ)
Index PCR	**50**	
DNA Nextera XT Index Primer 1 (N7xx) Nextera XT Index Primer 2 (S5xx) 2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix PCR Grade water	5 5 5 25 10	95°C, 3 phút 95°C, 30 giây 55°C, 30 giây 72°C, 30 giây 72°C, 5 phút 4°C (8 chu kỳ)

2.2.1.3. Phân tích metagenome hệ vi khuẩn nội sinh dựa trên thư viện đoạn 16S rDNA

Tập dữ liệu FastQ thô được nhập vào nền tảng QIIME 1.9.1. sau đó được xử lý bằng công cụ DADA2 v1.4.0 để lọc chất lượng. Việc cắt xén trình tự và loại bỏ chimera được thực hiện bằng cách sử dụng các hàm FilterAndTrim và RemoveBimeraDenovo tương ứng. Các trình tự đạt chất lượng có độ tương đồng ≥ 97% được nhóm lại thành một đơn vị phân loại OTU (Operational Taxonomic Unit) bằng cách sử dụng hàm Taxonomy. Cuối cùng, công cụ phân loại Clasifier của Dự án dữ liệu ribosome (Ribosomal Database Project) được sử dụng để gán các chuỗi đại diện cho các phân loại VSV. Các OTU có nguồn gốc lục lạp và ty thể thực vật sẽ bị loại bỏ.

Tất cả các phân tích thống kê và trực quan hoá dữ liệu được thực hiện trong phần mềm R (v3.4.2) bằng cách sử dụng gói Vegan (v2.6.4) (Oksanen et al., 2016), ggplot2 và Phyloseq (v1.42) (Mc Murdie & Holmes 2013). Chỉ số độ phong phus tương đối (relative abundance) và chỉ số đa dạng Alpha (Observed, Chao1, Shannon và Simpson) được tính toán để ước tính mức độ phong phú trong các mẫu. Sự khác biệt về tính đa dạng của hệ VKNS giữa các mẫu của hai giống lúa được phân tích bằng cách sử dụng tỷ lệ đa chiều phi số liệu (non-metric multidimensional scaling, NMDS) dựa trên sự không tương đồng Bray trên dữ liệu đã được chuẩn hóa và được kiểm tra mức ý nghĩa bằng thuật toán ANOSIM (999 hoán vị). Gói DESeq2 (v1.38.3) đã được sử dụng để xác định sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về mức độ phong phú tương đối của các OTU vi khuẩn (Love & Anders 2014).

Công cụ web http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/ được sử dụng để tạo biểu đồ Venn nhằm trực quan hóa các chi VKNS cùng xuất hiện hoặc chỉ xuất hiện ở các mẫu lúa bị bệnh và khỏe mạnh.

2.2.2. Phân lập vi khuẩn nội sinh

Phân lập VKNS từ các mẫu lúa được tiến hành theo mô tả của Bertani và cs. (2016), tóm tắt như sau:

***Xử lý mẫu*:** cắt các đoạn rễ, thân, lá của các cây lúa thu thập thành các đoạn 0,5 - 1 g ở vị trí giống nhau đối với tất cả các cây, cụ thể lấy phần thân trên mặt nước, phần giữa lá bỏ đầu mút và cuống lá và phần rễ dưới cuống rễ. Tiến hành khử trùng bề mặt mẫu lúa bằng cách rửa sạch mẫu dưới vòi nước máy và lần lượt đưa mẫu qua các bước khử trùng bề mặt sau: (i) ngâm trong cồn 75% trong 2 phút, rửa sạch bằng nước cất vô trùng; (ii) ngâm trong dung dịch hypochlorire 50% (7% Cl hoạt động) trong 2 phút, rửa sạch bằng nước cất vô trùng; (iii) ngâm trong cồn 75% trong 1 phút, rửa sạch bằng nước cất vô trùng; (iv) rửa sạch bằng nước cất vô trùng 5 lần.

Kiểm tra mức độ sạch của mẫu bằng cách cấy trang 0,1 mL nước rửa cuối cùng và đặt một phần mẫu sau khi khử trùng lên đĩa môi trường TSA 1/5 trong 60 phút trước khi tiến hành nghiền mẫu. Kiểm tra sinh trưởng của vi khuẩn sau 72 giờ.

Phân lập VKNS: dùng chày và cối sứ vô trùng nghiền nhuyễn mẫu trong 10 mL đệm PBS. Tiến hành pha loãng theo dãy đến 10^{-5} và cấy gạt trên môi trường thạch đĩa TSA 1/5 ở ba nồng độ pha loãng cuối. Ủ các đĩa ở nhiệt độ 28 - 30^{o}C trong 5 ngày. Nhặt các khuẩn lạc và tinh sạch lại trên đĩa TSA 1/5 cho đến khi thu được chủng thuần khiết.

2.2.3. Đánh giá hoạt tính kháng *Xoo* của vi khuẩn nội sinh

Đánh giá hoạt tính kháng *Xoo* của các chủng VKNS được tiến hành theo mô tả của Magaldi và cs. (2014). Chủng *Xoo* được cấy trên môi trường thạch PSA (peptone 10 g/L; sucrose 10 g/L; axit glutamic 1 g/L và agar 15 g/L), ủ đĩa ở 30^{o}C, 48 giờ (Ke et al., 2017). Các chủng VKNS được nuôi trong môi trường lỏng TSB ½ (Himedia, Ấn Độ) ở điều kiện 30^{o}C, lắc 150 v/p trong 24 giờ. Ly tâm dịch nuôi ở 5000 v/p trong 15 phút và lọc qua màng lọc kích thước lỗ 0,22 µm.

Hoạt tính kháng *Xoo* của các chủng VKNS được xác định bằng cách ria đều khuẩn lạc chủng *Xoo* lên bề mặt đĩa thạch PSA. Tiến hành đục các giếng thạch đường kính 5 mm và nhỏ vào mỗi giếng 50 µL dịch nuôi cấy đã loại tế bào của các chủng VKNS. Ủ các đĩa thử hoạt tính ở nhiệt độ 30°C trong 48 giờ.

Khả năng kháng *Xoo* được xác định dựa vào kích thước vùng kháng (ΔD) ở xung quanh vị trí giếng/thỏi thạch: $\Delta D = D - d$. Trong đó: D là đường kính vùng kháng khuẩn (mm), d là đường kính giếng/thỏi thạch.

2.2.4. Nghiên cứu các đặc tính sinh học của vi khuẩn nội sinh

Sinh trưởng và hoạt tính kháng *Xoo* của VKNS trong các thí nghiệm được đánh giá thông qua giá trị OD_{600} và đường kính vòng kháng khuẩn (theo phương pháp khuếch tán trên giếng thạch, xem mục 2.2.3). Chủng VKNS được nuôi trong môi trường dịch thể TSB ½, lắc 150 v/p trong 2 ngày (độ lặp lại: 3 bình nuôi cấy/thí nghiệm), lấy mẫu để xác định xác định OD_{600} và hoạt tính kháng *Xoo*. Đối với thí nghiệm xác định nhiệt độ nuôi cấy thích hợp, các chủng VKNS được nuôi cấy ở các nhiệt độ 25, 30, 37, 42°C. Để xác định pH môi trường thích hợp, các chủng VKNS được nuôi cấy trong môi trường TSB ½ có điều chỉnh độ pH ở các giá trị từ 5 đến 9 bằng dung dịch H_2SO_4 1 M hoặc dung dịch $NaHCO_3$ 1 M. Đối với thí nghiệm xác

định nồng độ muối thích hợp, VKNS được nuôi trong môi trường TSB ½ với nồng độ muối trong khoảng 0 – 20 g/L (sử dụng dung dịch muối 5M: NaCl 286,4 g; $MgCl_2.6H_2O$ 44,7 g; $CaCl_2.2H_2O$ 2,2 g, nước cất dẫn tới 1 L). Đối với thí nghiệm xác định nguồn carbon/nitơ thích hợp, VKNS được nuôi cấy trong môi trường dịch thể (môi trường Landy đối với chủng VY03, môi trường GA đối với chủng VY148), lắc 150 v/p trong 2 ngày (độ lặp lại: 3 bình nuôi cấy/thí nghiệm), lấy mẫu để xác định xác định OD_{600} và hoạt tính kháng *Xoo*. Nguồn carbon được bổ sung thay thế vào môi trường là một trong các hợp chất sau: glucose, acetate, methanol, glycerol, rỉ đường (1% v/v). Nguồn nitơ được bổ sung thay thế vào môi trường là một trong các chất sau: peptone, casein, cao thịt, cao nấm men.

Khả năng sinh siderophore được đánh giá theo phương pháp của Lakshmanan và cs. (2015). Hoà tan 60,5 mg chrome azurol S trong 50 mL nước cất và phối trộn với 10 mL dung dịch Fe(III) ($FeCl_3.6H_2O$ 1 mM; 10 mM HCl). Đổ từ từ hỗn hợp trên vào dung dịch hexadecyltrimethyl ammonium bromide (CTAB, 72,9 mg hoà tan trong 40 mL nước cất). Luôn sử dụng khuấy từ trong quá trình thực hiện. Khử trùng hỗn hợp ở 121^{o}C, 15 phút. Trộn 100 mL dung dịch chrome azurol S với 900 mL môi trường thạch TSB ½ rồi đổ đĩa petri. Cấy chấm điểm các chủng VSV và ủ ở 30^{o}C trong 72 giờ. Chủng vi khuẩn được ghi nhận có khả năng sinh siderophore khi làm biến đổi màu môi trường từ xanh dương sang vàng nhạt.

2.2.5. Định danh và phân tích trình tự hệ gen của vi khuẩn nội sinh

DNA hệ gen của các chủng VKNS được tách chiết sử dụng bộ kit Genomic DNA Extraction and Purification (New England Biolabs) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Nồng độ DNA được phân tích trên thiết bị BioPhotometer (Eppendorf). Độ tinh sạch của mẫu DNA cần đạt mức $A_{260}/A_{280} > 1,7$ và $A_{260}/A_{230} > 2$ (Tanveer, 2016).

Gen 16S rDNA (~1500 bp) và gen *rpoB* (khoảng 500 bp) được khuếch đại trong phản ứng PCR sử dụng cặp mồi 27F-1492R và rpoB-2292f-rpoB-3354r với thành phần và chu trình phản ứng được trình bày ở Phụ lục 2. Sản phẩm PCR sau khi được tinh sạch bằng kít tinh sạch sản phẩm PCR (Bioneer - Hàn Quốc) được

tiến hành phản ứng đọc trình tự với ABI Prism BigDye Terminator cycle sequencing kit và đọc trình tự trên máy tự động 3110 Avant Appied Biosystems. Trình tự gen sau đó được phân tích, so sánh với trình tự 16S rDNA/*rpoB* của các loài có liên quan hiện đã công bố trên Database EZTaxon/GenBank sử dụng công cụ BLAST Search. Cây phân loại được dựng theo phương pháp neighbour-joining (Saitou & Nei, 1987), trong đó định dạng cây được tiến hành dựa trên 1000 phép so sánh đa chiều (Felsenstein, 1985).

Giải trình tự hệ gen của VKNS được thực hiện trên nền tảng Illumina Hiseq 2500 với các đoạn đọc trình tự 150 bp paired-end. Hệ gen được lắp ráp từ các đoạn đọc (reads) bằng SPAdes v3.6.0 (Bankevich et al., 2012). Chú thích các gen được thực hiện bằng cách sử dụng công cụ Prokaryotic Genomes Automatic Annotation Pipeline (PGAAP) trên NCBI đối với hệ gen VSV nhân sơ và máy chủ Rapid Annotation Subsystem Technology (RAST) (Aziz et al., 2008). Các chất trao đổi bậc hai được phân tích bằng công cụ trực tuyến antiSMASH 7.0 (Blin et al., 2023).

2.2.6. Đánh giá khả năng xâm nhập vào rễ lúa của vi khuẩn nội sinh

Khả năng xâm nhập rễ lúa được đánh giá theo phương pháp của Bertani và cs. (2016). Tiến hành tạo thể đột biến ngẫu nhiên kháng rifampicin từ VKNS bằng cách cấy trải chủng VKNS trên đĩa thạch TSA 1/5 bổ sung rifampicin 100 µg/mL, nuôi ở 30^{o}C trong 48 giờ. Cấy chuyển các khuẩn lạc sang đĩa TSA-rifampicin mới và thu các thể đột biến ngẫu nhiên kháng rifampicin. Khử trùng bề mặt hạt thóc giống Bắc thơm 7 bằng cách ngâm trong dung dịch NaClO 5% trong 30 phút và rửa sạch bằng nước cất vô trùng 5 lần. Sau đó, hạt được đặt trong đĩa Petri có chứa dung dịch Hoagland ½ (Phụ lục 3) để nảy mầm ở 30^{o}C trong 1 tuần ở điều kiện tránh ánh sáng. Cây con 1 tuần tuổi được trồng vào ống Falcon 50 mL chứa 35 mL môi trường Hoagland ½, thạch 0,3% ở điều kiện chiếu sáng 16 giờ, tối 8 giờ, độ ẩm 80%, 30^{o}C trong 1 tuần. Cây được tưới 2 ngày/lần bằng nước cất vô trùng. Nuôi lắc thể đột biến kháng rifampicin trên môi trường TSB 1/5, sau đó pha loãng bằng môi trường TSB 1/5 để đưa OD_{600} về 0,3 và nhúng toàn bộ phần rễ của cây lúa 2 tuần tuổi vào dịch nuôi cấy đã pha loãng trong 60 phút. Trồng lại cây trong các ống Falcon 50 mL chứa môi trường Hoagland ½ thạch 0,3% trong điều kiện chiếu sáng

16/8, độ ẩm 80%, nhiệt độ 30ºC trong 6 ngày. Tại thời điểm kết thúc thí nghiệm, thu hoạch cây lúa và rửa rễ cây nhiều lần với nước cất rồi để khô trong không khí 10 phút.

Để xác định số lượng tế bào ở bề mặt rễ (epiphytic), rễ cây được cân và rửa trong 5 mL đệm PBS 1× bằng cách vortex 5 lần, mỗi lần 30 giây. Nước rửa này được pha loãng đến 10^{-3} và cấy trải trên môi trường thạch TSA 1/5 chứa 50 µg/mL rifampicin, nuôi ở 30°C trong 3 ngày. Đếm số lượng khuẩn lạc và tính toán mật độ tế bào (CFU/g).

Để xác định số lượng tế bào nội sinh (endophytic), sau khi rửa trong dung dịch PBS 1× (đã thực hiện ở bước trên), rễ lúa được khử trùng bề mặt như mô tả trong mục 2.2.2. Nước rửa cuối được cấy trải trên đĩa thạch TSA 1/5 chứa 50 µg/mL rifampicin để kiểm tra quy trình khử trùng bề mặt. Phần rễ đã khử trùng bề mặt được nghiền trong 10 mL đệm PBS 1×, sau đó 100 µL dịch nghiền rễ ở các độ pha loãng 10^{0} và 10^{-1} được cấy trải trên đĩa thạch TSA 1/5 chứa 50 µg/mL rifampicin, nuôi ở 30ºC trong 3 ngày. Đếm số lượng khuẩn lạc và tính toán mật độ tế bào (CFU/g).

2.2.7. Đánh giá hiệu quả kiểm soát nhiễm *Xoo* của vi khuẩn nội sinh

2.2.7.1. Thí nghiệm trong điều kiện nhà lưới

Thí nghiệm được thực hiện trong nhà lưới của Viện Bảo vệ thực vật từ tháng 6 đến tháng 10 năm 2024.

Chuẩn bị đất ở các ô thí nghiệm: Các ô thí nghiệm có kích thước 1 m × 1 m. Cuốc đất, phơi ải và làm sạch cỏ dại trước thí nghiệm 1 tháng, sau đó dẫn nước vào các ô ủ 3 - 4 ngày cho đất ngấu rồi tiến hành san phẳng bề mặt, giữ lại mức nước 5 cm. Phân bón lót được trộn đều vào đất, áp dụng cho tất cả các ô thí nghiệm: 15 g đạm + 15 g super lân + 0,25 g kali.

Xử lý hạt giống và cấy lúa: Hạt giống Bắc thơm 7 được ngâm ủ, gieo trên môi trường đất bùn bình thường. Chia số mạ làm 7 phần: 5 phần chăm sóc bình thường, 1 phần được tưới bằng dịch nuôi chủng VY03 (10^{6} CFU/mL), 1 phần được tưới

bằng dịch nuôi chủng VY148 (10^6 CFU/mL) vào ngày thứ 5 sau khi gieo. Khi mạ được 7 - 10 ngày tuổi thì đem cấy. Ô thí nghiệm được cấy 1 dảnh với mật độ 30 dảnh/m^2, khoảng cách cây cách cây 16 × 16 cm; hàng cách hàng 20 × 20 cm (Hình 2.2). Chăm sóc bằng kỹ thuật thông thường theo quy trình canh tác giống lúa Bắc thơm 7 và duy trì mức nước mặt 5 cm. Không sử dụng bất kỳ hóa chất/thuốc bảo vệ thực vật nào trong suốt thời gian thí nghiệm.

Hình 2. 1. Ảnh minh họa thí nghiệm đánh giá hiệu quả phòng trừ Xoo trong nhà lưới

Lây bệnh nhân tạo cho cây lúa (Ke et al., 2017): Khi cây lúa được 8 tuần tuổi, thì tiến hành lây nhiễm. Vi khuẩn *Xoo* được nuôi trong bình tam giác chứa môi trường dịch thể PSB trong 24 h. Dịch nuôi sau đó được pha loãng bằng dung dịch $MgCl_2$ 10 mM đạt mật độ 10^6 CFU/mL. Chọn lá bánh tẻ, dùng kéo vô trùng nhúng vào dịch nuôi *Xoo* rồi cắt đứt hoàn toàn một đoạn lá lúa tại vị trí cách đầu mút lá 3 - 5 cm. Một ngày sau khi nhiễm *Xoo*, tiếp tục phun huyền phù tế bào/dịch nuôi cấy của chủng VKNS bao gồm:

- Huyền phù tế bào: ly tâm dịch nuôi cấy chủng VKNS ở tốc độ 10.000 v/p trong 10 phút, bỏ dịch trong. Rửa cặn tế bào thu được bằng nước cất vô trùng. Hoà lại cặn tế bào trong nước cất vô trùng sao cho mật độ tế bào đạt 10^6 CFU/mL. Tiến hành phun dịch huyền phù tế bào đối với lô thí nghiệm, phun nước cất vô trùng đối với lô đối chứng (–).

- Dịch nuôi cấy loại tế bào: phun dịch nuôi cấy đã loại tế bào và pha loãng 10 lần bằng nước cất vô trùng đối với lô thí nghiệm, phun môi trường TSB ½ vô trùng pha loãng 10 lần bằng nước cất vô trùng đối với lô đối chứng (–). Ở lô đối chứng (+), phun thuốc bảo vệ thực vật Starner 20WP (axit oxolinic 20%, Sumitomo Chemical, Nhật Bản) với liều lượng khuyến cáo là 32 mL/m^2.

Bố trí thí nghiệm phòng chống bệnh bạc lá:

Công thức 1: Nhiễm *Xoo*, không nhiễm VKNS

Công thức 2A: Nhiễm VKNS khi gieo mạ, phun tế bào VKNS trước và sau khi nhiễm *Xoo*

Công thức 2B: Nhiễm VKNS khi gieo mạ, phun dịch nuôi VKNS (không chứa tế bào) trước và sau khi nhiễm *Xoo*

Công thức 3A: Nhiễm vi khuẩn biểu sinh (VKBS) khi gieo mạ, phun tế bào VKBS trước và sau khi nhiễm *Xoo*

Công thức 3B: Nhiễm VY148 khi gieo mạ, phun dịch nuôi VKBS (không chứa tế bào) trước và sau khi nhiễm *Xoo*

Công thức 4: Nhiễm *Xoo*, phun thuốc hóa học

Phương pháp điều tra đánh giá: Tiến hành điều tra ở thời điểm sau nhiễm 14 ngày. Mỗi công thức điều tra theo phương pháp 5 điểm chéo góc, mỗi điểm điều tra 5 lá, không điều tra trên các khóm lúa cạnh mép ô thí nghiệm. Thực hiện đếm số lá bị bệnh và phân cấp bệnh. Tính toán chỉ số bệnh, tỷ lệ bệnh và hiệu lực phòng trừ theo các công thức như trình bày ở mục 2.2.7.3.

2.2.7.2. Thí nghiệm ở điều kiện đồng ruộng

Thí nghiệm đồng ruộng phòng trừ bệnh bạc lá được thực hiện tại Đội 2, Quang Bắc, Hải Quang, Hải Hậu, Nam Định từ tháng 3 đến tháng 6 năm 2021 (vụ Xuân hè) trên giống lúa Bắc thơm 7. Đất ủ mạ được tưới dung dịch chứa VKNS (10^6 CFU/mL) 2 ngày trước khi gieo hạt với tỷ lệ 100 mL/m^2, trộn đều trong 10 cm đất mặt. Cây mạ sinh trưởng trên đất có bổ sung chủng VKNS trong 15 ngày trước khi đưa ra ruộng cấy. Diện tích lúa thí nghiệm là 3 luống lặp lại, mỗi luống 30 m^2 (dài × rộng là 3 m × 10 m). Trong mỗi luống, lúa được cấy từng dảnh với mật độ 42

dảnh/m^2, khoảng cách cây cách cây là 15 × 15 cm, hàng cách hàng là 16 × 16 cm. Chế độ phân bón, chăm sóc theo quy trình canh tác khuyến cáo đối với giống lúa Bắc thơm 7.

Trong giai đoạn cây lúa làm đòng đến trỗ (70 - 75 ngày tuổi), là thời điểm dễ nhiễm bệnh bạc lá, ở công thức thí nghiệm (CTTN) tiến hành phun dịch nuôi VKNS (10^6 CFU/mL) với tần suất 2 ngày 1 lần (tránh ngày mưa), tổng cộng 5 lần. Đối chứng gồm có (i) ruộng không phun thuốc (ĐC (-)) và (ii) ruộng phun thuốc hóa học Kasumil 2SL (hoạt chất Kasugamycin 2%) với liều lượng thường dùng (40 mL thuốc pha trong bình 16 L phun cho 300 – 400 m^2) ($ĐC_{ks}$).

Theo dõi tiến triển bệnh ở các ruộng thí nghiệm và đối chứng, đánh giá hiệu lực phòng trừ bệnh bạc lá 7 ngày 1 lần từ khi phun thuốc/VKNS cho đến khi thu hoạch. Cụ thể, mỗi công thức đánh dấu điều tra 10 điểm, mỗi điểm điều tra 10 dảnh/10 khóm lúa ngẫu nhiên, thực hiện đếm số lá bị bệnh và phân cấp bệnh theo thang sau: Cấp 1: < 1 % diện tích lá, hạt, bông bị bệnh; Cấp 3: Từ 1 % đến 5 % diện tích lá, hạt, bông bị bệnh; Cấp 5: Từ > 5 % đến 25 % diện tích lá, hạt, bông bị bệnh; Cấp 7: Từ > 25 % đến 50 % diện tích lá, hạt, bông bị bệnh; Cấp 9: > 50 % diện tích lá, hạt, bông bị bệnh).

Tính toán chỉ số bệnh, tỷ lệ bệnh và hiệu lực phòng trừ theo các công thức như trình bày ở mục 2.2.7.3.

2.2.7.3. Xử lý số liệu

Tính toán chỉ số bệnh và tỷ lệ bệnh theo TCVN 13268-1:2021 (Bảo vệ thực vật - phương pháp điều tra sinh vật gây hại - Phần 1: nhóm cây lương thực) bằng các công thức sau:

$$\text{Chỉ số bệnh (CSB): } CSB\ (\%) = \frac{\sum ni \times \text{vi}}{N \times K} \times 100$$

Trong đó: ni là số lá bị bệnh ở các cấp bệnh;
vi là các cấp bệnh (bệnh hại lá: cấp 1 - 9)
N là tổng số lá điều tra
K là cấp bệnh cao nhất quan sát được

$$\text{Tỷ lệ bệnh (\%)} = \frac{Số\ lá\ bị\ bệnh}{Số\ lá\ điều\ tra} \times 100$$

Hiệu lực phòng trừ được đánh giá theo công thức Abbott (Abbott, 1987):

$$H\ (\%) = \frac{C-T}{C} \times 100\ \%$$

Trong đó: C là tỉ lệ bệnh ở công thức đối chứng
T là tỉ lệ bệnh ở công thức thí nghiệm

Các yếu tố cấu thành năng suất và năng suất lúa được đánh giá theo QCVN 01-55: 2011/BNNPTNT gồm: số bông/m^2, số hạt chắc, khối lượng 1000 hạt, năng suất lý thuyết và năng suất thực tế (số liệu được tính toán n = 30 mẫu). Mẫu được thu thập theo TCVN 5451: 2008:

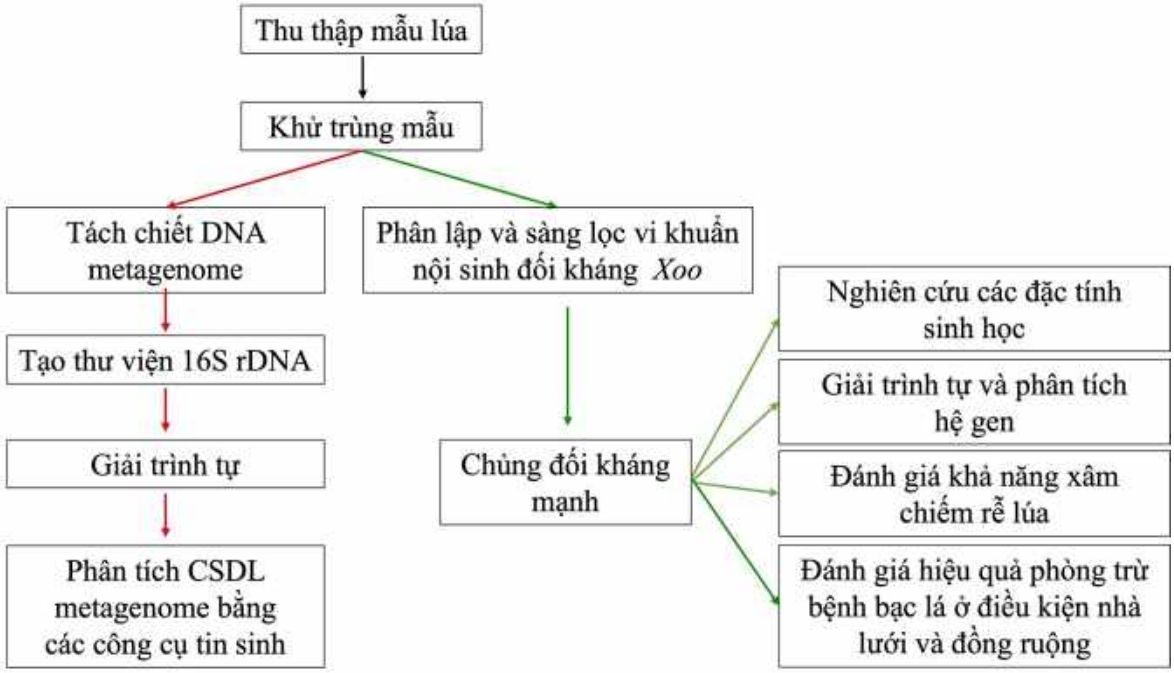
Năng suất lý thuyết (tạ/ha) = (Số bông/m^2× Số hạt chắc/bông × M 1.000 hạt)/10.000

Năng suất thực tế (tạ/ha) = (năng suất ô/30 m^2) × 10.000 m^2

2.2.8. Phân tích số liệu

Số liệu thu thập được xử lý và xây dựng đồ thị bằng phần mềm Excel (Microsoft Office, Mỹ) và GraphPad Prism 9.5.1(GraphPad Software, Mỹ). Phân tích kiểm định t (t-test) được sử dụng để đánh giá sự khác biệt có ý nghĩa, trong đó: ns - không có ý nghĩa thống kê; 0,0332 (*); 0,0021 (**); 0,0002 (***) ; < 0,0001 (****).

Sơ đồ các bước nghiên cứu



Hình 2. 2. Sơ đồ các bước nghiên cứu

CHƯƠNG III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. NGHIÊN CỨU MỐI LIÊN HỆ GIỮA HỆ VI KHUẨN NỘI SINH LÚA VÀ *Xoo*

Hệ VKNS có vai trò quan trọng trong việc kiểm soát sức khỏe của cây chủ. Trong phần nghiên cứu này, hệ VKNS của hai giống lúa bản địa có mức nhạy cảm khác nhau đối với bệnh bạc lá, cụ thể là giống Bắc thơm 7 (TB) nhạy cảm và giống IR4625 (LA) kháng bệnh được lựa chọn để phân tích bằng công cụ metagenomic. Mục tiêu nghiên cứu là để trả lời hai câu hỏi (i) vi khuẩn gây bệnh *Xoo* có thiết lập một quần xã VKNS điển hình (pathobiome) khi xâm nhập vào cây lúa hay không, và (ii) tính kháng bệnh bạc lá ở giống lúa LA có do VKNS quyết định hay không.

3.1.1. Sự đa dạng của hệ vi khuẩn nội sinh lúa qua phân tích metagenome

Tổng cộng có 30 cây lúa của các giống LA và TB (mỗi giống 15 cây) được thu thập để phân tích metagenome hệ VKNS (Bảng 2.1). Các cây lúa giống TB gồm 8 mẫu cây bị bệnh bạc lá (được chọn dựa trên các vết bệnh màu xám nâu - trắng dọc theo gân lá), và 7 mẫu cây khỏe mạnh được thu tại cùng một ruộng với cây bị bệnh. Đối với giống LA, có 15 cây khỏe được thu thập, không phát hiện mẫu bị bệnh bạc lá nào trong các đợt thu mẫu. Tiến hành cắt các mẫu rễ/thân/lá (tổng số 46 mẫu gồm: 30 mẫu lá, 8 mẫu thân, 8 mẫu rễ), khử trùng mẫu và tách chiết DNA tổng số. Sau bước tách chiết DNA thu được 43/46 mẫu (30 mẫu lá, 6 mẫu thân, 7 mẫu rễ) trong đó giống LA 23 mẫu và giống TB 20 mẫu đáp ứng các điều kiện chất lượng để giải trình tự metagenome (Phụ lục 4). Trình tự thô của các mẫu lúa được đăng ký trên GenBank với mã số BioProject PRJNA602829.

Dữ liệu giải trình tự metagenome amplicons vùng V3 - V4 của trình tự gen 16S rDNA sau khi xử lý chất lượng được mô tả cụ thể trong Phụ lục 4. Tổng số lần đọc (reads) đạt chất lượng hay tổng số trình tự đạt chất lượng của 43 mẫu là 234.803, trong đó mẫu LA là 164.829 trình tự và mẫu TB là 69.974 trình tự. Số trình tự của một mẫu dao động trong khoảng 194 - 22.676, giá trị trung bình là 5.461 (độ lệch chuẩn SD 6.072) (Bảng 3.1). Các dữ liệu trong bảng được xác định sau khi đã loại bỏ các trình tự chimera, trình tự mồi và adaptor.

Các trình tự đạt chất lượng với >97% tương đồng được sắp xếp vào các đơn vị phân loài (OTU). Số lượng OTU của giống LA từ 13 - 142, trung bình là 54,57±37,83 và của giống TB từ 12 - 121, trung bình là 41,65±34,29. Kết quả này cho thấy mẫu LA có số lượng OTU phong phú hơn so với giống TB, tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê (Bảng 3.1).

Bảng 3.1. Thông tin mẫu và số lượng trung bình của OTU theo giống và tình trạng mẫu

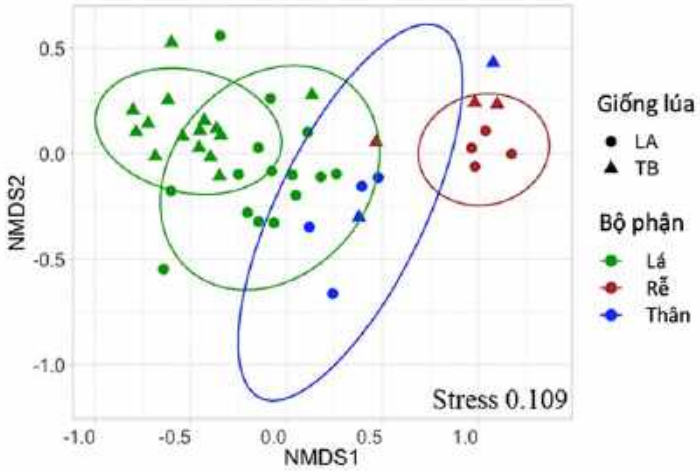
Thông số	Phân loại	Số mẫu	Số trình tự đạt chất lượng	Số OTU trung bình	*p*
Giống lúa	LA	23	164.829	54,57±37,83	0,250
	TB	20	69.974	41,65±34,29	
Tình trạng	LA (mẫu khoẻ)	23	164.829	54,57±37,83	0,407
	TB (mẫu khoẻ)	11	36.630	42,91±37,80	
	TB (mẫu bệnh)	9	33.344	40,11±31,65	0,862
	TB (mẫu khoẻ)	11	36.630	42,91±37,80	

Chao1 là chỉ số về sự phong phú của loài (tổng số loài trong một mẫu) nhạy cảm với các OTU hiếm, giá trị Chao1 cao hơn biểu thị tính đa dạng cao hơn. Kết quả phân tích alpha diversity cho thấy giá trị Chao1 của giống LA cao hơn của giống TB, nghĩa là hệ VKNS của giống LA có sự phong phú hơn so với của giống TB, đặc biệt là ở lá (p<0,05) và rễ (p=0,05) (Bảng 3.2). Giá trị cao nhất của Chao1 từ giống LA và TB tương ứng là 187,67 và 135,00, giá trị thấp nhất tương ứng là 24,00 và 21,00 (Phụ lục 5). Phân tích alpha diversity cũng chỉ ra rằng sự khác nhau về giá trị Shannon và Simpson là không đáng kể. Shannon và Simpson là chỉ số về tính đồng đều của loài (phân bố tỷ lệ thuận của số lượng từng loài trong một mẫu). Như vậy, tính đa dạng của hệ VKNS của cả hai giống lúa là tương đương nhau.

Bảng 3.2. Chỉ số đa dạng alpha của hệ VKNS của hai giống lúa LA và TB

Mẫu	Chao1			Shannon			Simpson		
	LA	TB	*p*	LA	TB	*p*	LA	TB	*p*
Tổng	77,92	55,91	0,09	2,19	2,11	0,70	0,76	0,76	0,93
Lá	55,26	39,35	**0,04**	1,88	1,84	0,75	0,71	0,72	0,84
Thân	77,85	84,29	0,69	2,23	2,73	0,40	0,76	0,87	0,49
Rễ	162,98	119,83	0,05	3,29	3,08	0,38	0,92	0,90	0,36

Phương pháp tọa độ (ordination) là một thuật ngữ chung cho các kỹ thuật đa biến, được sử dụng trong sinh thái học để mô tả mối quan hệ giữa các kiểu thành phần loài và biến thiên môi trường cơ bản. Phương pháp này được sử dụng phổ biến trong các phân tích thống kê với những bộ dữ liệu lớn (big data), giúp trực quan hoá một tập dữ liệu đa chiều bằng cách chiếu lên một không gian chiều thấp. Phân tích độ đa dạng beta sử dụng phương pháp toạ độ (ordination) chia tỷ lệ đa chiều không theo hệ mét (non-metric multidimensional scaling - NMDS) cho thấy hệ VKNS của hai giống lúa TB và LA có độ tương đồng khá cao (p = 0,023) (Hình 3.1) (Phụ lục 6). Xét theo các bộ phận khác nhau trên cây lúa, giống TB phân bố dọc theo trục thứ nhất cho thấy hệ VKNS có tính biến đổi cao hơn (p = 0,001) so với giống LA (p = 0,02). Ở cả hai giống lúa, hệ VKNS của lá và thân tương đối gần gũi (có sự tương đồng), trong khi thể hiện khác biệt lớn với hệ VKNS của rễ (tạo thành một cụm riêng biệt trên đồ thị NMDS).



Hình 3.1. Biểu đồ chia tỷ lệ đa chiều không theo hệ mét NMDS dựa trên mức đơn vị phân loại OTU của hai giống lúa LA và TB. Hình elip cho thấy khoảng tin cậy 95% (p<0,05) cho mỗi nhóm mẫu.

Như vậy, cấu trúc hệ VKNS của hai giống lúa LA và TB không khác biệt đáng kể nếu xét theo giống lúa hay vị trí canh tác, tuy nhiên sự khác biệt rõ rệt được phát hiện khi xét theo các bộ phận của cây cụ thể là lá/thân so với rễ. Kết quả này cũng tương đồng với kết quả đã được báo cáo bởi một số tác giả khi so sánh hệ VKNS lúa trồng tại Indonesia và Nhật Bản (Krishnamoorthy et al., 2021; Kumar et al., 2021). Kết quả này cũng góp phần khẳng định vai trò của các bộ phận khác nhau ở

thực vật trong việc thu hút VKNS. Rễ thường có hệ VKNS đa dạng nhất và chịu sự chi phối của dịch tiết rễ và các chất chuyển hóa của VSV vùng rễ.

Bảng 3.3. Các OTU chiếm ưu thế theo cấp phân loại trong hệ VKNS của hai giống lúa LA và TB

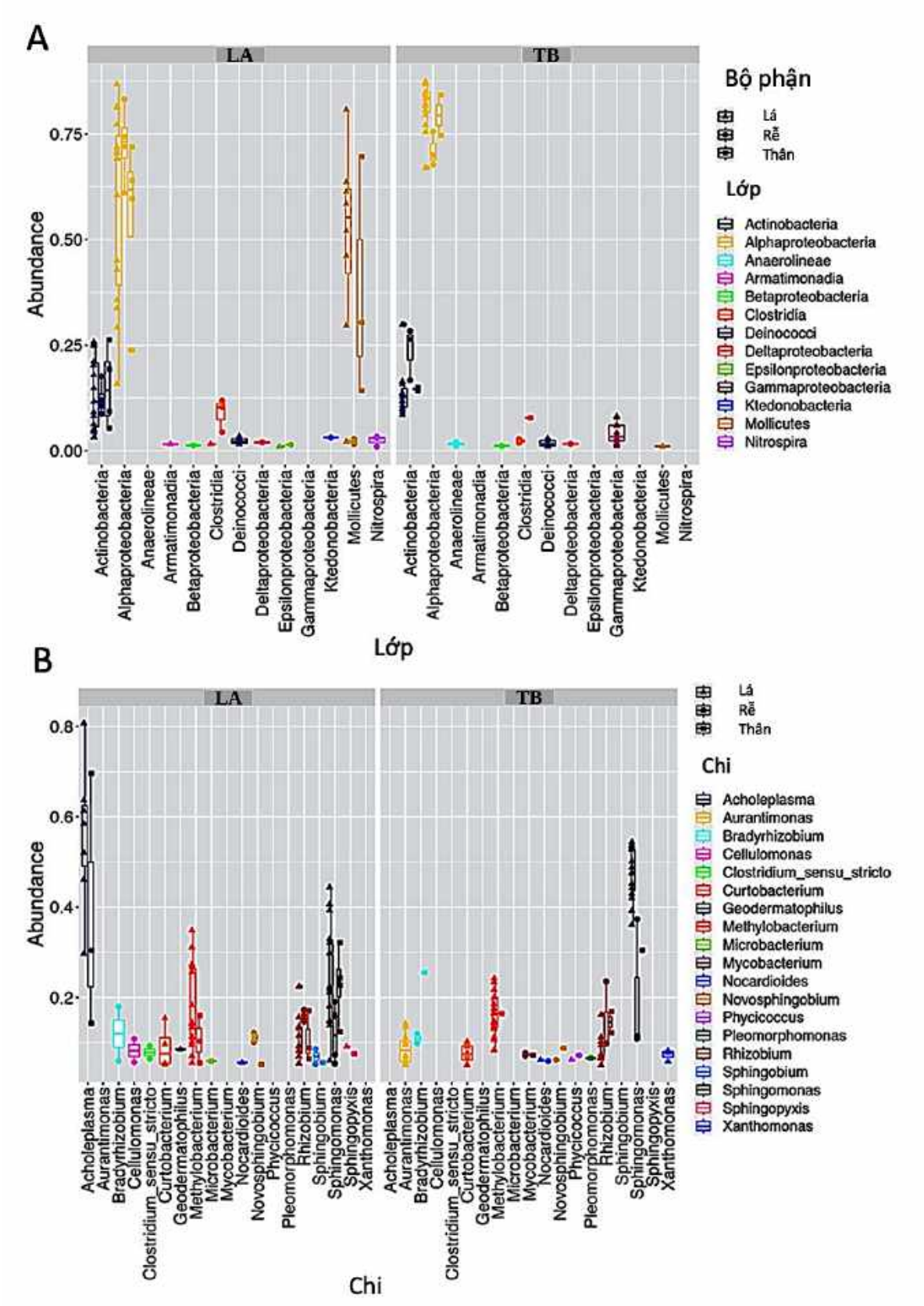
Cấp phân loại		LA (%)	TB (%)
Ngành	**Actinobacteria**	**13,59**	**15,22**
	Armatimonadetes	0,24	0,06
	Chloroflexi	0,35	0,30
	Deinococcus-Thermus	0,77	0,70
	Firmicutes	1,40	0,75
	Nitrospirae	0,38	0,01
	Proteobacteria	**60,90**	**82,80**
	Tenericutes	**22,30**	**0,09**
Lớp	**Actinobacteria**	**13,60**	**15,20**
	Alphaproteobacteria	**60,10**	**79,90**
	Anaerolineae	0,10	0,23
	Armatimonadia	0,23	0,06
	Betaproteobacteria	0,19	0,13
	Clostridia	1,40	0,74
	Deinococci	0,77	0,70
	Deltaproteobacteria	0,33	0,16
	Epsilonproteobacteria	0,23	0,02
	Gammaproteobacteria	0,07	2,57
	Mollicutes	**22,30**	**0,09**
	Nitrospira	0,38	0,01
Chi	***Acholeplasma***	**22,30**	**0,09**
	Aurantimonas	0,82	5,91
	Bradyrhizobium	1,39	2,50
	Curtobacterium	3,02	4,29
	Geodermatophilus	1,28	0,73
	Kineococcus	1,19	2,01
	Methylobacterium	**13,18**	**13,44**
	Mycobacterium	1,36	1,95
	Nocardioides	1,14	1,22
	Novosphingobium	2,09	1,21
	Phycicoccus	0,24	1,06
	Rhizobium	**10,22**	**8,56**
	Sphingomonas	**21,99**	**40,24**
	Sphingopyxis	1,92	0,41
	Xanthomonas	0,00	1,82

Bộ dữ liệu metagenome của giống lúa LA và TB được xếp vào 232 đơn vị phân loại OTU (169 OTU thuộc giống lúa TB và 216 OTU thuộc giống lúa LA), gồm 17 ngành, 31 lớp, 48 bộ, 98 họ và 232 chi. Các OTU chiếm ưu thế theo các cấp phân loại ngành, lớp và chi được trình bày trong Bảng 3.3.

Ở cấp độ ngành, Proteobacteria chiếm ưu thế nhất với 82,80% và 60,90% ở giống lúa TB và LA. Tiếp theo là Actinobacteria chiếm ưu thế thứ hai (15,22%) ở giống lúa TB và vị trí thứ ba với 13,59% ở giống lúa LA. Ngành Tenericutes được phát hiện với độ phong phú tương đối cao (22,32%), tập trung ở thân và lá, là ngành chiếm ưu thế thứ hai ở giống lúa LA, trong khi chỉ chiếm phần rất nhỏ trong hệ VKNS ở giống lúa TB (0,09%). Ngoài ra, một số ngành được phát hiện ở cả hai giống lúa với độ phong phú thấp (<1%), như Firmicutes, Deinococcus-Thermus, Chloroflexi và Nitrospirae.

Ở cấp độ lớp, Alpha-proteobacteria chiếm ưu thế nhất ở cả giống TB và LA (lần lượt là 79,90% và 60,10%), tiếp theo là Actinobacteria (lần lượt là 15,22% và 13,59%). Tương ứng với ngành Tenericutes chiếm ưu thế thứ hai ở giống lúa LA, lớp Mollicutes chỉ được tìm thấy ở giống này với độ phong phú cao (22,32%), tập trung ở lá và thân (Hình 3.1). Chiếm ưu thế thứ ba ở giống lúa TB là Gamma-proteobacteria (2,57%), trong khi ở giống LA là Clostridia (1,40%). Các lớp có độ phong phú <1% bao gồm: Anaerolineae, Armatimonadia, Deinococci, Epsilon-proteobacteria, Deltaproteobacteria….

Ở cấp độ chi, hệ VKNS ở giống lúa TB có tính đa dạng thấp hơn (169 chi) so với giống lúa LA (216 chi). Các chi chiếm ưu thế ở cả hai giống lúa gồm *Sphingomonas, Rhizobium, Methylobacterium* và *Curtobacterium*, trong đó chi *Sphingomonas* có tỷ lệ cao nhất, chiếm 40,24% ở giống lúa TB và 21,99% ở giống lúa LA. Các chi *Methylobacterium, Rhizobium* và *Curtobacterium* được tìm thấy ở cả hai giống lúa với tỷ lệ thấp hơn, lần lượt là 13,44%, 8,56%, và 4,29% ở giống lúa TB và 13,18%, 10,22%,và 3,02% ở giống lúa LA. Đặc biệt, chi *Acholeplasma* được tìm thấy với tỷ lệ khá cao ở giống LA (22,3%), tập trung chủ yếu ở lá và thân, nhưng chỉ xuất hiện với tỷ lệ rất nhỏ (0,09%) ở giống TB (Hình 3.2).



Hình 3.2. Sự đa dạng của hệ VKNS trong các bộ phận rễ/thân/lá lúa ở cấp độ lớp (độ phong phú tương đối > 0,01) (A) và chi (độ phong phú tương đối > 0,05) (B) của hai giống lúa LA và TB.

Thành phần các chi chiếm tỷ lệ thấp (<5%) trong các bộ phận của cây có sự khác biệt lớn hơn ở hai giống lúa. Chi *Aurantimonas* và *Xanthomonas* chiếm tương ứng 5,91% và 1,82% hệ VKNS ở giống TB nhưng chỉ xuất hiện với tỷ lệ 0,82% và 0,003% ở giống LA. Ngược lại, chi *Sphingopyxis* được tìm thấy ở giống LA với tỷ lệ 1,92%, cao hơn so với ở giống TB chỉ là 0,41%. So sánh đa dạng VKNS trong các bộ phận của cây lúa cũng chỉ ra rằng hệ VKNS trong rễ/thân lúa có sự đa dạng hơn trong lá (Hình 3.2).

Ngoài các chi chiếm ưu thế kể trên, trong rễ còn có sự xuất hiện của các chi *Bradyrhizobium, Celullomonas, Clostridium sensu stricto, Pleomorphomonas, Novosphingobium*… Tuy nhiên, *Sphingomonas* xuất hiện nhiều ở cả rễ/thân và lá lúa. *Sphingomonas* spp. phân bố rộng rãi trong tự nhiên nhờ khả năng tồn tại ở các môi trường nghèo dinh dưỡng và khả năng sử dụng nhiều nguồn carbon khác nhau (Balkwill et al., 2006). Việc *Sphingomonas* được tìm thấy ở tất cả các bộ phận của cây lúa có thể được giải thích bằng khả năng thích ứng cao của các loài thuộc chi này trong các điều kiện môi trường khác nhau.

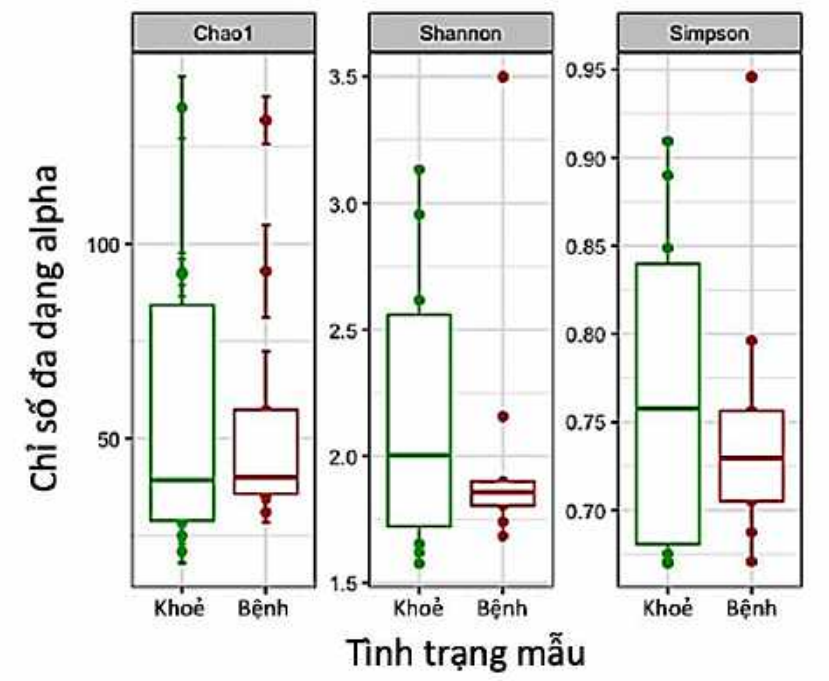
Các kết quả tương đồng về hệ VKNS rễ và thân lúa cũng đã được công bố. Kunda et al. (2018) đã báo cáo hệ VKNS trong rễ lúa trồng tại một số nơi ở Ấn Độ gồm 04 ngành chính là Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes và Spirochaetae, trong đó Proteobacteria chiếm ưu thế nhất với hơn 99% và lớp Alphaproteobacteria cũng chiếm ưu thế tuyệt đối với 88 – 99% (Kunda et al., 2018). Krishnamoorthy et al. (2021) đã báo cáo thành phần hệ vi khuẩn nội sinh hai giống lúa Kalonunia và Dehradun Basmati trồng tại Indonesia bao gồm: Proteobacteria (49,37%), Actinobacteria (28,66%), Firmicutes (4,11%), Bacteroidetes (0,94%). Tổng số OTU ở các mẫu rễ là 365 trong khi ở các mẫu ngọn là 302. Ở rễ, các chi chiếm ưu thế bao gồm: *Sphingomonas* (9,23%), *Caulobacter* (7,69%), *Methylobacterium* (3,07%), *Microbacterium* (3,07%). Các chi phổ biến ở ngọn là *Sphingobium* (37,50%), *Sphingomonas* (8,33%), *Corynebacterium* (6,25%). Mức đa dạng của VKNS ở rễ thường cao hơn so với thân và lá là do sự xâm nhập của VKNS thường bắt đầu từ rễ rồi di chuyển đến các bộ phận khác trong cây (Kumar et al., 2020b).

Như vậy, mặc dù có sự tương đồng đáng kể về cấu trúc, hệ VKNS giữa hai giống lúa LA và TB có sự khác biệt rõ rệt trong thành phần của các ngành, lớp, và chi ưu thế, đặc biệt là sự hiện diện và độ phong phú của ngành Tenericutes/lớp Mollicutes và chi *Acholeplasma* ở giống LA, cũng như các chi đặc trưng cho từng giống. Những khác biệt này không chỉ phản ánh sự đa dạng sinh học mà còn có thể liên quan đến các chức năng sinh lý khác nhau mà các hệ vi khuẩn nội sinh mang lại cho mỗi giống lúa (ảnh hưởng đến sức khỏe, khả năng thích nghi và năng suất). Hơn nữa, kết quả phân tích cũng cho thấy các bộ phận của cây (rễ so với thân/lá) đóng vai trò quan trọng hơn giống lúa trong việc định hình cấu trúc và tính đa dạng của hệ VKNS, cụ thể là rễ thường có hệ VKNS đa dạng hơn so với thân/lá.

3.1.2. So sánh hệ vi khuẩn nội sinh của cây lúa khỏe mạnh và cây lúa bị bệnh để đánh giá ảnh hưởng của *Xoo* tới hệ vi khuẩn nội sinh lúa (*Xoo*-pathobiome)

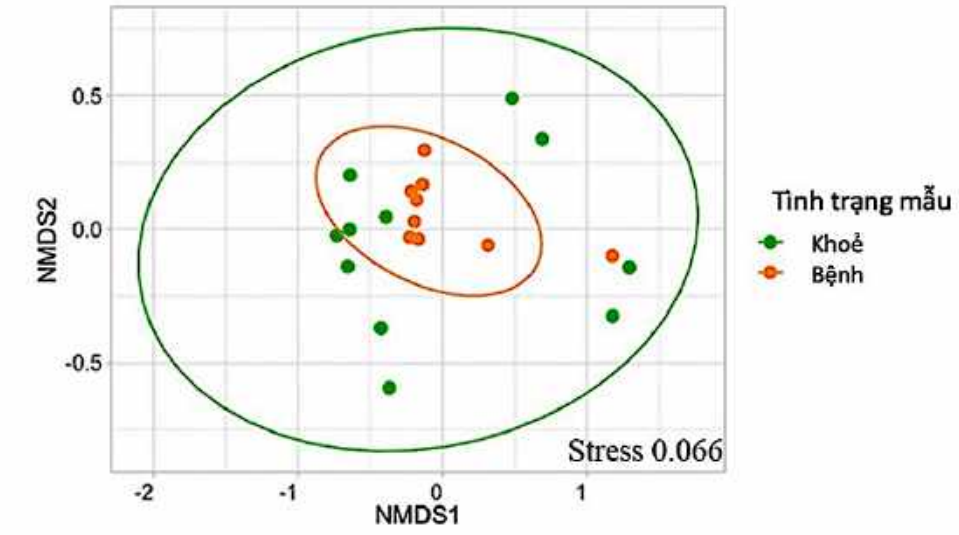
Hệ VKNS chịu ảnh hưởng của nhiều yếu tố khác nhau, bao gồm các giai đoạn sinh trưởng của cây và các điều kiện môi trường (đất đai, khí hậu) (Kunda et al, 2018). Trong các bộ phận khác nhau của cây, hệ VKNS rễ phụ thuộc phần lớn vào sinh thái đất, trong khi hệ VKNS các bộ phận trên mặt đất chịu ảnh hưởng nhiều hơn bởi các điều kiện môi trường như khí hậu, mầm bệnh và kỹ thuật canh tác (Compant et al., 2019; Bez et al., 2021). Sự hiện diện của các tác nhân gây bệnh thực vật trong cây chủ thường dẫn đến sự suy giảm tính đa dạng và thay đổi thành phần của hệ VKNS (Bulgari et al., 2014; Fadiji & Babalola, 2020). Ngược lại, hệ VKNS đa dạng hơn sẽ hỗ trợ tốt hơn cho cây chủ chống lại các tác nhân gây bệnh (Podolich et al., 2015).

Nhằm đánh giá ảnh hưởng của *Xoo* đến sự phong phú và đa dạng của hệ VKNS, các phân tích so sánh chỉ số đa dạng alpha, beta và thành phần hệ VKNS trong mẫu lúa khoẻ mạnh và mẫu lúa bệnh của giống TB đã được tiến hành. Kết quả phân tích cho thấy, chỉ số Chao1 của các mẫu lúa khoẻ mạnh và mẫu lúa bệnh cao tương đương nhau chứng tỏ mức độ phong phú loài dự kiến của hai nhóm mẫu không có sự khác biệt. Chỉ số Shannon và Simpson của mẫu lúa bệnh thấp hơn đáng kể so với các mẫu khỏe mạnh, có nghĩa là tính đồng đều của hệ VKNS trong hai loại mẫu đã có sự khác biệt (Hình 3.3).

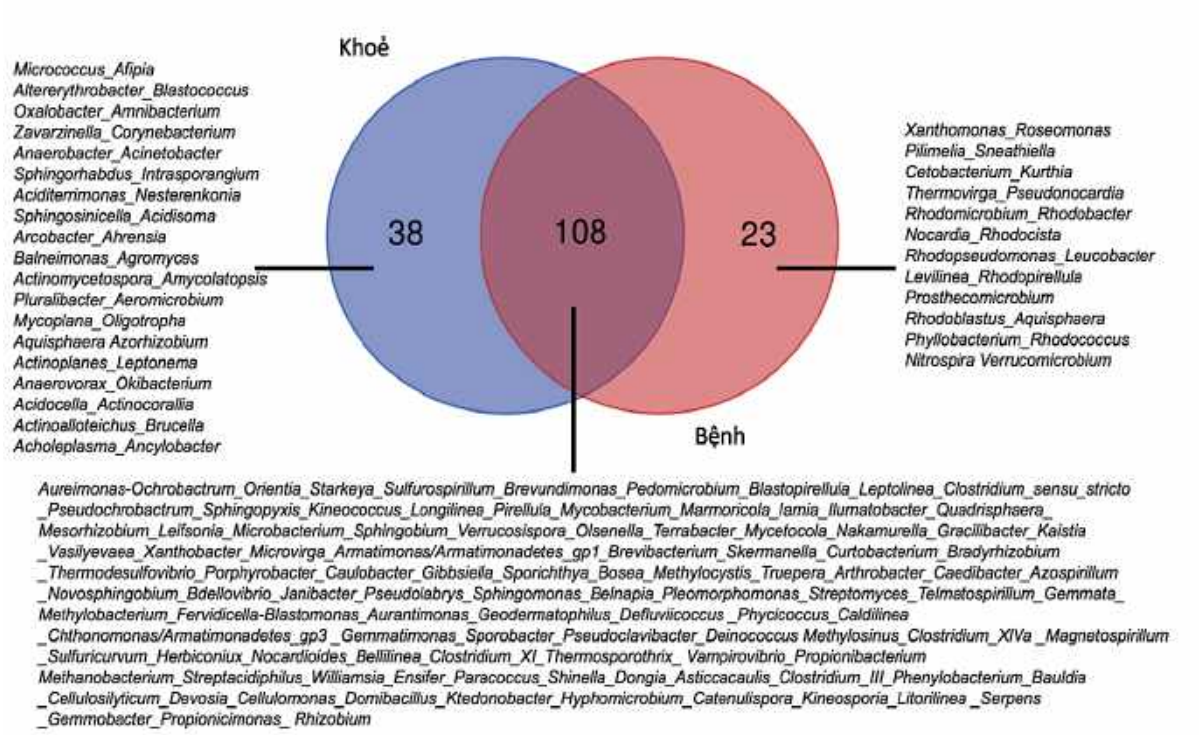


Hình 3.3. Đánh giá đa dạng alpha (theo ba chỉ số Chao1, Shannon và Simpson) của hệ VKNS ở các mẫu khỏe mạnh và mẫu nhiễm bệnh bạc lá giống lúa TB.

Kết quả phân tích độ đa dạng beta trên biểu đồ chia tỷ lệ đa chiều không theo hệ mét NMDS cho thấy, hệ VKNS của các mẫu TB bị bệnh bạc lá không khác biệt đáng kể so với mẫu khoẻ (p = 0,062) (Phụ lục 7), nhưng tạo thành một cụm phụ trong hệ VKNS của các mẫu khỏe mạnh (Hình 3.4).



Hình 3.4. Biểu đồ chia tỷ lệ đa chiều không theo hệ mét NMDS dựa trên mức đơn vị phân loại OTU của mẫu lúa khoẻ mạnh và mẫu lúa bệnh giống lúa TB. Hình elip cho thấy khoảng tin cậy 95% (p<0,05) cho mỗi loại mẫu



Hình 3. 5. Biểu đồ Venn hiển thị số lượng OTU chung và riêng giữa các mẫu khỏe mạnh và các mẫu nhiễm bệnh của giống TB

Số lượng các chi VKNS đồng xuất hiện hoặc chỉ xuất hiện ở các mẫu lúa khoẻ mạnh và mẫu lúa bệnh của giống TB được hiển thị trong biểu đồ Venn (Hình 3.5). Tổng cộng 108 chi được tìm thấy ở cả hai loại mẫu trong khi đó số lượng chi chỉ được tìm thấy trong hệ VKNS của các mẫu lúa khoẻ mạnh và mẫu lúa bệnh lần lượt là 38 và 23 chi.

Thành phần và độ phong phú tương đối (relative abundance) trung bình của các OTU chiếm ưu thế ở cấp phân loại ngành, lớp và chi của các mẫu lúa khoẻ và mẫu lúa bệnh giống TB được trình bày trong Bảng 3.4. Ngành Proteobacteria chiếm ưu thế nhất trong các mẫu khoẻ và mẫu bệnh, lần lượt là 80,93% và 85,09%. Ngành Actinobacteria được tìm thấy với mật độ trung bình và cao tương đương nhau đạt 16,49% ở mẫu khoẻ và 13,66% ở mẫu bệnh. Các ngành Chloroflexi, Deinococcus-Thermus, Firmicutes và Tenericutes được phát hiện với mật độ thấp trong cả hai loại mẫu (Bảng 3.4). Ở cấp độ lớp, các lớp phổ biến nhất là Alphaproteobacteria và Gammaproteobacteria, (ngành Proteobacteria), Actinobacteria (ngành Actinobacteria). Lớp Gammaproteobacteria chủ yếu được đại diện bởi các chi *Gibbsiella, Serpens* và *Xanthomonas*.

Sự khác biệt có ý nghĩa giữa độ phong phú của mẫu khỏe và nhiễm bệnh được tính toán bằng kiểm định t (t-test). Ở mẫu lá khoẻ, các chi *Aurantimonas, Bradyrhizobium, Phycicoccus, Nocardioides, Marmoricola* có độ phong phú cao hơn so với ở mẫu bệnh. Ngược lại, các chi *Sphingomonas, Methylobacterium, Curtobacterium, Sphingopyxis* ở mẫu lá bệnh phổ biến hơn so với ở mẫu lá khoẻ. Ở cấp phân loại lớp, lớp Gammaproteobacteria có sự khác biệt rõ rệt giữa các hệ vi khuẩn của mẫu khoẻ và mẫu bệnh (p=0,009). Lớp Gammaproteobacteria bao gồm các chi chiếm ưu thế là *Serpens, Gibbsiella* và *Xanthomonas* nhưng chỉ có chi *Xanthomonas* thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa (p=0,0001) giữa hai loại mẫu được nghiên cứu (Bảng 3.4).

Bảng 3.4. Các OTU chiếm ưu thế theo cấp phân loại trong hệ VKNS của giống TB

Cấp phân loại		**Cây khoẻ (%)**	**Cây bệnh (%)**	***p* (t-test)**
Ngành	Actinobacteria	16,49	13,66	0,317
	Chloroflexi	0,35	0,22	0,688
	Deinococcus-Thermus	0,96	0,39	0,123
	Firmicutes	1,09	0,35	0,392
	Proteobacteria	80,93	85,09	0,186
	Tenericutes	0,05	0,15	0,391
Lớp	Actinobacteria	16,49	13,66	0,317
	Alphaproteobacteria	79,30	80,68	0,643
	Anaerolineae	0,28	0,16	0,610
	Betaproteobacteria	0,13	0,14	0,942
	Clostridia	1,07	0,34	0,388
	Deinococci	0,96	0,39	0,123
	Deltaproteobacteria	0,24	0,06	0,329
	Gammaproteobacteria	**1,23**	**4,21**	**0,009**
	Mollicutes	0,05	0,15	0,391
Chi	*Agromyces*	0,16	0,15	0,969
	Aurantimonas	6,90	4,71	0,273
	Bradyrhizobium	3,44	1,34	0,479
	Brevundimonas	0,35	0,51	0,536
	Curtobacterium	3,72	5,00	0,400
	Deinococcus	0,93	0,93	0,133
	Geodermatophilus	0,58	0,92	0,321
	Gibbsiella	0,60	0,03	0,098
	Kineococcus	1,86	2,18	0,644
	Marmoricola	0,22	0,04	0,100

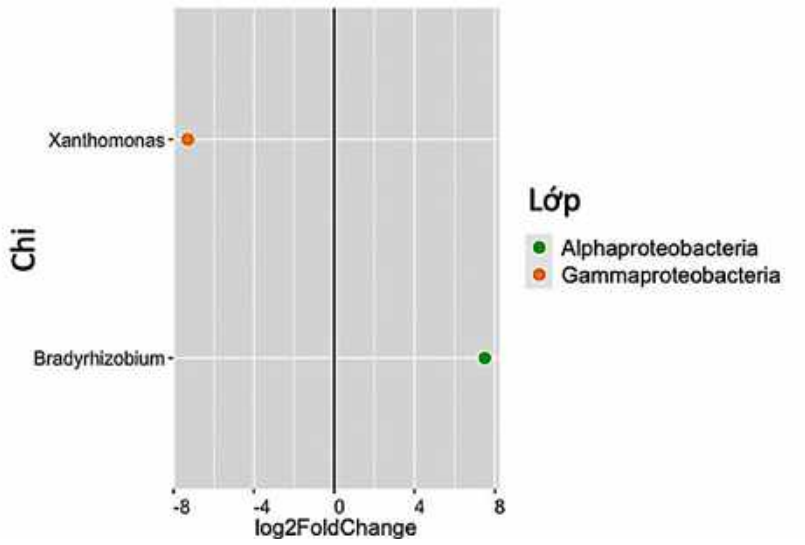
Cấp phân loại		Cây khoẻ (%)	Cây bệnh (%)	*p* (t-test)
	Methylobacterium	11,53	15,79	0,218
	Microbacterium	0,76	0,76	0,989
	Mycobacterium	2,49	1,29	0,314
	Nocardioides	1,75	0,57	0,147
	Novosphingobium	1,59	0,75	0,452
	Ochrobactrum	0,33	0,16	0,390
	Phycicoccus	1,79	0,16	0,077
	Rhizobium	8,30	8,88	0,825
	Serpens	0,59	0,11	0,129
	Sphingobium	0,80	0,51	0,537
	Sphingomonas	38,30	42,60	0,541
	Sphingopyxis	0,20	0,66	0,060
	Xanthomonas	**0,00**	**4,05**	**<0,001**

Tiến hành so sánh hệ VKNS trong các mẫu cây bị bệnh bạc lá và mẫu cây khỏe mạnh của giống lúa TB dựa trên phân tích sự khác biệt tuyến tính (linear discriminant analysis) bằng công cụ DESeq2. DESeq2 sử dụng một mô hình thống kê để tính toán sự khác biệt trong biểu hiện gen giữa hai hoặc nhiều nhóm mẫu. Mỗi điểm dữ liệu biểu thị một chi (trục y) được xác định là khác biệt đáng kể giữa các mẫu lúa khỏe mạnh và mẫu lúa bị bệnh. Các giá trị âm của log2 fold change (trục x) biểu thị độ phong phú tương đối cao hơn trong các mẫu bị bệnh của giống TB và các giá trị dương biểu thị độ phong phú tương đối cao hơn trong các mẫu khỏe mạnh. Kết quả chỉ ra rằng hai chi *Xanthomonas* và *Bradyrhizobium* có tỷ lệ khác biệt nhất (Hình 3.6) (Phụ lục 8). Chi *Bradyrhizobium* xuất hiện với tỷ lệ trung bình 3,44% trong thân và rễ của mẫu lúa TB khoẻ mạnh, cao hơn so với giá trị trung bình 1,34% ở mẫu lúa bệnh nhưng có sự khác biệt rất lớn khi phân tích so sánh theo cặp mẫu bằng phân tích sự khác biệt tuyến tính.

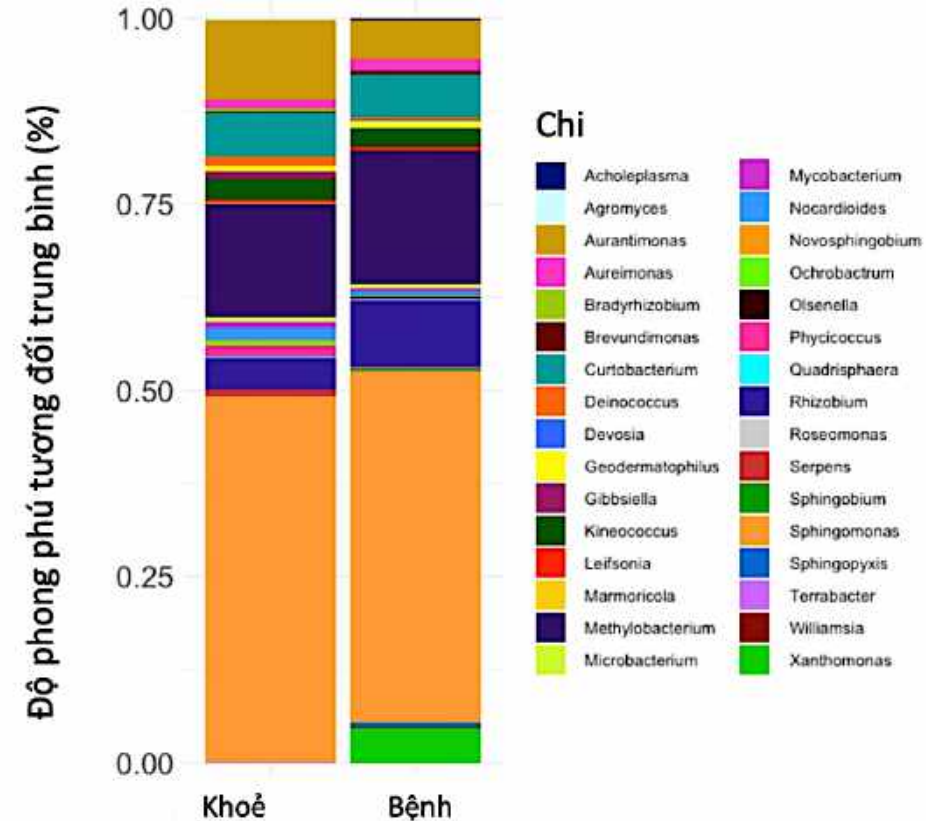
Ngược lại, chi *Xanthomonas* thể hiện sự khác biệt rất lớn trong hai loại mẫu khi phân tích so sánh bằng hai phương pháp. Chi *Xanthomonas* có mặt với tỷ lệ cao trong các mẫu lúa bị bệnh (4,05%) và chỉ có trong các mẫu lá (Hình 3.7).

Các phân tích trên cho thấy, sự có mặt của *Xoo* ở lá không gây sự thay đổi đáng kể trong thành phần của hệ VKNS . Tỷ lệ *Xanthomonas* cao trong các mẫu lúa TB bị bệnh bạc lá rất có thể là một yếu tố làm thay đổi tính đa dạng và đồng đều

của hệ VKSN so với các mẫu lúa TB khỏe mạnh. Tuy nhiên, không xác định được các loài VNKS khác thay đổi tỷ lệ rõ rệt (tăng hoặc giảm) khi có mặt *Xoo.* Nói cách khác, không xác định được sự thiết lập hệ VSV gây bệnh (pathobiome) đặc trưng đối với *Xoo*.



Hình 3.6. So sánh sự khác biệt về hệ VKNS (cấp độ chi) ở cây lúa bị bệnh bạc lá và cây lúa khỏe mạnh của giống lúa TB. So sánh khác biệt tuyến tính dựa trên DESeq2 ($p<0,05$).



Hình 3.7. Thành phần hệ VKNS ở cấp độ chi (relative abundance >0,001) trong mẫu lá khoẻ và mẫu lá bệnh của giống TB

Hệ VKNS liên quan tới tác nhân gây bệnh (pathobiome) chịu ảnh hưởng của nhiều yếu tố, gồm (i) các chất kháng khuẩn do tác nhân gây bệnh sản sinh ra, (ii) nguồn dinh dưỡng (carbon và nitơ) khả dụng bị cạnh tranh, (iii) phản ứng miễn dịch tại chỗ và toàn hệ thống của thực vật, và (iv) tín hiệu tương tác giữa thực vật - vi khuẩn và vi khuẩn - vi khuẩn (Bez et al., 2021). Trong những điều kiện cụ thể, tác nhân gây bệnh khiến hệ VSV nội sinh thay đổi và tạo điều kiện cho sự thiết lập của bệnh (Mannaa & Seo, 2021).

Tác nhân gây bệnh thực vật có thể tương tác với các loài nội sinh vô hại khác theo hướng có lợi về mặt trao đổi chất và làm tăng mức độ nghiêm trọng của bệnh. Buonaurio và cs. (2015) đã phát hiện vi khuẩn *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* gây bệnh u bướu trên cành ô liu truyền tín hiệu quorum (quorum sensing) với VKNS *Erwinia toletana* vô hại sống trong các u bướu khiến bệnh nặng hơn. Nhóm tác giả cũng báo cáo việc đồng thời nhiễm các loài *Pantoea* và *Erwinia* với *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* kích thích vi khuẩn xâm chiếm, khai thác chất dinh dưỡng, phá vỡ khả năng phòng vệ của cây và tăng kích thước các cục bướu (Buonaurio et al., 2015).

Tác nhân gây bệnh thực vật cũng có thể thay đổi cấu trúc của hệ VKNS và thiết lập các điều kiện thuận lợi cho chúng tồn tại và xâm chiếm cây chủ. Kim và cs. (2020) đã báo cáo vi khuẩn *Burkholderia glumae* tương tác với các VKNS trên lúa thông qua hệ thống bài tiết T6SS, dẫn đến giảm quần thể của các vi khuẩn có lợi như *Luteibacter* và *Dyella* có vai trò thúc đẩy sự phát triển của cây và góp phần bảo vệ cây chống lại vi khuẩn gây bệnh (Kim et al., 2020). Phân tích metagenomic cũng cho thấy những thay đổi đáng kể trong cấu trúc hệ VKNS trên cây lúa bị nhiễm bệnh so với cây khỏe mạnh hoặc cây bị nhiễm đột biến *B. glumae* khuyết thiếu T6SS (Kim et al., 2020). Nấm *Magnaporthe oryzae* gây bệnh đạo ôn khi nhiễm vào cây lúa cũng làm thay đổi cấu trúc hệ VKNS trong lá và hạt tại vị trí nhiễm, đồng thời làm giảm tỷ lệ VNKS có nguồn gốc từ đất (Dastogeer et al., 2022). Một số tác nhân gây bệnh thực vật có thể liên kết với các tác nhân gây bệnh khác hoặc các vi khuẩn cộng sinh ở thực vật, dẫn đến tương tác đa loài phức tạp, làm tăng mức độ nghiêm trọng của bệnh (Bez et al., 2021). Musonerimana và cs. (2020) đã chứng

minh hệ VSV gây bệnh trong các mẫu lúa nhiễm bệnh thối bẹ thay đổi theo vị trí canh tác và điều kiện môi trường. Phân tích metagenome cho thấy ở các vùng đất cao tác nhân gây bệnh chính là *Pseudomonas fuscovaginae* bất kể mùa khô hay mùa mưa và không phụ thuộc giống lúa. Tuy nhiên, ở các vùng đất thấp và vào mùa mưa, mật độ của *P. fuscovaginae* thấp trong khi các loài nấm *Sarocladium oryzae*, *Bipoloris* và *Fusarium* lại chiếm ưu thế trong các cây mắc bệnh thối bẹ. Do đó, thối bẹ là một căn bệnh phức tạp liên quan đến nhiều loại tác nhân gây bệnh (Musonerimana et al., 2020). Bez và cs. (2021) đã chứng minh vi khuẩn *Dickeya zeae* gây bệnh thối gốc lúa làm thay đổi hệ VKNS về thành phần loài, số lượng và sự phong phú dẫn đến sự hình thành pathobiome liên quan đến trạng thái bệnh. Tổng số chi được tìm thấy ở cả mẫu khoẻ và mẫu bệnh là 140, có 40 chi xuất hiện ở riêng mẫu khoẻ nhưng có tới 158 chi chỉ xuất hiện ở mẫu bệnh. Các chi *Aridibacter, Candidatus-Koribacter, Kineococcus, Vicinamibacter, Planctomycetes, Dysgonomonas, Microbacter* xuất hiện với tỷ lệ cao ở các mẫu lúa khoẻ mạnh trong khi đó các chi *Paludibaculum, Bryobacter, Curtobacterium, Kineosporia, Paludibacter* chiếm ưu thế ở các mẫu lúa bệnh. *D. zeae* xâm nhập vào cây qua rễ và di chuyển lên thân cây do đó đã gây ảnh hưởng lớn đến hệ VKNS. Cụ thể là một số loài vi khuẩn kỵ khí có thể đã tham gia vào sự tiến triển của bệnh thông qua việc tạo điều kiện cho quá trình xâm chiếm, biểu hiện các yếu tố độc lực và làm giảm khả năng kháng của cây chủ. Nhóm tác giả cũng đề xuất bệnh thối gốc lúa có thể là kết quả của sự tương tác giữa nhiều loài chứ không chỉ do một tác nhân gây bệnh duy nhất (Bez et al., 2021).

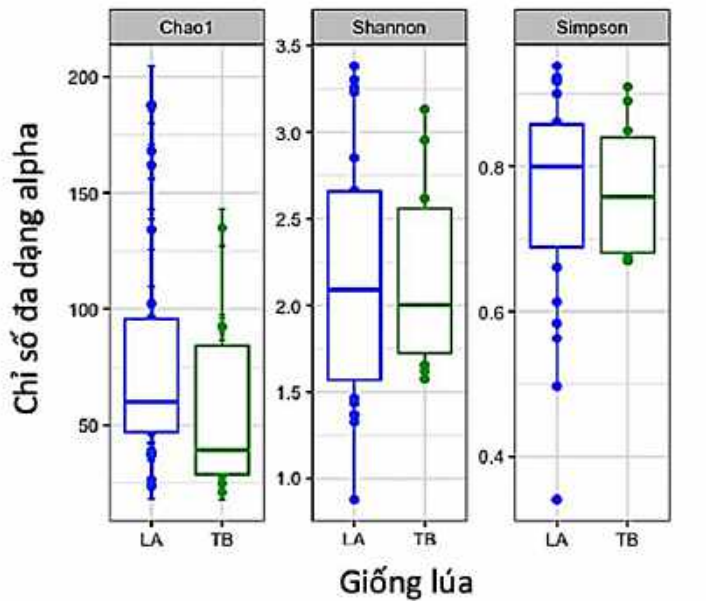
Khác với bệnh thối gốc do *D. zeae* nhiễm từ rễ, *Xoo* xâm nhập qua vết thương hoặc thuỷ khổng ở lá, di chuyển theo hệ thống mạch dẫn, do đó rất có thể không gây ảnh hưởng lớn đến hệ VKNS của cây lúa. Như vậy, mỗi tác nhân gây bệnh có cơ chế và tác động khác nhau đến hệ VSV của cây chủ. Không thể khái quát hóa vai trò của hệ VKNS và những tương tác sinh học có thể có dẫn tới bệnh thực vật.

Như vậy, các phân tích trong nghiên cứu này cho thấy sự có mặt của *Xoo* trong mẫu lúa TB đã ảnh hưởng đến tính đa dạng và đồng đều của hệ VKNS. Tuy nhiên, ngoài chi *Xanthomonas* xuất hiện với tỷ lệ cao trong các mẫu lúa bệnh, các

phân tích không xác định được sự thay đổi tỷ lệ rõ rệt ở các chi VKNS chiếm ưu thế khác (tăng hoặc giảm) khi có mặt *Xoo*. Các bằng chứng thu được chỉ ra rằng không có dấu hiệu rõ ràng về việc thiết lập một hệ VSV gây bệnh đặc trưng và rộng khắp do *Xoo* gây ra (*Xoo*-pathobiome) ở giống lúa TB. Nguyên nhân được đề xuất là do vi khuẩn *Xoo* xâm nhập vào cây lúa từ lá qua khí khổng và các vết thương, khó ảnh hưởng đến hệ VKNS được cho là chủ yếu xâm nhập từ rễ.

3.1.3. So sánh hệ vi khuẩn nội sinh ở hai giống lúa TB và LA để xác định nhóm vi khuẩn liên quan tính kháng bệnh bạc lá ở giống lúa LA

Giống Bắc thơm 7 (TB) du nhập vào Việt Nam từ năm 1998 và được trồng rộng rãi ở vùng đồng bằng sông Hồng. Giống lúa này mẫn cảm cao với bệnh bạc lá, thiệt hại năng suất hàng năm khoảng 25-30% (có khi tới 50%) (Cục Trồng trọt). Giống IR4625 (LA) được trồng chủ yếu ở đồng bằng sông Cửu Long và cho đến nay chưa có báo cáo về dịch bệnh bạc lá trên giống lúa này. Việc so sánh hệ VKNS trong các mẫu lúa khoẻ mạnh của hai giống lúa này được tiến hành nhằm xác định nhóm VKNS có thể liên quan tới tính kháng bệnh bạc lá của giống lúa LA. Kết quả phân tích đa dạng alpha của hệ VKNS ở các mẫu khoẻ mạnh của hai giống lúa cho thấy chỉ số Chao1 ở giống LA (77,92) cao hơn so với giống TB (55,63) trong khi hai chỉ số Shannon và Simpson cao tương đương nhau (Hình 3.8).



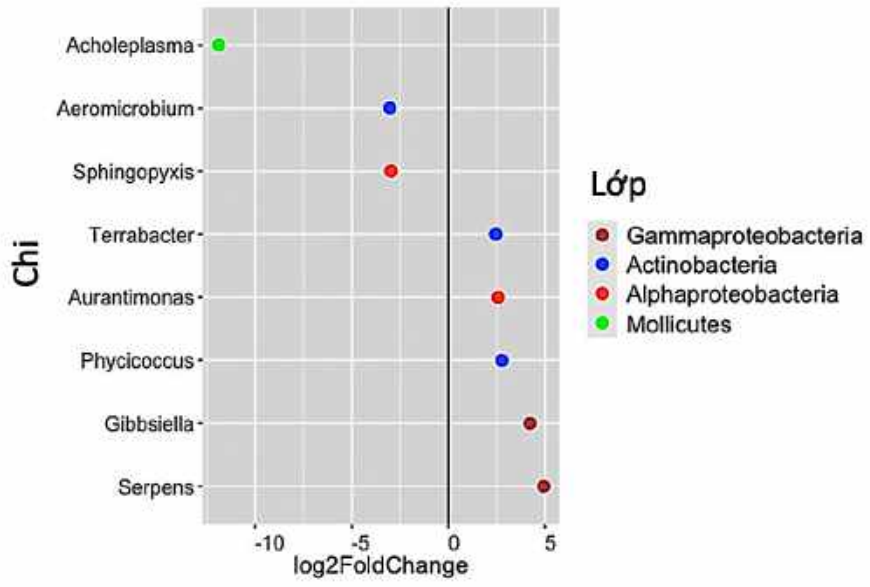
Hình 3.8. Đánh giá đa dạng alpha (theo ba chỉ số Chao1, Shannon và Simpson) của hệ VKNS ở các mẫu lúa khỏe mạnh của hai giống lúa LA và TB

Xét theo các bộ phận của cây, cả ba chỉ số này ở rễ của giống LA cao hơn so với giống TB, nhưng ở thân, chỉ số này ở giống TB cao hơn (Bảng 3.5). Sự phong phú loài dự kiến của hệ VKNS ở mẫu lá của giống LA cao hơn ở mức có ý nghĩa so với giống TB ($p<0,05$)

Bảng 3.5. Chỉ số đa dạng alpha của hệ VKNS trong mẫu khoẻ mạnh của hai giống lúa LA và TB

Mẫu	Chao1			Shannon			Simpson		
	LA	**TB**	***p***	**LA**	**TB**	***p***	**LA**	**TB**	***p***
Tổng	77,92	55,63	0,17	2,19	2,18	0,96	0,76	0,77	0,80
Lá	55,26	30,80	**0,01**	1,88	1,81	0,76	0,71	0,72	0,96
Thân	77,85	84,28	0,70	2,23	2,73	0,40	0,76	0,87	0,49
Rễ	162,98	113,87	0,08	3,29	2,88	0,06	0,92	0,87	0,09

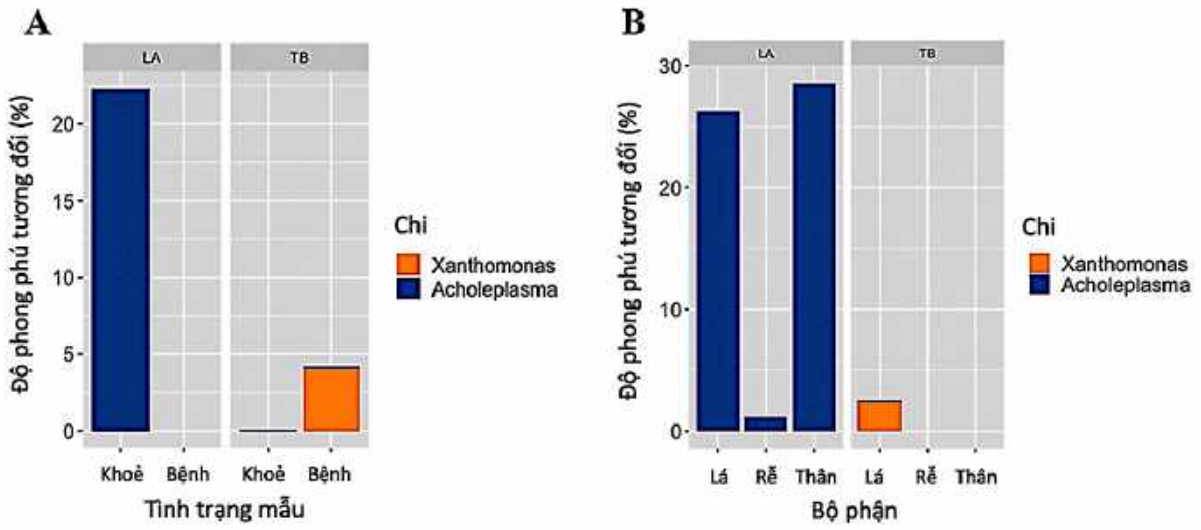
Phân tích sự khác biệt tuyến tính ($p < 0,05$) đã được tiến hành để tính toán sự khác biệt trong hệ gen của VKNS trong các mẫu khoẻ của hai giống lúa LA và TB dựa trên mức OTU (Hình 3.9). Mỗi điểm dữ liệu biểu thị một chi (trục y) được xác định là khác biệt đáng kể giữa các mẫu lúa LA và mẫu lúa TB. Các giá trị âm của log2 fold change (trục x) biểu thị độ phong phú tương đối (relative abundance) cao hơn trong các mẫu LA và các giá trị dương biểu thị độ phong phú tương đối cao hơn trong các mẫu TB



Hình 3.9. Phân tích sự khác biệt tuyến tính DESeq ($p < 0,05$) so sánh hệ VKNS trong các mẫu khoẻ của hai giống lúa LA và TB dựa trên mức OTU.

Các tính toán bằng công cụ DESeq đã phát hiện 08 OTU có tỷ lệ khác biệt lớn (Hình 3.9). Chi *Acholeplasma* (thuộc lớp Mollicutes) có sự khác biệt rõ rệt ở mẫu LA, thể hiện qua giá trị log2 fold change đạt -11,87, trong khi các chi *Gibbsiella* và *Serpens* thuộc lớp Gammaproteobacteria có tỷ lệ cao hơn ở mẫu TB, giá trị log2 fold change đạt tương ứng 4,212 và 4,917. Lớp Alphaproteobacteria và Actinobacteria với các chi đại diện khác nhau có sự khác biệt khá lớn ở cả hai giống lúa, cụ thể là ở giống lúa LA có các chi *Sphingopysis* (Alphaproteobacteria) và *Aeromicrobium* (Actinobacteria), trong khi đó ở giống lúa TB có các chi *Aurantimonas* (Alphaproteobacteria), *Physicoccus* và *Terrabacter* (Actinobacteria).

So sánh các mẫu lá bị bệnh và mẫu lá khỏe mạnh của cả hai giống lúa chỉ ra rằng chi *Xanthomonas* xuất hiện trong các mẫu lá TB mắc bệnh (4,05%) trong khi chiếm tỷ lệ hầu như không đáng kể trong giống LA (0,003%) (Hình 3.10A). Ngược lại, chi *Acholeplasma* chỉ được phát hiện ở giống lúa LA với tỷ lệ cao (22,32%), tập trung trong lá và thân (Hình 3.2B, Hình 3.10B), nhưng có tỷ lệ rất thấp (0,09%) ở giống lúa TB, cả mẫu khỏe mạnh và mẫu bị bệnh, tập trung ở lá (Hình 3.10A, B).



Hình 3.10. Độ phong phú tương đối (relative abundance) của các chi *Acholeplasma* và *Xanthomonas* trong hệ VKNS của hai giống lúa LA và TB. (A) Xét theo triệu chứng bệnh; (B) Xét theo các bộ phận của cây

Từ kết quả này, giả thuyết được đề xuất là *Acholeplasma* có mặt với tỷ lệ cao ở giống lúa LA là yếu tố liên quan đến tính kháng bệnh bạc lá của giống lúa này,

trong khi *Xanthomonas* có mặt ở các mẫu bệnh của giống lúa TB là yếu tố liên quan đến tính mẫn cảm của các giống này đối với bệnh bạc lá.

Chi *Acholeplasma* chưa từng được báo cáo trong các nghiên cứu trước đây như một thành phần của hệ VKNS ở giống lúa hoang *Oryza longistaminata* (Peng et al., 2021) cũng như ở các giống lúa *O. sativa* L. được trồng trong các điều kiện khí hậu khác nhau (Bez et al., 2021; Wang et al., 2021). Như vậy sự có mặt của *Acholeplasama* với tỷ lệ cao ở giống lúa LA là điểm đặc biệt so với các giống lúa khác. *Acholeplasama* được tìm thấy ở nhiều điều kiện môi trường khác nhau dưới hình thức là VSV hoại sinh và cộng sinh ở động vật có xương sống, côn trùng và thực vật (Siewert et al., 2014). *Acholeplasama* có kích thước tế bào nhỏ, không có màng tế bào, hệ gen đơn giản và khả năng sinh tổng hợp hạn chế. Tuy nhiên do có nhiều cơ chế vận chuyển các chất khác nhau, chúng có thể phát triển tốt theo lối sống tự do hoặc cộng sinh với vật chủ nhờ sử dụng các nguồn năng lượng và carbon từ bên ngoài (Lazarev et al., 2011).

Một số loài *Acholeplasma* đã được báo cáo sinh trưởng liên kết với thực vật, ví dụ như *A. florum* ở hoa chanh và bưởi (McCoy et al., 1984), *A. brassicae* trên bề mặt bông cải xanh, và *A. palmae* trong mô chồi của cây dừa (Tully et al., 1994b). Tuy nhiên, chưa có báo cáo nào mô tả *Acholeplasma* là tác nhân gây bệnh thực vật chính (Kube et al., 2014). Trong những trường hợp bất lợi, *Acholeplasma* có thể biến đổi thành các tế bào nano có khả năng gây bệnh cao hơn cho thực vật so với dạng thông thường (Chernov et al., 2006). Đặc biệt, một số loài *Acholeplasma* có thể lây nhiễm cho thực vật giống như chi vi khuẩn gần gũi là *Phytoplasma* (Strauss, 2009). *Acholeplasma* có thể sinh các enzyme ngoại bào phân hủy thành tế bào thực vật như cellulase và amylase, hỗ trợ chúng xâm nhập vào mô thực vật chủ (Kube et al., 2014). *Acholeplasma* đã được phát hiện cư trú trong ruột và hệ bạch huyết của nhiều loài côn trùng sống nhờ thực vật (Tully et al., 1994a), do vậy có thể được truyền vào thực vật qua con đường chích hút của các loài côn trùng này (Bonnet et al., 1991).

Rõ ràng là ở giống lúa LA, *Acholeplasma* sống cộng sinh bên trong mô của cây chủ mà không gây hại. Tuy nhiên, rất có thể lipopolysaccharides do

Acholeplasma tạo ra hoạt động như một chất kích thích cây chủ sản xuất các chất chuyển hóa thứ cấp để chống lại sự xâm nhập tiếp theo của các mầm bệnh khác (Fadiji & Babalola, 2020). Bên cạnh đó, *Acholeplasma* có mặt với tỷ lệ cao trong thân và lá của giống lúa LA có thể đã cản trở sự xâm nhập của *Xanthomonas* và/hoặc cạnh tranh không gian sinh trưởng với *Xanthomonas*. Giả thiết này được đề xuất giải thích cho khả năng kháng bệnh bạc lá của giống lúa LA. Tuy nhiên, giả thiết cần được khẳng định bằng các nghiên cứu thực nghiệm *in vitro* và *in vivo* để hiểu chính xác về vai trò của *Acholeplasma* đối với khả năng kháng bệnh bạc lá trên giống lúa như LA. Phân lập *Acholeplasma* từ cây lúa và tiến hành các thí nghiệm lây nhiễm nhân tạo là cách tiếp cận để làm sáng tỏ giả thiết trên. Tuy nhiên, *Acholeplasma* là nhóm vi khuẩn có kích thước tế bào nhỏ, không có màng tế bào, việc phân lập thuần khiết và thực hiện các kỹ thuật nghiên cứu tương tác với cây trồng không đơn giản và chưa được báo cáo trong các nghiên cứu trước đây.

Như vậy, các phân tích cho thấy hệ VKNS của hai giống lúa có sự khác biệt rõ rệt về tính đa dạng và thành phần chi, giống LA có sự phong phú loài dự kiến cao hơn so với giống TB. Chi *Acholeplasma* (thuộc lớp Mollicutes) được phát hiện với tỷ lệ cao đáng kể ở giống lúa LA, đặc biệt tập trung ở lá và thân. Ngược lại, chi *Xanthomonas*, tác nhân gây bệnh bạc lá, lại chủ yếu xuất hiện trong các mẫu lá TB mắc bệnh. Giả thiết về sự có mặt với tỷ lệ cao của *Acholeplasma* trong giống lúa LA là yếu tố liên quan đến tính kháng bệnh bạc lá của giống này cần được tiếp tục khẳng định bằng các nghiên cứu thực nghiệm *in vitro* và *in vivo*. Phân lập chủng thuần khiết và thử nghiệm lây nhiễm nhân tạo sẽ là hướng đi quan trọng để làm sáng tỏ cơ chế bảo vệ (nếu có) của *Acholeplasma* ở cấp độ phân tử và sinh thái.

3.2. NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG VI KHUẨN NỘI SINH TRONG PHÒNG TRỪ BỆNH BẠC LÁ

Nhằm mục đích ứng dụng VKNS trong phòng trừ bệnh bạc lá, các chủng VKNS thuần khiết đã được phân lập từ các bộ phận rễ/thân/lá lúa sau khi khử trùng bề mặt và sàng lọc khả năng đối kháng *Xoo*. Các chủng có hoạt tính kháng *Xoo* cao được nghiên cứu về các đặc tính sinh lý và phân loại, sau đó thử nghiệm đánh giá hiệu quả phòng trừ bệnh bạc lá lúa ở điều kiện nhà lưới và điều kiện đồng ruộng.

3.2.1. Phân lập chủng vi khuẩn nội sinh và đánh giá các đặc tính sinh học

3.2.1.1. Phân lập chủng vi khuẩn nội sinh và đánh giá hoạt tính kháng Xoo

Tiến hành phân lập VKNS từ các mẫu rễ/thân/lá của 46 mẫu lúa khỏe mạnh trong vùng bị bệnh bạc lá sau khi đã khử trùng bề mặt. Các chủng được lựa chọn để tinh sạch dựa trên so sánh loại trừ với các đĩa đối chứng gồm: (i) mẫu đã khử trùng bề mặt đặt trực tiếp trên môi trường dinh dưỡng và (ii) nước rửa mẫu lần cuối sau các bước khử trùng bề mặt.

Kết quả cho thấy, số lượng vi khuẩn còn lại trong dịch rửa cuối rất ít. Trong khi đó, các mẫu rễ/thân/lá sau khi đã được khử trùng bề mặt vẫn còn chứa nhiều vi khuẩn bám dính bề mặt (epiphytic), đặc biệt là ở các mẫu thân và rễ (Phụ lục 9). Những khuẩn lạc có hình dạng khác với các khuẩn lạc trên đĩa đối chứng sẽ tiếp tục được tinh sạch bằng cách cấy ria trên đĩa môi trường TSA ½ mới để chắc chắn thu được các chủng ứng viên VKNS thuần khiết.

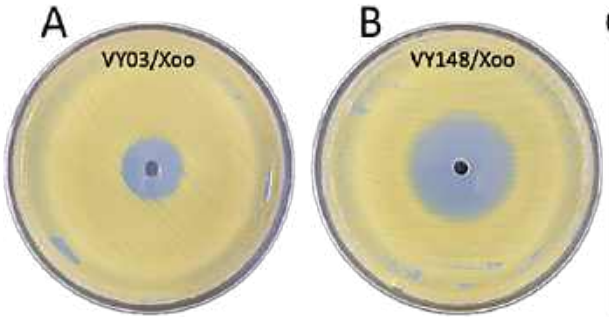
Tổng cộng có 394 chủng ứng viên VKNS đã được phân lập, trong đó 189 chủng được phân lập từ rễ (chiếm 48%), 111 chủng từ thân (28,2%), 84 chủng từ lá (23,3%) (Bảng 3.6). Kết quả này tương đồng với một số nghiên cứu đã được công bố trước đây, cho thấy VKNS lúa tập trung cao nhất ở rễ, sau đó đến thân và lá. Bertani và cs. (2016) đã phân lập được 1318 chủng VKNS từ 54 cây lúa được trồng trong điều kiện khô và ngập nước, gồm 700 chủng phân lập từ rễ, 314 chủng từ lá và 304 chủng từ thân. Điều này cũng phù hợp với các nghiên cứu đã chứng minh VKNS xâm nhập vào cây chủ từ rễ.

Bảng 3.6. Kết quả phân lập các ứng viên VKNS từ các mẫu lúa

TT	Giống lúa	Số lượng mẫu	Số lượng chủng			
			Rễ	Thân	Lá	Tổng số
1	TB	23	62	39	51	152
2	LA	23	127	82	33	242
	Tổng cộng	**46**	**189**	**111**	**84**	**394**

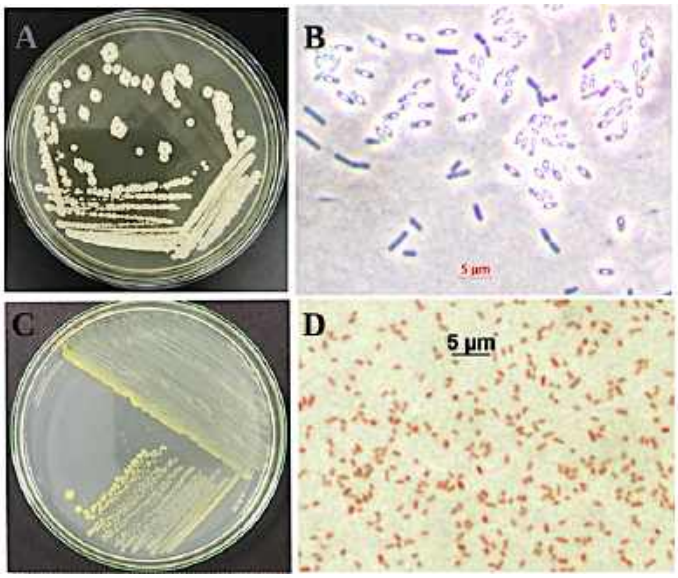
Sàng lọc hoạt tính kháng *Xoo* của 394 chủng ứng viên VKNS phân lập từ các giống lúa TB và LA được thực hiện bằng phương pháp đục lỗ thạch. Sau bước sàng lọc đầu tiên, các chủng tiềm năng tiếp tục được đánh giá hoạt tính kháng *Xoo* sử

dụng dịch nuôi trong môi trường TSB ½. Kết quả thu được 2 chủng giữ hoạt tính kháng *Xoo* ổn định sau 2 lần khảo sát lặp lại là VY03 và VY148 với vòng ức chế lần lượt là 15 mm ± 0,5 mm và 28 mm ± 0,5 mm (Hình 3.11).



Hình 3.11. Thí nghiệm *in vitro* đánh giá hoạt tính đối kháng *Xoo* của hai chủng ứng viên VKNS VY03 và VY148. A – Chủng VY03 kháng *Xoo*; B – Chủng VY148 kháng *Xoo*

Chủng VY03 và VY148 được phân lập tương ứng từ rễ và thân đã khử trùng bề mặt của cây lúa khỏe mạnh giống TB, thu thập trong cùng ruộng có cây nhiễm bệnh bạc lá. Trên môi trường TSA, chủng VY03 có khuẩn lạc hình dạng không xác định, mép không đều, lồi cao hình vành khăn, nhầy, bề mặt nhám, màu trắng đục. Tế bào của chủng hình trực khuẩn có kích thước từ 2,2 - 6,8 × 0,47 - 0,78 µm, Gram dương (Hình 3.12A, B). Chủng VY148 có khuẩn lạc hình tròn, mép đều, phẳng, bề mặt bóng, màu vàng nhạt, đường kính 1,6 - 2 mm. Tế bào của chủng hình trực khuẩn ngắn, kích thước 1,5 - 1,7 × 0,5 - 0,6 µm, Gram âm (Hình 3.12C, D).

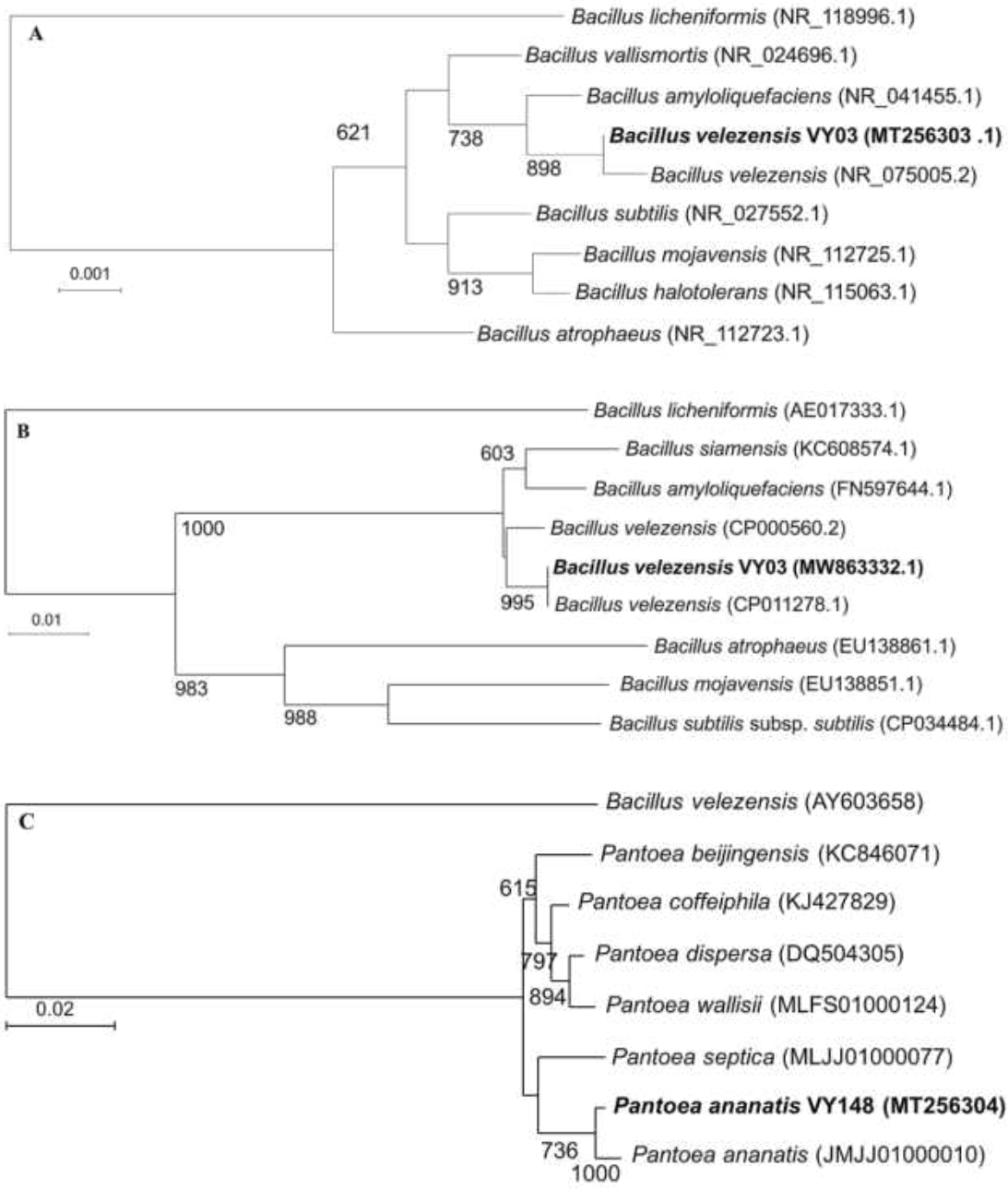


Hình 3.12. Hình thái khuẩn lạc và tế bào của chủng VY03 (A, B) và VY148 (C, D)

3.2.1.2. Định danh hai chủng VY03 và VY148

Phân tích so sánh trình tự 16S rDNA của chủng VY03 với các chủng đã công bố trên cơ sở dữ liệu EZTaxon cho thấy chủng VY03 có quan hệ gần nhất với *Bacillius velezensis* (tỷ lệ tương đồng 99,93%) (Hình 3.13A). Đối với chi *Bacillus*, việc định danh chính xác tới loài được khuyến cáo kết hợp so sánh trình tự gen chỉ thị khác cùng với 16S rDNA. Gen *rpoB* mã hóa cho tiểu đơn vị beta của enzyme RNA polymerase, một enzyme quan trọng trong quá trình phiên mã, được sử dụng phổ biến trong phân tích và xác định phát sinh loài vi khuẩn. Trong nghiên cứu này, gen *rpoB* được lựa chọn như một gen chỉ thị để định danh chủng VY03. Mối liên hệ phát sinh loài của chủng VY03 với loài *B. velezensis* cũng được xác nhận bằng phân tích trình tự gen *rpoB* (Hình 3.13B). Như vậy, chủng được định danh là *B. velezensis* VY03. Trình tự gen 16S rDNA và *rpoB* của chủng VY03 đã được gửi vào GenBank dưới các số hiệu MT256303 và MW863332 (Phụ lục 10).

Chi *Bacillus* thường được phân lập từ rễ, thân và lá lúa với tỷ lệ cao (Walitang et al., 2019). Bertani và cs. (2016) đã phân lập và xác định được 689 ứng viên VKNS từ các bộ phận của cây lúa thuộc 51 chi khác nhau, trong đó có 94 ứng viên (13,6%) VKNS thuộc chi *Bacillus.* Loài *Bacillus velezensis* thường được tìm thấy trong mô của một số thực vật như lạc, lúa mì, lúa…, có khả năng kích thích sinh trưởng thực vật và sinh các chất kháng khuẩn, kháng nấm. Chủng *B. velezensis* LS123N nội sinh lúa có khả năng kiểm soát hiệu quả nhiều loại bệnh trên lúa, bao gồm bệnh bạc lá, bệnh đạo ôn, bệnh bakanae, bệnh Pythium và bệnh đốm nâu (Tu et al., 2024). Chủng *B. velezensis* Lle-9 phân lập từ củ hoa *Lilium leucanthum* có khả năng kháng nhiều loại nấm gây bệnh thực vật như *Botryosphaeria dothidea, Fusarium oxysporum, Botrytis cinerea* và *Fusarium fujikuroi*. Các chất chuyển hóa thứ cấp của *B. velezensis* cũng có thể kích thích cơ chế miễn dịch hệ thống của thực vật, nhờ đó tăng cường sự chống chịu đối với các VSV gây bệnh (Rabbee et al., 2019).



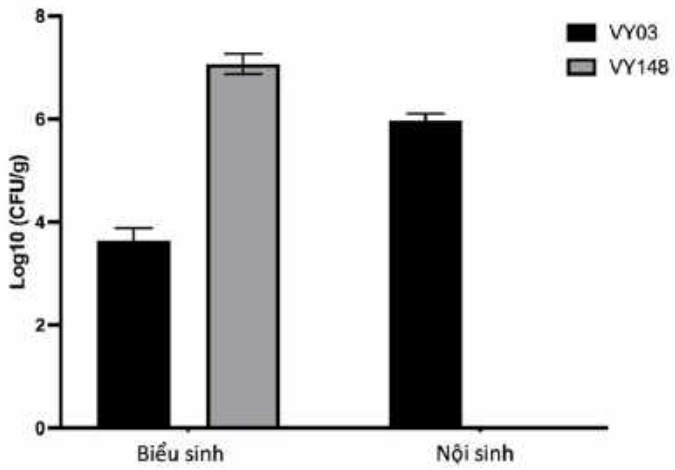
Hình 3.13. Cây phát sinh loài dựa trên so sánh trình tự 16S rDNA và gen *rpoB* của chủng VY03 (A, B) và VY148 (C) với trình tự của các chủng đã biết trên ngân hàng GenBank. Cây phân loại được dựng theo phương pháp neighbour-joining, trong đó định dạng cây được tiến hành dựa trên 1000 phép so sánh đa chiều

Kết quả phân tích so sánh trình tự gen 16S rDNA của chủng VY148 cho thấy chủng VY148 gần gũi nhất với loài *Pantoea ananatis* (tỷ lệ tương đồng 99,79%). Do đó, chủng được định danh là *P. ananatis* VY148, mã GenBank MT256304 (Hình 3.13C) (Phụ lục 10). *Pantoea ananatis* là vi khuẩn sinh trưởng nội sinh (endophytic) và biểu sinh (epiphytic) ở nhiều loại cây trồng, trong đó có cây lúa. *P.*

ananatis thường được phân lập từ hạt và thân lúa, mang một số đặc tính có lợi cho cây trồng, trong đó có khả năng đối kháng với các VSV gây bệnh thực vật. Chủng *P. ananatis* R100 được phân lập từ hạt lúa đã được chứng minh có tác dụng ức chế đối với *Acidovorax avenae* subsp. *avenae*, tác nhân gây bệnh đốm nâu trên lúa (Wu et al., 2016). Trong một nghiên cứu khác, Megias và cs. (2016) đã chỉ ra rằng chủng VKNS lúa *P. ananatis* AMG521 cũng có khả năng kích thích tăng trưởng thực vật và tăng năng suất lúa.

3.2.1.3. Đánh giá khả năng xâm nhập rễ lúa của hai chủng VY03 và VY148

Khả năng xâm nhập rễ lúa thể hiện qua đặc tính sinh trưởng nội sinh và/hoặc biểu sinh của hai chủng VY148 và VY03 được đánh giá trong thí nghiệm *in planta* sử dụng cây mạ 1 tuần tuổi. Kết quả cho thấy chủng VY03 có khả năng xâm nhập rễ tốt, thể hiện qua khả năng sinh trưởng nội sinh cao, đạt mức $9{,}9\times10^5$ CFU/g rễ tươi. Chủng VY03 cũng có khả năng sinh trưởng biểu sinh khá tốt, đạt mức $4{,}9\times10^3$ CFU/g rễ tươi. Ngược lại, chủng VY148 chỉ biểu hiện lối sống biểu sinh với mật độ tế bào trên bề mặt rễ cao, đạt $1{,}3\times10^7$ CFU/g rễ tươi, không phát hiện được tế bào nội sinh (Hình 3.14).



Hình 3.14. Đánh giá khả năng sinh trưởng biểu sinh/nội sinh của hai chủng VY03 và VY148

Khả năng xâm chiếm cây chủ mạnh mẽ là một đặc tính giúp VKNS cư trú bền vững trong các mô của cây và trở thành một tác nhân kiểm soát sinh học tiềm năng (Dong et al., 2022). VKNS thường cư trú bên trong cây chủ với mật độ từ 10^3 - 10^7 CFU/g sinh khối tươi, trong rễ là 10^6 - 10^7 CFU/g (Bertani et al., 2016). Một số

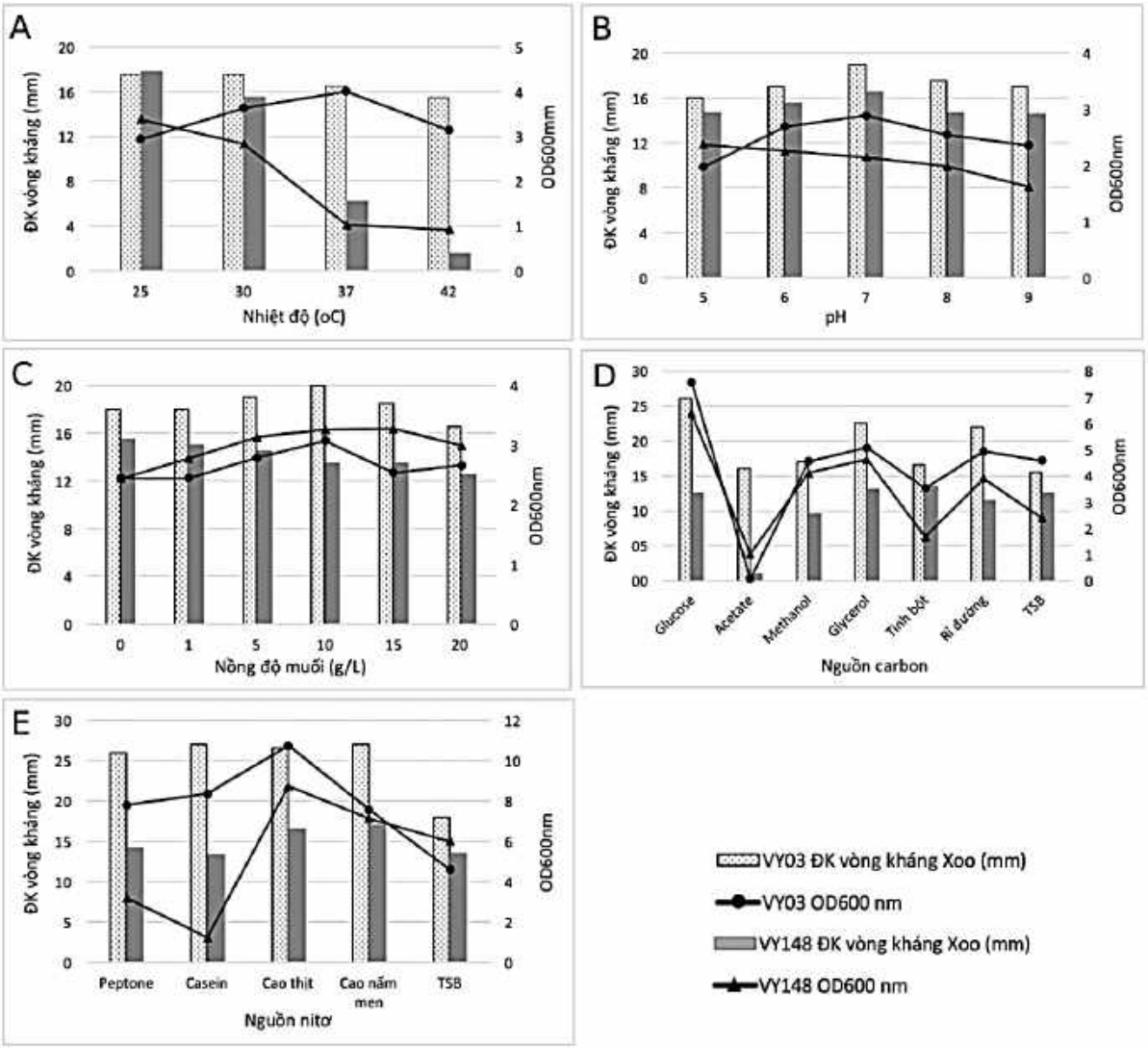
chủng *Bacillus* xâm chiếm rễ tích cực đã được báo cáo. Chủng *B. velezensis* CC09 xâm chiếm rễ cây lúa mì với tỷ lệ khoảng 3×10^3 CFU/g trọng lượng tươi (Kang et al., 2018). Chủng *B. velezensis* IBUN 2755 cũng đã ghi nhận đạt nồng độ 10^4 CFU/g trọng lượng tươi của rễ lúa (Perea-Molina et al., 2022). Chủng VY03 có thể được phân lập lại từ các mẫu rễ được khử trùng bề mặt là bằng chứng tốt cho thấy khả năng thiết lập sống nội sinh của nó. Đây là một lợi thế quan trọng để chủng VY03 dựa vào môi trường vi mô ổn định hơn và ít cạnh tranh hơn, từ đó bảo vệ cây chủ khỏi bị nhiễm mầm bệnh thực vật. Khả năng xâm nhập vào rễ và thiết lập đời sống nội sinh của vi khuẩn có ý nghĩa rất quan trọng, giúp mối quan hệ của vi khuẩn và cây chủ trở nên bền vững và hỗ trợ hiệu quả việc chống lại tác nhân gây bệnh cao hơn.

Chủng VY148 không có khả năng xâm nhập vào rễ, tuy nhiên sinh trưởng biểu sinh với mật độ tế bào rất cao (>10^7 CFU/g rễ tươi). Trong thí nghiệm *in vitro*, chủng VY148 thể hiện hoạt tính kháng *Xoo* cao hơn chủng nội sinh VY03. Nghiên cứu tiếp theo về đặc tính sinh học, phân tích hệ gen và đánh giá hiệu quả phòng trị bệnh bạc lá sẽ được tiến hành với cả hai chủng VY03 (nội sinh và biểu sinh) và VY148 (biểu sinh) để so sánh.

3.2.1.4. Đánh giá ảnh hưởng của các điều kiện nuôi cấy đến sinh trưởng và hoạt tính kháng Xoo của hai chủng VY03 và VY148

Ảnh hưởng của nhiệt độ: Chủng VY03 sinh trưởng tốt ở khoảng nhiệt độ 30 – 37°C, tuy nhiên hoạt tính đối kháng *Xoo* khá ổn định khi nuôi cấy trong dải nhiệt độ 25 – 37°C. Trong khi đó, nhiệt độ có ảnh hưởng lớn đến sinh trưởng và hoạt tính sinh học của chủng VY148. Chủng này sinh trưởng tốt và có hoạt tính kháng *Xoo* tốt nhất trong khoảng nhiệt độ 25 – 30°C (Hình 3.15A).

Ảnh hưởng của pH: Chủng VY03 sinh trưởng tốt ở khoảng pH trong khoảng 6 – 8, tuy nhiên pH 7 là phù hợp nhất. Chủng VY148 có thể sinh trưởng tốt ở pH 5 – 7, tốt nhất ở pH 7. Hoạt tính kháng *Xoo* của hai chủng tốt nhất khi nuôi cấy ở pH 7 (Hình 3.15B).



Hình 3.15. Ảnh hưởng của các điều kiện nuôi cấy lên sinh trưởng và hoạt tính kháng *Xoo* của hai chủng VY03 và VY148. (A) Nhiệt độ; (B) pH; (C) Nồng độ muối; (D) Nguồn carbon; (E) Nguồn nitơ.

Ảnh hưởng của nồng độ muối: Cả hai chủng đều có thể sinh trưởng ở các nồng độ muối thử nghiệm trong khoảng 0 - 20 g/L. Chủng VY03 sinh trưởng tốt nhất và có hoạt tính kháng *Xoo* cao nhất khi nuôi cấy ở nồng độ muối 5 - 15 g/L. Chủng VY148 cũng sinh trưởng tốt nhất ở khoảng nồng độ muối này nhưng hoạt tính kháng *Xoo* cao nhất khi nuôi cấy ở nồng độ muối ≤ 5 g/L (Hình 3.15C). Đặc điểm sinh học này có ý nghĩa thuận lợi khi đưa các chủng này vào ứng dụng tại các khu vực canh tác bị xâm thực mặn.

Ảnh hưởng của nguồn carbon và nitơ: Nguồn carbon (gồm có glucose, acetate, methanol, glycerol, tinh bột, rỉ đường) và nguồn nitơ (peptone, casein, cao thịt, cao

nấm men) được thử nghiệm riêng biệt và so sánh với đối chứng là sinh trưởng của hai chủng trong môi trường TSB (Hình 3.15D, E). Glucose là nguồn carbon thích hợp nhất cho sinh trưởng và hoạt tính kháng *Xoo* của chủng VY03. Glucose cũng là nguồn carbon thích hợp nhất với chủng VY148. Với glycerol hoặc rỉ đường chủng VY148 đạt mức OD_{600} thấp hơn, tuy nhiên hoạt tính kháng *Xoo* lại cao hơn so với glucose. Nguồn carbon từ acetate đều không thích hợp với hai chủng này (Hình 3.15D). Đối với chủng VY03, bốn nguồn nitơ khảo sát đều phù hợp. Đối với chủng VY148, cao thịt và cao nấm men kích thích sinh trưởng rõ rệt so với môi trường TSB và tạo hoạt tính kháng *Xoo* tốt hơn đáng kể. Casein và peptone là nguồn nitơ tốt cho chủng VY03, nhưng không phù hợp cho chủng VY148 (Hình 3.15E).

Như vậy hai chủng VY03 và VY148 là những vi khuẩn ưa ấm điển hình, dễ dàng nuôi cấy đạt mật độ tế bào cao trong môi trường dịch thể với các nguồn carbon và nitơ phổ biến.

3.2.2. Phân tích hệ gen của hai chủng VY03 và VY148

3.2.2.1. Thông tin chung

Chủng *Bacillus velezensis* VY03 có nhiễm sắc thể dạng vòng có chiều dài 3.942.273 bp với hàm lượng GC là 46,7%. Toàn bộ hệ gen được dự đoán chứa 3.714 trình tự mã hóa protein (protein - coding sequence CDS), 86 tRNA và 27 rRNA (Bảng 3.7). Tổng cộng 1.686 chức năng gen được mô tả dựa trên công cụ Rapid Annotation Subsystem Technology (RAST), bao gồm các chức năng sinh học chính của vi khuẩn, với các chức năng ưu thế bao gồm axit amin và các dẫn xuất (299), carbohydrate (219) và chuyển hoá protein (210) (Phụ lục 11).

Bảng 3.7. Thông tin chung về hệ gen của chủng *B. velezensis* VY03 và *P. ananatis* VY148

Đặc điểm	VY03	VY148
Kích thước (bp)	3,942,273	4,768,481
Hàm lượng GC (%)	46.7	53.6
Trình tự mã hoá protein (protein-coding sequence)	3,714	4,248
Gen rRNA	27	22
Gen tRNA	86	77
Mã GenBank	CP072843	CP086009

Hệ gen của chủng *P. ananatis* VY148 bao gồm nhiễm sắc thể dạng vòng với chiều dài 4.465.754 bp và một plasmid dài 302.727 bp. Phân tích sâu hơn dự đoán hệ gen chứa trình tự DNA mã hóa cho 4.248 gen, 77 gen tRNA và 22 gen rRNA. DNA hệ gen có hàm lượng GC trung bình cao hơn là 53,6%. Số lượng các gen ở mỗi nhóm chức năng cao hơn so với chủng VY03 (Bảng 3.7).

3.2.2.2. Các gen/cụm gen liên quan đến các hợp chất trao đổi bậc hai

Hai chủng VY03 và VY148 có hoạt tính kháng khuẩn, do vậy các gen/cụm gen liên quan đến các hợp chất trao đổi bậc hai được quan tâm. Phân tích hệ gen của hai chủng này và so sánh với một số chủng khác thuộc cùng loài *B. velezensis* (FZB42, GUMT319 và M75) và *P. ananatis* (LMG 2665, OC5a và YJ76) đã được thực hiện bằng công cụ trực tuyến antiSMASH. Kết quả cho thấy, chủng *B. velezensis* VY03 chứa 12 cụm gen liên quan đến quá trình sinh tổng hợp các hợp chất kháng khuẩn và kháng nấm mạnh (Bảng 3.8). Đáng chú ý, sáu cụm gen được xác định là giống hệt nhau (tương đồng 100%) với các cụm gen đã báo cáo ở các chủng *B. velezensis* khác, bao gồm ba cụm mã hóa cho ba hợp chất non-ribosomal peptide (NRPS) (fengycin, bacillibactin và bacilysin) và ba cụm mã hóa cho ba hợp chất polyketide (PKS) (macrolactin, bacillaene và difficidin).

- Cụm gen *pks* mã hóa cho macrolactin, một polyketide có hoạt tính kháng khuẩn mạnh, đặc biệt hiệu quả với vi khuẩn gây bệnh thực vật như *Ralstonia solanacearum* (Chen et al., 2018). Polyketide bacillaene, được mã hóa bởi cụm gen *bae* có khả năng ức chế tổng hợp protein của vi khuẩn, hoạt động trên cả vi khuẩn Gram âm và Gram dương. Tương tự, cụm gen *dif* mã hóa difficidin, một polyketide kháng sinh phổ rộng có hiệu quả cao với nhiều loài vi khuẩn (Rabee et al., 2019).
- Ba hợp chất non-ribosomal peptide bao gồm lipopeptide fengycin mã hoá bởi cụm gen *fen* có hoạt tính kháng nấm mạnh, đặc biệt đối với nấm sợi, thông qua cơ chế làm thay đổi tính thấm màng tế bào nấm (Jin et al., 2024). Cụm gen *dhb* mã hóa bacillibactin, một siderophore có ái lực cao với Fe^{3+}, giúp vi khuẩn cạnh tranh sắt trong môi trường, đồng thời hạn chế nguồn sắt cho nấm gây bệnh, từ đó

góp phần kiểm soát sinh học hiệu quả (Li et al., 2014). Cuối cùng, cụm gen *bac* mã hóa bacilysin, một dipeptide kháng sinh phổ rộng có khả năng phá vỡ thành tế bào vi khuẩn, đặc biệt hiệu quả với *Xanthomonas* spp. (Chen et al., 2018).

Bảng 3.8. Các gen/cụm gen mã hóa các chất chuyển hóa thứ cấp có hoạt tính kháng khuẩn trong hệ gen của *B. velezensis* VY03

***B. velezensis* VY03**					***B. velezensis* khác**		
					FZB42	**GUMT319**	**M75**
Nhóm chất dự đoán	**Vị trí**	**Kích thước (kb)**	**Cụm gen tương đồng (%)**	**Tên cụm gen**			
NRPS	305,122 - 369,940	64.82	Surfactin (82%)	*srf*	+	+	+
Thiopeptide, LAP	584,284 - 613,454	29.12	Kijanimicin (4%)	-[a]	-	-	+
PKS-like	920,746 - 961,990	41.24	Butirosin (7%)	-[a]	+	+	+
Terpene	1,046,867 - 1,064,163	17.3	-[a]	-[a]	+	+	+
TransAT-PKS	1,362,841 - 1,450,662	87.82	Macrolactin (100%)	*pks*	+	+	+
TransPKS, type3PKS, NRPS	1,670,169 - 1,770,844	100.67	Bacillaene (100%)	*bae*	+	+	+
NRPS, transAT-PKS, betalactone	1,837,319 - 1,971,197	133.87	Fengycin (100%)	*fen*	+	+	+
Terpene	1,035,897 - 2,057,780	21.88	-[a]	-[a]	+	+	+
Type 3 PKS	2,310,588 - 2,171,688	41.10	-[a]	-[a]	+	+	+
Trans-PKS	2,299,600 - 2,393,376	93.77	Difficidin (100%)	*dif*	+	+	+
NRPS-metallophore, NRPS, RiPP-like	3,051,003 - 3,102,792	51.78	Bacillibactin (100%)	*dhb*	+	+	+
NRPS	3,616,432 - 3,657,850	41.41	Bacilysin (100%)	*bac*	+	+	+

(-[a]) không tìm thấy cụm tương tự nào thông qua phân tích antiSMASH;
(+) sự có mặt hoặc (-) vắng mặt của các cụm gen chất trao đổi thứ cấp;
FZB42, GUMT319 và M75 là ba chủng đại diện của B. velezensis có trình tự hệ gen đã được công bố trên GenBank

- Ngoài ra, hệ gen chủng VY03 cũng chứa cụm gen có mức độ tương đồng thấp hơn với các trình tự đã biết, chẳng hạn như sinh tổng hợp surfactin (82%). Cụm gen *srf* được dự đoán mã hóa surfactin, một lipopeptide vòng có hoạt tính bề mặt cao, có khả năng phá vỡ màng sinh học của VSV và gây ra tính kháng hệ thống ở thực vật. Surfactin còn đóng vai trò tín hiệu trong tương tác giữa các loài (Jin et al., 2024).

So sánh với các chủng *B. velezensis* khác như FZB42, GUM T319 và M75 có thể thấy rằng cả bảy cụm gen trên đều hiện diện đầy đủ ở tất cả các chủng này (Bảng 3.8). Tuy nhiên, mức độ tương đồng của cụm gen *srf* của VY03 thấp hơn (82%) so với ở các chủng khác, gợi ý khả năng có sự biến đổi trình tự hoặc cấu trúc gen trong chủng VY03. Tuy vậy, sự hiện diện đồng thời của toàn bộ các cụm gen chính này ở VY03 cho thấy đây là một chủng có tiềm năng sinh học tương đương với các chủng đã được nghiên cứu rộng rãi, đồng thời có thể sở hữu những đặc điểm di truyền riêng biệt giúp thích nghi tốt với môi trường bản địa hoặc mục tiêu ứng dụng cụ thể. Việc không tìm thấy trong hệ gen chủng VY03 các cụm gen tương đồng cao cho Kijanimicin, Butirosin, Terpene và Type 3 PKS như chủng M75 hoặc GUM T319 đã phản ánh sự đa dạng di truyền và khả năng thích nghi của các chủng *B. velezensis.*

Phân tích hệ gen của chủng *Pantoea ananatis* VY148 cho thấy sự hiện diện của nhiều cụm gen mã hóa chất chuyển hóa thứ cấp bao gồm cả các hợp chất đã được mô tả và các cụm gen chưa rõ chức năng (Bảng 3.9).

- Chủng VY148 mang hai cụm gen sinh tổng hợp siderophore là desferrioxamine E (tương đồng 100%) và aerobactin (tương đồng 77%). Các cụm gen này có vai trò quan trọng trong cơ chế thu nhận sắt – yếu tố thiết yếu cho sự sinh trưởng của VSV trong môi trường cạnh tranh (Rabee et al., 2019). Sự hiện diện của cụm gen này cho thấy *P. ananatis* VY148 có thể sử dụng cơ chế này để cạnh tranh với các VSV khác trong môi trường sống. Hai cụm gen này chỉ hiện diện ở chủng OC5a mà không có mặt ở hai chủng còn lại (LMG 2665 và YJ76), cho thấy sự phân hóa di truyền đáng kể giữa các chủng *P. ananatis*.

Bảng 3.9. Các gen/cụm gen mã hóa các chất chuyển hóa thứ cấp có hoạt tính kháng khuẩn trong hệ gen của *P. ananatis* VY148

***P. ananatis* VY148**					***P. ananatis* khác**		
					LMG 2665	**OC5a**	**YJ76**
Nhóm chất dự đoán	**Vị trí**	**Kích thước (kb)**	**Cụm gen tương đồng (%)**	**Tên cụm gen**			
Terpene	270,556 - 294,120	23.56	Carotenoid (83%)	-[a]	+	+	+
NRP + Polyketide	796,819 - 810,155	12.34	Luminmycin/ Glidobactin A/Cepafungin (15%)	*glb*	+	+	-
Hserlactone	2,241,890 - 2,262,522	20.63	-[a]	-[a]	+	+	+
	2,835,214 - 2,855,825	20.61	-[a]	-[a]	+	+	+
NRP + Polyketide	2,353,018 - 2,374,183	21.17	Lankacidin C (13%)	*lkc*	-	-	-
Phosphonate	2,606,228 - 2,630,748	24.52	-[a]	-[a]	-	-	-
Thiopeptide, saccharide	2,915,386 - 2,941,651	26.27	O-antigen (14%)	-[a]	+	-	+
NI-siderophore	3,712,253 - 3,742,604	30.35	Desferrioxamine E (100%)	*dfo*	-	+	-
NI-siderophore	4,126,998 - 4,159,403	32.41	Aerobactin (77%)	*iuc*	-	+	-

(-[a]) không tìm thấy cụm tương tự nào thông qua phân tích antiSMASH;
(+) sự có mặt hoặc (-) vắng mặt của các cụm gen chất trao đổi thứ cấp;
LMG 2665, OC5a và YJ76 là ba chủng đại diện của P. ananatis có trình tự hệ gen đã được công bố trên GenBank

- Cụm gen terpene có độ tương đồng 83% với cụm gen carotenoid đã biết, được phát hiện trong hệ gen chủng VY148. Cụm gen này hiện diện trong cả ba chủng tham chiếu (*P. ananatis* LMG 2665, OC5a và YJ76), phù hợp với các nghiên cứu trước đây về khả năng tổng hợp carotenoid ở loài *Pantoea* (Mishra et al., 2022). Carotenoid là nhóm sắc tố có hoạt tính sinh học quan trọng, đặc biệt là khả năng chống oxy hóa.

- Các cụm gen thuộc nhóm Non-Ribosomal Peptide (NRP) và polyketide, bao gồm cụm gen mã hóa Luminmycin/Glidobactin A/Cepafungin và Lankacidin C, lần

lượt có độ tương đồng thấp với các cụm gen tham chiếu (15% và 13%). Đặc biệt, cụm gen Lankacidin C vắng mặt hoàn toàn trong các chủng đối chứng, cho thấy đây có thể là một cụm gen đặc trưng cho VY148, tiềm ẩn khả năng tổng hợp hợp chất mới có hoạt tính kháng khuẩn (LaGier et al., 2022).

- Hai cụm gen hserlactone và phosphonate, mặc dù không có sự tương đồng với bất kỳ cụm gen nào trong cơ sở dữ liệu antiSMASH, vẫn được xác định trong hệ gen của VY148. Sự hiện diện của hai cụm gen cho thấy đây có thể là các cụm gen mới hoặc ít được mô tả, tiềm năng cao trong việc tổng hợp các hợp chất chuyển hóa thứ cấp chưa được biết đến.
- Cụm gen mã hóa O-antigen (thiopeptide/saccharide) cũng được phát hiện với mức độ tương đồng thấp (14%). O-antigen là một phần của lipopolysaccharide trên bề mặt vi khuẩn, có vai trò trong tương tác với môi trường và đáp ứng miễn dịch của vật chủ, góp phần vào đặc tính thích nghi và tiềm năng gây bệnh hoặc cộng sinh của vi khuẩn.

Như vậy, hệ gen chủng *Pantoea ananatis* VY148 mang các cụm gen mã hóa các chất chuyển hóa thứ cấp, bao gồm cả các hợp chất có hoạt tính sinh học đã biết (như carotenoid, siderophore) và các cụm gen chưa được mô tả rõ (hserlactone, phosphonate). Sự hiện diện của các cụm gen NRP/Polyketide có mức tương đồng thấp, cùng với các cụm gen lạ, cho thấy tiềm năng khai thác VY148 như một nguồn VSV sản sinh chất kháng sinh mới. Những kết quả này phù hợp với các báo cáo trước đây về khả năng sinh các hợp chất sinh học có hoạt tính của *Pantoea ananatis*, mở ra hướng nghiên cứu tiếp theo trong khai thác VKNS làm nguồn hợp chất tự nhiên phục vụ y học và nông nghiệp.

3.2.2.3. Các gen/cụm gen liên quan đến khả năng xâm chiếm nội sinh

Các gen liên quan đến khả năng xâm chiếm nội sinh như khả năng vận động và hình thành màng sinh học cũng được quan tâm tìm kiếm trong hệ gen của các chủng nội sinh. Các gen *epsBCD*, chịu trách nhiệm tổng hợp exopolysaccharide và cụm gen *flg*, kiểm soát quá trình tổng hợp roi, đã được phát hiện trong hệ gen của chủng VY03 (Bảng 3.10). Hệ gen chủng VY03 cũng mang các locus mã hóa các

enzyme phân hủy thành tế bào thực vật để tạo điều kiện cho sự xâm nhập nội sinh như *pelA* và *pelB1* (mã hóa sinh tổng hợp pectin lyase), *galETK* và *xylA* (mã hóa các enzyme sử dụng galactose và xylose). Các cụm gen này không có trong hệ gen của chủng VY148 chỉ sinh trưởng biểu sinh. Ngoài ra, các gen kiểm soát quá trình tổng hợp sinh học các hợp chất kích thích tăng trưởng thực vật và/hoặc khả năng miễn dịch của thực vật đã được tìm thấy, như *trpABCDER* (tổng hợp tryptophan, tiền chất của axit indole-3-acetic), *priA* (tổng hợp auxin), *alsDSR* và *bdhA* (để tổng hợp acetoin và 2,3-butanediol).

Bảng 3.10. Các gen/cụm gen liên quan đến tương tác giữa thực vật-vi khuẩn trong hệ gen của hai chủng VY03 và VY148, được chú giải nhờ máy chủ RAST và công cụ PGAAP

Gen/cụm gen	Vị trí		Sản phẩm dự đoán	Vai trò dự đoán
	VY03	VY148		
Di động và tạo biofilm				
abrB	45,468 - 45,752	-	Transition state regulatory protein	Chất ức chế và chất hoạt hóa quá trình phiên mã của các gen được biểu hiện trong trạng thái chuyển tiếp giữa giai đoạn sinh trưởng sinh dưỡng và bắt đầu pha tĩnh và hình thành bào tử
cheAW cheV	-	1,953,836 - 1,956,351 3,391,352 - 3,392,314	Chemotaxis protein	Phản ứng với những thay đổi trong thành phần hóa học của môi trường
ecsA	984,952 - 985,695	-	ABC transporter, ATP-binding protein	Liên quan đến việc chuyển vị một chất nền chưa biết qua màng. Các miền xuyên màng (transmembrane domain) tạo thành một lỗ trên màng và miền liên kết ATP (ATP-binding domain) chịu trách nhiệm tạo ra năng lượng. Cần thiết cho độc lực.
ecsB	985,688 - 986,914	-	ABC transporter, permease protein	
ecsC	986,957 - 987,661	-	EcsC protein	
epsBCD	3,325,944 - 3,329,375	-	Exopolysaccharide biosynthesis	
flaA	3,414,287 - 3,415,273	-	Flagellar protein	

Gen/cụm	Vị trí		Sản phẩm dự	Vai trò dự đoán
flbB	1,601,268 - 1,601,882	-	Flagellar protein	
flbD	1,604,514 - 1,604,729	-	Flagellar protein	
fleN	1,615,215 - 1,613,322	-	Flagellar synthesis regulator	
cgs	-	114,699 - 123,281	Beta 1-2 glucan synthetase	Tạo ra beta-glucan ở nấm
lytS	2,793,288 - 2,795,069	-	Autolysis histidine kinase	Hệ thống LytR/LytS điều hoà các gen liên quan đến quá trình tự phân hủy, chết tế bào theo chương trình, hình thành màng sinh học và chuyển hóa thành tế bào
RstA	-	2,200,254 - 2,198,953	Sensory histidine kinase	
swrA	3,399,807 - 3,400,142		Swarming motility protein	
swrC	673,030 - 676,173		Swarming motility protein	
Chuyển hoá carbohydrate				
abnA	2,786,708 - 2,787,673	-	Arabinan endo 1,5 α-L-arabinosidase	
ganA	1,154,699 - 1,155,811	-	Arabinogalactan endo-1,4-beta-galactanase	
lacG	1,161,641 - 1,163,041	-	6-phospho-beta-galactosidase	
lacR	1,163,288 - 1,164,055	-	Lactose phosphotransferase system repressor	
pelA	725,343 – 726,608	-	Pectate lyase precursor	
pelB1	3,774,513 - 3,775,751	-	Pectin lyase	Pectin lyase tác động lên các chất pectic polysaccharide ở phiến giữa và thành tế bào chính của thực vật bậc cao

Gen/cụm	Vị trí		Sản phẩm dự	Vai trò dự đoán
xynB	1,784,544 - 1,786145	-	Xylan 1,4-beta-xylosidase	Tham gia vào quá trình phân huỷ polysaccharide thành tế bào thực vật
Kích thích sinh trưởng thực vật				
bdhA	621,181 - 622,221	68,112 - 68,885	2,3-butanediol dehydrogenase	
phy	2,098,189 - 2,099,340	-	3-phytase	
trpEab	2,205,142 - 2,207,134	2,119,548 - 2,121,541	Tryptophan synthase	
trpD	2,207,773 - 2,208,525	2,121,589 - 2,122,950	Indole-3-glycerol phosphate synthetase	

Thông tin về các gen/cụm gen có cùng chức năng cũng được phát hiện trong hệ gen của chủng VY148. Các gen liên quan đến cấu trúc roi bao gồm *fli, flh*, *flg*, *motA/motB*. Một số cụm gen liên quan đến quá trình dị hóa carbohydrate như *galEKT*, *xylAB* và *xynA*, đã được tìm thấy tuy nhiên, các gen quan trọng liên quan đến quá trình phân hủy thành tế bào thực vật bao gồm *pelAB* và *xynB* đã không được phát hiện. Các gen liên quan đến khả năng vận động và hình thành màng sinh học của chủng VY148 cũng không được tìm thấy. Không giống như VY03, các protein liên quan đến hoá hướng động như CheAVW đã được xác định trong hệ protein lõi của chủng *P. ananatis* VY148 (Bảng 3.10).

Nhiều chủng *Bacillus* nội sinh lúa đã được chứng minh có khả năng kháng tác nhân gây bệnh thực vật như *Xoo, Burkholderia glumae, Dickeya zeae*… (Kumar et al., 2020b; Tu et al., 2024). Các chủng này cũng thể hiện khả năng kích thích tăng trưởng thực vật và kích kháng hệ thống ở cây chủ (Chung et al., 2015). Một số VKNS lúa thuộc loài *P. ananatis* đã được báo cáo là có khả năng kích thích tăng trưởng thực vật và tăng năng suất lúa (Megias et al., 2016, Lu et al., 2021). Wu và cs. (2016) đã báo cáo chủng *P. ananatis* R100 phân lập từ hạt lúa không gây bệnh cho cây lúa và thể hiện tác dụng ức chế tác nhân gây bệnh sọc nâu trên lúa *Acidovorax avenae* subsp. *avenae*. Hai chủng *B. velezensis* VY03 và *P. ananatis* VY148 thể hiện hoạt tính kháng *Xoo* cao ở điều kiện *in vitro* và mang các gen/cụm gen mã hóa cho các hoạt chất kháng khuẩn tiềm năng, thể hiện rằng chúng là các tác

nhân kiểm soát sinh học tiềm năng. Hệ gen của các chủng VKNS được ký gửi tại GenBank với mã số BioProject PRJNA719969. Mã số trình tự hệ gen chủng *B. velezensis* VY03 và của chủng *P. ananatis* VY148 lần lượt là CP072843 và CP086009

3.2.3. Đánh giá hiệu quả phòng trừ bệnh bạc lá của hai chủng VY03 và VY148

Hai chủng VY03 và VY148 cùng có hoạt tính kháng *Xoo* cao (Hình 3.10), tuy nhiên chúng tương tác với cây chủ theo các cách khác nhau. Chủng VY03 thể hiện khả năng sinh trưởng nội sinh tốt hơn so với biểu sinh, trong khi đó chủng VY148 chỉ thể hiện khả năng sinh trưởng biểu sinh trong điều kiện thí nghiệm. Trong phần nghiên cứu này, hiệu quả phòng trừ của hai chủng đối với bệnh bạc lá lúa do *Xoo* gây ra được đánh giá thông qua thí nghiệm ở điều kiện nhà lưới và đồng ruộng.

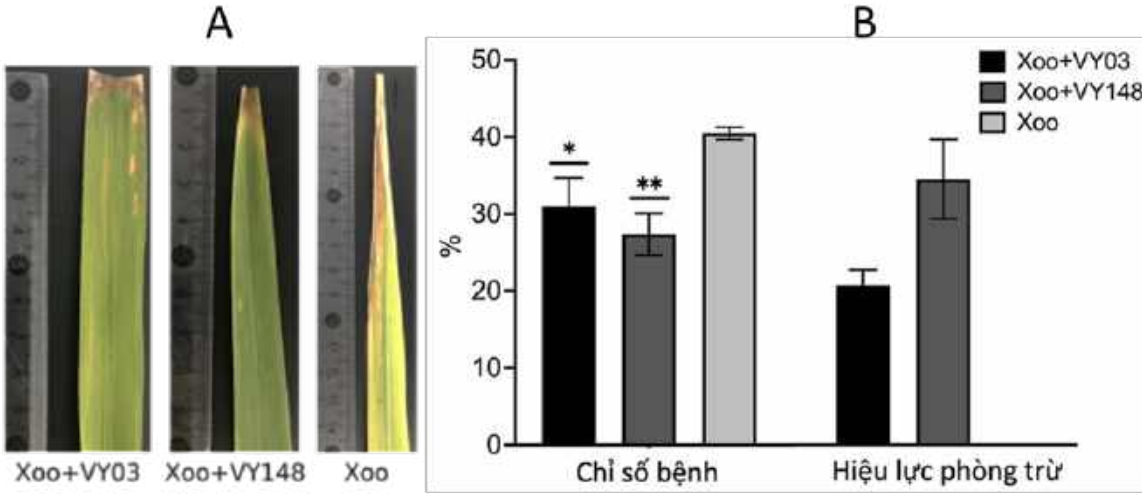
Dịch nuôi cấy không chứa tế bào của hai chủng VY03 và VY148 có hoạt tính kháng *Xoo*, chứng tỏ các chủng này tiết các chất kháng khuẩn vào môi trường. Tuy nhiên, vi sinh vật đối kháng có khả năng tiêu diệt tác nhân gây bệnh thông qua sinh hoạt chất kháng khuẩn và/hoặc cạnh tranh không gian sinh trưởng (Fadiji & Babalola, 2020; Xia et al., 2022). Do vậy, trong nghiên cứu này, tế bào và dịch nuôi không chứa tế bào của hai chủng VY03 và VY148 được thử nghiệm riêng biệt trong hai thí nghiệm tiến hành song song.

3.2.3.1. Đánh giá hiệu quả phòng trừ bệnh bạc lá của hai chủng VY03 và VY148 ở điều kiện nhà lưới

Thí nghiệm đánh giá hiệu quả kiểm soát bệnh bạc lá trên cây lúa bị nhiễm *Xoo* đã được tiến hành trong điều kiện nhà lưới sử dụng dịch huyền phù tế bào trong nước cất vô trùng của các chủng VY03 và VY148 hoặc dịch nuôi cấy không chứa tế bào của các chủng này để phun lên lá lúa nhiễm *Xoo* (Hình 3.16).

Trong thí nghiệm sử dụng dịch huyền phù tế bào, các tổn thương trên lá lúa được phun tế bào VY03 hoặc VY148 đã giảm đáng kể, trong khi nhóm đối chứng có các triệu chứng bạc lá rõ rệt (Hình 3.16A) với chỉ số bệnh là 40,47 ± 0,82% và tỷ lệ bệnh cao là 76,67 ± 5,78% (Hình 3.16B). Nhóm được xử lý bằng VY03 cho thấy chỉ số bệnh giảm mạnh còn 33,04 ± 3,72%, tuy nhiên, hiệu lực phòng trừ khá thấp ở

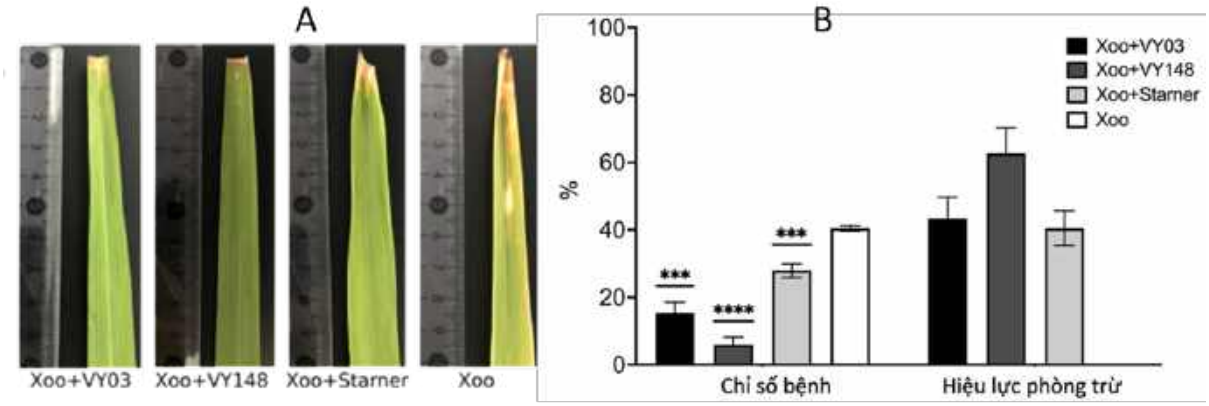
mức 20,71 ± 2,03%. Các mẫu lúa được xử lý bằng tế bào VY148 đạt được mức độ kiểm soát bệnh mạnh hơn, chỉ số bệnh giảm còn 27,38 ± 2,73%, với tỷ lệ bệnh là 50% và hiệu lực phòng trừ là 34,52 ± 5,15% (Hình 3.16B).



Hình 3.16. Thí nghiệm đánh giá hiệu quả phòng trừ bệnh bạc lá do *Xoo* trên cây lúa sử dụng tế bào của chủng VY03 và VY148. A – Hình ảnh lá lúa sau 14 ngày nhiễm *Xoo* và xử lý bằng VSV; B – Chỉ số bệnh và hiệu lực phòng trừ. Độ lệch chuẩn được tính toán từ ba lần lặp lại thử nghiệm cho mỗi mẫu. Dấu hoa thị biểu thị sự khác biệt đáng kể về giá trị chỉ số bệnh giữa nhóm đối chứng và nhóm xử lý VY03/VY148 ($p < 0,05$).

Thí nghiệm sử dụng dịch nuôi cấy đã loại tế bào của hai chủng VY03 và VY148 thu được hiệu quả bảo vệ cao hơn (Hình 3.17A). Cụ thể, dịch nuôi cấy không có tế bào của chủng VY03 đã làm giảm chỉ số bệnh xuống còn 15,39 ± 3,24%, đạt hiệu lực phòng trừ là 43,45 ± 6,27%. Đối với chủng VY148, chỉ số bệnh rất thấp chỉ ở mức 6,03 ± 2,19% và hiệu lực phòng trừ cao là 62,69 ± 7,56% đã được ghi nhận, thậm chí cao hơn đáng kể so với xử lý bằng thuốc hóa học Starner, có hiệu lực phòng trừ là 40,48 ± 5,15% (Hình 3.17B).

Các kết quả trên cũng tương đồng với một số báo cáo về hiệu quả kiểm soát bệnh bạc lá lúa của các chủng VKNS đã được công bố trong và ngoài nước. Hồ Xuân Uyển và cs. (2023) đã phun dịch nuôi cấy chủng *Bacillus* spp. (10^8 CFU/mL) (phân lập từ lá lúa nhiễm bệnh bạc lá) lên toàn bộ lá của cây lúa ở thời điểm 42 ngày sau gieo. Một ngày sau, cây lúa tiếp tục được phun dịch nuôi cấy chủng *Xoo* (10^8 CFU/mL). Kết quả theo dõi sau 14 ngày cho thấy, hiệu lực phòng trừ bệnh bạc lá ở cây lúa thí nghiệm là 48,94% so với đối chứng không xử lý.



Hình 3.17. Thí nghiệm đánh giá hiệu quả phòng trừ bệnh bạc lá do *Xoo* trên cây lúa sử dụng dịch nuôi cấy không chứa tế bào của chủng VY03 và VY148. A – Hình ảnh lá lúa sau 14 ngày nhiễm *Xoo* và xử lý bằng dịch nuôi; B – Chỉ số bệnh và hiệu lực phòng trừ. Starner là thuốc hóa học trị bệnh bạc lá. Độ lệch chuẩn được tính toán từ ba lần lặp lại thử nghiệm cho mỗi mẫu. Dấu hoa thị biểu thị sự khác biệt đáng kể về giá trị mức độ nghiêm trọng của bệnh giữa nhóm đối chứng và nhóm xử lý VY03/VY148 ($p < 0,05$).

Resti và cs. (2020) đã ngâm hạt giống lúa đã được khử trùng bề mặt trong dịch nuôi cấy của hỗn hợp hai chủng VKNS *Bacillus* (mật độ 10^8 CFU/mL) trong 15 phút, để khô trước khi gieo hạt. Cây mạ 25 ngày tuổi tiếp tục được ngâm rễ trong dịch nuôi cấy VKNS (10^8 CFU/mL) trong 2 giờ, trồng trong các chậu nhựa và được lây nhiễm *Xoo*. Kết quả theo dõi sau 60 ngày cho thấy, các chủng VKNS *Bacillus* spp đã làm giảm 32,35% tỷ lệ mắc bệnh bạc lá và giảm 61,15% chỉ số bệnh so với đối chứng. Nguyên nhân được cho là do hai chủng VKNS này có khả năng sản xuất ra các hợp chất có khả năng ức chế các tác nhân gây bệnh thực vật như kháng sinh, siderophore và axit salicylic. Thí nghiệm tương tự cũng được tiến hành bởi Ooi và cs. (2022). Hạt lúa giống MR220 CL2 (Malaysia) được khử trùng bề mặt và gieo trồng tự nhiên trong điều kiện nhà trồng tiêu chuẩn với ánh sáng tự nhiên, nhiệt độ và độ ẩm dao động tự nhiên. Cây giống được xử lý bằng chủng VKNS *Bacillus* phân lập từ lá và rễ lúa của cây lúa khoẻ mạnh và cây lúa nhiễm bệnh bạc lá với liệu lượng 5 mL dịch nuôi (10^9 CFU/mL)/cây con ở thời điểm 1 và 29 sau trồng. Nhiễm *Xoo* (10^9 CFU/mL) được tiến hành ở thời điểm 30 ngày sau trồng bằng phương pháp cắt lá. Tiếp tục xử lý cây cây lúa với dịch nuôi các chủng VKNS ở thời điểm 1, 3, 5, 7 và 13 ngày sau nhiễm. Kết quả điều tra ở thời điểm 15 ngày sau nhiễm đã cho thấy sự giảm đáng kể về chiều dài vết bệnh và diện tích lá nhiễm bệnh, lần lượt

là 1,5 ± 1,3 cm và 4,02 ± 3,9%. Ngoài ra, hiệu quả bảo vệ lên tới 85,3 ± 12,5% so với đối chứng không được xử lý chủng VKNS.

Một số chủng VKNS lúa *P. ananatis* đã được báo cáo là có khả năng kích thích tăng trưởng thực vật, tăng năng suất lúa và ức chế mầm bệnh gây bệnh sọc nâu trên lúa (Megias et al., 2016; Lu et al., 2021; Wu et al., 2016). Cho đến nay hầu như chưa có công bố nào về khả năng kiểm soát bệnh bạc lá lúa của loài *P. ananatis.* Trong nghiên cứu này, chủng *P. ananatis* VY148 là vi khuẩn biểu sinh, thể hiện hoạt tính đối kháng *Xoo* cao hơn so với chủng vi khuẩn nội sinh VY03 ở thí nghiệm *in vitro*, đồng thời cũng có hiệu quả phòng trừ bệnh bạc lá cao hơn trong thí nghiệm ở điều kiện nhà lưới. Chủng VY148 sinh siderophore và mang các cụm gen liên quan đến sinh tổng hợp aerobactin, có thể có liên quan đến khả năng đối kháng *Xoo* (Phụ lục 12). Chủng VY03 mang rất nhiều gen/cụm gen liên quan đến sinh tổng hợp các chất kháng khuẩn (như fengycin, bacillibactin, bacilysin, macrolactin, bacillaene và difficidin). Bên cạnh *Xoo*, chủng VY03 cũng ức chế sự phát triển của các tác nhân gây bệnh quan trọng khác trong nông nghiệp như *Ralstonia solanacearum, Alternaria alternata và Colletotrichum gloeosporioides* (Phụ lục 13). Nghiên cứu tách chiết và xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất kháng khuẩn do hai chủng VY03 và VY148 sản sinh chưa thành công do các hợp chất này không bền và dễ bị phân hủy trong quá trình tách chiết.

Ngoài việc sản sinh các chất kháng khuẩn, vi khuẩn đối kháng làm giảm sự phát triển của các tác nhân gây bệnh thực vật bằng cách cạnh tranh về các không gian sinh trưởng hoặc chất dinh dưỡng (Palmieri et al., 2022). Sự cạnh tranh phụ thuộc vào mức độ xâm chiếm hiệu quả các hốc sinh thái chung của các chủng đối kháng xâm chiếm với các tác nhân gây bệnh (Kohl et al., 2019). Vi khuẩn gây bệnh *Xoo* chiếm giữ bề mặt lá trước khi xâm nhập vào mô lá thông qua các vết thương hoặc qua các thủy khổng (Gluck-Thaler et al., 2020). Chủng VY03 chứa các gen mã hóa cho enzyme phân huỷ thành tế bào thực vật như pectin lyase, phân hủy galactose và xylose trong hệ gen, có khả năng nội sinh tốt, trong khi biểu sinh ở mức thấp (Hình 3.14), có thể không phải là đối thủ cạnh tranh trực tiếp của *Xoo* về không gian sinh trưởng. Chủng VY148 được phân lập từ mẫu thân đã khử trùng bề

mặt của cây lúa và phát triển hoàn toàn biểu sinh, là đối tượng chia sẻ không gian sinh trưởng và cạnh tranh trực tiếp với *Xoo*. Do vậy, chủng biểu sinh VY148 có hiệu quả bảo vệ cao hơn VY03 chống lại *Xoo* nhiễm bệnh trên lá lúa theo cả hai cơ chế (i) sinh hoạt chất kháng khuẩn và (ii) cạnh tranh về không gian sinh trưởng. Ưu thế của chủng VY03 so với chủng VY148 có thể là khả năng xâm nhập vào rễ cao và sinh trưởng nội sinh, đồng hành và bảo vệ cây lúa trong suốt quá trình sinh trưởng.

Các loài *Pantoea* được báo cáo có thể tác nhân gây bệnh hoặc là vi khuẩn có lợi với khả năng kiểm soát sinh học ở nhiều loại cây chủ (Duchateau et al., 2024). Các đại diện của *Pantoea* đã được báo cáo là có khả năng kiểm soát nhiều loại vi sinh vật gây bệnh thực vật như *Botrytis cinerea, Penicillium expansum, Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* và *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae, Acidovorax avenae* subsp. *avenae*, *Erwinia amylovora* ở các cây chủ khác nhau (Wu et al., 2016; Lee et al., 2024). Các hợp chất kháng khuẩn/kháng nấm do *Pantoea* spp. sinh ra bao gồm các hợp chất hữu cơ dễ bay hơi (VOC) có cơ chế hoạt động không chọn lọc (Zhao et al., 2022), các loại kháng sinh như pantocin và dapdiamide (Smits et al., 2019) và các chất hoạt động bề mặt sinh học như ananatoside và lipopeptide (Holscher & Kovacs, 2017). Tuy nhiên, hầu hết các loại kháng sinh đã được nghiên cứu như andrimid, agglomerin, herbicolin và microcin đều là sản phẩm chuyển hóa của *Pantoea agglomerans* (Lv et al., 2022). Chỉ có chất hoạt động bề mặt sinh học glycolipid PNP-1 được báo cáo là do *P. ananatis* sản xuất (Smith et al., 2016). *P. ananatis* là loài liên quan đến lúa phổ biến và chiếm ưu thế nhất trong chi *Pantoea* (Kini et al., 2021). Loài này đã được báo cáo về nhiều tác dụng có lợi khác nhau đối với cây lúa nhưng các chủng cũng có thể hoạt động như các tác nhân gây bệnh cơ hội (Egorova et al., 2015; Xue et al., 2021). Nhìn chung, *P. ananatis* không có enzyme phân huỷ thành tế bào thực vật. Loài này cạnh tranh không gian trên bề mặt cây bằng cách chủ động di chuyển và sản xuất EPS, cùng với một số chất hoạt động bề mặt ức chế các tác nhân gây bệnh (Xue et al., 2021; Lv et al., 2022). Chủng *P. ananatis* VY148 thể hiện hoạt tính đối kháng *Xoo* tốt trong cả thử nghiệm *in vitro* và trong điều kiện nhà lưới.

Căn cứ vào những phân tích trên, có thể đưa ra giả thiết về cơ chế tác động của VY03 và VY148 trong phòng trừ bệnh bạc lá như sau:

Chủng *P. ananatis* VY148 – Cơ chế biểu sinh kết hợp sinh chất kháng khuẩn: chủng VY148 có khả năng sinh trưởng mạnh trên bề mặt lá – nơi *Xoo* bám và xâm nhập qua thủy khổng hoặc vết thương. Điều này cho phép VY148 (i) cạnh tranh trực tiếp về không gian sinh trưởng với *Xoo*, ngăn cản sự định cư của mầm bệnh ở giai đoạn đầu nhiễm (Gluck-Thaler et al., 2020); (ii) việc sản sinh siderophore (aerobactin) làm giảm lượng sắt tự do, một yếu tố thiết yếu cho sự phát triển và độc lực của *Xoo*; (iii) VY148 có khả năng tiết ra chất hoạt động bề mặt hoặc chất kháng khuẩn chưa xác định, có thể làm tổn hại màng tế bào hoặc ức chế quá trình sinh tổng hợp của *Xoo*. Cơ chế này phù hợp với mô hình phòng trừ sinh học theo hướng cạnh tranh về không gian và dinh dưỡng, đặc biệt hiệu quả trong giai đoạn sớm của bệnh.

Chủng *B. velezensis* VY03 – Cơ chế nội sinh, kích kháng hệ thống và phổ kháng khuẩn rộng: chủng VY03 có khả năng xâm nhập tốt vào mô rễ và mô bên trong cây nhờ mang các gene mã hóa enzyme phân hủy polysaccharide như pectin lyase, enzyme phân giải galactose và xylose. Nhờ vậy, VY03 phát triển như một VKNS và hình thành mối quan hệ ổn định với cây chủ. Cơ chế tác động có thể bao gồm: (i) sản sinh nhiều hợp chất kháng khuẩn phổ rộng như fengycin, difficidin, bacilysin, bacillaene… giúp ức chế trực tiếp *Xoo* và các mầm bệnh thứ cấp khác như *Ralstonia*, *Alternaria*, *Colletotrichum*; (ii) kích hoạt tính kháng hệ thống nhờ sự hiện diện lâu dài trong mô cây, giúp cây tăng cường sức đề kháng với các tác nhân gây bệnh. Tuy nhiên, do khả năng phát triển biểu sinh yếu, VY03 không trực tiếp cạnh tranh với *Xoo* ở bề mặt lá – giai đoạn sớm của bệnh, dẫn đến hiệu quả bảo vệ thấp hơn trong điều kiện nhà lưới.

3.2.3.2. Đánh giá hiệu quả phòng trừ bệnh bạc lá lúa của chủng VY03 ở điều kiện đồng ruộng

Bacillus velezensis được biết đến như một tác nhân kiểm soát sinh học (biocontrol agent) tốt và an toàn. Trong nghiên cứu này, chủng VY03 thể hiện hoạt tính đối kháng tốt đối với *Xoo* ở điều kiện *in vitro* và nhà lưới và đối kháng một số

tác nhân gây bệnh thực vật khác. Do đó, chủng VY03 rất có tiềm năng ứng dụng vào sản xuất chế phẩm sinh học phòng trừ bệnh bạc lá. Việc đánh giá hiệu quả phòng trừ bệnh hại này của chủng VY03 ở điều kiện đồng ruộng là rất cần thiết. Chủng VY148 mặc dù thể hiện hoạt tính kháng *Xoo* cao hơn nhưng loài *Pantoea ananatis* chưa được chấp nhận sử dụng như một tác nhân kiểm soát sinh học, do vậy thử nghiệm đồng ruộng không được tiến hành với chủng này.

Trong thí nghiệm đồng ruộng, tế bào chủng VY03 được đưa vào đất gieo hạt và ươm mạ để tạo điều kiện cho vi khuẩn xâm nhập vào cây ngay từ giai đoạn đầu của quá trình sinh trưởng. Cây mạ sau đó được cấy ra ruộng, chăm sóc theo quy trình thường quy và theo dõi tiến triển của bệnh bạc lá trong tự nhiên. Kết quả điều tra mức độ nhiễm bệnh bạc lá trong giai đoạn cây lúa làm đòng đến trỗ (70 - 75 ngày tuổi) cho thấy bệnh bạc lá xuất hiện ở tất cả các ruộng thí nghiệm với tỷ lệ bệnh tăng dần qua các kỳ điều tra (Bảng 3.11). Ở ruộng thí nghiệm tiếp xúc sớm với chủng VY03 tại thời điểm trổ bông, tỷ lệ bệnh (TLB) bạc lá là 19,83± 4,86 % và chỉ số bệnh (CSB) là 9,21 ± 2,01%. Tương tự, ở các ruộng đối chứng có tỷ lệ bệnh là 20,05 ± 3,83% – 21,24 ± 5,36% và chỉ số bệnh là 9,38 ± 0,82% – 10,16 ± 4,26%.

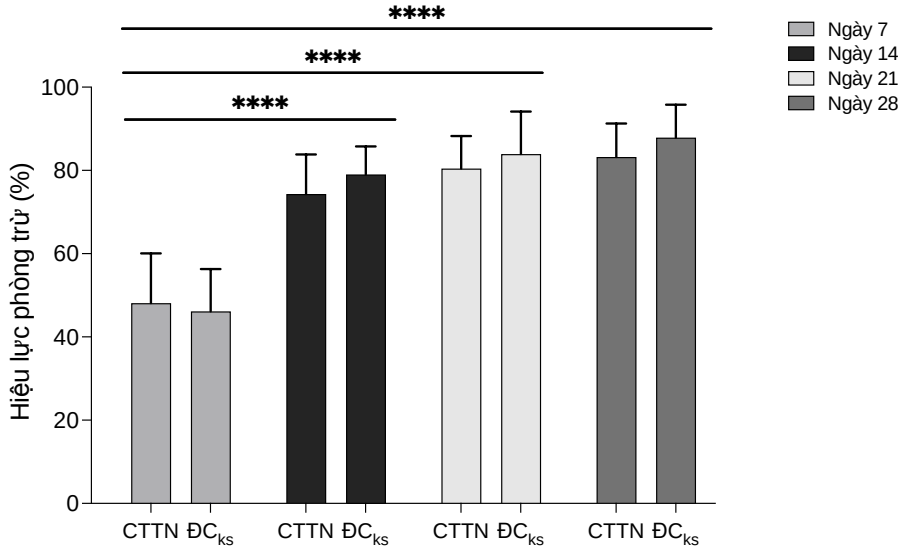
Bảng 3.11. Mức độ nhiễm bệnh ở các công thức thí nghiệm

Ngày	CTTN (%)		$ĐC_{KS}$ (%)		ĐC(–) (%)	
	TLB	CSB	TLB	CSB	TLB	CSB
0	19,83±4,86	9,21±2,01	20,05±3,83	9,38±0,82	21,24±5,36	10,16±4,26
7	24,53±3,51	10,34±1,42	25,62±2,91	11,07±1,82	48,72±7,90	26,25±2,28
14	17,27±5,79	9,35±2,48	14,23±4,38	7,71±3,42	68,63±9,71	37,21±1,42
21	12,96±4,82	6,63±3,72	10,45±6,20	4,12±0,80	67,35±8,80	44,75±3,70
28	9,38±3,16	6,59±1,24	7,07±4,69	4,96±2,06	60,11±13,69	42,22±2,08

Sau khi xác định sự gia tăng của bệnh bạc lá trong các ruộng thí nghiệm, dịch nuôi cấy (không loại tế bào) của chủng VY03 được phun ở ruộng thí nghiệm (công thức thí nghiệm, CTTN) và so sánh với đối chứng là ruộng không xử lý bệnh (đối chứng âm, ĐC (-)) và ruộng của các hộ dân xung quanh phun thuốc Kasumin 2SL (đối chứng kiểm soát, $ĐC_{KS}$). Kasumin 2SL là sản phẩm thương mại chứa hoạt chất kasugamucin chiết xuất từ dịch lên men của xạ khuẩn *Streptomyces kusagaensis*,

được khuyến cáo sử dụng cho phòng trừ bệnh bạc lá nhờ cơ chế sự hình thành axit amin trong cơ thể vi khuẩn. Kết quả cho thấy xử lý bằng chủng VY03 làm giảm tỷ lệ bệnh và chỉ số bệnh một cách rõ rệt, ở mức tương đương với thuốc hóa học Kasumin 2SL (Bảng 3.11).

Cụ thể kết quả đánh giá ở thời điểm lúa chín sáp tức 21 ngày sau xử lý với VKNS, ruộng được phun dịch tế bào chủng VY03 (CTTN) có tỷ lệ bệnh và chỉ số bệnh tương ứng là 12,96 ± 4,82%và 6,63 ± 3,72%, tương đương với ruộng phun thuốc Kasumin 2SL là 10,45 ± 6,20% và 4,12 ±0,80 %. Ruộng đối chứng không xử lý có tỷ lệ bệnh và chỉ số bệnh tiếp tục tăng nhanh qua các kỳ điều tra và đạt cao nhất ở giai đoạn này là 67,35 ± 8,80% và 44,75 ± 3,70%. Hiệu lực phòng trừ bệnh bạc lá ở ruộng xử lý bằng chủng vi khuẩn VY03 và ruộng phun thuốc Kasumin 2SL tương đương nhau ở thời điểm ngày 14 - 28 ngày, tương ứng đạt mức 74,31 - 84,21% và 79,05 - 87,88% (Hình 3.18). Hiệu quả kiểm soát bệnh cao hơn so với thí nghiệm trong điều kiện nhà lưới, phản ánh tác dụng của việc xử lý đất mạ bằng chủng VY03.

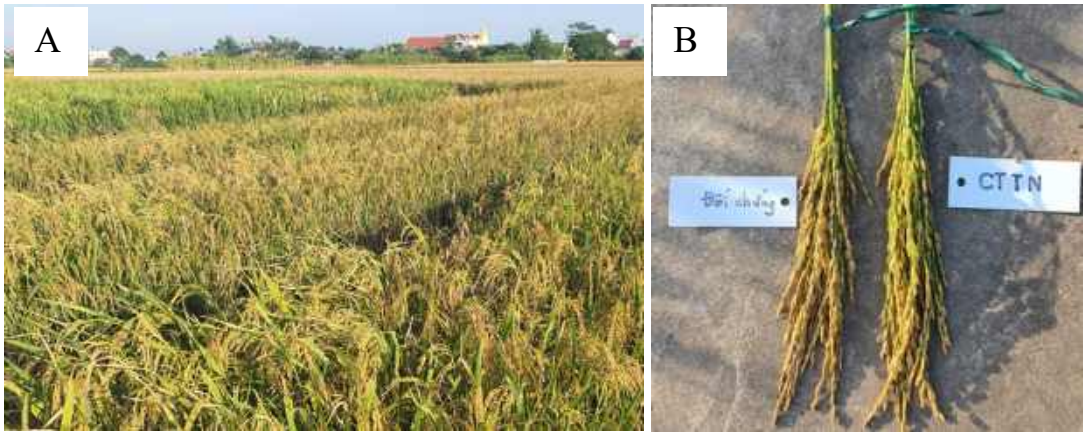


Hình 3.18. Hiệu lực phòng trừ bệnh bạc lá ở các công thức thí nghiệm trong điều kiện thực tế ngoài đồng ruộng. Độ lệch chuẩn được tính toán từ ba lần lặp lại thử nghiệm cho mỗi mẫu. Dấu hoa thị biểu thị sự khác biệt đáng kể về giá trị hiệu lực phòng trừ giữa các thời điểm điều tra ($p < 0,05$).

Kết quả phân tích phương sai hai chiều (two-way ANOVA) tại các thời điểm 7, 14, 21 và 28 ngày sau xử lý cho thấy yếu tố thời gian là biến số ảnh hưởng mạnh

nhất đến hiệu quả phòng trừ bệnh bạc lá, với tỷ lệ biến thiên đạt 69,57 - 79,81% (Phụ lục 14). Hiệu quả phòng trừ của cả hai công thức xử lý VKNS và thuốc hóa học đều tăng đáng kể theo thời gian, đạt mức cao nhất sau 28 ngày. Mặc dù $ĐC_{KS}$ có xu hướng đạt hiệu quả cao hơn CTTN tại từng thời điểm, khác biệt giữa hiệu quả phòng trừ của hai công thức không có ý nghĩa thống kê ở mọi thời điểm đánh giá. Điều này khẳng định rằng việc xử lý chủng VY03 có hiệu lực tương đương với thuốc hóa học trong kiểm soát bệnh bạc lá trên đồng ruộng trong điều kiện thí nghiệm.

Bên cạnh đó, hiệu quả của chủng VY03 trong ức chế bệnh bạc lá do *Xoo* còn được đánh giá thông qua các yếu tố cấu thành năng suất và năng suất lúa (Hình 3.19). Quan sát hình thức bông lúa có thể thấy ở ruộng CTTN bông lúa có màu sắc hạt vàng sáng, ít hạt lép, trong khi ở ruộng ĐC (-) bông lúa có nhiều hạt lép, màu nâu tối (Hình 3.19B).



Hình 3. 19. Thí nghiệm đánh giá hiệu quả kiểm soát bệnh bạc lá của chủng VY03 ngoài đồng ruộng. A – Hình ảnh khu thí nghiệm thực tế; B – Bông lúa thu hoạch ở ruộng đối chứng (ĐC(-)) và công thức thí nghiệm (CTTN)

Kết quả đánh giá chi tiết (Bảng 3.12) cho thấy, số bông/m^2 của CTTN trong khoảng 267 – 291, số hạt chắc/bông giao động từ 117 – 122 hạt, cao hơn ĐC (–) (mức sai khác có ý nghĩa). Khối lượng 1000 hạt trong CTTN cũng cao hơn ĐC (–) (mức sai khác có ý nghĩa). Năng suất lý thuyết của CTTN và $ĐC_{KS}$ đạt tương ứng 64,7 tạ/ha và 70,4 tạ/ha, cao hơn công thức ĐC(-) 12% và 13% (so sánh có ý nghĩa) (Bảng 3.12). Màu sắc hạt ở các công thức phun chế phẩm và phun thuốc hóa học đều có màu sắc hạt vàng sáng hơn so với công thức đối chứng. Kết quả này cũng

tương đồng với báo cáo về chủng *B. velezensis* BTR11 có hiệu quả bảo vệ cao chống lại bệnh bạc lá đạt 75 - 85% trong điều kiện đồng ruộng và tăng năng suất (khoảng 12%) (Do et al., 2023).

Bảng 3.12. Yếu tố cấu thành năng suất và năng suất lúa của thí nghiệm.

Công thức	Bông/m²	Số hạt chắc/bông	M1000 hạt (g)	NSLT (tạ/ha)		NSTT (tạ/ha)
				Năng suất	Tăng (%)	
CTTN	285,6^{a}	110,25^{b}	20,56^{b}	64,7^{bc}	12	59,2
ĐC$_{KS}$	289,8^{a}	118,12^{c}	20,58^{b}	70,4^{c}	13	62,3
ĐC	268,8^{a}	104,22^{a}	19,25^{a}	53,9^{a}	-	48,6

Tổng hợp các kết quả phân tích trong thử nghiệm đồng ruộng cho thấy chủng VY03 có ảnh hưởng tích cực tới sự phát triển của cây lúa, gồm (i) kiểm soát bệnh bạc lá và (ii) tăng năng suất lúa. Chủng VY03 thể hiện tác dụng như một probiotic cho cây lúa thông qua nhiều cơ chế đã được phân tích trong các nội dung trước bao gồm: khả năng xâm nhập và sinh trưởng nội sinh, đối kháng VSV gây bệnh phổ rộng (Phụ lục 13), hệ gen chứa các gen pectin lyase cho phép chủng di chuyển trong hệ dẫn, giữa các tế bào thực vật. Khi cây lúa được tiếp xúc sớm với tế bào chủng VY03 (đưa vi khuẩn vào đất gieo mạ) giúp vi khuẩn có thể xâm nhập sớm vào cây lúa và thể hiện các tác động "lợi khuẩn" đối với cây chủ. Kết quả là, chủng VY03 thể hiện hiệu quả kiểm soát bệnh bạc lá lúa ở điều kiện đồng ruộng tương đương với thuốc hóa học, đồng thời còn mang lại lợi ích về tăng năng suất và cải thiện chất lượng hạt. Việc xử lý hạt giống bằng VY03 trong quá trình gieo mạ rất thuận tiện và hoàn toàn tích hợp với các quy trình sản xuất cây con, không có giới hạn về thời gian phun như thuốc hóa học. Điều này cho thấy sử dụng chủng nội sinh VY03 là một lựa chọn bền vững hơn so với các phương pháp sử dụng thuốc bảo vệ thực vật hóa học truyền thống. Việc ứng dụng VY03 như một tác nhân sinh học phù hợp với xu hướng canh tác lúa hữu cơ và giảm thiểu sử dụng hóa chất trong nông nghiệp, góp phần bảo vệ môi trường và sức khỏe con người.

KẾT LUẬN

1. Kết quả phân tích so sánh hệ VKNS của hai giống lúa Bắc thơm 7 (TB) và IR4625 (LA) bằng công cụ metagenomics cho thấy:

- Hệ VKNS của giống lúa LA phong phú và đồng đều hơn so với giống lúa TB. Hệ VKNS rễ khác biệt so với hệ VKNS của lá/thân ở cả hai giống lúa.
- Sự xâm nhập của tác nhân gây bệnh bạc lá *Xoo* ở mẫu lúa bệnh giống TB không dẫn đến thiết lập một hệ VKNS gây bệnh đặc trưng (pathobiome), ngoại trừ làm giảm tính đa dạng của hệ VKNS.
- Chi *Acholeplasma* có mặt với tỷ lệ cao ở giống lúa LA (tập trung ở thân và lá) là khác biệt lớn nhất so với giống lúa TB, do vậy được đề xuất là có vai trò trong tính kháng bệnh bạc lá của giống lúa LA.

2. Chủng *Bacillus velezensis* VY03 và *Pantoea ananatis* VY148 được phân lập thuần khiết tương ứng từ rễ và thân đã khử trùng bề mặt của cây lúa TB khỏe mạnh có hoạt tính đối kháng *Xoo* cao, sinh trưởng tốt ở điều kiện ưa ấm và sử dụng các nguồn carbon và nitơ thông thường. Chủng VY03 sinh trưởng nội sinh tốt hơn biểu sinh, trong khi chủng VY148 chỉ sinh trưởng biểu sinh.

- Hệ gen của hai chủng chứa nhiều gen liên quan đến khả năng sinh tổng hợp các hoạt chất kháng khuẩn, khả năng di động và kích thích sinh trưởng thực vật. Chủng VY03 chứa các cụm gen mã hóa cho các enzyme phân hủy thành tế bào thực vật, trong khi chủng VY148 không chứa các gen tương tự.

3. Đánh giá hiệu quả phòng trừ bệnh bạc lá ở điều kiện nhà lưới và đồng ruộng cho thấy:

- Dịch nuôi không chứa tế bào của hai chủng VY03 và VY148 có hiệu quả phòng trừ tốt đối với bệnh bạc lá, trong đó chủng VY148 có hiệu quả phòng trừ cao hơn (62,69 ± 7,56%) so với chủng VY03 (43,45 ± 6,27%). Tế bào của chủng VY03 và VY148 thể hiện tính đối kháng với vi khuẩn gây bệnh thông qua cơ chế sinh chất kháng khuẩn và cạnh tranh về không gian sinh trưởng.

- Ở điều kiện đồng ruộng, việc tưới dịch nuôi chủng VKNS VY03 ở giai đoạn gieo mạ và phun bổ sung khi có triệu chứng bệnh bạc lá giúp đạt hiệu quả phòng trừ cao tương đương với xử lý bằng thuốc Kasumin 2SL, đạt mức 74,31 - 84,21%. Năng suất lý thuyết của công thức xử lý với chủng VY03 cao hơn công thức đối chứng 12%.

HƯỚNG NGHIÊN CỨU TIẾP THEO

Một số hướng nghiên cứu tiếp theo cần thực hiện như sau:

- Nghiên cứu làm sáng tỏ vai trò của *Acholeplasma* đối với tính kháng bệnh bạc lá của giống lúa LA.
- Xác định hoạt chất sinh học kháng *Xoo* của hai chủng *Bacillus velezensis* VY03 và *Pantoea ananatis* VY148.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC CỦA TÁC GIẢ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. **Thu Thi Hieu Nguyen**, Cristina Bez, Iris Bertani, Minh Hong Nguyen, Thao Kim Nu Nguyen, Vittorio Venturi, Hang Thuy Dinh (2024) Microbiome analysis revealed *Acholeplasma* as a possible factor influencing the susceptibility to bacterial leaf blight disease of two domestic rice cultivars in Vietnam. *Plant Pathol. J.* 40(2): 225-232.
2. Đinh Thúy Hằng, Nguyễn Duy Tới, **Nguyễn Thị Hiếu Thu**, Nguyễn Kim Nữ Thảo (2023) Chủng vi khuẩn nội sinh rễ lúa *Bacillus velezensis* VY03 có hoạt tính đối kháng phổ rộng với vi sinh vật gây bệnh thực vật để ứng dụng trong kiểm soát sinh học (Bằng độc quyền Giải pháp hữu ích số 3298). Bộ Khoa học và Công nghệ.
3. **Nguyễn Thị Hiếu Thu**, Nguyễn Duy Tới, Lại Tiến Dũng, Nguyễn Kim Nữ Thảo, Đinh Thuý Hằng (2021) Nghiên cứu ứng dụng vi khuẩn nội sinh *Bacillus velezensis* VY03 trong phòng chống bệnh bạc lá lúa. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam* 6(127): 63-70.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tiếng Việt

1. Bùi Thanh Đạo, Ngô Thanh Phong, Cao Ngọc Điệp (2021) Phân lập và nhận diện vi khuẩn nội sinh có khả năng cố định đạm, hòa tan lân và tổng hợp IAA trong cây đậu phộng (lạc) (*Arachis hypogaea* L.) trồng tại 03 huyện miền núi tỉnh Bình Định. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ* 55(4B): 10-20.
2. Phạm Thị Tố Oanh (2020) Nghiên cứu sản xuất chế phẩm vi sinh vật đối kháng thân thiện với môi trường trong phòng trừ bệnh bạc lá lúa đối với sản xuất nông nghiệp tại Việt Nam. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Đại học Thái Nguyên* 225(05): 77-83.
3. Trần Vũ Phến, Nguyễn Thị Vàng, Đinh Ngọc Trúc (2014) Khả năng phòng trừ sinh học bệnh bạc lá lúa của một số chủng *Bacillus* phân lập từ tỉnh Hậu Giang trong điều kiện nhà lưới. *Tạp chí Nông nghiệp và phát triển nông thôn* 12: 62-69.
4. Nguyễn Văn Phượng, Mai Thị Phương Nga, Tô Thị Mai Hương, Mai Đức Chung, Chu Hoàng Hà, Lê Trần Bình (2020) Sàng lọc *in vitro* vi khuẩn nội sinh rễ lúa nước có khả năng kích thích sinh trưởng và kháng nấm đạo ôn *Magnaporthe oryzea*. Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc 2020.
5. Phạm Thiên Thành, Tăng Thị Diệp, Tống Thị Huyền, Nguyễn Trí Hoàn, Dương Xuân Tú, Lê Thị Thanh (2020) Ứng dụng chỉ thị phân tử ADN chọn tạo giống lúa kháng bệnh bạc lá. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam* 7(116): 29-35.
6. Hoàng Thị Như Thủy, Nguyễn Duy Nhật, Nguyễn Nữ Cẩm Ly, Từ Minh Hải, & Trần Thị Xuân Phương (2022) Phân lập và tuyển chọn dòng vi khuẩn nội sinh trong cây lúa ở Thừa Thiên Huế. *Tạp Chí Khoa học và Công nghệ nông nghiệp, Trường Đại học Nông Lâm Huế* 6(1): 2859–2870. https://doi.org/10.46826/huaf-jasat.v6n1y2022.893
7. Dương Xuân Tú, Phạm Thiên Thành, Tăng Thị Diệp, Tống Thị Huyền, Lê Thị Thanh, Nguyễn Thị Thu, Nguyễn Trí Hoàn (2017) Ứng dụng chỉ thị phân tử trong chọn tạo giống lúa thơm kháng bệnh bạc lá cho các tỉnh phía Bắc. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp* 60(2): 59-64.
8. Lý Ngọc Thanh Xuân và Phạm Duy Tiến (2018) Tuyển chọn các dòng vi khuẩn nội sinh và vùng rễ lúa mùa nổi có khả năng cung cấp indol-3-axetic. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn* 2: 78-85.
9. Hồ Xuân Uyển, Trần Vũ Phến, Phùng Ngọc Yến Phương (2023) Tuyển chọn vi khuẩn *Bacillus* có hiệu quả kiểm soát bệnh cháy bìa lá lúa do vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* phân lập từ một số vùng trồng lúa ở đồng bằng sông cửu long . *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Đại học Thái Nguyên* 229(01): 61 - 67.

Tiếng Anh

11. Abbott W S (1987) A method of computing the effectiveness of an insecticide.
12. Akbari-Kiarood SL, Rahnama K, Golmohammadi M, Nasrollanejad S (2020). Quorum-quenching endophytic bacteria inhibit disease caused by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* in Citrus cultivars. *J. Basic Microbiol.* 60(9): 746-757.
13. An SQ, Potnis N, Dow M, Vorhölter FJ, He YQ, Becker A, Teper D, Li Y, Wang N, Bleris L, Tang JL (2020) Mechanistic insights into host adaptation, virulence and epidemiology of the phytopathogen *Xanthomonas*. *FEMS Microbiol. Rev.* 44: 1-32. http://doi.org/10.1093/femsre/fuz024.

14. Arnon DI (1950) Dennis Robert Hoagland: 1884-1949. *Science* 112(2921): 739-742.

15. Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, Formsma K, Gerdes S, Glass EM, Kubal M, Meyer F, Olsen GJ, Olson R, Osterman AL, Overbeek RA, McNeil LK, Paarmann D, Paczian T, Parrello B, Pusch GD, Reich C, Stevens R, Vassieva O, Vonstein V, Wilke A, Zagnitko O (2008). The RAST server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics.* 9: 75. http://doi.org/10.1186/1471-2164-9-75.

16. Balkwill DL, Fredrickson JK, Romine MF (2006) *Sphingomonas* and related genera. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E (eds) *The Prokaryotes*. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/0-387-30747-8_23.

17. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Sergey I, Nikolenko S, Pham S, Prjibelski AD, A.V. P, Sirotkin AV, Vyahhi N, Tesler G, Max A (2012) SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* 19: 455-477. http://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021.

18. Bertani I, Abbruscato P, Piffanelli P, Subramoni S, Venturi V (2016) Rice bacterial endophytes: isolation of a collection, identification of beneficial strains and microbiome analysis. *Environ Microbiol Rep.* 8: 388-98. http://doi.org/10.1111/1758-2229.12403.

19. Bez C, Esposito A, Dinh TH, Nguyen HM, Valè G, Licastro D, Venturi V (2021) The rice foot rot pathogen *Dickeya zeae* alters the in-field plant microbiome. *Environ. Microbiol.* 23(12): 7671--7687.

20. Blin K, Shaw S, Kloosterman A, Charlop-Powers Z, van Weezel G, Medema M, Weber T (2021) antiSMASH 6.0: improving cluster detection and comparison capabilities. *Nucleic Acids Res.* 47(W1): W81-W87. https://doi.org/10.1093/nar/gkz310.

21. Blumenstein K, Albrectsen BR, Martín JA, Hultberg M, Sieber TN, Helander M, Witzell J (2015) Nutritional niche overlap potentiates the use of endophytes in biocontrol of a tree disease. *Biol. Control* 60: 655–667.

22. Bulgarelli D, Schlaeppi K, Spaepen S, Ver Loren van Themaat E, Schulze- Lefert P (2013) Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 64: 807–838. doi: 10.1146/annurev-arplant-050312- 120106.

23. Bulgari D, Casati P, Quaglino F, Bianco PA (2014) Endophytic bacterial community of grapevine leaves influenced by sampling date and phytoplasma infection process. *BMC Microbiol*. 14: 198. https://doi.org/10.1186/1471-2180.

24. Buschart A, Sachs S, Chen X, Herglotz J, Krause A, Reinhold-Hurek B (2012) Flagella mediate endophytic competence rather than act as MAMPs in rice-*Azoarcus* sp. strain BH72 interactions. *Mol. Plant Microbe Interact.* 25: 191–199. doi: 10.1094/MPMI-05-11-0138

25. Chen J, Li N, Han S, Sun Y, Wang L, Qu Z, Dai M, Zhao G (2020b) Characterization and bioremediation potential of nickel- resistant endophytic bacteria isolated from the wetland plant *Tamarix chinensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 367

26. Chen L, Heng J, Qin S, Bian K (2018) A comprehensive understanding of the biocontrol potential of *Bacillus velezensis* LM2303 against *Fusarium* head blight. PLoS ONE 13(6): e0198560. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198560

27. Chen X, Marszałkowska M, Reinhold-Hurek B (2020a) Jasmonic acid, not salicyclic acid restricts endophytic root colonization of rice. *Frontiers in plant science*, 10: 1758.

28. Chen Y, Fan JB, Du L, Xu H, Zhang QH, He YQ (2014) The application of phosphate solubilizing endophyte *Pantoea dispersa* triggers the microbial community in red acidic soil. *Appl. Soil Ecol.* 84: 235–244.

29. Chernov VM, Moukhametshina NE, Gogolev YV, Nesterova TN, Trushin MV, Chernova OA (2006) Adaptation to unfavorable conditions of growth: pathogenicity of *Acholeplasma laidlawii* PG8. *Electron. J. Biomed*. 3: 11-15.

30. Chukwu SC, Rafii MY, RamLee SI, Ismail SI, Hasan MM, Oladosu YA, Magaji UG, Akos I, Olalekan KK (2019) BLB resistance in rice: a review of conventional breeding to molecular approach. *Mol. Biol. Rep.* 46: 1519–1532.

31. Chung EJ, Hossain MT, Khan A, Kim KH, Jeon CO, Chung YR (2015) *Bacillus oryzicola* sp. nov., an Endophytic bacterium isolated from the roots of rice with antimicrobial, pgp, and systemic resistance inducing activities in rice. *Plant Pathol. J.* 31(2): 152–164.

32. Compant S, Cambon MC, Vacher C, Mitter B, Samad A, Sessitsch A (2021) The plant endosphere world–bacterial life within plants. *Environ. Microbiol.* 23(4): 1812-1829.

33. Compant S, Cassan F, Kostić T (2024) Harnessing the plant microbiome for sustainable crop production. *Nat. Rev. Microbiol.* https://doi.org/10.1038/s41579-024-01079-1

34. Compant S, Samad A, Faist H, Sessitsch A (2019) A review on the plant microbiome: ecology, functions, and emerging trends in microbial application. *J. Adv. Res*. 19:29–37.

35. Correa-Galeote D, Bedmar EJ, Arone GJ (2018) Maize endophytic bacterial diversity as affected by soil cultivation history. *Front. Microbiol.* 9: 484.

36. Coutinho BG, Licastro D, Mendonça-Previato L, Cámara M, Venturi V (2015) Plant-influenced gene expression in the rice endophyte *Burkholderia kururiensis* M130. *Mol. Plant Microbe Interact.* 28: 10–21. doi: 10.1094/MPMI- 07- 14- 0225- R

37. Cruz-Barrera M, Jakobs-Schoenwandt D, Persicke M, Gómez MI, Ruppel S, Patel AV (2020) Anhydrobiotic engineering for the endophyte bacterium *Kosakonia radicincitans* by osmoadaptation and providing exogenously hydroxyectoine. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 36: 1-16.

38. Cui J, Nie F, Zhao Y, Zhang D, Zhou D, Wu J, Liu L (2024) A review on plant endophytes in response to abiotic stress. *Environ. Pollut. Bioavailab.* 36(1): 2323123.

39. Dastogeer KM, Tumpa FH, Sultana A, Akter MA, Chakraborty A (2020) Plant microbiome-an account of the factors that shape community composition and diversity. *Curr. Plant Biol.* 23: 100161. doi: 10.1016/j.cpb.2020.100161

40. Dastogeer KM, Yasuda M, Okazaki S (2022) Microbiome and pathobiome analyses reveal changes in community structure by foliar pathogen infection in rice. *Front. Microbiol.* 13: 949152.

41. de Almeida Lopes KB, Carpentieri-Pipolo V, Oro TH, Stefani Pagliosa E, Degrassi G (2016) Culturable endophytic bacterial communities associated with field-grown soybean. *J. Appl. Microbiol.* 120: 740–755. doi: 10.1111/jam. 13046.

42. Do TQ, Nguyen TT, Dinh VM (2023) Application of endophytic bacterium *Bacillus velezensis* BTR11 to control bacterial leaf blight disease and promote rice growth. *Egypt. J. Biol. Pest Control.* 33(1):

43. Dubey A, Malla MA, Kumar A, Dayanandan S, Khan ML (2020) Plants endophytes: unveiling hidden agenda for bioprospecting toward sustainable agriculture. *Crit. Rev. Biotechnol.* 40(8): 1210-1231.

44. Duchateau S, Crouzet J, Dorey S, Aziz A (2024) The plant-associated *Pantoea* spp. as biocontrol agents: Mechanisms and diversity of bacteria-produced metabolites as a prospective tool for plant protection. *Biol. Control.* 188: 105441. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2024.105441.

45. Egorova M, Mazurin E, Ignatov A (2015) First report of *Pantoea ananatis* causing grain discolouration and leaf blight of rice in Russia. *New Dis. Rep.* 32: 21. https://doi.org/10.5197/j.2044-0588.2015.032.021.

46. Eid AM, Fouda A, Abdel-Rahman MA, Salem SS, Elsaied A, Oelmüller R, Hijri M, Bhowmik A, Elkelish A, Hassan SED (2021) Harnessing bacterial endophytes for promotion of plant growth and biotechnological applications: an overview. *Plants* 10: 935. https://doi.org/ 10.3390/plants10050935

47. Fadiji AE & Babalola OO (2020) Elucidating mechanisms of endophytes used in plant protection and other bioactivities with multifunctional *Prospects. Front. Bioeng. Biotechnol.* 8:467. doi: 10.3389/fbioe.2020.00467

48. Fazle-Rabbee M & Baek KH (2020) Antimicrobial activities of lipopeptides and polyketides of *Bacillus velezensis* for agricultural applications. *Molecules* 25(21): 4973.

49. Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution.* 39: 783-791.

50. Feng L, Schaefer AL, Hu M, Chen R, Greenberg EP (2019) Virulence factor identification in the banana pathogen *Dickeya zeae* MS2. *Appl. Environ. Microbiol*. 85:e01611–e01619. doi: 10.1128/AEM.01611-19.

51. Ferrando L & Scavino AF (2015) Strong shift in the diazotrophic endophytic bacterial community inhabiting rice (*Oryza sativa*) plants after flooding. *FEMS Microbiol. Ecol.* 91:fiv104. doi: 10.1093/femsec/fiv104

52. Gamalero E, Favale N, Bona E, Novello G, Cesaro P, Massa N, Glick BR, Orozco-Mosqueda MdC, Berta G, Lingua G (2020) Screening of bacterial endophytes able to promote plant growth and increase salinity tolerance. *Appl. Sci.* 10: 5767.

53. Glassner H, Zchori-Fein E, Yaron S, Sessitsch A, Sauer U, Compant S (2018) Bacterial niches inside seeds of *Cucumis melo* L. *Plant Soil* 422: 101-113.

54. Gluck-Thaler E, Cerutti A, Perez-Quintero AL, Butchacas J, Roman-Reyna V, Madhavan VN, Shantharaj D, Merfa MV, Pesce C, Jauneau A (2020) Repeated gain and loss of a single gene modulates the evolution of vascular plant pathogen lifestyles. *Sci. Adv.* 6: eabc4516.

55. Gnanamanickam SS (2009) Biological control of bacterial blight of rice. Biological control of rice diseases. *Progr. Biol. Control.* 8: 67-78.

56. Gopal M & Gupta A (2016) Microbiome selection could spur next-generation plant breeding strategies. *Front Microbiol* 7: 1971. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01971

57. Haldar S & Sengupta S (2023) An overview of the multifaceted role of plant growth-promoting microorganisms and endophytes in sustainable agriculture: developments and prospects. *Microbial Symbionts and Plant Health: Trends and Applications for Changing Climate*, 179-208.

58. Halim RA, Hasan NA, Ramachandran K (2020) Screening of endophytic bacteria as biocontrol agents against bacteria leaf blight (*Xanthomonas oryzae*). *HAYATI J. Biosci.* 27(3): 215-215.

59. Hardoim PR, van Overbeek LS, Berg G, Pirttila AM, Compant S, Campisano A, Doring M, Sessitsch A (2015) The hidden world within plants: Ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 79: 293–320.

60. Harrison JG & Griffin EA (2020) The diversity and distribution of endophytes across biomes, plant phylogeny and host tissues: how far have we come and where do we go from here? *Environ. Microbiol.* 22: 2107–2123. https://doi.org/10.1111/1462-2920.14968.

61. He Y, Miao X, Xia Y, Chen X, Liu J, Zhou G (2024) The research of antagonistic endophytic bacterium *Bacillus velezensis* CSUFT-BV4 for growth promotion and induction of resistance to anthracnose in *Camellia oleifera*. *Microorganisms* 12(4): 763.

62. Hoa PTP, Hop DV, Quang NQ, Ton PH, Ha TH, Hung NV, Van NT, Hai TV, Quy NTK, Dao NTA, Thom VT (2014) Biological control of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* causing rice bacterial blight disease by *Streptomyces toxytricini* (VN08-A-12), isolated from soil and leaf-litter samples in Vietnam. *Biocont. Sci.* 19: 3.

63. Holscher T & Kovacs AT (2017) Sliding on the surface: bacterial spreading without an active motor. *Environ. Microbiol.* 19: 2537–2545. https://doi.org/10.1111/1462-2920.13741.

64. Hu HJ, Chen YL, Wang YF, Tang YY, Chen SL, Yan SZ (2017) Endophytic *Bacillus cereus* effectively controls *Meloidogyne incognita* on tomato plants through rapid rhizosphere occupation and repellent action. *Plant Dis.* 101(3): 448-455.

65. Husain FM, Nasser A. Al-Shabib, Noor S, Khan RA, Khan MS, Ansari FA, Khan MS, Khan A, Ahmad I (2019) Chapter 12 - Current strategy to target bacterial quorum sensing and virulence by phytocompounds. Editor(s): Sajjad M, Khan A, Iqbal A, Chattopadhyay D, *New Look to Phytomedicine*, Academic Press, pp 301-329, ISBN 9780128146194, https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814619-4.00012-4.

66. Ji GH, Wei LF, Wu YP, Bai XH (2008) Biological control of rice bacterial blight by *Lysobacter antibioticus* strain 13-1. *Biol. Control* 45: 288-296.

67. Ji H, Zhou L, Yang R, Xu M, Qian H, Tong J,Sun M (2025) Overexpression of ORP1C gene increases the rice resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* through

negatively regulating transcription activator-like effectors translocation. *Plant Signal. Behav.* 20(1): 2441864.

68. Jiao R, Munir S, He P (2020) Biocontrol potential of the endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* YN201732 against tobacco powdery mildew and its growth promotion. *Biol Control*. 143: 104160.

69. Jin P, Chu L, Xuan Z, Lin Z, Fang Y, Pan X, Miao W (2024*) Bacillus velezensis*, a new valuable source of bioactive molecules within plant microbiomes and natural weapons for the biocontrol of plant pathogens. *Trop. Plants* 4(1).

70. Jun L, Yan L, Ligeng M (2019) CRISPR/Cas9-Based genome editing and its applications for functional genomic analyses in plants. *Small Meth.* 3: 1800473.

71. Ke Y, Hui S, Yuan M (2017) *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* inoculation and growth rate on rice by leaf clipping method, *Bio-protocol* 7 (19): e2568. DOI: 10.21769/BioProtoc.2568.

72. Kim N, Kim JJ, Kim I, Mannaa M, Park J, Kim J, Lee HH, Lee SB, Park DS, Sul WJ (2020) Type VI secretion systems of plantpathogenic *Burkholderia* glumae BGR1 play a functionally distinct role in interspecies interactions and virulence. *Mol. Plant Pathol.* 21: 1055–1069.

73. Kini K, Agnimonhan R, Dossa R, Silué D, Koebnik R (2021) Genomics-informed multiplex PCR scheme for rapid identification of rice-associated bacteria of the genus *Pantoea*. *Plant Dis.* 105: 2389–2394. https://doi.org/10.1094/PDIS-07-20-1474-RE.

74. Kohl J, Kolnaar R, Ravensberg WJ (2019) Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: relevance beyond efficacy. *Front. Plant Sci*. 10. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00845.

75. Kõiv V, Roosaare M, Vedler E, Kivistik PA, Toppi K, Schryer DW (2015) Microbial population dynamics in response to *Pectobacterium atrosepticum* infection in potato tubers. *Sci. Rep.* 5:11606. doi: 10.1038/ srep11606.

76. Krishnamoorthy A, Gupta A, Sar P, Maiti MK (2021) Metagenomics of two gnotobiotically grown aromatic rice cultivars reveals genotype-dependent and tissue-specific colonization of endophytic bacterial communities attributing multiple plant growth promoting traits. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 37: 1-16. https://doi.org/10.1007/s11274-021-03022-5.

77. Kube M, Siewert C, Migdoll AM, Duduk B, Holz S, Rabus R, Reinhardt R (2014) Analysis of the complete genomes of *Acholeplasma brassicae*, *A. palmae* and *A. laidlawii* and their comparison to the obligate parasites from '*Candidatus Phytoplasma'. Microb. Physiol*. 24: 19-36. https://doi.org/10.1159/000354322.

78. Kumar A, Droby S, Singh VK, Singh SK, White, JF (2020a) Entry, colonization, and distribution of endophytic microorganisms in plants. In *Microbial endophytes* pp. 1-33. Woodhead Publishing.

79. Kumar M, Kumar A, Sahu KP, Patel A, Reddy B, Sheoran N, Rathour R (2021) Deciphering core-microbiome of rice leaf endosphere: Revelation by metagenomic and microbiological analysis of aromatic and non-aromatic genotypes grown in three geographical zones, *Microbiol. Res.* 246: 126704.

80. Kumar V, Jain L, Jain SK, Chaturvedi S, Kaushal P. Bacterial endophytes of rice (Oryza sativa L.) and their potential for plant growth promotion and antagonistic

activities (2020b) *South Afr. J. Botany*. 134: 50-63. https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.02.017

81. Kunda P, Dhal PK, Mukherjee A (2018) Endophytic bacterial community of rice (*Oryza sativa* L.) from coastal saline zone of West Bengal: 16S rRNA gene based metagenomics approach. *Meta Gene* 18: 79-86. https://doi.org/10.1016/J.MGENE.2018.08.004.

82. Kuźniar A, Włodarczyk K,Wolińska A (2019) Agricultural and other biotechnological applications resulting from trophic plant-endophyte interactions. *Agronomy* 9(12): 779. https://doi.org/10.3390/agronomy9120779

83. LaGier MJ, McDaniel M, Ragner A, Castillo A (2022) Identification and characterization of a potential antibiotic producing strain of *Pantoea ananatis*. *J. Genomics* 10: 26.

84. Lakshmanan V, Shantharaj D, Li G, Seyfferth AL, Janine Sherrier D, Bais HP (2015) A natural rice rhizospheric bacterium abates arsenic accumulation in rice (*Oryza sativa* L.). *Planta* 242: 1037-50.

85. Lazarev VN, Levitskii SA, Basovskii YI, Chukin MM, Akopian TA, Vereshchagin VV (2011) Complete genome and proteome of *Acholeplasma laidlawii*. *J. Bacteriol*. 193: 4943-53. https://doi.org/10.1128/JB.05059-11.

86. Lee J, Jung W, Ahsan SM, Jung H, Choi HW (2024) Identification of *Pantoea ananatis* strain BCA19 as a potential biological control agent against *Erwinia amylovora*. *Front.Microbiol.* 15: 1493430. https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1493430

87. Li B, Li Q, Xu Z, Zhang N, Shen Q, Zhang R (2014) Responses of beneficial *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to different soilborne fungal pathogens through the alteration of antifungal compounds production. *Front Microbiol.* 5: 636. .doi:10.3389/fmicb.2014.00636 .

88. Li J, Wang C, Liang W, Liu S (2021) Rhizosphere microbiome: the emerging barrier in plant-pathogen interactions. *Front. Microbiol.* 12: 772420.

89. Li SH, Xu SR, Zhang RN, Liu Y, Zhou RC (2016) The Antibiosis action and rice-induced resistance, mediated by a lipopeptide from *Bacillus amyloliquefaciens* B014, in controlling rice disease caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 26: 748 – 756.

90. Liu H, Carvalhais LC, Crawford M, Singh E, Dennis PG, Pieterse CMJ and Schenk PM (2017) Inner plant values: diversity, colonization and benefits from endophytic bacteria. *Front. Microbiol*. 8: 2552. doi: 10.3389/fmicb.2017.02552.

91. Liu H, Li J, Carvalhais LC, Percy CD, Prakash Verm J, Schenk PM (2021) Evidence for the plant recruitment of beneficial microbes to suppress soil-borne pathogens. *New Phytol.* 229: 2873–2885. doi: 10.1111/nph.17057.

92. Love MI, Huber W, Anders S (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 15: 1-21. https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8.

93. Lu Y, Zhong, Q, Xiao S, Wang B, Ke X, Zhang Y, Chen L (2022) A new NLR disease resistance gene Xa47 confers durable and broad-spectrum resistance to bacterial blight in rice. *Front. Plant Sci.* 13: 1037901.

94. Lv L, Luo J, Ahmed T, Zaki HEM, Tian Y, Shahid MS, Chen J, Li B (2022) Beneficial effect and potential risk of *Pantoea* on rice production. *Plants* 11: 2608. https://doi.org/10.3390/plants11192608.

95. Manna M & Seo YS (2021) Plants under the attack of allies: Moving towards the plant pathobiome paradigm. *Plants* 10(1): 125. https://doi.org/10.3390/plants10010125.

96. Mansfield J, Genin S, Magori S, Citovsky V, Sriariyanum M, Ronald P (2012) Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 13: 614–629. doi: 10.1111/j.1364-3703.2012.00804.x.

97. McCoy RE, Basham HG, Tully JG, Rose DL, Carle P, Bové JM (1984) *Acholoplasma florum*, a new species isolated from plants. *Int. J. Syst. Bacteriol*. 34: 11-15. https://doi.org/10.1099/00207713-34-1-11.

98. McMurdie PJ & Holmes S (2013) Phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data (M Watson, Ed.). *PLoS One* 8: e61217. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217.

99. Megías E, Megías M, Ollero FJ, Hungria M (2016) Draft genome sequence of *Pantoea ananatis* strain AMG521, a rice PGPB endophyte isolated from the Guadalquivir marshes in southern Spain. *Genome Announc* 4(1): e01681-15

100. Michl K, Berg G & Cernava T (2023) The microbiome of cereal plants: The current state of knowledge and the potential for future applications. *Environ. Microbiome* 18: 28. https://doi.org/10.1186/s40793-023-00484-y.

101. Mina D, Pereira JA, Lino-Neto T, Baptista P (2020) Epiphytic and endophytic bacteria on olive tree phyllosphere: exploring tissue and cultivar effect. *Microb Ecol* 80: 145–157. https://doi.org/10.1007/s00248-020- 01488-8.

102. Mishra, S, Priyanka, Sharma S (2022). Metabolomic insights into endophyte-derived bioactive compounds. *Front. Microbiol*. 13: 835931.

103. Mitter B, Petric A, Shin MW, Chain PS, Hauberg-Lotte L, Reinhold-Hurek B (2013) Comparative genome analysis of *Burkholderia phytofirmans* PsJN reveals a wide spectrum of endophytic lifestyles based on interaction strategies with host plants. *Front. Plant Sci.* 4: 120. doi: 10.3389/fpls. 2013.00120.

104. Moronta-Barrios F, Gionechetti F, Pallavicini A, Marys E, Venturi V (2018) Bacterial microbiota of rice roots: 16S-based taxonomic profiling of endophytic and rhizospheric diversity, endophytes isolation and simplified endophytic community. *Microorganisms* 6: 14. https://doi.org/10.3390/microorganisms6010014.

105. Mosquito S, Bertani I, Licastro D, Compant S, Myers MP, Hinarejos E (2020) In planta colonization and role of T6SS in two rice *Kosakonia* endophytes. *Mol. Plant Microbe. Interact.* 33: 349–363.

106. Nemchinov LG, Iris BM, Uschapovsky IV, Grinstead S, Shao J, Postnikova OA (2023) Composition of the alfalfa pathobiome in commercial fields. *Front. Microbiol.* 14: 1225781.

107. Niño-Liu DO, Ronald PC, Bogdanove AJ (2006) *Xanthomonas oryzae* pathovars: model pathogens of a model crop. *Mol. Plant Pathol.* 7: 303-324.

108. Oksanen J, Blanchet FG, Kindt R, Legendre P, Minchin PR, O'Hara R (2016) Vegan: Community ecology package. In: R package version 2: 3–5.

109. Okubo T, Ikeda S, Sasaki K, Ohshima K, Hattori M, Sato T, Minamisaw K (2014) Phylogeny and functions of bacterial communities associated with field-grown rice shoots. *Microbes Environ.* 29(3): 329-332.

110. Olanrewaju OS, Glick BR, Babalola OO (2024) Beyond correlation: Understanding the causal link between microbiome and plant health. *Heliyon*, 10(23).

111. Ooi YS, Nor NMM, Furusawa G, Tharek M, Ghazali AH (2022) Application of bacterial endophytes to control bacterial leaf blight disease and promote rice growth. *Plant Pathol. J.* 38(5): 490.

112. Oulas A, Pavloudi C, Polymenakou P, Pavlopoulos GA, Papanikolaou N, Kotoulas G, Iliopoulos L (2015). Metagenomics: tools and insights for analyzing next-generation sequencing data derived from biodiversity studies. *Bioinform. Biol. Insights* 9: BBI-S12462.

113. Palmieri D, Ianiri G, Del Grosso C, Barone G, De Curtis F, Castoria R, Lima G (2022) Advances and perspectives in the use of biocontrol agents against fungal plant diseases. *Horticulturae* 8(7): 577.

114. Peng X, Xie J, Li W, Xie H, Cai Y, Ding X (2021) Comparison of wild rice (*Oryza longistaminata*) tissues identifies rhizome-specific bacterial and archaeal endophytic microbiomes communities and network structures. *Plos One.* https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246687.

115. Pereira LB, Thomazella DP, Teixeira PJ (2023) Plant-microbiome crosstalk and disease development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 72: 102351. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2023.102351

116. Piromyou P, Songwattana P, Greetatorn T, Okubo T, Kakizaki KC, Prakamhang J (2015) The Type III secretion system (T3SS) is a determinant for rice-endophyte colonization by non-photosynthetic *Bradyrhizobium*. *Microbes Environ.* 30: 291–300. doi: 10.1264/jsme2.ME15080

117. Podolich O, Ardanov P, Zaets I, Pirttilä AM, Kozyrovska N (2015) Reviving of the endophytic bacterial community as a putative mechanism of plant resistance. *Plant Soil* 388: 367-77. https://doi.org/10.1007/s11104-014-2235-1.

118. Puri A, Padda KP, Chanway CP (2018) Evidence of endophytic diazotrophic bacteria in lodge pole pine and hybrid white spruce trees growing in soils with different nutrient statuses in the West Chilcotin region of British Columbia, Canada. *For. Ecol. Manag.* 430: 558–565.

119. Rabbee MF, Ali MS, Choi J, Hwang BS, Jeong SC, Baek KH (2019) *Bacillus velezensis*: a valuable member of bioactive molecules within plant microbiomes. *Molecules*, 24(6): 1046.

120. Rana KL, Kour D, Kaur T, Devi R, Yadav AN, Yadav N, Dhaliwal HS, Saxena AK (2020) Endophytic microbes: Biodiversity, plant growth-promoting mechanisms and potential applications for agricultural sustainability. *Antonie Van Leeuwenhoek* 113: 1075–1107.

121. Rashid MHO, Khan A, Hossain MT, Chung YR (2017) Induction of systemic resistance against aphids by endophytic *Bacillus velezensis* YC7010 via expressing phytoalexin deficient in *Arabidopsis*. *Front. Plant Sci.* 8: 211.

122. Ren G, Zhang H, Lin X, Zhu J, Jia Z (2015) Response of leaf endophytic bacterial

community to elevated CO_2 at different growth stages of rice plant. *Front. Microbiol.* 6: 855. doi: 10.3389/fmicb.2015.00855.

123. Resti Z, Liswarni Y, Martinius M (2020) Endophytic bacterial consortia as biological control of bacterial leaf blight and plant growth promoter of rice (*Oryza sativa* L.). *J. Appl. Agr. Sci. Technol.* 4(2): 134-145. https://doi.org/10.32530/jaast.v4i2.146.

124. Rodríguez CE, Antonielli L, Mitter B, Trognitz F, Sessitsch A (2020) Heritability and functional importance of the *Setaria viridis* bacterial seed microbiome. *Phytobiomes J.* 4: 40–52.

125. Rooney AP, Price NP, Ehrhardt C, Swezey JL, Bannan JD (2009) Phylogeny and molecular taxonomy of the *Bacillus subtilis* species complex and description of *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* subsp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59: 2429 - 2436.

126. Saitou N & Nei M (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.

127. Santoyo G, Moreno-Hagelsieb G, Orozco-Mosqueda C, Glick BR (2016) Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiol. Res.* 183: 92–99. https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.11.008.

128. Schlaeppi K & Bulgarelli D (2015) The plant microbiome at work. *Mol. plant-microb interact.* 28(3): 212-217.

129. Sessitsch A, Hardoim P, Döring J, Weilharter A, Krause A, Woyke T (2012) Functional characteristics of an endophyte community colonizing rice roots as revealed by metagenomic analysis. *Mol. Plant Microbe Interact.* 25: 28–36. https://doi.org/10.1094/MPMI-08-11-0204.

130. Shahzad R, Waqas M, Khan AL, Asaf S, Khan MA, Kang SM (2016) Seed-borne endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* RWL-1 produces gibberellins and regulates endogenous phytohormones of *Oryza sativa*. *Plant Physiol. Biochem.* 106: 236–243. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.05.006.

131. Sharma A, Johri BN, Sharma AK, Glick BR (2003) Plant growth-promoting bacterium Pseudomonas sp. strain GRP3 influences iron acquisition in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilzeck). *Soil Biol. Biochem*. 35: 887–894.

132. Sheibani-Tezerji R, Rattei T, Sessitsch A, Trognitz F, Mitter B (2015) Transcriptome profiling of the endophyte *Burkholderia phytofirmans* PsJN indicates sensing of the plant environment and drought stress. *mBio* 6:e00621- 15. https://doi.org/10.1128/mBio.00621-15

133. Shekhar S, Sinha D, Kumari A (2020) An overview of bacterial leaf blight disease of rice and different strategies for it's management. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 9 (4): 2250-2265.

134. Siewert C, Hess WR, Duduk B, Huettel B, Reinhardt R, Büttner C, Kube M (2014) Complete genome determination and analysis of *Acholeplasma oculi* strain 19L, highlighting the loss of basic genetic features in the *Acholeplasmataceae*. *BMC Genome* 15: 931. https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-931.

135. Singh B, Boukhris I, Pragya Kumar V, Yadav AN, Farhat-Khemakhem A, Kumar A, Singh D, Blibech M, Chouayekh H (2020) Contribution of microbial phytases to the

improvement of plant growth and nutrition: A review. *Pedosphere* 30: 295–313.

136. Smith DD, Nickzad A, Déziel E, Stavrinides J. (2016) A novel glycolipid biosurfactant confers grazing resistance upon *Pantoea ananatis* BRT175 against the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Msphere*. 1: e00075-15. https://doi.org/10.1128/mSphere.00075-15.

137. Smits THM, Duffy B, Blom J, Ishimaru CA, Stockwell VO (2019) Pantocin A, a peptide-derived antibiotic involved in biological control by plant-associated *Pantoea* species. *Arch. Microbiol.* 201: 713–722. https://doi.org/10.1007/s00203-019-01647-7.

138. Strauss E (2009) Phytoplasma research begins to bloom. *Science* 325: 388-90. https://doi.org/10.1126/science.325_388.

139. Su P, Wicaksono WA, Li C, Michl K, Berg G, Wang D (2022) Recovery of metagenome-assembled genomes from the phyllosphere of 110 rice genotypes. *Sci. Data* 9: 254. https://doi.org/10.1038/s41597-022-01320-7.

140. Subramanian P, Mageswari A, Kim K, Lee Y, Sa T (2015) Psychrotolerant endophytic *Pseudomonas* sp. strains OB155 and OS261 induced chilling resistance in tomato plants (*Solanum lycopersicum* Mill.) by activation of their antioxidant capacity. *Mol. Plant Microbe Interact.* 28: 1073–1081. doi: 10.1094/ MPMI- 01- 15- 0021- R.

141. Tian BY, Cao Y, Zhang KQ (2015). Metagenomic insights into communities, functions of endophytes, and their associates with infection by root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*, in tomato roots. *Sci Rep* 5: 17087. doi: 10.1038/srep17087

142. Tosi M, Mitter EK, Gaiero J, Dunfield KE (2020) It takes three to tango: the importance of microbes, host plant and soil management to elucidate manipulation strategies for the plant microbiome. *Can J Microbiol* 66:413–433. doi: 10.1139/cjm-2020-0085

143. Tran DM & Nguyen TH (2023) Rice (*Oryza sativa* L.) cultivated in the Central Highlands of Vietnam: Dataset on the endophytic microbiome. *Data in Brief* 50: 109551.

144. Tran DM & Nguyen TH (2024) Endophytic bacterial dataset of the Cavendish banana grown in Dak Lak Province of Vietnam using 16S rRNA gene metabarcoding. *Data in Brief* 52: 109863.

145. Trivedi P, Batista BD, Bazany KE, Singh BK (2022) Plant-microbiome interactions under a changing world: responses, consequences and perspectives. *New. Phytol.* 234: 1951–1959. doi: 10.1111/nph.18016.

146. Trivedi P, Leach JE, Tringe SG, Sa T, Singh BK (2020) Plant–microbiome interactions: from community assembly to plant health. *Nat. Rev. Microbiol.* 18(11): 607-621.

147. Tu CK, Huang WD, Wang PH, Lin WL, Chen HY, Rau ST, Chang TC, Young LS, Wang CL, Lee MH (2024) The rice endophytic bacterium *Bacillus velezensis* LS123N provides protection against multiple pathogens and enhances rice resistance to wind with increase in yield. *Biol. Control.* 192: 105507. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2024.105507.

148. Tully JG, Whitcomb RF, Rose DL, Bové JM, Carle P, Somerson NL, Williamson DL, Eden-Green S (1994) *Acholeplasma brassicae* sp. nov. and *Acholeplasma palmae* sp.

nov., two non-sterol-requiring mollicutes from plant surfaces. *Int. J. Syst. Bacteriol*. 44: 680-4. https://doi.org/10.1099/00207713-44-4-680.

149. Upreti R & Thomas P (2015) Root-associated bacterial endophytes from *Ralstonia solanacearum* resistant and susceptible tomato cultivars and their pathogen antagonistic e ects. *Front. Microbiol.* 6: 255. doi: 10.3389/fmicb.2015. 00255.

150. Vandenkoornhuyse P, Quaiser A, Duhamel M, Le Van A, Dufresne A (2015) The importance of the microbiome of the plant holobiont. *New Phytol.* 206(4): 1196-1206.

151. Verma P, Yadav AN, Khannam KS, Panjiar N, Kumar S, Saxena AK, Suman A (2015) Assessment of genetic diversity and plant growth promoting attributes of psychrotolerant bacteria allied with wheat (*Triticum aestivum*) from the northern hills zone of India. *Ann. Microbiol.* 65: 1885–1899.

152. Vorholt J (2012) Microbial life in the phyllosphere. *Nat Rev Microbiol* 10: 828–840. https://doi.org/10.1038/nrmicro2910.

153. Vorholt JA, Vogel C, Carlström CI, Müller DB (2017) Establishing causality: opportunities of synthetic communities for plant microbiome research. *Cell Host Microbe* 22:142–155. doi: 10.1016/j.chom.2017. 07.004.

154. Walitang D, Samaddar S, Roy Choudhury A, Chatterjee P, Ahmed S, Sa T (2019) Diversity and plant growth-promoting potential of bacterial endophytes in rice. In "*Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): prospects for sustainable agriculture*", pp. 3-17.

155. Walterson AM, Smith DDN, Stavrinides J (2014) Identification of a Pantoea biosynthetic cluster that directs the synthesis of an antimicrobial natural product. *PLoS ONE* 9(5): e96208. doi:10.1371/journal.pone.0096208

156. Wang P, Kong X, Chen H, Xiao Y, Liu H, Li X (2021) Exploration of intrinsic microbial community modulators in the rice endosphere indicates a key role of distinct bacterial taxa across different cultivars. *Front. Microbiol*. 12. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.629852.

157. Watts D, Palombo EA, Jaimes Castillo A, Zaferanloo B (2023) Endophytes in agriculture: potential to improve yields and tolerances of agricultural crops. *Microorganisms* 11: 1276. https://doi.org/ 10.3390/microorganisms11051276.

158. Webb KM, Oña I, Bai J, Garrett KA, Mew T, Vera-Cruz CM (2010) A benefit of high temperature: increased effectiveness of a rice bacterial blight disease resistance gene. *New Phytol*. 185: 568-576.

159. Wei CY, Lin L, Luo LJ, Xing YX, Hu CJ, Yang LT, Li YR, An Q (2014) Endophytic nitrogen-fixing *Klebsiella variicola* strain DX120E promotes sugarcane growth. *Biol. Fertil. Soils* 50: 657–666.

160. Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173(2): 697-703.

161. Wu L, Liu R, Niu Y, Lin H, Ye W, Guo L, Hu X (2016) Whole genome sequence of *Pantoea ananatis* R100, an antagonistic bacterium isolated from rice seed. *J. Biotechnol.* 225: 1-2.

162. Wu L, Wu H, Chen L, Yu X, Borriss R, Gao X (2015) Difficidin and bacilysin from Bacillus amyloliquefaciens FZB42 have antibacterial activity against *Xanthomonas*

oryzae rice pathogens. *Sci. Rep.* 5: 12975. doi:10.1038/srep12975.

163. Xia Y, Liu J, Chen C, Mo X, Tan Q, He Y, Wang Z, Yin J, Zhou G (2022) The multifunctions and future prospects of endophytes and their metabolites in plant disease management. *Microorganisms* 10(5): 1072. https://doi.org/10.3390/microorganisms10051072

164. Xue Y, Hu M, Chen S, Hu A, Li S, Han H, Lu G, Zeng L, Zhou J (2021) *Enterobacter asburiae* and *Pantoea ananatis* causing rice bacterial blight in China. *Plant Dis.* 105: 2078-2088. https://doi.org/10.1094/PDIS-10-20-2292-RE.

165. Zachow C, Jahanshah G, de Bruijn I, Song C, Ianni F, Pataj Z (2015) The novel lipopeptide poaeamide of the endophyte *Pseudomonas poae* RE1-1-14 is involved in pathogen suppression and root colonization. *Mol. Plant Microbe Interact.* 28: 800–810. doi: 10.1094/MPMI-12-14- 0406-R.

166. Zeng J, Xu T, Cao L, Tong C, Zhang X, Luo D, Zhu Y (2018) The role of iron competition in the antagonistic action of the rice endophyte *Streptomyces sporocinereus* OsiSh-2 against the pathogen *Magnaporthe oryzae*. *Microb. Ecol.* 76: 1021-1029.

167. Zhang H & Wang S (2013) Rice versus *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*: a unique pathosystem. *Curr. Opin. Plant Biol.* 16: 188–195. doi: 10.1016/j.pbi. 2013.02.008.

168. Zhang J, Liu W, Bu J, Lin Y, Bai Y (2023) Host genetics regulate the plant microbiome. *Curr. Opin. Microbiol.* 72: 102268. https://doi.org/10.1016/j.mib.2023.102268.

169. Zhang W, Fan X, Li J, Ye T, Mishra S, Zhang L, Chen S (2021) Exploration of the quorum-quenching mechanism in *Pseudomonas nitroreducens* W-7 and its potential to attenuate the virulence of *Dickeya zeae* EC1. *Front. Microbiol.* 12: 694161.

170. Zhao X, Zhou J, Tian R, Liu Y (2022) Microbial volatile organic compounds: Antifungal mechanisms, applications, and challenges. *Front. Microbiol*. 13: 922450 https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.922450.

Web:

Viện nghiên cứu lúa Quốc tế. *Bacterial blight.* Truy cập ngày 15/12/2024 tại http://www.knowledgebank.irri.org/decision-tools/rice-doctor/rice-doctor-fact-sheets/item/bacterial-blight

Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam. *Bệnh bạc lá*. Truy cập ngày 15/12/2024 tại https://vaas.vn/kienthuc/Caylua/10/074_bacla.htm

PHỤ LỤC

Phụ lục 1. Hình ảnh minh họa các cây lúa thu thập được. (A) Cây lúa khoẻ. (B) Cây lúa nhiễm bệnh bạc lá

Phụ lục 2: Phản ứng PCR khuyếch đại gen 16S rDNA và *rpoB*

Phụ lục 3: Thành phần các dung dịch và môi trường

Phụ lục 4: Danh sách mẫu lúa sử dụng cho phân tích metagenome

Phụ lục 5: Kết quả phân tích các chỉ số đa dạng alpha của các mẫu lúa

Phụ lục 6: Kết quả phân tích chia tỷ lệ đa chiều không theo hệ mét NMDS của các loài vi khuẩn dựa trên mức OTU thu được từ các mẫu khác nhau của hai giống lúa LA và TB

Phụ lục 7: Kết quả phân tích chia tỷ lệ đa chiều không theo hệ mét NMDS của các loài vi khuẩn dựa trên mức OTU thu được từ các mẫu lúa khỏe mạnh và bị bệnh của giống lúa TB

Phụ lục 8: Kết quả phân tích độ phong phú khác biệt (differential abundance analysis) ($P < 0,05$) của các mẫu lúa

Phụ lục 9: Phân lập vi khuẩn nội sinh lúa. (A) Đĩa phân lập; (B) Đĩa kiểm chứng (đặt trực tiếp mẫu rễ/thân/lá sau khi khử trùng bề mặt); (C) Đĩa kiểm chứng (cấy gạt nước rửa mẫu rễ lần cuối sau khi khử trùng bề mặt)

Phụ lục 10: Trình tự gen 16S rDNA và *rpoB* của chủng VY03 và VY148

Phụ lục 11. Các gen/cụm gen liên quan đến quá trình trao đổi chất của hai chủng *B. velezensis* VY03 và *P. ananatis* VY148

Phụ lục 12: Hình minh hoạ khả năng sinh siderophore của chủng VY148

Phụ lục 13: Hoạt tính đối kháng các chủng nấm bệnh *Ralstonia solanacearum* (A), *Alternaria alternata* (B) và *Colletotrichum gloeosporioides* (C) của chủng *B. velezensis* VY03. DMSO (50 µl) được sử dụng làm đối chứng và không có khả năng ức chế nấm bệnh.

Phụ lục 14: Bảng tổng hợp kết quả phân tích phương sai hai chiều (two-way ANOVA) ở các thời điểm khác nhau

Phụ lục 1. Hình ảnh minh họa các cây lúa thu thập được. (A) Cây lúa khoẻ. (B) Cây lúa nhiễm bệnh bạc lá

A  B 

Phụ lục 2: Phản ứng PCR khuyếch đại gen 16S rDNA và *rpoB*

Thành phần phản ứng	Thể tích (µl)	Nhiệt độ (°C)	Thời gian	Số chu kỳ
PCR gen 16S rDNA				
H_2O MQ	13,5	94	3 phút	
10x buffer	2,5	94	30 giây	35
BSA (3 mg/ml)	2,5	55	45 giây	
$MgCl_2$ (20 mM)	2	72	1,5 phút	
dNTP (2,5 mM)	2	72	7 phút	
Mồi 27F (50 pmol/µl)	0,5			
Mồi 1492R (50 pmol/µl)	0,5			
Taq polymerase (5u/µl)	0,5			
DNA Khuôn	1			
PCR gen *rpoB*				
H_2O MQ	13,5	94	5 phút	
10x buffer	2,5	94	30 giây	35
BSA (3 mg/ml)	2,5	55	30 giây	
$MgCl_2$ (20 mM)	2	72	1 phút	
dNTP (2,5 mM)	2	72	7 phút	
Mồi rpoB-2292f (50 pmol/µl)	0,5			
Mồi rpoB-3354r (50 pmol/µl)	0,5			
Taq polymerase (5u/µl)	0,5			
DNA Khuôn	1			

Phụ lục 3: Thành phần các dung dịch và môi trường

- Dung dịch Hoagland (Arnon, 1950):

Dung dịch Hoagland			**Thành phần vi lượng**	
Thành phần	Dung dịch gốc	Thể tích	Thành phần	Hàm lượng
KNO_3	1M	6 mL	H_3BO_3	2,86 g
$Ca(NO_3)_2$	1M	4 mL	$MnCl_2{\cdot}4\ H_2O$	1,81 g
$NH_4H_2PO_4$	1M	1 mL	$ZnSO_4{\cdot}7H_2O$	0,22 g
$MgSO_4.7H_2O$	1M	2 mL	$CuSO_4.5\ H_2O$	0,08 g
Fe-EDTA	1g Fe/L	5 mL	$MoO_3{\cdot}H_2O$ 85%	0,02 g
Vi lượng		1 mL	H_2O	Dẫn tới 1 L
H_2O		Dẫn tới 1 L		

- Thành phần các môi trường nuôi cấy vi sinh vật

Môi trường	**Thành phần (cho 1 L)**	**Hãng sản xuất/TLTK**
Tryptic Soy Broth TSB ½/ Agar TSA ½	Tryptone 8,5 g; soytone 1,5 g; glucose 1,25 g; NaCl 2,5 g; K_2HPO_4 1,25 g; agar 15 g (đối với TSA)	HiMedia (Ấn Độ)
Peptone Sucrose Broth PSB/Agar PSA	Peptone 10 g; sucrose 10 g; L-glutamic acid 1 g; agar 20 g (đối với PSA)	Ke et al., 2017
Landy	Glucose 20 g; KH_2PO_4 1 g; $MgSO_4.7H_2O$ 0,5 g; $FeSO_4.6H_2O$ 0.0012 g; $CuSO_4.7H_2O$ 0.0016 g; $MnSO_4$ 0.0004 g; axit L-glutamic 1 g; cao nấm men 10 g	Wu et al., 2015
GA	Glycerol 20 mL; $(NH_4)_2SO_4$ 1 g; K_2HPO_4 11,5 g; KH_2PO_4 4,5 g; $MgSO_4.7H_2O$ 0,12 g; thiamine HCl 2 mg; axit nicotinic 0,05 g; tryptone 5 g	Walterson et al., 2014

Phụ lục 4: Danh sách mẫu lúa sử dụng cho phân tích metagenome

TT	Tên mẫu	Tình trạng mẫu	Bộ phận	DNA genome			Số lần đọc	Số OTU
				Nồng độ (µg/mL)	$A_{260/280}$	$A_{260/230}$		
I	**Long An**							
1	A1	Khoẻ	Lá	137	2,18	2,13	669	30
2	A2	Khoẻ	Thân	23	1,76	1,00	4.170	63
3	A3	Khoẻ	Rễ	30	1,78	1,07	12.549	134
4	A5	Khoẻ	Lá	108	2,08	1,82	318	16
5	A6	Khoẻ	Lá	73	1,73	1,79	683	36
6	A7	Khoẻ	Lá	176	1,79	1,94	611	13
7	A8	Khoẻ	Thân	58	2,11	1,18	5.255	43
8	A9	Khoẻ	Rễ	40	3,09	0,95	6.540	104
9	A10	Khoẻ	Lá	141	1,71	1,99	492	22
10	B1	Khoẻ	Lá	209	1,76	2,14	364	19
11	B2	Khoẻ	Lá	157	1,67	1,86	1.478	30
12	B3	Khoẻ	Lá	103	1,56	1,33	13.953	75
13	B4	Khoẻ	Thân	43	1,36	0,96	6.844	76
14	B5	Khoẻ	Rễ	43	1,17	0,72	20.053	142
15	B6	Khoẻ	Lá	95	1,50	1,27	10.661	71
16	B7	Khoẻ	Lá	117	1,56	1,47	12.065	44
17	B8	Khoẻ	Lá	37	1,23	0,78	4.027	28
18	B9	Khoẻ	Lá	140	1,55	2,62	8.423	30
19	B10	Khoẻ	Thân	48	1,30	0,96	1.405	26
20	C1	Khoẻ	Rễ	46	1,99	0,87	18.824	114
21	C2	Khoẻ	Lá	72	1,76	1,46	2.727	30
22	C3	Khoẻ	Lá	136	1,80	1,70	10.042	43
23	C4	Khoẻ	Lá	81	1,21	1,34	22.676	66
II	**Thái Bình**							
1	C6	Khoẻ	Lá	145	1,83	2,08	194	17
2	C7	Khoẻ	Rễ	152	0,98	1,10	8.237	89
3	C8	Khoẻ	Thân	29	0,73	0,81	2.306	77
4	C10	Khoẻ	Lá	180	1,88	2,15	700	15
5	D1	Khoẻ	Lá	247	1,77	1,54	1.999	22
6	D2	Khoẻ	Rễ	10	1,80	0,57	17.063	120
7	D3	Khoẻ	Lá	274	1,86	2,10	538	20
8	D4	Khoẻ	Lá	204	1,86	2,07	371	16
9	D5	Khoẻ	Thân	8	1,71	0,33	4.051	64
10	D6	Khoẻ	Lá	125	1,86	1,85	235	12
11	D7	Khoẻ	Lá	190	1,84	2,03	936	20
12	D8	Bệnh	Lá	127	1,84	1,95	2.035	24

TT	Tên mẫu	Tình trạng mẫu	Bộ phận	DNA genome			Số lần đọc	Số OTU
				Nồng độ (µg/mL)	$A_{260/280}$	$A_{260/230}$		
13	E1	Bệnh	Lá	144	1,85	1,93	1.480	26
14	E2	Bệnh	Lá	127	1,65	1,83	3.460	29
15	E3	Bệnh	Lá	171	1,57	2,51	1.627	32
16	E4	Bệnh	Rễ	20	2,58	0,89	12.621	121
17	E5	Bệnh	Lá	125	1,79	1,75	3.118	26
18	E6	Bệnh	Lá	165	1,78	1,86	1.876	25
19	E7	Bệnh	Lá	174	1,76	1,85	1.707	25
20	E8	Bệnh	Lá	101	1,40	2,22	5.420	53

Phụ lục 5: Kết quả phân tích các chỉ số đa dạng alpha của các mẫu lúa

TT	Tên mẫu	Chao1	Shannon	Simpson
1	A1	37,5000000	2,3915850	0,8403860
2	A2	88,9090900	2,6512110	0,8541260
3	A3	168,0000000	3,3041620	0,9231810
4	A5	37,2500000	2,0889600	0,7900597
5	A6	56,8000000	2,5201520	0,8413746
6	A7	26,5000000	1,4630190	0,6606647
7	A8	74,5000000	2,0903270	0,8064613
8	A9	134,2500000	3,3815430	0,9379297
9	A10	54,5000000	2,0817690	0,7722751
10	B1	24,0000000	2,0533950	0,7996015
11	B2	47,1111100	1,8406350	0,7196171
12	B3	102,3333300	2,6632840	0,8613037
13	B4	96,0000000	2,8520230	0,8998073
14	B5	187,6666700	3,2316490	0,9195231
15	B6	95,2307700	2,5190070	0,8314138
16	B7	62,1666700	1,3646030	0,5626548
17	B8	47,1666700	1,6779700	0,7160176
18	B9	56,6666700	0,8774290	0,3405858
19	B10	52,0000000	1,3273960	0,4969441
20	C1	162,0000000	3,2590650	0,9169834
21	C2	38,5000000	1,4346240	0,6129486
22	C3	60,1111100	1,3703170	0,5833456
23	C4	83,0000000	1,9026270	0,7861252
24	C6	28,2500000	2,2549900	0,8176214
25	C7	92,7500000	2,6171310	0,8311102
26	C8	92,0769200	2,9547410	0,8899959
27	C10	21,0000000	1,5763370	0,6697469
28	D1	43,0000000	1,6201870	0,6706485
29	D2	135,0000000	3,1323100	0,9093491
30	D3	29,5000000	2,0027920	0,7577770
31	D4	29,6000000	1,7931880	0,6862635
32	D5	76,5000000	2,4998400	0,8488431
33	D6	25,0000000	1,6530860	0,6751652
34	D7	39,2500000	1,8345690	0,7436034
35	D8	31,0000000	1,6837790	0,6707392
36	E1	38,0000000	1,8052460	0,7166015
37	E2	57,3333300	1,8566570	0,7294136
38	E3	44,5000000	2,1568260	0,7961289
39	E4	131,7500000	3,5000460	0,9460430
40	E5	35,7500000	1,8993690	0,7541927
41	E6	35,0000000	1,8864390	0,7562937
42	E7	40,0000000	1,7406560	0,7050002
43	E8	93,0000000	1,8073680	0,6873622

Phụ lục 6: Kết quả phân tích chia tỷ lệ đa chiều không theo hệ mét NMDS của các loài vi khuẩn dựa trên mức OTU thu được từ các mẫu của hai giống lúa LA và TB

TT	Mẫu	MDS1	MDS2
1	A1	-0,06742507	-0,328207895
2	A2	0,39223345	-0,155823019
3	A3	1,0373069	0,108154373
4	A5	-0,34810939	0,558940525
5	A6	0,11076491	0,101430028
6	A7	-0,64370741	-0,548669731
7	A8	0,11899709	-0,348464969
8	A9	1,17524699	-0,001788644
9	A10	-0,08486855	0,261495323
10	B1	-0,60583839	-0,177856819
11	B2	-0,14868524	0,027795402
12	B3	0,25947005	-0,097368736
13	B4	0,4775271	-0,114172188
14	B5	0,96508892	0,026581651
15	B6	0,17850423	-0,111271287
16	B7	-0,07912206	-0,084119028
17	B8	-0,25172905	-0,098659913
18	B9	-0,14712658	-0,322466898
19	B10	0,2396077	-0,664455327
20	C1	0,9825679	-0,062282885
21	C2	-0,20540318	-0,279941651
22	C3	0,04780513	-0,198114203
23	C4	0,030082	-0,102351328
24	C6	-0,60275605	0,526173062
25	C7	0,46641513	0,054756504
26	C8	1,07751422	0,431050384
27	C10	-0,78664108	0,103310089
28	D1	-0,54339026	0,08239006
29	D2	1,09894439	0,234292612
30	D3	-0,62057355	0,253878897
31	D4	-0,68718317	-0,013194032
32	D5	0,37663406	-0,30252503
33	D6	-0,8034117	0,205059684
34	D7	-0,72423201	0,142864591
35	D8	-0,42998544	0,156494201
36	E1	-0,34369002	0,087093099
37	E2	-0,36688225	0,118054066
38	E3	-0,35054182	-0,108019206
39	E4	0,98187466	0,241792814
40	E5	-0,39772668	-0,016544153
41	E6	-0,45687093	0,028297038
42	E7	-0,45305645	0,108595977
43	E8	0,13237152	0,277796562

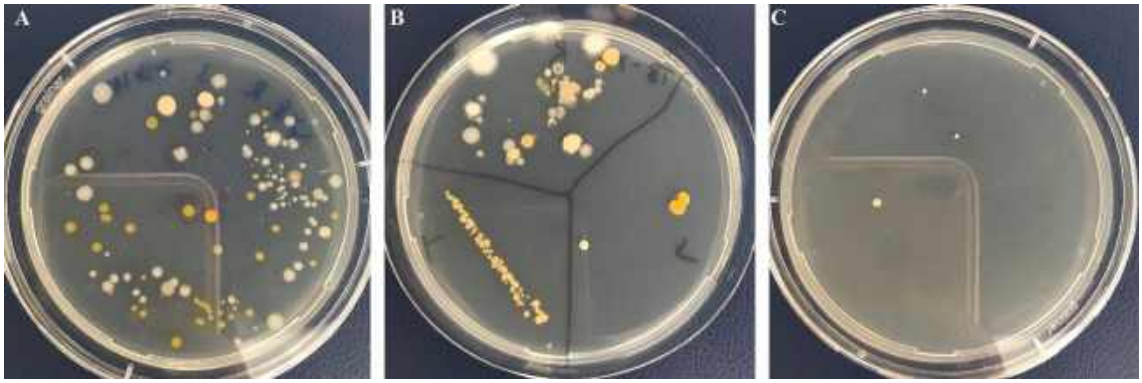
Phụ lục 7: Kết quả phân tích chia tỷ lệ đa chiều không theo hệ mét NMDS của các loài vi khuẩn dựa trên mức OTU thu được từ các mẫu lúa khỏe và bị bệnh của giống lúa TB

TT	Mẫu	MDS1	MDS2
1	C6	-0,3684536	-0,594006955
2	C7	0,6883875	0,33779021
3	C8	1,1741935	-0,32469772
4	C10	-0,6567998	-0,139944814
5	D1	-0,3930013	0,045739841
6	D2	1,2911087	-0,142921502
7	D3	-0,6400981	0,202697774
8	D4	-0,4276523	-0,369442205
9	D5	0,4791934	0,490120542
10	D6	-0,7330131	-0,022845324
11	D7	-0,6443013	-0,00087565
12	D8	-0,2281594	-0,029546928
13	E1	-0,140161	0,167311852
14	E2	-0,1800571	0,109686723
15	E3	-0,1269863	0,295886131
16	E4	1,1727419	-0,099746309
17	E5	-0,2177615	0,141568949
18	E6	-0,1668669	-0,036381596
19	E7	-0,1955961	0,028847801
20	E8	0,3132829	-0,059240818

Phụ lục 8: Kết quả phân tích độ phong phú khác biệt (differential abundance analysis) (P < 0,05) của các mẫu lúa

baseMean	log2FoldChange	lfcSE	stat	pvalue	padj	Phylum	Class	Order	Family	Genus
So sánh các mẫu lúa bệnh và khoẻ mạnh của giống TB										
22,148	-7,293	1,613	-4,520	0,000	0,001	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Xanthomonas
28,993	7,501	1,963	3,821	0,000	0,011	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	Bradyrhizobium
So sánh các mẫu lúa của giống LA và TB										
604,974	-11,870	1,610	-7,373	0,000	0,000	Tenericutes	Mollicutes	Acholeplasmatales	Acholeplasmataceae	Acholeplasma
27,386	-2,964	0,637	-4,649	0,000	0,000	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Sphingopyxis
41,840	2,569	0,596	4,308	0,000	0,001	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Aurantimonadaceae	Aurantimonas
2,759	4,917	1,188	4,139	0,000	0,001	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Serpens
11,767	2,760	0,775	3,560	0,000	0,008	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Intrasporangiaceae	Phycicoccus
2,717	4,212	1,193	3,530	0,000	0,008	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Gibbsiella
3,713	-3,027	0,925	-3,272	0,001	0,017	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Nocardioidaceae	Aeromicrobium
1,420583	1,421	2,462	0,777	3,170	0,002	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Intrasporangiaceae	Terrabacter

Phụ lục 9: Phân lập vi khuẩn nội sinh lúa. (A) Đĩa phân lập; (B) Đĩa kiểm chứng (đặt trực tiếp mẫu rễ/thân/lá sau khi khử trùng bề mặt); (C) Đĩa kiểm chứng (cấy gạt nước rửa mẫu rễ lần cuối sau khi khử trùng bề mặt).



Phụ lục 10: Trình tự gen 16S rDNA và *rpoB* của chủng VY03 và VY148

>MT256303.1 Bacillus velezensis strain VY03 16S ribosomal RNA gene

CTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGA
TGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCG
GGGCTAATACCGGATGGTTGTCTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACA
GATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCT
GAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATC
TTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTC
TGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACG
GCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAG
GGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTG
GGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGA
ACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAG
GATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCCTTAGT
GCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGAC
GGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGA
CATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCG
TCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCAT
TCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCAT
GCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAA
GCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCT
AGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACG
AGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTA

>MT256304.1 Pantoea ananatis strain VY148 16S ribosomal RNA gene

CTCGGGTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGGATCTGCCCGATAGAGGGGGATAACCACTGG
AAACGGTGGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCACTATCGGAT
GAACCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGCGGGGTAACGGCCCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAG
AGGATGACCAGCCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTG
CACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTT
CAGCGGGGAGGAAGGCGATAAGGTTAATAACCNNGTCGATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTA
ACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCA
CGCAGGCGGTCTGTTAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCTGGGAACTGCATTTGAAACTGGCAG
GCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATAC
CGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATT
AGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTTCCCTTGAGGAGTGGCTTCCGG
AGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGG
CCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCC
ACGGAATTCGGCAGAGATGCCTTAGTGCCTTCGGGAACTGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGC
TCGTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGATTCGG
TCGGGAACTCAAAGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCC
CTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGG
ACCTCATAAAGTGCGTCGTAGTCCGGATCGGAGTCTGCAACTCGACTCCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTA
ATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAG
TGGGTTGCAAAAGAAGTAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTTACCACTTTGTGATTCATGACTGGGG

>MW863332.1 Bacillus velezensis strain VY03 RNA polymerase beta subunit (rpoB) gene, partial cds

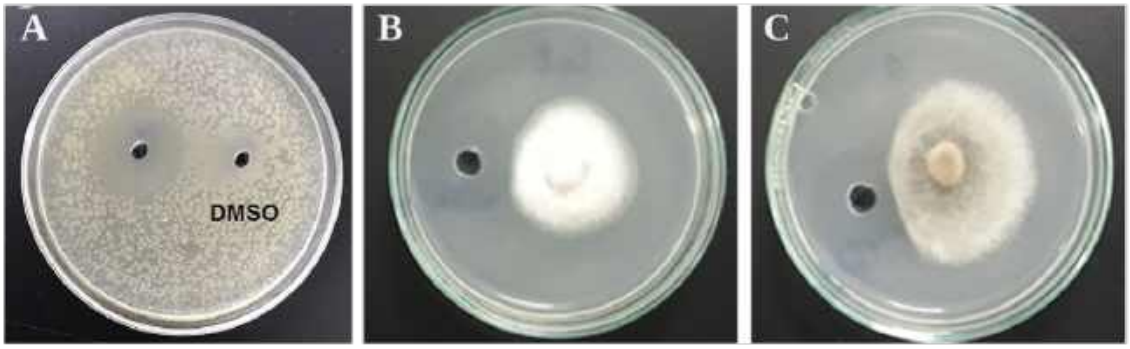
AGTCAGGATTTCTTGAAGCGTGTAAGCTGCGCCGTAAGCTTCAAGCGCCCAAACCTCCATCTCACCGAAA
CGCTGTCCGCCGAATTGGGCTTTACCGCCGAGAGGCTGCTGCGTAACAAGTGAGTAAGGACCTGTAGAAC
GGGCATGAAGTTTATCGTCAACCATGTGAGCCAGTTTGATCATGTACATGATTCCGACTGATACACGGTT
GTCGAACGGTTCTCCCGTACGGCCGTCATAAAGAACTGTTTTAGCGTCTCTTGACATGCCTGCTTCTTCA
AGTGTTTCCCACACATCTTCTTCACGCGCGCCGTCAAATACAGGTGACGCGATGTGAATGCCGAGGTAGC
GGGCAGCCATACCCATGTGAAGTTCTAATACCTGACCGATATTCATACGTGATGGTACACCCAGCGGGTT
AAGCATGATATCGATCGGCGTGCCGTCAGGAAGGTAAGGCATATCTTCTTCAGGAAGAATCTTCGAGATA
ACCCCTTTATTTCCGTGACGTCCGGCCATTTTATCACCTTCAGAAATCTTACGTTTCTGAACGATATATA
CGCGTACAAGCTGGTTCACTCCCGGAGGAAGTTCGTCGCCGTCTTCACGGTTGAAGACTTTTACGTCGTG
GATAATTCCGCCGCCGCCGTGAGGCACACGGAGAGAAGTATCACGGACTTCACGCGCTTTTTCTCCAAAG
ATCGCATGAAGAAGGCGTTCTTCAGCCGTAAGCTCAGTTACACCTTTAGGCGTTACTTTACCTACGAGAA
GGTCTCCGTCGTTGACTTCCGCACCGATACGGATAATTCCGCGGTCATCAAGGTTGCGAAGCGCGTCTTC
CCCTACGTTTGGAATATCGCGGGTGATCTCTTCCGGTCCAAGCTTTGTATCACGTGCTTCTGATTCATAT
TCTTC

Phụ lục 11. Các gen/cụm gen liên quan đến quá trình trao đổi chất của hai chủng *B. velezensis* VY03 và *P. ananatis* VY148

Nhóm chức năng	Số lượng gen/cụm gen	
	VY03	**VY148**
Cofactor, vitamin, nhóm prosthetic, sắc tố	147	143
Vỏ và thành tế bào	81	50
Độc lực, gây bệnh và phòng vệ	39	37
Chuyển hoá kali	3	13
Quang hợp	0	0
Phage, prophage, nhân tố chuyển vị, plasmid	13	7
Vận chuyển màng	41	44
Chuyển hoá và thu nhận sắt	23	28
Chuyển hoá RNA	66	53
Nucleoside và Nucleotide	94	100
Chuyển hoá Protein	210	210
Phân chia tế bào và chu kỳ tế bào	6	7
Di động và hoá hướng động	44	14
Điều hoà và truyền tín hiệu tế bào	26	44
Chuyển hoá thứ cấp	8	5
Chuyển hoá DNA	64	80
Axit béo, lipid và Isoprenoid	53	78
Chuyển hoá N	19	8
Ngủ đông và tạo bào tử	92	1
Hô hấp	41	89
Phản ứng với các điều kiện bất lợi	45	78
Chuyển hoá các hợp chất thơm	12	27
Amino acid và các dẫn xuất	299	332
Chuyển hoá S	6	26
Chuyển hoá P	11	33
Carbohydrate	219	335
Khác	24	12
Tổng	**1686**	**1854**

Phụ lục 12: Hình minh hoạ khả năng sinh siderophore của chủng VY148

Phụ lục 13: Hoạt tính đối kháng các chủng nấm bệnh *Ralstonia solanacearum* (A), *Alternaria alternata* (B) và *Colletotrichum gloeosporioides* (C). của chủng *B. velezensis* VY03. DMSO (50 µl) được sử dụng làm đối chứng và không có khả năng ức chế nấm bệnh.



Phụ lục 14: Bảng tổng hợp kết quả phân tích phương sai hai chiều (two-way ANOVA) ở các thời điểm khác nhau

Cặp thời điểm (ngày)	***P-value*** **(Thời điểm theo dõi)**	***P-value*** **(CTTN và ĐCks)**	**Độ biến thiên (%)**	**Ghi chú**
7–14	<0.0001 ****	0.4434 ns	69.57%	Hiệu quả tăng mạnh
7–21	<0.0001 ****	0.6900 ns	75.16%	Tiếp tục tăng
7–28	<0.0001 ****	0.4510 ns	79.81%	Cao nhất, hiệu quả nhất
7–14-21–28	<0.0001 ****	0.0225 *	73,05%	Xu hướng tăng toàn bộ thời gian theo dõi

ns - không có ý nghĩa thống kê; 0,0332 (*); 0,0021 (**); 0,0002 (***); < 0,0001 (****).