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

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Hà Nội - 2025

Công trình được hoàn thành tại:

Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội

Người hướng dẫn khoa học: GS. Vittorio Venturi

PGS. TS. Đinh Thuý Hằng

Phản biện:

Phản biện:

Phản biện:

Luận án đã được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ họp tại Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học - ĐHQGHN vào hồi…..giờ….. ngày…..tháng…..năm…..

Có thể tìm hiểu luận án tại:

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 rất quan trọng đối với an ninh lương thực tại nhiều quốc gia. Tuy nhiên, 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. 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. Hiện nay, việc phát triển và ứng dụng các chế phẩm sinh học sử dụng vi sinh vật (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.

Nghiên cứu về VKNS đã được bắt đầu từ thế kỷ 20 và đã chứng minh khả năng của VKNS trong việc cải thiện sinh trưởng thực vật và đối kháng lại các tác nhân gây bệnh. Sự phát triển của công nghệ giải trình tự gen thế hệ mới, công cụ tin sinh hiện đại và kỹ thuật metagenomics đã tạo điều kiện thuận lợi cho việc phân tích đa dạng sinh học và làm rõ vai trò cụ thể của hệ VKNS thực vật. Nhiều phát hiện mới về mối tương tác thực vật - VKNS cũng như sự hình thành hệ vi sinh vật gây bệnh ở thực vật (pathobiome) đã được công bố.

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), (ii) hệ VSV biểu sinh nằm trên bề mặt các cơ quan trên mặt đất (phylosphere), (iii) hệ VSV nội sinh sống bên trong các mô thực vật bao gồm rễ, thân, lá, hoa và hạt (Vorholt et al., 2012; Compant et al., 2019).

Hệ VSV thực vật rất đa dạng, phức tạp và mang lại nhiều lợi ích cho thực vật bao gồm kiểm soát sinh học các tác nhân gây bệnh thực vật và thúc đẩy tăng trưởng thực vật, do đó, quyết định tình trạng sức khỏe của thực vật (Compant et al., 2024). 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. 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 mà các cơ chế phân tử chi phối còn cần được tiếp tục nghiên cứu làm rõ.

1.1.2. Hệ vi sinh vật gây bệnh thực vật

Bệnh thực vật là kết quả của mối quan hệ ba bên thực vật - tác nhân gây bệnh - các VSV khác 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. 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).

Hệ VSV gây bệnh thực vật (pathobiome) là một phần của hệ VSV thực vật, không chỉ bao gồm một quần xã đa dạng của tất cả các sinh vật gây bệnh trong cây mà còn bao hàm các tương tác đa loài quyết định tình trạng sức khỏe của cây (Nemchinov et al., 2023).

1.1.3. Hệ vi sinh vật nội sinh thực vật

VSV nội sinh được định nghĩa 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".

VSV nội sinh vật bao gồm nấm nội sinh, vi khuẩn nội sinh và xạ khuẩn nội sinh (Dubey et al., 2020). Các thành viên chính của nấm nội sinh bao gồm Ascomycota, Zygomycota và Basidiomycota. 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. Vi khuẩn nội sinh 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).

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).

1.2. VI KHUẨN NỘI SINH THỰC VẬT

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). 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.

Vi khuẩn có thể xâm nhập qua rễ bên, 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. 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, VKNS xâm chiếm khoảng gian bào, các khoảng nội bào, hệ thống mạch, lớp biểu bì…của hầu hết các bộ phận của cây như rễ, thân, lá, hoa, quả…

Khả năng chuyển động, hoá hướng động, sản sinh các enzyme phân hủy thành tế bào thực vật, sinh lipopolysaccharide ngoại bào, siderphorevà hệ thống bài tiết 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).

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

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).

Các nghiên cứu sử dụng kỹ thuật metagenomics 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).

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).

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). Ngoài ra, khả năng phòng vệ của thực vật và trạng thái sức khỏe của cây chủ cũng ảnh hưởng đến đặc tính và chức năng của hệ VKNS thực vật.

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

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

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

1.3.1.3. Sinh siderophore

1.3.1.4. Sinh các enzyme thuỷ phân

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

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

1.3.2.2. Sinh các phytohormone

1.3.2.3. Chuyển hóa nitơ

1.3.2.4. Hòa tan phosphate khó tan

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

1.3.3. Phát triển chế phẩm sinh học từ VKNS

Nhiều chủng VKNS như *Bacillus*, *Thiobacillus, Pseudomonas, Azospirillum, Rhizobium* và *Gluconacetobacter…* 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.

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

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

Bệnh bạc lá lúa (bacterial leaf blight) là một bệnh hại nghiêm trọng gây ra bởi vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) (Mansfield et al., 2012).. Bệnh xuất hiện ở khắp các vùng trồng lúa trên thế giới và có thể gây tổn thất năng suất lúa tới 60%, thậm chí 100%. Cây lúa có thể bị nhiễm bệnh ở tất cả các giai đoạn, đặc biệt từ đẻ nhánh đến ra đòng, trổ bông. Triệu chứng ban đầu là các mép lá bị héo xanh, sau đó lan dần vào trong và từ trên xuống dưới, khiến toàn bộ lá bị héo khô, mất khả năng quang hợp, dẫn tới giảm năng suất (Zhang & Wang, 2013). Bệnh phát triển mạnh ở khí hậu ấm, ẩm 28 – 34°C. Nguồn lây nhiễm chính là nước tưới, hạt giống và gốc rạ. *Xoo* lây lan nhờ gió, mưa và thường xâm nhập vào lá lúa thông qua khí khổng và các vết thương (Chukwu et al., 2019). *Xoo* là vi khuẩn gram âm hình que sản sinh nhiều yếu tố độc lực, trong đó quan trọng nhất là exopolysaccharide (EPS) hay còn gọi là xanthan (Husain et al., 2019). Xanthan tạo cấu trúc màng sinh học bền vững giúp bảo vệ vi khuẩn khỏi các tác động bất lợi. Sinh khối *Xoo* và EPS có thể lấp kín các mạch dẫn, làm tắc nghẽn đường vận chuyển nước và dinh dưỡng, dẫn đến lá bị khô héo và ảnh hưởng nghiêm trọng đến năng suất lúa.

Ở Việt Nam, bệnh bạc lá lúa được phát hiện ở nhiều nơi trên cả nước, đặc biệt là ở khu vực miền Bắc. 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. 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. Bệnh bạc lá gây hại chủ yếu trên các giống nhiễm như Bắc thơm 7, Bắc ưu 903, LC25, BC15, 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 50-80% số lá, tập trung ở các tỉnh/thành gồm: Thái Bình, Nam Định, Hải Phòng, Hà Nội, Phú Thọ, Bắc Ninh, Bắc Giang, Hưng Yên, Ninh Bình, Sơn La, Hà Nam…).

1.4.2. Các biện pháp phòng trị bệnh bạc lá lúa

1.4.2.1. Cải tiến kỹ thuật canh tác

1.4.2.2. Sử dụng thuốc bảo vệ thực vật hóa học

1.4.2.3. Tạo giống lúa kháng bệnh bạc lá

1.4.2.3. 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 như *Pseudomonas fluorescens, Bacillus* spp. làm tác nhân kiểm soát sinh học.

Ở Việt Nam, một số nghiên cứu về việc sử dụng vi khuẩn đối kháng bao gồm *Bacillus* spp., *Streptomyces…* để phòng trị bệnh bạc lá lúa đã được công bố. Cho đến nay hầu như có rất ít nghiên cứu trong nước báo cáo về các chủng VKNS thực vật nói chung và nội sinh lúa nói riêng có khả năng đối kháng *Xoo* và phòng trừ bệnh bạc lá. 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

Giống lúa 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.

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 và càng gần với những cây nhiễm bệnh càng tốt. Tổng cộng 30 cây lúa (15 cây giống LA và 15 cây giống TB) ở giai đoạn làm đòng được thu thập vào tháng 5 - 6/2018.

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

2.1.4. Hoá chất

2.1.5. Thiết bị

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

2.2.1.2. Tạo thư viện gen 16S rDNA

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

2.2.2. Phân lập vi khuẩn nội sinh

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

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

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

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

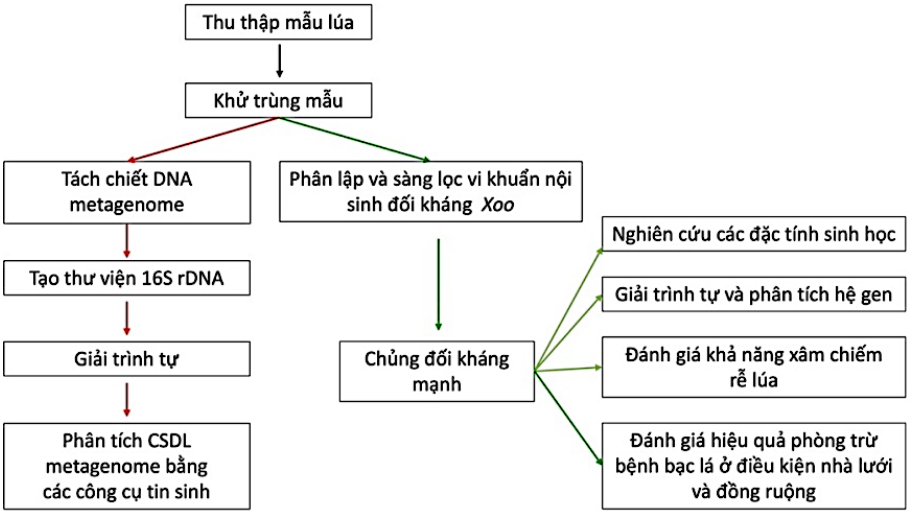
2.2.7. Đánh giá hiệu quả kiểm soát nhiễm *Xoo* của các chủng vi khuẩn nội sinh

2.2.7.1. Thí nghiệm trong điều kiện nhà lưới

2.2.7.2. Thí nghiệm ở điều kiện đồng ruộng

2.2.8. Phân tích số liệu

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*

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. 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.

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). Các dữ liệu trong bảng được xác định sau khi đã loại bỏ các trình tự chimera, trình tự mồi và adaptor.

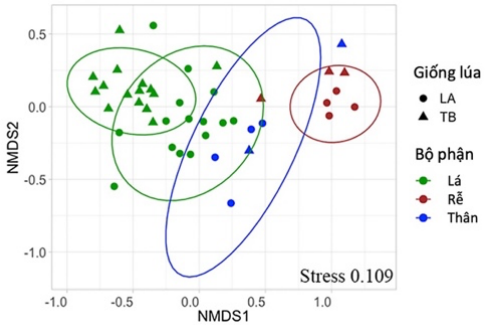
Các trình tự đạt chất lượng với >97% tương đồng được sắp xếp vào các đơn vị phân loài (OTU). Số lượng OTU của giống LA từ 13 - 142, trung bình là 54,57±37,83 và của giống TB từ 12 - 121, trung bình là 41,65±34,29. Kết quả này cho thấy mẫu LA có số lượng OTU phong phú hơn so với giống TB, tuy nhiên sự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

Bảng 3.2. 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

Kết quả phân tích đa dạng alpha 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). Phân tích đa dạng alpha cũng chỉ ra rằng sự khác nhau về giá trị Shannon và Simpson là không đáng kể. Như vậy, tính đồng đều của hệ VKNS của cả hai giống lúa là tương đương nhau.

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). 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). 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.



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.

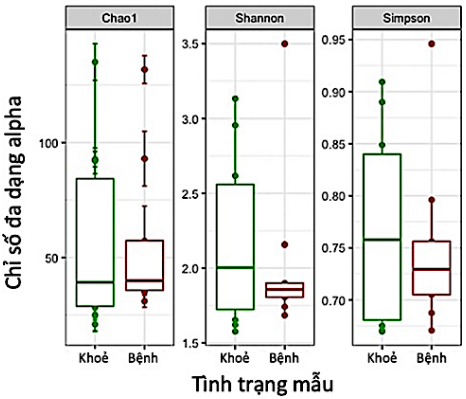
Bộ dữ liệu metagenome của giống lúa LA và TB được xếp vào 232 đơn vị phân loại OTU (169 OTU thuộc giống lúa TB và 216 OTU thuộc giống lúa LA), gồm 17 ngành, 31 lớp, 48 bộ, 98 họ và 232 chi (Bảng 3.3). Ở cấp độ chi, hệ VKNS ở giống lúa TB có tính đa dạng thấp hơn (169 chi) so với giống lúa LA (216 chi). Hệ VKNS của hai giống lúa có sự khác biệt rõ rệt trong thành phần của các ngành, lớp, và chi ưu thế.

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

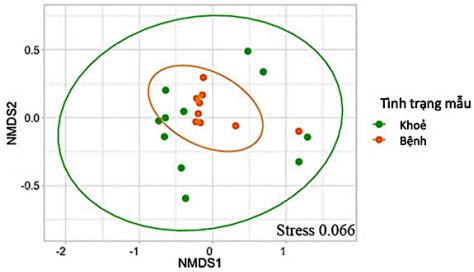
3.1.2. So sánh hệ vi khuẩn nội sinh của cây lúa khỏe mạnh và cây lúa bị bệnh để đánh giá ảnh hưởng của *Xoo* tới hệ vi khuẩn nội sinh lúa (*Xoo*-pathobiome)

Kết quả phân tích đa dạng alpha của hệ VKNS ở giống TB 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 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), 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

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.

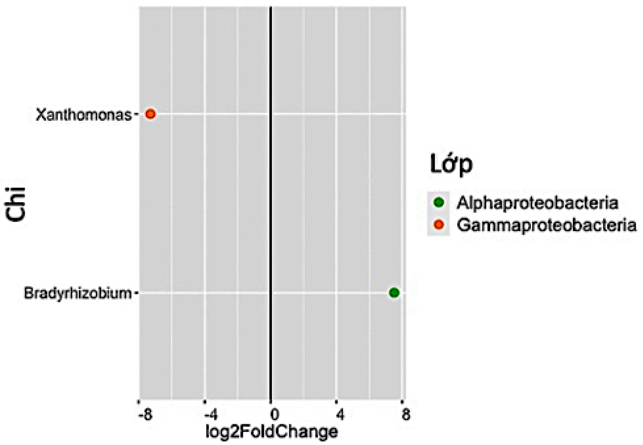
Bảng 3.4. Các OTU chiếm ưu thế theo cấp phân loại trong hệ VKNS của giống TB

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
	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

Cấp phân loại		Cây khoẻ (%)	Cây bệnh (%)	*p* (t-test)
	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**

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).

Kết quả phân tích sự khác biệt tuyến tính (linear discriminant analysis) bằng công cụ DESeq2 chỉ ra rằng hai chi *Xanthomonas* và *Bradyrhizobium* có tỷ lệ khác biệt nhất (Hình 3.6). 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.



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).

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. 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 vi sinh vật gây bệnh (pathobiome) đặc trưng đối với *Xoo*.

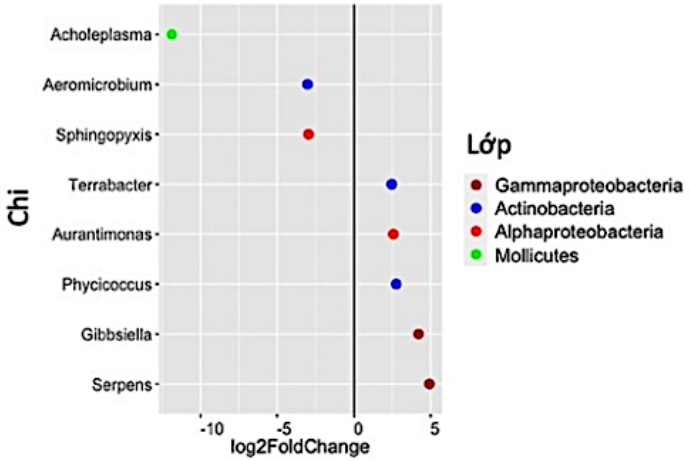
3.1.3. So sánh hệ vi khuẩn nội sinh ở hai giống lúa TB và LA để xác định nhóm vi khuẩn liên quan tính kháng bệnh bạc lá ở giống lúa LA

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. 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

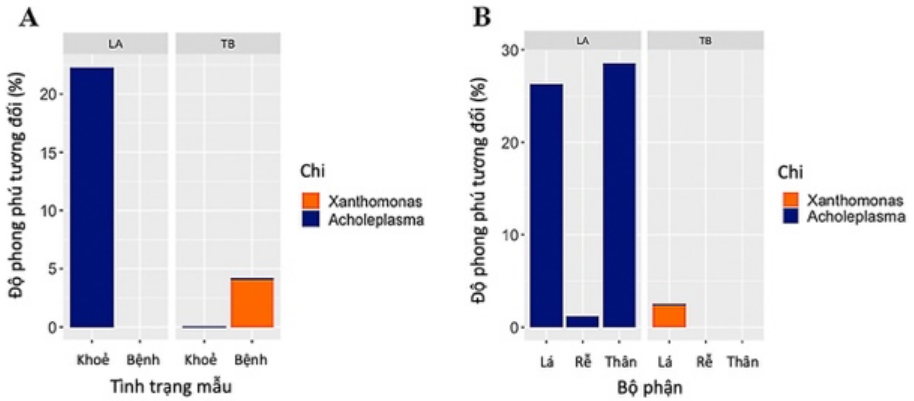
Mẫu	Chao1			Shannon			Simpson		
	LA	**TB**	***p***	**LA**	**TB**	***p***	**LA**	**TB**	***p***
Tổng	77,92	55,63	0,17	2,19	2,18	0,96	0,76	0,77	0,80
Lá	55,26	30,80	**0,01**	1,88	1,81	0,76	0,71	0,72	0,96
Thân	77,85	84,28	0,70	2,23	2,73	0,40	0,76	0,87	0,49
Rễ	162,98	113,87	0,08	3,29	2,88	0,06	0,92	0,87	0,09

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, cao hơn ở mẫu LA, 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.



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.

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 3.10B), 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 thiết 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. *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.

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

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

Tổng cộng có 394 chủng ứng viên VKNS 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%).

Sau khi sàng lọc hoạt tính kháng *Xoo* 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.

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. 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.

3.2.1.2. Định danh hai chủng VY03 và VY148

Chủng được định danh là *B. velezensis* VY03 dựa trên phân tích so sánh trình tự gen 16S rDNA và *rpoB* . Trình tự gen 16S rDNA và *rpoB* của chủng VY03 đã được gửi vào GenBank dưới các số hiệu MT256303 và MW863332. Chủng VY148 được định danh là *P. ananatis* VY148, mã GenBank MT256304.

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

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/gam rễ tươi. Chủng VY03 cũng có khả năng sinh trưởng biểu sinh khá tốt, đạt mức $4,9\times10^3$ CFU/gam 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, không phát hiện được tế bào nội sinh.

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

Nhiệt độ phù hợp cho sinh trưởng và hoạt tính đối kháng *Xoo* của chủng VY03 là 30 – 37°C, của chủng VY148 là 25 – 37ºC. pH phù hợp cho sinh trưởng tốt và hoạt tính đối kháng *Xoo* của hai chủng là pH 7. Hai chủng sinh trưởng tốt và có hoạt tính kháng *Xoo* cao nhất ở nồng độ muối 5 - 15 g/L. Nguồn carbon thích hợp với chủng VY03 là glucose, nguồn nitơ thích hợp là peptone, casein, cao thịt và cao nấm men. Nguồn carbon thích hợp với chủng VY148 là glucose, glycerol và rỉ đường, nguồn nitơ thích hợp là cao thịt và cao nấm men.

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

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. 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).

Hệ gen chủng *B. velezensis* VY03 chứa 12 cụm gen liên quan đến quá trình sinh tổng hợp các hợp chất kháng khuẩn 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) tương đồng 100% với các cụm gen đã báo cáo ở các chủng *B. velezensis* khác. Ngoài ra, hệ gen chủng VY03 cũng chứa cụm gen sinh tổng hợp surfactin (82%), butirosin (7%) và kijanimicin (4%). Các gen liên quan đến khả năng xâm chiếm nội sinh như gen *epsBCD*, cụm gen *flg*, các locus mã hóa các enzyme phân hủy thành tế bào thực vật *pela*, *pelB1, galETK*, *xylA,* 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 như *trpABCDER*, *priA*, *alsDSR* và *bdhA* đã được phát hiện trong hệ gen của chủng VY03.

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.

Hệ gen chủng VY148 chứa cụm gen mã hoá cho các hợp chất kháng khuẩn siderophore desferrioxamine E (tương đồng 100%) và aerobactin (tương đồng 77%), luminmycin/glidobactin A/cepafungin (15%) và lankacidin C (13%). Hệ gen của chủng VY148 cũng chứa các gen liên quan đến cấu trúc roi bao gồm *fli, flh*, *flg*, *motA/motB*, gen liên quan đến quá trình dị hóa carbohydrate như *galEKT*, *xylAB* và *xynA*. Các protein liên quan đến hoá hướng động như CheAVW đã được xác định trong hệ protein lõi của chủng *P. ananatis* VY148.

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

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

Nhóm đối chứng không xử lý dịch huyền phù tế bào VKNS có các triệu chứng bạc lá rõ rệt với chỉ số bệnh là 40,47 ± 0,82% và tỷ lệ bệnh cao là 76,67 ± 5,78%. 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%.

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%.

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*. 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*.

Chủng VY03 chứa các gen mã hóa cho enzyme PCWDE như pectin lyase, phân hủy galactose và xylose trong hệ gen, có khả năng nội sinh tốt, trong khi biểu sinh ở mức thấp 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, sinh các chất kháng khuẩn và kháng nấm phổ rộng và sinh trưởng nội sinh, đồng hành và bảo vệ cây lúa trong suốt quá trình sinh trưởng.

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

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). 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, $ĐC_{KS}$).

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). Ở thời điểm 21 ngày sau xử lý với VKNS, ruộng được phun dịch nuôi cấy chủng VY03 (CTTN) có tỷ lệ bệnh và chỉ số bệnh cao tương đương với ruộng phun thuốc Kasumin 2SL. Ruộng đối chứng 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. 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%. 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.

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

Phân tích phương sai hai chiều (two-way ANOVA) cho thấy thời gian là yếu tố ảnh hưởng chính đến hiệu quả phòng trừ bệnh bạc lá, tỷ lệ biến thiên đạt 69,57–79,81%. Cả CTTN và $ĐC_{KS}$ đều đạt hiệu quả cao nhất sau 28 ngày, với hiệu lực tương đương nhau và không có khác biệt thống kê đáng kể giữa các công thức.

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 (NSLT) của CTTN và $ĐC_{KS}$ đạt tương ứng 64,7 và 70,4 tạ/ha, cao hơn công thức ĐC (-) 12 và 13% (so sánh có ý nghĩa) (Bảng 3.12).

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

Công thức	Bông/m^2	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. 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. Việc ứng dụng VY03 như một probiotic, 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 sinh trưởng biểu sinh tốt hơn nội sinh.

- Hệ gen của hai chủng chứa nhiều gen liên quan đến khả năng sinh tổng hợp các hoạt chất kháng khuẩn, di động, phân huỷ thành thành tế bào 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 ở điều kiện phòng thí nghiệm, 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 xử lý 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.