



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0033320

(51)⁷ A01N 63/00

(13) B

(21) 1-2016-04567

(22) 28/05/2015

(86) PCT/KR2015/005342 28/05/2015

(87) WO 2015/183003 A1 03/12/2015

(30) 10-2014-0064712 28/05/2014 KR

(45) 25/09/2022 414

(43) 25/05/2017 350A

(73) JGREEN INDUSTRY INC. (KR)

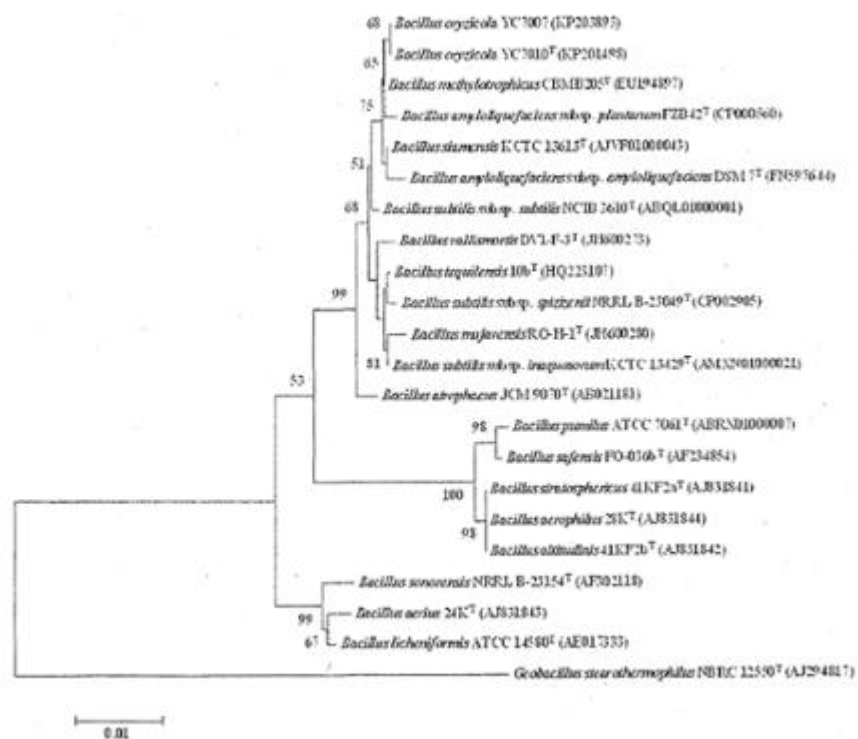
25-3, Worasan-ro 950beon-gil, Munsan-eup Jinju-si, Gyeongsangnam-do 660-841 (KR)

(72) CHUNG, Young Ryun (KR); HOSSAIN, Mohammad Tofajjal (BD); CHUNG, Eu Jin (KR); KIM, Geun Gon (KR); LEE, Jung Eun (KR).

(74) Công ty Cổ phần Sở hữu công nghiệp INVESTIP (INVESTIP)

(54) CHŨNG VI SINH VẬT *BACILLUS ORYZICOLA* SỐNG TRONG MÔ CỦA THỰC VẬT ĐƯỢC PHÂN LẬP TỪ VÙNG RỄ LÚA VÀ CHẾ PHẨM VI SINH VẬT DÙNG CHO PHÂN BÓN SỬ DỤNG VI SINH VẬT NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến chủng mà có tính hiệu quả của phân bón vi sinh vật và có thể được sử dụng làm loại thuốc diệt sinh vật hại sinh học, bằng cách phân lập vi sinh vật sống trong mô của thực vật đa chức năng, mà có thể ngăn ngừa rộng sự phát triển của nấm và vi khuẩn gây bệnh thực vật và cụ thể là hoạt động trên lúa làm thực vật chủ, do đó duy trì cả tác dụng cảm ứng kháng bệnh và tác dụng thúc đẩy sự tăng trưởng thực vật, sau đó nuôi cấy và phối chế sinh khối. Sáng chế đề xuất vi sinh vật *Bacillus oryzicola* hoặc *Bacillus oryzicola* có trị số tương đồng ADN-ADN là 70% hoặc lớn hơn so với *Bacillus oryzicola*. Sáng chế còn đề cập đến vi sinh vật *Bacillus oryzicola* có cùng các mẫu BOX-PCR với *Bacillus oryzicola* YC7007 (mã số hộp lưu: KCCM11275P) và chế phẩm vi sinh vật dùng cho phân bón sử dụng các vi sinh vật này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chủng vi sinh vật sống trong mô của thực vật và chế phẩm vi sinh vật chứa chúng, và cụ thể hơn là chủng vi sinh vật *Bacillus oryzicola* và chế phẩm vi sinh vật chứa chúng.

Sáng chế đã được suy luận từ nghiên cứu được thực hiện như một phần của: ‘Next-Generation Biopesticide Development Project’ (tập dự án số 10044909, tiêu đề dự án: Sự phát triển của vật liệu vi sinh vật thế hệ tiếp theo để kiểm soát bệnh thực vật bằng cách sử dụng vi sinh vật đối kháng) được hỗ trợ bởi Bộ lương thực, Nông nghiệp, Lâm nghiệp và Ngư nghiệp trong năm 2010 và ‘Industrial Convergence Core Technology Development Project’ được hỗ trợ bởi Bộ công thương 2013 (tập dự án số 808015-3-2, tập dự án số 808015-3-2, tiêu đề dự án: Sự phát triển chất bảo vệ cây trồng probiotic phổ rộng có tác dụng được duy trì liên tục (2010-2013)).

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Trong vài thập kỷ qua trên thế giới, nhằm tăng số lượng cây trồng nông nghiệp như hạt, rau xanh, trái cây, v.v., lượng lớn phân bón hóa học và thuốc trừ sâu nông nghiệp dùng để kiểm soát sâu bệnh, và côn trùng, đã được sử dụng. Do việc sử dụng phân bón hóa học và thuốc trừ sâu nông nghiệp liên tục như vậy, nên một số vấn đề như sự axit hóa đất, mất tính phì nhiêu của đất, ô nhiễm môi trường, thuốc hủy diệt sinh thái, độc tố của động vật có vú, sự kháng thuốc trừ sâu của sâu bệnh, côn trùng và cỏ dại hoặc tương tự, đã được tăng thích hợp. Ngoài ra, do sự thay đổi khí hậu bất thường gây ra bởi sự tăng lượng cacbon dioxit trong khí quyển,

sự khô cạn liên tục và sự tích lũy muối trong đất nông làm giảm sản lượng ổn định của các loại cây trồng nông nghiệp.

Để khắc phục các vấn đề được mô tả nêu trên, các nỗ lực nhằm giảm lượng phân bón hóa học và thuốc trừ sâu nông nghiệp được sử dụng được thực hiện trong nước và nước ngoài, và cụ thể là, do hoạt động hỗ trợ nông nghiệp thân thiện với môi trường được thành lập đầu tiên vào 1999, Chính sách Hàn Quốc được thực hiện hướng đến sự thúc đẩy nông nghiệp thân thiện với môi trường thứ ba. Mục tiêu của kế hoạch này là để thực hiện việc giảm lượng phân bón hóa học và thuốc trừ sâu nông nghiệp được sử dụng khoảng 15% đến năm 2015, so với 2011. Đồng thời, đối với yêu cầu quốc gia về các thực phẩm an toàn đang tăng do mức sống cao trong khía cạnh xã hội, và nông nghiệp sinh thái học thân thiện như nông nghiệp hữu cơ hoặc nông nghiệp tự nhiên được hướng đến việc bảo vệ môi trường đối với sản xuất nông nghiệp và hệ sinh thái tự nhiên là nhanh chóng mở rộng, sao cho nghiên cứu về sự phát triển của phân bón và thuốc trừ sâu sinh học bằng cách sử dụng vi sinh vật có thể thay thế phân bón hóa học và thuốc trừ sâu hiện nay cũng được tăng nhanh. Các công ty đa quốc gia đã biết đến các hạn chế trong việc sử dụng phân bón hóa học và thuốc trừ sâu, gần đây đã được phát triển và được phối hợp các tác nhân sinh học, cụ thể là, hoạt động nhà máy làm tăng cường các đại lý có thể bù các hạn chế nêu trên. Ngược lại, các công ty đa quốc gia đã được tiến hành phát triển giống cây của các cây trồng chịu khô hạn có thể lớn và phát triển ngay cả trong một số vùng khô hạn nghiêm trọng hoặc tích lũy muối. Các sản phẩm vi sinh vật được phát triển này được phối chế bằng cách chọn các vi sinh vật có các chức năng cụ thể từ môi trường tự nhiên, và sinh khối nuôi cấy chúng. Các sản phẩm vi sinh vật được phối chế có thể được sử dụng để phun trên lá hoặc làm chất dạng hạt dùng để xử lý đất để ngăn ngừa dịch bệnh và các côn trùng gây hại, hoặc

theo cách khác, cũng có thể được sử dụng làm phân bón vi sinh vật hoặc chất tăng cường thực vật (xem tài liệu không phải là sáng chế 1).

Các vi sinh vật được sử dụng ở đây được phân bố rộng rãi trong môi trường tự nhiên như đất, rễ cây, biển, v.v., và có tính đa dạng về loài và tiết ra các loại chất chuyển hóa khác nhau, do đó được sử dụng hiệu quả trong nông nghiệp thân thiện với môi trường. Việc sử dụng các vi sinh vật có thể thường được phân loại thành ba loại, bao gồm: sử dụng trực tiếp chính vi sinh vật; sử dụng các chất chuyển hóa được sản xuất bởi sự lên men vi trùng học; và sử dụng vi sinh vật các chất chuyển hóa làm hợp chất dẫn để tổng hợp về thuốc trừ sâu, hoặc tương tự. Trong số đó, phương pháp được sử dụng nhất là sử dụng trực tiếp các vi sinh vật đối kháng có thể ức chế tác nhân gây bệnh thực vật, vi khuẩn vùng rễ thúc đẩy sự tăng trưởng thực vật (plant growth promoting rhizobacteria - PGPR) và các vi sinh vật sống trong mô để thúc đẩy sự tăng trưởng thực vật. Cụ thể là, nghiên cứu về sự kháng bệnh của thực vật bởi các vi sinh vật này đã được thực hiện tốt.

Trong số các vi sinh vật khác nhau, nghiên cứu về vi khuẩn sống trong mô được thực hiện tích cực trong nước và nước ngoài 10 năm gần đây. Ở đây, vi khuẩn sống trong mô được xác định làm vi khuẩn có mặt trong mô của thực vật sống và khỏe mạnh tạo ra các lợi thế khác nhau mà không có tổn hại đáng kể nào cho thực vật. Thông thường, được biết rằng vi khuẩn sống trong mô có thể có mặt trong khoảng trống giữa tế bào thực vật hoặc bên trong tế bào, gây ra trực tiếp hoặc gián tiếp sự kháng bệnh, các côn trùng gây hại và áp suất, và có ảnh hưởng lớn dựa trên sự tăng trưởng của cây. Cụ thể hơn, được cho rằng vi khuẩn sống trong mô tạo ra sự cố định nitơ, sự hòa tan axit phosphoric, sự tạo ra đại thực bào chứa sắt, sự tạo ra hoocmon hoạt tính, tạo ra vật liệu chống vi khuẩn hoặc tính kháng bệnh của thực vật, do đó ngăn ngừa sự nhiễm trùng gây bệnh và thúc đẩy sự tăng trưởng thực vật (xem tài liệu không phải là sáng chế từ 1 đến 4). Vi khuẩn sống trong mô như vậy

có ái lực với thực vật chủ và có thể tạo ra mối quan hệ cộng sinh trong mô của thực vật chủ mà không được công nhận là vi khuẩn gây bệnh, (xem tài liệu không phải là sáng chế 5). Một số vi khuẩn cụ thể sống trong mô có thể tạo ra tác dụng thúc đẩy sự tăng trưởng thực vật và tác dụng kiểm soát bệnh cùng một lúc bằng cách sử dụng một hoặc nhiều cơ chế. Nói theo cách khác, các cơ chế khác nhau có thể được áp dụng trong khoảng thời gian khác nhau trong đời sống thực vật. Gen thực vật có thể được thay đổi bởi sự có mặt của vi khuẩn, và gen được thay đổi như vậy có thể đôi khi cho phép đầu mối tác dụng vi khuẩn sống trong mô trong thực vật (xem tài liệu không phải là sáng chế 6). Vi khuẩn sống trong mô được sinh sôi bên trong tế bào, trong đó toàn bộ mật độ của vi khuẩn là cao trong rễ và phần đầu của thân cây, và được giảm dần về phía các phần cao hơn của thực vật như thân cây, lá cây, v.v... Trong trường hợp lá ngô, được phát hiện rằng mật độ của vi khuẩn nằm trong khoảng từ 1×10^3 đến 1×10^7 cfu/g. Đối với vi khuẩn sống trong mô được phân lập cho đến nay, khoảng 130 loại trong khoảng 50 giống bao gồm, ví dụ, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Agrobacterium*, hoặc các giống tương tự, đã được phát hiện ra. Các vi khuẩn này có thể hỗ trợ sự tăng trưởng của các cây trồng quan trọng về kinh tế như cà chua, khoai tây, ngô và lúa trong khi ngăn ngừa sự thâm nhập của dịch bệnh, do đó làm tăng sản lượng cây trồng.

Lúa là một trong năm loại cây trồng đứng đầu trên thế giới nhưng bao gồm sự giảm sản lượng do các bệnh khác nhau. Trong số đó, thiệt hại gây ra bởi nấm gây bệnh như bệnh đạo ôn, bệnh khô vằn lá lúa, v.v.. gây ra sự giảm nghiêm trọng sản lượng cây trồng, và do đó, được ngăn ngừa hiệu quả bằng cách phát triển các cây trồng kháng và phát triển thuốc trừ sâu hóa học cho đến nay. Tuy nhiên, bệnh nấm, bệnh thối hạt và bệnh bạc lá lúa, v.v.. là các bệnh do vi khuẩn, mà được gây ra bởi các bệnh do vi khuẩn truyền hạt, khác với các bệnh nêu trên rất thường xuyên xảy ra trong các vùng và gây ra thiệt hại lớn. Trong các năm gần đây, trong các

bệnh này đã khó khăn trong việc kiểm soát chúng. Các tác nhân gây bệnh này qua đông trong cánh đồng lúa hoặc mô cỏ dại xung quanh, và cụ thể là, do lúa dễ bị phá hoại bởi các tác nhân gây bệnh dưới các điều kiện ẩm và ấm, khó có thể kiểm soát bệnh nếu bệnh bắt đầu phát triển một lần. Sự kiểm soát tác nhân gây bệnh thường dựa vào thuốc trừ sâu hóa học, tuy nhiên, việc sử dụng hầu hết thuốc trừ sâu hóa học như vậy đã phát sinh các vấn đề như ô nhiễm môi trường hoặc độc tố của động vật có vú. Do đó, có sự quan tâm ngày càng tăng về thuốc trừ sâu sinh học thân thiện với môi trường có khả năng thay thế thuốc trừ sâu hóa học nêu trên.

Hàng chục loại thuốc trừ sâu sinh học dùng để ngăn ngừa bệnh thực vật hiện nay đã được phát triển và bán sẵn trên thị trường trong nước và nước ngoài. Trong số đó, một số thuốc trừ sâu sinh học có tác dụng phần lớn được sản xuất bằng cách sử dụng vi khuẩn *Bacillus* và nấm như *Trichoderma* (xem tài liệu không phải là sáng chế từ 7 đến 10). Các sản phẩm loài *Bacillus* có thể bao gồm *B. subtilis*, *B. pumilus* và *B. amyloliquefaciens*, và hầu hết các chủng này được biết là có cơ chế tiết ra vật liệu kháng sinh, cụ thể là, cyclic peptit như iturin, surfactin, v.v..., để ức chế trực tiếp tác nhân gây bệnh, theo một cách khác, để cảm ứng khả năng kháng bệnh của vật chủ. *Bacillus* sp. tạo ra các bào tử và được sống sót trong khoảng thời gian dài ngay cả dưới môi trường tự nhiên kém, và bởi vì khả năng kháng vi khuẩn khá cao, nhiều nhà nghiên cứu đã điều tra và công bố kết quả của nó về việc kiểm soát sinh học của các bệnh thực vật (xem tài liệu không phải là sáng chế 10). Khác với các kết quả được nêu trên, một số kết quả nghiên cứu vi khuẩn sống trong mô, cụ thể là, *Bacillus metylotropicus* đã được báo cáo gần đây. Chủng này được phân lập đầu tiên và được xác định với danh mục ở Hàn Quốc vào năm 2010, và đã được xác định để có khả năng thúc đẩy sự tăng trưởng thực vật (xem tài liệu không phải là sáng chế 1). Sau đây, vi khuẩn nêu trên được phân lập từ rễ cây nhân sâm, cà chua và khoai tây và được báo cáo có khả năng ức chế gây bệnh và tác dụng

thúc đẩy sự tăng trưởng thực vật ở Trung Quốc (xem tài liệu không phải là sáng chế từ 11 đến 13). Tuy nhiên, các nghiên cứu này không bao gồm kết quả về sự cảm ứng của khả năng kháng bệnh của thực vật chủ hoặc sự ức chế các bệnh khác, khác với khả năng kháng vi khuẩn của chúng nêu trên đối với tác nhân gây bệnh thực vật. Nghiên cứu về các vi sinh vật sống trong mô của lúa hầu hết được thực hiện bởi các nhà nghiên cứu trong lĩnh vực trồng lúa, cụ thể là, Hàn Quốc, Trung Quốc, v.v., và nghiên cứu về việc so sánh của khuẩn lạc vi khuẩn sống trong rễ với lúa thực tiễn gần nhất và không được tuốt trong mỗi khoảng thời gian phát triển đã được công bố. Theo kết quả nghiên cứu như vậy, được báo cáo rằng khuẩn lạc vi khuẩn thuộc Proteobacteria được phát hiện trong lúa không tuốt, trong khi vi khuẩn đa dạng thuộc Firmicutes, cụ thể là, *Bacillus* sp. đã được phát hiện ra với tỷ lệ tương đối cao trong rễ cây lúa theo nông nghiệp thực tiễn (xem tài liệu không phải là sáng chế 14). Ngoài ra, được báo cáo rằng các loại khác nhau của *Bacillus* sp., *PaeniBacillus* sp. và *Pseudomonas* sp., mà ức chế sự tăng trưởng của tác nhân gây bệnh như bệnh đạo ôn hoặc bệnh nấm, đã được phân lập từ rễ cây lúa (xem tài liệu không phải là sáng chế 15). Mặc dù nghiên cứu về tính đa dạng của các loại vi khuẩn khác nhau sống trong rễ cây lúa đã được thực hiện một phần, sự nghiên cứu về vi khuẩn có các chức năng khác nhau trong khi hoạt động cụ thể trên lúa như được đề xuất theo sáng chế vẫn chưa được bộc lộ. Bên cạnh đó, nhiều nghiên cứu đã được hoàn thành về các loài *Bacillus* sp. được phân lập từ các môi trường cụ thể, tuy nhiên, chỉ một số loại của nó đã được bán trên thị trường và được sử dụng hiệu quả dùng để kiểm soát thực vật (xem tài liệu không phải là sáng chế 16 và 17). Một lý do về điều này cho là tác dụng kiểm soát sâu bệnh có thể tương đối thấp bởi vì cơ chế ức chế tác nhân gây bệnh chỉ được thông qua làm tiêu chuẩn khi phân lập vi khuẩn đối kháng. Do đó, để ngăn ngừa bệnh hiệu quả hơn trong khi các đặc tính biểu hiện của chúng nêu trên, cần thiết điều tra và phát triển các vi sinh vật đa chức năng có thể cung

cấp đồng thời khả năng cảm ứng sự kháng bệnh của thực vật chủ và các tác dụng thúc đẩy sự tăng trưởng của thực vật chủ, do đó tăng cường thực vật chủ.

Tài liệu không phải là sáng chế

Tài liệu không phải là sáng chế 1: Madhaiyan, M., Poongguzhali, S., Kwon, S. W., và Sa, T. M. (2010). *Bacillus metylotrophicus* sp. nov., a metanol-utilizing, vi khuẩn thúc đẩy tăng trưởng thực vật được phân lập từ đất trồng rễ cây lúa. Int J Syst Evol Microbiol 60:2490-2495.

Tài liệu không phải là sáng chế 2: Chert, C., Bauske, E. M., Musson, G., Rodriguez-Kabana, R., và Kloepper, J. W. (1995). Biological control of *Fusarium* whilt of cotton by use of endophytic bacteria. Biol Cont 5:10-16.

Tài liệu không phải là sáng chế 3: Costa, J. M., & Loper, J. E. (1994). Đặc trưng về sự sản xuất đại thực bào chứa sắt bởi tác nhân kiểm soát sinh học *Enterobacter cloacae*. Mol. Plant-Microbe Tương tác, 7: 440-448

Tài liệu không phải là sáng chế 4: Wakelin, S. A., Warren, R. A., Harvey, P. R., Ryder, M. H. (2004). Phosphate solubilization by *Penicillium* spp. closely associated with wheat roots. Biology and Fertility of Soils 40: 36-43.

Tài liệu không phải là sáng chế 5: Rosenblueth, M., & Martinez-Romero, E. (2006). Bacterial endophytes and their interactions with hosts. Molecular Plant-Microbe Interactions 19: 827-837.

Tài liệu không phải là sáng chế 6: de Matos Nogueira, E., Vinagre, F., Masuda, H. P., Vargas, C., de P, V. L. M., da Silva, F. R., dos Santos, R. V., Baldani, J. I., Gomes Ferreira, P. C., và Hemerley. (2001). Sự biểu hiện của các gen của cây mía được cảm ứng bởi sự ghép vi khuẩn *Gluconacetobacter diazotrophicus* và *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. Genet. Mol. Biol. 24: 199-206.

Tài liệu không phải là sáng chế 7: Bibi, F., Yasir, M., Song, G. C., Lee, S. Y., và Chung, Y. R. (2012). Tính đa dạng và đặc trưng của vi khuẩn sống trong mô

kết hợp với thực vật ở vùng bãi lộ do triệu và sự đối kháng của chúng tác dụng trên tác nhân gây bệnh thực vật thủy khuẩn. Plant Pathol J 28:20-31.

Tài liệu không phải là sáng chế 8: Cao, C., Park, S., và McSpadden, G. (2010). Sự kiểm soát thuốc trừ sâu sinh học về các bệnh thực vật: các nguồn và các sản phẩm cho người nông dân ở Ohio. Tờ thông tin, các nguồn nông nghiệp và tự nhiên. Đại học bang Ohio SAG-18-10.

Tài liệu không phải là sáng chế 9: Lee, S. K., Sohn, H. B., Kim, G. G., và Chung, Y. R. (2006). Việc tăng cường kiểm soát sinh học của bệnh thối xám trên cây dưa chuột bằng cách phun lên lá và hỗn hợp trồng gốc là *Trichoderma harzianum* YC459 và ứng dụng của nó đối với cà chua trong nhà kính. Plant Pathol J 22:283-288.

Tài liệu không phải là sáng chế 10: Pak, K. S. (2011). Tình trạng phát triển của thuốc trừ sâu nông nghiệp vi sinh vật và sự quan trọng của *Bacillus* sp. Microorganism, sự mong chờ về hóa học công nghiệp 14(4):1-11.

Tài liệu không phải là sáng chế 11: Kim, B. K., Chung, J. H., Kim, S. Y., Jeong, H., Kang, S. G., Kwon, S. K., Lee, C. H., Song, J. Y., Yu, D. S., Ryu, C. M., và Kim, J. F. (2012). Trình tự bộ di truyền của vi khuẩn khuẩn lạc trên lá *Bacillus* sp. strain 5B6, được phân lập từ cây anh đào. J Bacteriol 194:3758-3759

Tài liệu không phải là sáng chế 12: Ma, L., Cao, Y. H., Cheng, M. H., Huang, Y., Mo, M. H., Wang, Y., Yang, J. Z., và Yang, F. X. (2013). Tính đa dạng phát sinh loài của vi khuẩn cư trú trong nội mô của thực vật của *Panax notoginseng* có các đặc tính đối kháng với tác nhân gây bệnh của phức hợp bệnh thối rễ. Ant van Leeuwen 103:299-312.

Tài liệu không phải là sáng chế 13: Yan, X., He, L., Song, G., và Wang, R. (2011). Hoạt động sinh học đối kháng của chủng sống trong mô được phân lập từ *Salvia mitiorrhiza*. Afr J Biotech 10:15117-15122.

Tài liệu không phải là sáng chế 14: Aslam, Z., Yasir, M., Yoon, H. S., Jeon, C. O., và Chung, Y. (2013). Tính đa dạng của tập thể vi khuẩn trong rễ cây lúa được quản lý theo các phương pháp thông thường và không có đất canh tác. *J Microbiol* 51:747-756.

Tài liệu không phải là sáng chế 15: Yang, J. H., Liu, H. X., Zhu, G. M., Pan, Y. L., Xu, L. P., và Guo, J. H. (2008). Sự phân tích đa dạng về các đối kháng từ vi khuẩn được kết hợp với lúa và ứng dụng của chúng với sự kiểm soát sinh học về các bệnh của lúa. *J Appl Microbiol* 104:91-104.

Tài liệu không phải là sáng chế 16: Gatson, J. W., Benz, B. F., Chandrasekaran, C., Satomi, M., Venkateswaran, K., và Hart, M. E. (2006). *Bacillus tequilensis* sp. nov., được phân lập từ một hàm Mexico 2000 năm tuổi, liên quan chặt chẽ đến *Bacillus subtilis*. *Int J Syst Evol Microbiol* 56:1475-1484.

Tài liệu không phải là sáng chế 17: Sumpavapol, P., Tongyonk, L., Tanasupawat, S., Chokesajjawatee, N., Luxananil, P., và Visessanguan, W. (2010). *Bacillus siamensis* sp. nov., được phân lập từ cưa được ướp muối (poo-khem) ở Thái Lan. *Int J Syst Evol Microbiol* 60:2364-2370.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Do đó, để bù lại các nhược điểm nêu trên, mục đích của sáng chế là phát triển và tạo ra chế phẩm vi sinh vật có tất cả tính hiệu quả của phân bón vi sinh vật, tính hiệu quả tăng cường thực vật và tính hiệu quả bảo vệ thực vật bằng cách phân lập vi khuẩn sống trong mô của thực vật đa chức năng, mà có thể ngăn ngừa rộng sự tăng trưởng của nấm và vi khuẩn gây bệnh thực vật và hoạt động cụ thể trên lúa làm thực vật chủ, nhờ đó duy trì cả hai tác dụng cảm ứng kháng bệnh và tác dụng thúc đẩy sự tăng trưởng thực vật, sau đó nuôi cấy sinh khối và phối chế chúng.

Để thu được mục đích được mô tả nêu trên, một khía cạnh của sáng chế, đề xuất vi sinh vật *Bacillus oryzae* hoặc *Bacillus oryzae* có trị số tương đồng ADN-ADN là 70% hoặc lớn hơn so với *Bacillus oryzae* nêu trên.

Ở đây, *Bacillus oryzae* có thể bao gồm 16S rARN có trình tự cơ bản là SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2.

Hơn nữa, *Bacillus oryzae* có thể là *Bacillus oryzae* YC7007 (mã số nộp lưu: KCCM11275P) hoặc *Bacillus oryzae* YC7010 (mã số nộp lưu: KACC18228).

Ngoài ra, *Bacillus oryzae* có thể có tính hiệu quả cảm ứng kháng bệnh của thực vật.

Ngoài ra, bệnh thực vật có thể ít nhất là bệnh được chọn từ nhóm bao gồm bệnh thối hạt, bạc lá lúa, tàn rụi và nấm.

Hơn nữa, *Bacillus oryzae* có thể còn có tính hiệu quả ức chế tác nhân gây bệnh thực vật, tính hiệu quả thúc đẩy sự tăng trưởng thực vật và hiệu quả tăng cường thực vật.

Ngoài ra, tính hiệu quả thúc đẩy sự tăng trưởng thực vật có thể tính hiệu quả thúc đẩy sự tăng trưởng thực vật đối với lúa.

Theo khía cạnh khác của sáng chế, đề xuất chế phẩm vi sinh vật dùng cho phân bón, bảo vệ thực vật và sử dụng tăng cường thực vật, bao gồm vi sinh vật nêu trên, và dung dịch nuôi cấy hoặc phần lọc nuôi cấy của nó làm thành phần hoạt tính. Hiệu quả đạt được của sáng chế

Theo sáng chế, có thể đề xuất chế phẩm vi sinh vật ưu việt chứa vi khuẩn đa chức năng, mà có thể đóng vai trò đồng thời là chất bảo vệ thực vật tự nhiên, chất tăng cường thực vật và phân bón vi sinh vật, so với vi khuẩn đã biết được báo cáo trong lĩnh vực kỹ thuật, bằng cách sử dụng vi khuẩn đa chức năng *Bacillus oryzae* mà có thể ức chế đồng thời sự tăng trưởng của vi khuẩn và nấm gây bệnh

thực vật đáng kể trong vụ mùa và không chỉ tác dụng cảm ứng khả năng kháng bệnh của thực vật chủ mà còn tác dụng thúc đẩy sự tăng trưởng của thực vật chủ, khác biệt ở chỗ chế phẩm có thể tạo ra vật liệu kháng sinh và vật liệu dùng để thúc đẩy tăng trưởng và cảm ứng khả năng kháng bệnh mắc phải toàn thân của vật chủ, do đó ức chế trực tiếp tác nhân gây bệnh thực vật, và có thể hoạt động cụ thể trên lúa biểu hiện khả năng thúc đẩy tăng trưởng và khả năng cảm ứng kháng bệnh mắc phải toàn thân.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG. 1 là hình vẽ minh họa trình tự cơ bản của gen 16S rARN là chủng (a) YC7007 và chủng (b) YC7010.

FIG. 2 là hình vẽ minh họa cây phát sinh loài được tạo ra bằng cách phân tích trình tự gen 16S rARN của chủng YC7007.

FIG. 3 hình vẽ minh họa các kết quả phân tích về chủng YC7007 thông qua phân tích di truyền, cụ thể là, BOX-PCR, so với các chủng tương tự.

FIG. 4 là hình vẽ minh họa đối với sự khác biệt và sự so sánh của việc xử lý để giải thích tác dụng ngăn ngừa lúa thối hạt.

FIG. 5 là hình vẽ minh họa đối với sự khác biệt và sự so sánh việc xử lý để giải thích tác dụng ngăn ngừa bệnh bạc lá lúa.

FIG. 6 là biểu đồ (a) và hình vẽ (b) minh họa tác dụng kháng vi khuẩn của dung dịch nuôi cấy chủng YC7007 trong mỗi khoảng thời gian nuôi cấy.

FIG. 7 là biểu đồ minh họa tác dụng kháng vi khuẩn của dung dịch nuôi cấy chủng YC7007 trong mỗi nhiệt độ xử lý.

FIG. 8 là biểu đồ minh họa việc thực hiện ức chế sự tăng trưởng của dung dịch nuôi cấy chủng YC7007 đối với tác nhân gây bệnh do vi khuẩn truyền qua hạt giống nghiêm trọng.

FIG. 9 là hình vẽ (a) và biểu đồ (b) minh họa các kết quả điều tra sự hoạt động bao gồm sự kháng mắc phải toàn thân đối với lúa bạc lá lúa và tàn rụi liên quan đến chủng YC7007.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả cụ thể viện dẫn đến các ví dụ. Trước đó, các thuật ngữ hoặc từ ngữ được sử dụng trong phần mô tả và yêu cầu bảo hộ cụ thể của bản mô tả sáng chế không bị giới hạn đến các nghĩa thông thường hoặc nghĩa từ điển của nó. Thay vào đó, dựa trên cơ sở yếu tố cơ bản mà tác giả có thể xác định thích hợp khái niệm về thuật ngữ nhằm giải thích sáng chế của chính mình theo cách tốt nhất, điều này phải được hiểu là có ý nghĩa và khái niệm theo tinh thần kỹ thuật của sáng chế. Do đó, kết cấu của các ví dụ được nêu trong bản mô tả sáng chế chỉ là phương án được ưu tiên theo sáng chế, và không thể hiện tất cả tinh thần kỹ thuật của sáng chế. Do đó, được đánh giá rằng các đương lượng và biến đổi khác nhau có thể thay thế tại thời điểm nộp đơn có thể là có mặt.

Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra chủng mà có thể được sử dụng làm dạng của thuốc diệt sinh vật hại sinh học có tính hiệu quả của phân bón vi sinh vật bằng cách phân lập vi khuẩn đa chức năng sống trong mô, mà có thể ức chế nhiều sự tăng trưởng của nấm và vi khuẩn gây bệnh cho thực vật trong khi hoạt động cụ thể trên lúa làm thực vật chủ, do đó thể hiện cả khả năng kháng bệnh bao gồm và tác dụng thúc đẩy sự tăng trưởng thực vật, sau đó nuôi cấy sinh khối và phối chế chúng.

Nói cách khác, kết quả điều tra vi khuẩn được phân lập từ lúa, được phát hiện ra rằng loại vi khuẩn có tất cả các tính hiệu quả nêu trên. Ngoài ra, kết quả thực hiện sự xác định và phân tích trình tự cơ bản của gen 16S rARN, thử nghiệm tính tương đồng ADN-ADN, hoặc tương tự, được nhận biết là vi sinh vật thuộc giống *Bacillus* sp., do đó, được gọi là "*Bacillus oryzae* YC7007".

Vi sinh vật này như được mô tả trong sáng chế không chỉ bao gồm *Bacillus oryzae*, mà còn phải hiểu rằng, nếu có sự lai giống ADN-ADN dựa trên bài viết của Goris và các đồng tác giả (Goris, J., Konstantinidis, K. T., Klappenbach, J. A., Coenye, T., Vandamme, P., và Tiedje, J M. (2007). Trị số lai giống ADN-ADN và mối quan hệ của chúng với sự tương tự của toàn bộ bộ gen. *Int J Syst Evol Microbiol* 57:81-91), một số vi sinh vật biểu diễn trị số tương đồng ADN-ADN là 70% hoặc lớn hơn có thể được bao gồm trong *Bacillus oryzae* theo sáng chế. Nói cách khác, nếu sự lai giống ADN-ADN đã được thực hiện theo tiêu chuẩn được đưa ra trong bài viết của Goris và các đồng tác giả, thì vi sinh vật biểu diễn trị số tương đồng ADN-ADN là 70% hoặc lớn hơn có thể được quản lý giống vi sinh vật như *Bacillus oryzae* theo sáng chế.

Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, *Bacillus oryzae* có thể bao gồm 16S rARN có trình tự cơ bản được xác định với SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2, *Bacillus oryzae* có thể là *Bacillus oryzae* YC7007 (mã số nộp lưu: KCCM11275P) hoặc *Bacillus oryzae* YC7010 (mã số nộp lưu: KACC 18228).

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả cụ thể hơn bằng cách viện dẫn đến các ví dụ. Theo các ví dụ của sáng chế, phần mô tả sẽ lần lượt được đưa ra theo ví dụ 1 tập trung vào các thí nghiệm của chủng YC7007 và ví dụ 2 tập trung vào thí nghiệm của chủng YC7010.

Ví dụ 1

Sự phân lập và sự đồng nhất hóa của chủng YC7007

(1) Sự phân lập của chủng YC7007

Chủng YC7007 được phân lập từ mô bên trong của rễ của lúa phát triển trong đất của vùng thử nghiệm ở đại học quốc gia Gyeongsang ở thành phố Jinju phía nam Hàn Quốc. Đầu tiên, để phân lập khuẩn sống trong mô của thực vật, bề

mặt của rễ được cắt khúc được khử trùng bằng cách ngâm đoạn được cắt trong 1% dung dịch natri hyperchlorit (NaOCl) trong khoảng 10 phút. Sau khi đặt các đoạn này vào môi trường 1/10 TSA (canh đậu nành 3 g, thạch 16 g/1 l của nước được tinh chế), các đoạn được nuôi cấy trong khoảng 2 đến 3 ngày, sau đó kiểm tra sự khử trùng của bề mặt trong khi quan sát sự tăng trưởng của vi khuẩn. 1,0 g trên đoạn rễ có bề mặt được khử trùng được thực hiện và đưa vào máy khử trùng áp suất cao, sau đó bổ sung 9,0 ml nước được khử trùng và được tinh chế và nghiền hỗn hợp bằng phương tiện là bát và cối giã được khử trùng. 0,1 ml vật liệu được xay được thực hiện và đưa vào 0,9 ml nước được khử trùng và được tinh chế, và sau đó, được pha loãng 10 lần (10^{-3}), tiếp theo pha loãng bổ sung 10 lần theo thứ tự (10^{-4} và 10^{-5}). Dung dịch được pha loãng được tách thành ba phần ba phần bằng nhau và được phân bố trên môi trường 1/10 TSA, và sau đó, được tạo đốm bản đồng nhất trên đó. Tủ áp này được ủ tại nhiệt độ 28°C trong khoảng 2 đến 3 tuần, và khuẩn lạc đơn phát triển được phân lập hoàn toàn và được gọi là chủng YC7007.

(2) Sự đồng nhất hóa của chủng YC7007

Để nhận biết chủng YC7007 được phân lập, các dấu hiệu hình thái, sinh lý học và hóa sinh được điều tra nghiên cứu như sau. Được đưa vào chủng tiêu chuẩn (loài điển hình) tương tự với chủng YC7007 được phân lập, dấu hiệu hình thái được nghiên cứu bằng cách sử dụng kính hiển vi quét điện tử, trong khi dấu hiệu sinh lý học và hóa sinh được lần lượt điều tra nghiên cứu theo phương pháp phân tích cụ thể được triển khai theo các tác giả sáng chế và phương pháp phân tích điển hình (xem tài liệu không phải là sáng chế 7).

Chủng YC7007 được phân lập là gam dương và có tính chuyển động, các tế bào ở dạng thanh (có chiều rộng $0,6\text{ }\mu\text{m}$, chiều dài $1,8\text{-}2,6\text{ }\mu\text{m}$), được tạo ra bào tử sống trong mô và không thể phát triển dưới điều kiện kỵ khí. Các kết quả nghiên cứu về các dấu hiệu sinh lý học và hóa sinh của chủng này so với loại điển hình

tương tự được thể hiện trong bảng 1 dưới đây, và trị số tương đồng ADN-ADN được thể hiện trong bảng 2 dưới đây. Các kết quả của tất cả các chủng được sử dụng trong bảng 1 thu được thông qua việc nghiên cứu theo phương pháp phân tích nêu trên.

[Bảng 1]

Đặc tính	1	2	3	4	5	6	7
Tăng trưởng tại nồng độ pH 13	+	+	+	+	+	+	+
Tăng trưởng tại 14% NaCl	-	-	-	-	-	-	+
Hydrolysis của							
Gelatin	+	-	+	+	+	+	+
Carboxymethyl xenlulaza	-	-	-	-	+	-	+
Kit API							
Arbutin	+	W	-	W	+	W	+
D-lactosa	+	W	W	W	-	W	-
Tinh bột	+	W	-	W	W	-	+
Glycogen	+	W	-	W	W	W	+
Gentiobioza	+	W	-	-	-	-	+
D-Turanosa	-	-	W	+	+	-	+
Kali-5-ketogluconat	-	-	W	-	-	-	-
Alkaline phosphatase	W	+	+	+	-	+	+
Axit phosphatase	W	W	-	-	-	+	-
Naphthol-AS-BI	+	-	-	+	+	+	+
Phosphohydrolaza							
α-Glucosidaza	-	-	+	-	-	-	-
N-acetyl-β-glucosaminidaza	-	+	+	-	-	+	+
α-Mannosidaza	-	-	W	-	-	-	-
Hàm lượng G+C (%mol)	50.5	51.2	41.4 ^b	45 ^c	ND	ND	ND

*Tara: 1, chủng YC7007; 2, chủng YC7010[†]; 3, *B. siamensis* KACC 15859[†]; 4, *B. methylophilus* KACC 13105[†]; 5, *B. subtilis* subsp. *inaquosorum* KACC 17047[†]; 6, *B. amylobacteriens* subsp. *plantarum* KACC 17177[†]; 7, *B. tequilensis* KACC 15944[†].

+: dương; -: âm; W: dương yếu; ND: Không xác định.

Dữ liệu dùng cho chủng loại liên quan từ nghiên cứu này từ khi được chỉ rõ

^bSumpavaporn et al., 2010.

Tham chiếu đến bảng 1, kết quả so sánh các dấu hiệu sinh lý học và hóa sinh của chủng YC7007 với kết quả so sánh của loài *Bacillus* tương tự khác, có thể được xác nhận rằng chủng YC7007 khác với loại cùng giống về sự tăng trưởng tại nồng độ pH 4,5 và pH 12, sự tăng trưởng trong dung dịch muối 14%, sự tăng trưởng tại nhiệt độ 60°C, sự giảm gelatin, sự không thoái biến carboxymetyl xenluloza, sự thoái biến arbutin, dilactoza, tinh bột, glycogen hoặc gentibios trong thử nghiệm kit API, các đặc tính phenotypic quan trọng của naphthol-AS-BI-phosphohydrolaza, N-acetyl-beta-glucoza aminidaza enzym, hoặc các chất tương tự.

Trong khi, sau khi xác định trình tự cơ bản là gen 16S rARN trong chủng YC7007 (1513 bp, xem FIG. 1), vị trí hệ thống của trình tự cơ bản được xem xét bằng cách thực hiện tìm kiếm tính tương đồng, so với cơ sở dữ liệu của GenBank/EMBL/DDBJ. FIG. 2 minh họa cây phát sinh loài được tạo ra bằng cách phân tích trình tự gen 16S rARN của chủng YC7007. Trên FIG. 2, số lượng các điểm giao nhau thể hiện trị số chương trình thu được từ 1000 lần lặp lại.

Để xác nhận sự khác biệt giữa chủng YC7007 và loại cùng giống, sự lai giống ADN-ADN được nghiên cứu, và các kết quả của chúng được thể hiện trong bảng 2 dưới đây. Thí nghiệm được thực hiện bằng cách sử dụng sự tạo nhãn DIG ADN và bộ dò (Roche Applied Science) và bằng cách viện dẫn đến bài viết của Lee và các đồng tác giả (Lee, S. H., Shim, J. K., Kim, J. M., Choi, H. K. & Jeon, C. O. (2011). *Henriciella litoralis* sp. nov., được phân lập từ bãi lộ do triều, sự chuyển *Maribaculum marinum* Lai và các đồng tác giả 2009 thành genus *Henriciella* làm *Henriciella aquimarina* nom. nov. và phân mô tả được sửa genus *Henriciella*. Int J Syst Evol Microbiol 61: 722-727). Gen ADN được chiết (ADN hệ gen) được pha loãng ở nồng độ khác nhau và dung dịch natri hydroxit (NaOH) được bổ sung vào đó, sau đó áp dụng nhiệt tại 80°C để làm biến tính gen. Sau khi, gen được làm biến tính được gắn lặp lại ba lần lặp lại với màng hybrid-

N+ nylon (Amersham Pharmacia Biotech). Sau khi xử lý chúng bằng sự hạn chế enzym HaeIII, đoạn ADN được xử lý được sử dụng làm dụng cụ dò ADN được gắn nhãn dùng cho sự lai giống ngang giữa các chủng. Nhiệt độ đối với sự lai giống và việc rửa được sử dụng theo sách hướng dẫn chỉ thị. ADN được tạo môi ngẫu nhiên được gắn nhãn với digoxigenin (DIG)-dUTP và hybrids được phát hiện ra trên màng nylon bằng xét nghiệm miễn dịch enzym bằng cách sử dụng kit gắn nhãn ADN môi cao DIG (Roche Applied Science). Các tín hiệu lai giống được xác định và được phân tích bằng cách sử dụng máy quét (HP Scanjet 3770) và Adobe Photoshop (v. 7,0). 100% tín hiệu lai giống của ADN đích và dụng cụ dò được nhận ra. Trị số tương đồng ADN-ADN giữa các chủng được tính từ cường độ của chính tín hiệu lai giống thông qua sự làm loãng. Do đó, mặc dù trị số tương đồng của chủng YC7007 đến chủng YC7010 là 91,5%, chủng YC7007 được thể hiện trị số tương đồng là 50,4% hoặc nhỏ hơn so với loại khác như *B. amyloliquefaciens*, *B. metylotrophicus*, *B. siamensis*, *B. subtilis*, *B. tequilensis*. Do đó, chủng này được xác nhận làm chủng khác từ loại nêu trên. Cụ thể là, chỉ khi trị số tương đồng ADN-ADN này giữa các loại tương tự là 70% hoặc cao hơn, các loại này được công nhận là cùng loại với nhau. Nếu trị số nêu trên nhỏ hơn mức nêu trên, loại này được xem xét là loại khác nhau (Goris, J., Konstantinidis, K. T., Klappenbach, J. A., Coenye, T., Vandamme, P., và Tiedje, J M. (2007). Trị số lai giống ADN-ADN và mối quan hệ của chúng đối với sự tương tự của toàn bộ bộ gen. *Int J Syst Evol Microbiol* 57:81-91).

[Bảng 2]

Chủng	Trị số tương đồng ADN-ADN (%)
YC7010	91,5±11,0
<i>B. amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> KACC17177 ^T	41,9±7,9
<i>B. metylotrophicus</i> KACC 13105 ^T	48,7±9,4
<i>B. siamensis</i> KACC 15859 ^T	50,4±3,5
<i>B. subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i>	47,4±4,0

KACC 17047 ^T	
<i>B. requilensis</i> KACC 15944 ^T	37,9±5,7

Sự phân tích về các axit béo giữa chủng YC7007 và loại cùng giống được thực hiện, và các kết quả của chúng được thể hiện trong bảng 3 dưới đây. Tham chiếu đến bảng 3, chủng YC7007 có toàn bộ mẫu tương tự với loại cùng giống, tuy nhiên, rượu C_{16:1} ω7c và C_{16:1} ω11c không được phát hiện, và lượng axit béo khác là khác một chút so với loại cùng giống.

[Bảng 3]

Axit béo	1	2	3	4	5
C _{12:0}	1,7	-	-	-	-
C _{14:0}	-	1,1	1,1	-	0,7
C _{15:0}	-	-	-	-	8,2
C _{16:0}	6,1	7,7	4,1	5,1	3,3
C _{17:0}	-	-	-	-	0,9
C _{18:0}	-	5,1	1,1	-	-
iso-C _{14:0}	4,6	2,9	2,6	6,1	2,7
iso-C _{15:0}	28,1	27,7	31,9	28,8	30,7
iso-C _{16:0}	6,8	5,2	3,9	5,9	2,5
iso-C _{17:0}	6,4	6,4	7,6	6,9	5,6
iso-C _{17:1} ω 10c	2,0	1,7	2,6	-	1,6
anteiso-C _{15:0}	38,4	32,0	35,6	39,8	37,2
anteiso-C _{17:0}	5,9	5,3	5,8	7,6	4,7
rượu C _{16:1} ω 7c	-	3,4	1,2	-	-
C _{16:1} ω 11c	-	1,4	1,5	-	2,0
C _{20:1} ω 7c	-	0,2	-	-	-
Dấu hiệu tổng hợp 4*	-	-	1,1	-	-

[Lưu ý]

Các dấu hiệu tổng hợp bao gồm C_{17:1} ISO I/ANTEI không được phân tích bằng phép sắc ký khí

- 1: YC7007

- 2: YC7010^T

- 3: *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* KACC 17177^T

- 4: *B. methylotrophicus* KACC13105^T

- 5: *B. siamensis* KACC 15859^T

--: không được phát hiện

FIG. 3 minh họa sự so sánh và các kết quả phân tích của chủng YC7007, so với loại cùng giống thông qua phân tích gen (BOX-PCR). Polymeraza dùng để phân tích gen (BOX-PCR) Platinum Taq DNA polymerase High Fidelity (Invitrogen), trong khi sử dụng BOXAR1 (5'-CATCGGCAAGGCGACGCTGACG-3') làm đoạn mồi. Các điều kiện PCR lần lượt được bao gồm sự biến tính ban đầu tại nhiệt độ 95°C trong khoảng 7 phút, sự làm biến chất, sự ủ và sự mở rộng tại nhiệt độ 90°C trong khoảng 30 giây, 40°C trong khoảng 1 phút và 72°C trong khoảng 3 phút, mà đây 35 lần lặp quá trình, và sự mở rộng cuối cùng được thực hiện bằng cách phản ứng chủng tại nhiệt độ 72°C trong khoảng 10 phút để khuếch đại gen. Sản phẩm PCR thu được được đưa vào xác định độ khuếch đại bằng cách sử dụng 1% LE agarose gel (Seakem). Trên FIG. 3, lần lượt M biểu thị tín hiệu 1kb, 1 biểu thị chủng YC7007, 2 biểu thị chủng *Bacillus metylotrophicus* KACC13105, và 3 chủng biểu thị *Bacillus siamensis* PD-A10^T.

Như được thể hiện trên FIG. 3, để so sánh chủng YC7007 cụ thể với chủng tiêu chuẩn có cùng tên khoa học với tiêu chuẩn của chủng YC7007, sự phân tích gen (BOX-PCR) được thực hiện. Do đó, trở nên rõ ràng là chủng YC7007 khác với loại cùng giống.

Do đó, liên quan đến sinh lý học và hóa sinh, và các kết quả sinh học phân tử thu được nêu trên, vi sinh vật theo sáng chế được xác định làm chủng, được gọi tên là chủng *Bacillus oryzae* YC7007, được gửi đến trung tâm nuôi cấy các vi sinh vật Hàn Quốc (Korean Culture Center of Microorganisms - KCCM) vào ngày 18, tháng tư năm 2012, và mã số nộp lưu được nhận là KCCM 11275P.

Sự mô tả phân loại đối với *Bacillus oryzae* sẽ được đưa ra như sau.

Vi khuẩn nêu trên là gam dương và vi khuẩn ưu khí có thể tạo ra bào tử sống trong mô ($0,6-1,0 \times 2,5-2,8 \mu\text{m}$), các tế bào tồn tại đơn lẻ hoặc theo cặp của nó. Khi vi khuẩn được nuôi cấy trong môi trường 1/10 TSA trong khoảng 24 giờ, quần thể vi khuẩn có màu trắng kem và được tạo ra lõi tại vùng giữa của nó trong khi có dạng gân đều. Vi khuẩn này có thể được phát triển ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 20 đến 60°C, nồng độ nằm trong khoảng từ pH 4,5 đến pH 12 và nồng độ NaCl nằm trong khoảng từ 0 đến 13%. Kết quả thử nghiệm kháng kháng sinh, có thể được phát hiện rằng vi khuẩn theo sáng chế có sự kháng đến 30 $\mu\text{g/ml}$ nồng độ của cloramphenicol, tuy nhiên, không thể hiện sự kháng đến 10 $\mu\text{g/ml}$ ampicillin, gentamixin và penicillin cũng như 30 $\mu\text{g/ml}$ tetracyclin, streptomycin, vancomycin và kanamycin. Các axit béo chính là anteiso- $\text{C}_{15:0}$ và iso- $\text{C}_{15:0}$.

Thử nghiệm tính hiệu quả ức chế của chủng YC7007 với nấm gây bệnh và vi khuẩn trong tủ áp

Để xem xét tính hiệu quả ức chế bao gồm 10 loại của vi khuẩn sống phân lập trong mô bao gồm chủng YC7007 đối với nấm gây bệnh và vi khuẩn, hoạt động kháng vi khuẩn được nghiên cứu như sau.

Hoạt động kháng vi khuẩn của vi khuẩn sống trong mô YC7007 được xác định bằng các điều tra nghiên cứu sự ức chế tăng trưởng theo sinh thử nghiệm đối chiếu đối với 4 loại của nấm gây bệnh thực vật quan trọng (*Gibberella fujikuroi* (bệnh nấm), *Pythium ultimum* (bệnh ngập nước), *Bipolaris oryzae* (đốm sẫm của lúa), *Magnaporthe grisea* (bệnh đạo ôn)) và 3 loại (*Burkholderia glumae* (bệnh thối hạt), *Xanthomonas oryzae* PV. *oryzae*, *Xanthomonas oryzae* PV. *oryzae* (bệnh bạc lá lúa)).

Nấm gây bệnh và chủng YC7007 được đưa vào điều tra nghiên cứu các tác dụng ức chế tăng trưởng theo phương pháp đĩa giấy trong môi trường tăng trưởng 1/5 PDA và 1/10 TSA lần lượt bao gồm 5g môi trường đường khoai tây thạch

(PDB, Difco) (16 g thạch/1 l nước được tinh chế). Đĩa giấy (đường kính lá 5 mm) được đặt ở khoảng cách bằng nhau là 1 cm từ ngoại biên của tủ ấp, và sau đó đĩa giấy thấm đủ 100 μ l dung dịch nuôi cấy của chủng, đĩa (6 mm) có sợi nấm gây bệnh phát triển trong khoảng 4 ngày trong môi trường PDA được đặt tại trung tâm của nó, sau đó nuôi cấy tại nhiệt độ từ 24 đến 28°C trong khoảng thời gian từ 4 đến 6 ngày theo tác nhân gây bệnh.

Việc điều tra nghiên cứu về sự ức chế của vi khuẩn gây bệnh được thực hiện bằng cách tạo huyền phù vi khuẩn gây bệnh được nuôi cấy tại nhiệt độ 28°C qua đêm trong nước được khử trùng và được tinh chế ($O.D_{600} = 0,1$) và làm chất dính 0,1 ml huyền phù trong môi trường, sau đó đo mức độ ức chế tăng trưởng gây bệnh của chủng YC7007. Tác dụng ức chế gây bệnh của phân lọc nuôi cấy được sản xuất bởi chủng YC7007 được xác định bằng cách sử dụng phân lọc được điều chế bằng cách tiến hành nuôi cấy lắc trong môi trường chất lỏng canh trường loại trừ thạch tại nhiệt độ 28°C trong khoảng 72 giờ (120 rpm), quay ly tâm dung dịch nuôi cấy và lọc chúng thông qua máy lọc Millipore. Để điều chỉnh phản ứng đến nhiệt độ của phân lọc nuôi cấy, sau khi xử lý trong nước ấm giữa ở nhiệt độ xử lý tương ứng đối với 10 phút, các tác dụng ức chế này được điều tra nghiên cứu.

Bảng 4 sau minh họa các kết quả điều tra nghiên cứu về hoạt động kháng vi khuẩn của chủng YC7007 đối với nấm gây bệnh thực vật nghiêm trọng và vi khuẩn gây bệnh thực vật nghiêm trọng.

[Bảng 4]

Chủng	Khoảng cách ức chế (mm)						
	<i>Burkholderia glumae</i>	<i>Xanthomonas oryzae</i> PV.. <i>oryzae</i>	<i>Xanthomonas oryzae</i> PV. <i>oryzicola</i>	<i>Gibberella fujikuroi</i>	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Magnaporthe grisea</i>	<i>Pythium ultimum</i>
YC7005	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++
YC7007	++++	++++	++++	+++	++++	++++	++++
YC7008	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++
YC7009	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++
YC7010	++++	++++	++++	+++	++++	++++	++++
YC7011	-	-	-	++	++	++	++
YC7012	++	++	++	+++	+++	+++	+++

YC7021	-	-	-	-	++	++	++
YC7024	-	-	-	+++	+++	+++	+++
YC7026	-	nt	nt	+++	+++	+++	+++

[Lưu ý]

- khoảng cách ức chế: +, < 3 mm; ++, 4-5 mm; +++, 6-8 mm; +++, > 8 mm.

Tham chiếu đến bảng 4, có thể thấy rằng, mặc dù hoạt động kháng vi khuẩn của vi khuẩn sống trong mô chủng YC7007 đối với nấm gây bệnh thực vật được thay đổi ít tùy thuộc vào môi trường, các tác dụng ức chế tăng trưởng của sợi nấm nằm trong khoảng từ 3 đến 10 mm được thể hiện.

Ngoài ra, tham chiếu đến bảng 5, có thể thấy rằng dung dịch nuôi cấy được thể hiện các tác dụng ức chế tăng trưởng nằm trong khoảng từ 4 đến 10 mm trong khi phần lọc nuôi cấy được thể hiện các tác dụng ức chế tăng trưởng nằm trong khoảng từ 3 đến 8 mm, với hoạt động kháng vi khuẩn 1/10 TSA của chủng YC7007 của vi khuẩn sống trong mô đối với vi khuẩn gây bệnh thực vật.

[Bảng 5]

Canh trường	Mức độ ức chế			
	<i>Burkholderia glumae</i>	<i>Xanthomonas oryzae</i> PV. <i>oryzae</i>	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>
Dung dịch nuôi cấy	++++	++++	+++	++
Phần lọc nuôi cấy	+++	+++	+	+

[Lưu ý]

- Khoảng cách ức chế: +, < 3 mm; ++, 4-5 mm; +++, 6-8 mm; +++, 8-10 mm

Từ các kết quả nêu trên, có thể được hiểu rằng chủng theo sáng chế có tác dụng ức chế gây bệnh cao và rộng trên vi khuẩn đối kháng khác bất kỳ được biết đến nay.

Thử nghiệm đánh giá tính hiệu quả kiểm soát thuốc trừ sâu của chủng YC7007 đối với nấm gây bệnh

Dựa trên tác dụng ức chế ở thử nghiệm bên trong tủ áp thực nghiệm theo Ví dụ 2, điều tra nghiên cứu về tác dụng kiểm soát thuốc trừ sâu của chủng YC7007 đối với bảy loại bệnh thực vật nghiêm trọng được thực hiện bằng cách xử lý trực tiếp các thực vật tương ứng với chủng YC7007. Thử nghiệm tính hiệu quả kiểm soát được yêu cầu và được thực hiện bởi viện nghiên cứu Hàn Quốc của công nghệ hóa học (KRICT), và các bệnh thực vật này có thể là bệnh đạo ôn, bệnh khô vằn lá lúa, bệnh mốc thối xám ở cà chua, bệnh héo rũ ở cà chua (tác nhân gây bệnh: *Phytophthora infestans*), bệnh rỉ lá cây lúa mì (tác nhân gây bệnh: *Puccinia recondita*), nấm mốc bột lúa mạch (tác nhân gây bệnh: *Blumeria graminis f. sp. hordei*) và bệnh loét quả ớt (tác nhân gây bệnh: *Colletotrichum coccodes*), v.v...

Việc xử lý được thực hiện bằng cách đặt hai chậu thực vật bị bệnh trên đĩa quay 1 ngày trước khi ghép với huyền phù YC7007, và phun huyền phù trên thực vật bằng các phương tiện ống phun xì (1 kg/cm^2) trong khi quay đĩa để kết dính đồng đều huyền phù trên toàn bộ thực vật. Điều tra nghiên cứu về khả năng kháng bệnh bao gồm tác dụng bằng cách làm ướt huyền phù của chủng được thực hiện bằng cách làm ướt 5 ml của chủng trên ba chậu của mỗi thực vật chủ 7 ngày trước khi ghép tác nhân gây bệnh, nuôi cây thực vật chủ trong nhà kính trong khoảng 1 tuần, và sau đó, kiểm tra mức độ tấn công bệnh. Huyền phù của chủng được điều chế và được sử dụng bằng cách nuôi cấy lắc chủng trong môi trường 1/10 TSB tại nhiệt độ 28°C qua đêm, quay ly tâm chúng, và sau đó, tạo huyền phù vi khuẩn các tế bào trong dung dịch 10 mM MgSO_4 để điều chỉnh nồng độ của chúng đến $2 \times 10^6 \text{ cfu/ml}$. Điều tra nghiên cứu về sự ghép gây bệnh và sự tấn công bệnh được thực hiện bằng cách ghép 7 loại bào tử và sợi nấm gây bệnh đối với thực vật chủ tương

ứng. Các phương pháp thử nghiệm cụ thể về bệnh thực vật tương ứng được tiến hành như được mô tả dưới đây.

Bệnh đạo ôn (RCB) được tạo ra bằng cách ghép môi trường thạch cám thóc bằng tác nhân gây bệnh, chủng *Magnaporthe grisea* (*M. grisea*) KJ201, nuôi cấy chúng trong tủ áp tại nhiệt độ 25°C trong khoảng 2 tuần để tạo ra bào tử, và sau đó, nuôi cấy chúng trong nước được khử trùng và được tinh chế tạo ra huyền phù bào tử bằng nồng độ được xác định trước (3×10^5 bào tử/ml). RCB được điều chế được phun đủ để phun lúa NakDong được ngâm rử xuống (giai đoạn 3 đến 4 lá cây chính). Lúa được ghép được nuôi cấy ở trạng thái ban đêm trong phòng ẩm trong khoảng 24 giờ và được đưa vào tấn công bệnh trong phòng điều hòa không khí có độ ẩm tương đối là 80% hoặc lớn hơn tại nhiệt độ là 26°C trong khoảng 4 ngày, sau đó điều tra nghiên cứu về tỷ lệ vùng lá nhiễm trùng.

Quạt gió vỏ thóc (Rice sheath blast - RSB) được chuẩn bị bằng cách đưa lượng cám mong muốn trong chai nuôi cấy 1l, khử trùng và ghép cùng với chủng gây bệnh, *Rhizoctonia solani* (*R. solani*) AG1, và sau đó, nuôi cấy sản phẩm được xử lý trong tủ áp tại nhiệt độ 25°C trong khoảng 7 ngày. Sự ghép bệnh được thực hiện bằng cách nghiền sinh khối sợi nấm được nuôi cấy thành các mảnh nhỏ, việc ghép đồng đều chậu được ngâm thuốc và phát triển NakDong lúa giai đoạn 4 đến 5 lá cây với miếng đất, và nuôi cấy chúng trong phòng ẩm (25°C) trong khoảng 7 ngày gây ra sự tấn công bệnh, sau đó điều tra nghiên cứu về vùng diện tích lá nhiễm trùng được tạo ra trong vỏ.

Cà chua mốc thối xám (TGM) được chuẩn bị bằng cách ghép môi trường thạch khoai tây với sự gây bệnh, bệnh thối xám (*B. cinerea*), nuôi cấy chúng trong bộ ổn định nhiệt tại 25°C tạo ra bào tử và sử dụng chúng làm chất cấy. Sự ghép gây bệnh được thực hiện bằng cách nuôi cấy bào tử, điều chỉnh nồng độ của nó đến 3×10^5 bào tử/ml bằng cách sử dụng máy đếm huyết cầu, và sau đó, phun ghép cây cà

chua được ngâm thuốc (giai đoạn từ 2 đến 3 lá cây). Cây cà chua non được ghép được đặt trong tủ lạnh ẩm tại nhiệt độ 20°C (có độ ẩm tương đối là 95% hoặc cao hơn) cảm ứng sự tấn công bệnh trong khoảng 3 ngày, sau đó điều tra nghiên cứu về tỷ lệ vùng lá nhiễm trùng.

Bệnh héo rũ ở cà chua (TLB) được chuẩn bị bằng cách ghép môi trường yếm mạch với tác nhân gây bệnh, chủng *Phytophthora infestans* (*P. infestans*) và nuôi cấy chúng trong tủ áp tại nhiệt độ 20°C tạo ra nang động bào tử. Sự ghép gây bệnh được thực hiện như sau: bổ sung nang động bào tử được tạo ra vào nước được khử trùng và được tinh chế, nuôi cấy chúng, và sau đó, điều chế huyền phù bào tử với nồng độ bào tử là 3×10^4 bào tử nang/ml; giữ huyền phù được phối chế trong tủ lạnh để làm cứng chúng và bào tử nổi trong khe hở, do đó bào tử huyền phù nổi; và phun ghép cây cà chua được ngâm thuốc (giai đoạn từ 2 đến 3 lá cây) với huyền phù được phối chế. Cây cà chua non được ghép gây bệnh được đưa vào xử lý sương trong phòng ẩm tại nhiệt độ 20°C trong khoảng 2 ngày, và sau đó, được đưa vào tấn công bệnh trong phòng điều hòa không khí, sau đó điều tra nghiên cứu về tỷ lệ vùng lá nhiễm trùng được xuất hiện trên lá cây 3 ngày sau khi sự ghép.

Bệnh rỉ lá cây lúa mỳ (WLR) có gây bệnh, *Puccinia recondita* (*P. recondita*), làm biotroph. Do đó, chất cấy được sử dụng ở đây là bào tử hạ được tạo ra trong thực vật non của cây lúa mỳ trong khi trực tiếp nuôi cấy phụ cùng trên thực vật trong phòng thí nghiệm. Để điều tra nghiên cứu các tác dụng của thuốc của chúng, 5 hạt giống lúa mỳ (giống cây trồng: Eunpa) được gieo trong chậu dùng một lần (đường kính: 4,5 cm), được nuôi cấy trong nhà kính trong khoảng 8 ngày tạo ra cây non một lá, sau đó ngâm thuốc cây non và ghép phun cùng với chất cấy (0,11 g/l bào tử). Cây lúa non mỳ được tiêm chủng được đưa vào xử lý sương trong phòng ẩm tại nhiệt độ 20°C trong khoảng 1 ngày, và sau đó, được chuyển đến phòng điều hòa không khí với độ ẩm tương đối là 70% tại nhiệt độ 20°C gây ra sự

tấn công bệnh, sau đó điều tra nghiên cứu về tỷ lệ vùng lá nhiễm trùng 7 ngày sau khi ghép.

Nấm mốc bột lúa mạch (BPM) tác nhân gây bệnh, *Blumeria graminis* (*B. graminis* f. sp. *hordei*) làm biotroph. Do đó, chất cấy được sử dụng ở đây là bào tử được tạo ra trong lúa mạch trong khi nuôi cấy phụ cây lúa mạch non trong phòng thí nghiệm. Để điều tra nghiên cứu các tác dụng thuốc của chúng, 5 hạt giống lúa mạch (giống cây trồng: lúa mạch mùa đông) được gieo trong chậu dùng một lần (đường kính: 4,5 cm), được nuôi cấy trong nhà kính trong khoảng 8 ngày tạo ra cây non giai đoạn 1 lá, sau đó phun thuốc trên cây non, làm khô bằng gió chúng trong nhà kính và phân tán bào tử nấm mốc bột trên lúa mạch được ngâm thuốc để ghép chúng. Cây lúa mạch non được ghép được giữ trong phòng điều hòa không khí với độ ẩm tương đối khoảng 60% tại 20 đến 23°C gây ra sự tấn công bệnh trong khoảng 7 ngày, sau đó điều tra nghiên cứu về tỷ lệ vùng lá nhiễm trùng.

Bệnh loét quả ớt (RPA) được chuẩn bị bằng cách ghép môi trường yếm mạch với tác nhân gây bệnh, *Coletotricum cocodes* (*C. coccodes*), nuôi cấy chúng tại nhiệt độ 25°C trong khoảng 10 ngày tạo ra bào tử, nuôi cấy chúng, điều chỉnh nồng độ của chúng đến 2×10^5 bào tử trên ml, do đó tạo ra huyền phù bào tử. Cây hồ tiêu non được ngâm thuốc (trong giai đoạn khoảng 3 đến 4 lá cây) được ghép phun bằng huyền phù bào tử được điều chế, được đặt trong phòng ẩm (25°C), và được đưa vào xử lý sương trong khoảng 2 ngày để tấn công bệnh trong phòng điều hòa không khí (25°C, 75% RH). Ba ngày sau khi ghép, sau đó điều tra nghiên cứu về tỷ lệ vùng lá nhiễm trùng.

Trị số điều chỉnh được tính từ tỷ lệ vùng lá nhiễm trùng thu được bằng cách điều tra nghiên cứu về bệnh theo phương trình 1 dưới đây.

[Phương trình 1]

Trị số điều chỉnh (%) = $(1 - \text{tỷ lệ vùng lá nhiễm trùng trong nhóm được xử lý} / \text{tỷ lệ vùng lá nhiễm trùng trong nhóm không được xử lý}) \times 100$

Bảng 6 sau đây minh họa các kết quả điều tra nghiên cứu về các tác dụng kiểm soát của chủng YC7007 đối với bệnh thực vật nghiêm trọng.

[Bảng 6]

Phương pháp xử lý	Trị số điều chỉnh (%)						
	Bệnh đạo ôn	Bệnh khô vằn lúa	Bệnh cà chua mốc thối xám	Bệnh héo rũ ở cà chua	Bệnh rỉ lá cây lúa mỳ	Bệnh nấm mốc bột lúa mạch	Bệnh loét
Phun lá	70	6	36	31	83	72	71
Làm ướt đất	35	0	0	0	0	0	0

Tham chiếu đến bảng 6, liên quan đến các tác dụng kiểm soát đối với 7 loại bệnh thực vật nghiêm trọng, có thể thấy rằng, trong trường hợp bệnh đạo ôn, bệnh rỉ lá cây lúa mỳ, bệnh nấm mốc bột lúa mạch và bệnh loét quả ớt, trị số điều chỉnh nằm trong khoảng từ 70 đến 83%, trong khi bệnh khô vằn lá lúa, bệnh cà chua mốc thối xám và bệnh héo rũ ở cà chua được thể hiện trị số điều chỉnh thấp là 36% hoặc nhỏ hơn. Cụ thể là, tác dụng kiểm soát do khả năng kháng bệnh sau khi làm ướt đất 35% trong trường hợp của lúa, do đó, được xác nhận rằng chủng YC7007 có đặc tính cây chủ cụ thể đối với lúa.

Thử nghiệm về tính hiệu quả ngăn ngừa bệnh thối hạt do khả năng kháng bệnh bởi chủng YC7007

Để xem xét lúa tính hiệu quả ngăn ngừa bệnh thối hạt do khả năng kháng bệnh bởi chủng YC7007, điều tra nghiên cứu về tác dụng kiểm soát được thực hiện như sau.

Sau khi cấy cây lúa non (DongJin 1) được nuôi cấy trong buồng phát triển thực vật (nằm trong khoảng từ 28 đến 30°C, độ ẩm tương đối là 80% hoặc lớn hơn) trong khoảng 2 tuần vào đất nền được khử trùng hoặc không được khử trùng để nuôi cấy lúa, 10 ml huyền phù của chủng (2×10^7 cfu/ml) được phân bố ngay lập tức trên đó (120 g). huyền phù của chủng YC7007 được điều chế bằng cách nuôi cấy lắc trong môi trường 1/10 TSB tại nhiệt độ 28°C qua đêm, quay ly tâm chúng, tạo huyền phù các tế bào vi khuẩn trong dung dịch 10 mM MgSO₄, và sau đó, điều chỉnh thích hợp nồng độ của chúng. Sau khi xử lý 5 ngày, sự ghép được thực hiện bằng cách bôi chất dính lên dụng cụ dò ghép bằng huyền phù gây bệnh ở lúa thối hạt (*B. glumae*) (5×10^7 cfu/ml, OD₆₀₀ = 0,1) và ghép 20 lá cây với ba lần lặp lại đối với mỗi xử lý. Huyền phù gây bệnh được ly tâm sau khi nuôi cấy trong khoảng 24 giờ trong môi trường R2A, và các tế bào vi khuẩn được tạo huyền phù trong dung dịch 10 mM MgSO₄ và được sử dụng bằng cách điều chỉnh thích hợp nồng độ của chúng. Sau khi ghép gây bệnh, sản phẩm được xử lý được đặt trên buồng tăng trưởng trong khoảng 5 ngày, và sau đó, được điều tra nghiên cứu đối với mức độ hoại tử của lá nhiễm trùng. Mức độ tấn công bệnh được phân loại từ 0 đến 3 (0: không có dấu hiệu của bệnh, 1: chỗ hoại tử nhỏ, 2: đốm sẫm lớn được tạo ra từ một vài chỗ hoại tử, 3: hoại tử trên toàn bộ vùng), và trị số điều chỉnh được ước lượng bằng cách tính mức độ ức chế bệnh so với nhóm kiểm soát. Chất của nhóm kiểm soát dùng để cảm ứng khả năng kháng bệnh của lúa được sử dụng ở đây là dung dịch benzothiadiazol (BTH) 1 mM.

Bảng 7 sau minh họa các kết quả điều tra nghiên cứu về tác dụng ngăn ngừa bệnh thối hạt của lúa bằng cách xử lý đất sử dụng chủng YC7007, và FIG. 4 là hình vẽ minh họa đối với sự khác biệt và sự so sánh việc xử lý để giải thích tác dụng ngăn ngừa bệnh thối hạt của lúa.

[Bảng 7]

Xử lý	Mức độ tấn công bệnh		Trị số điều chỉnh (%)
	Chiều dài của lá nhiễm trùng (mm)	Mức độ tấn công bệnh	
Không xử lý	0±0c	0±0c	-
<i>B. glume</i>	17,4±1,0a	2,4±0,06a	-
YC7007+B. <i>glume</i>	2,0±0,2b	1,10±0,06b	54
BTH	1,5±0,2bc	1,03±0,09b	57

Tham chiếu đến bảng 7 và FIG. 4, được chứng minh rằng, kết quả về ghép đất với tác nhân gây bệnh sau khi xử lý 5 ngày về đất với huyền phù của chủng YC7007 và điều tra nghiên cứu tác dụng kiểm soát, nhóm được xử lý chủng có chiều dài lá nhiễm trùng là 2,0 mm và mức độ tấn công bệnh là 1,1 trong khi nhóm kiểm soát chỉ được xử lý bằng cách sử dụng tác nhân gây bệnh có chiều dài lá nhiễm trùng là 17,4 mm và mức độ tấn công bệnh là 2,4, do đó thể hiện trị số giảm đáng kể so với nhóm kiểm soát. Ngoài ra, trị số điều chỉnh là 54% thường giống với 57% trong trường hợp của BTH làm chất của nhóm kiểm soát, do đó chứng minh cùng khoảng của tác dụng gây kháng bệnh chủ.

Thử nghiệm về tính hiệu quả ngăn bệnh ngừa bệnh bạc lá lúa do khả năng kháng bệnh bởi chủng YC7007

Để xem xét tính hiệu quả ngăn bệnh ngừa bệnh bạc lá lúa do khả năng kháng bệnh của chủng YC7007, điều tra nghiên cứu về tác dụng kiểm soát được tiến hành như sau.

Sau khi cấy cây lúa non (DongJin 1) được nuôi cấy trong buồng phát triển thực vật (nằm trong khoảng từ 28 đến 30°C, độ ẩm tương đối là 80% hoặc lớn hơn) trong khoảng 5 tuần vào đất nền được khử trùng hoặc không được khử trùng để nuôi cấy lúa, 10 ml huyền phù của chủng (2×10^7 cfu/ml) được phân bố ngay lập tức trên đó (120 g). sau khi xử lý 5 ngày, sự ghép được thực hiện bằng cách bôi chất

dính lên dụng cụ dò ghép bằng huyền phù gây bệnh bạc lá lúa (*X. oryzae* PV. *Oryzae*) (1×10^7 cfu/ml, $OD_{600} = 0,1$) và ghép 20 lá cây với ba lần lặp lại đối với mỗi xử lý. Huyền phù gây bệnh bạc lá lúa được điều chế theo cùng phương pháp như được mô tả đối với bệnh lúa thối hạt nêu trên. Sau khi ghép sự gây bệnh, sản phẩm được xử lý được đặt trên ruộng tăng trưởng trong khoảng 5 ngày, và sau đó, được điều tra nghiên cứu đối với mức độ hoại tử của lá nhiễm trùng. Mức độ tấn công bệnh được phân loại từ 0 đến 9 (0: không có dấu hiệu của bệnh, 1: chỗ hoại tử nhỏ, từ 2 đến 4: đốm sẫm có kích cỡ trung bình bao gồm từ một vài chỗ hoại tử, từ 5 đến 8: đốm sẫm lớn bao gồm từ một vài chỗ hoại tử, 9: hoại tử trên toàn bộ vùng), và trị số điều chỉnh được ước lượng bằng cách tính mức độ ức chế bệnh so với nhóm kiểm soát.

Bảng 8 sau đây minh họa các kết quả điều tra nghiên cứu về tác dụng ngăn ngừa bệnh bạc lá lúa bằng cách xử lý đất bằng cách sử dụng chủng YC7007, và FIG. 5 là hình vẽ minh họa cho sự khác biệt và sự so sánh việc xử lý để giải thích tác dụng ngăn ngừa bệnh bạc lá lúa.

[Bảng 8]

Xử lý	Mức độ tấn công bệnh *		Trị số điều chỉnh (%)
	Vết châm kim	sự xén	
Không xử lý	1,0 $\pm$ 0c	1,0 $\pm$ 0c	-
<i>X oryzae</i>	7,4 $\pm$ 0,4a	2,4 $\pm$ 0,06a	-
YC7007+ <i>X oryzae</i>	2,3 $\pm$ 0,67b	2,2 $\pm$ 0,23b	65

(*) mức độ tấn công bệnh nằm trong khoảng từ 0 đến 9; các ký tự tiếng Anh khác nghĩa là sự khác biệt đáng kể có thể xuất hiện bởi nhiều sự xác minh của Dunkin ($p = 0,05$)

Tham chiếu đến bảng 8 và FIG. 5, được chứng minh rằng, kết quả ghép đất với tác nhân gây bệnh sau khi xử lý 5 ngày của đất với huyền phù của chủng

YC7007 và điều tra nghiên cứu tác dụng kiểm soát, mặc dù có sự khác biệt nhỏ giữa sự ghép kiểu vết châm kim và kiểu xén, nhóm được xử lý chủng YC7007 lần lượt có mức độ tấn công bệnh là 2,3 và 2,2, so với nhóm kiểm soát chỉ được xử lý bằng cách sử dụng tác nhân gây bệnh mà lần lượt có mức độ tấn công bệnh là 7,4 và 5,67, do đó lần lượt thể hiện trị số điều chỉnh cao là 69% và 61% (trung bình là 65%). Do đó, tác dụng gây kháng bệnh cây chủ ưu việt được xác nhận.

Thử nghiệm về tính hiệu quả ngăn ngừa bệnh nấm do khả năng kháng bệnh bởi chủng YC7007

Để xem xét tính hiệu quả ngăn ngừa bệnh nấm do khả năng kháng bệnh của chủng YC7007, điều tra nghiên cứu về tác dụng kiểm soát được tiến hành như sau.

Sau khi cấy cây lúa non (DongJin 1) được nuôi cấy trong buồng phát triển thực vật (từ 28 đến 30°C, độ ẩm tương đối là 80% hoặc lớn hơn) trong khoảng 2 tuần vào đất nền được khử trùng hoặc không được khử trùng để nuôi cấy lúa, 15 ml huyền phù của chủng (từ 10^5 đến 10^7 cfu/ml) được phân bố ngay lập tức trên đó (150 g). Sau khi xử lý 3 ngày, sự ghép được thực hiện bằng cách ghép lại các cây non ba lần sao cho 10 cây non trên mỗi mỗi lặp lại được ghép với 1,5 g/chỗ tác nhân gây bệnh nấm (*G. fujikuroi*) (5×10^5 cfu/g). Sau khi ghép sự gây bệnh, sản phẩm được xử lý được đặt trên buồng tăng trưởng trong khoảng 10 đến 30 ngày, và sau đó, được điều tra nghiên cứu đối với mức độ hoại tử của lá nhiễm trùng. Mức độ tấn công bệnh được phân loại từ 0 đến 5 (0: không có dấu hiệu của bệnh, 1: lá vàng mỏng và thân cây xoắn, từ 2 đến 4: lá vàng và thân cây cao, 5: hoại tử trên toàn bộ vùng), và trị số điều chỉnh được ước lượng bằng cách tính mức độ ức chế bệnh so với nhóm kiểm soát.

Bảng 9 sau đây minh họa các kết quả điều tra nghiên cứu về các tác dụng ngăn ngừa bệnh nấm bằng cách xử lý đất sử dụng chủng YC7007

[Bảng 9]

Xử lý	Mức độ tấn công bệnh*	Trị số điều chỉnh (%)
Không xử lý	0±0c	-
<i>G. fujikuroi</i>	3,40±0,31a	-
YC7007+ <i>G. fujikuroi</i>	1,40±0,12b	58,8

(*) mức độ tấn công bệnh nằm trong khoảng từ 0 đến 5; các ký tự tiếng Anh khác nghĩa là sự khác biệt đáng kể có thể xảy ra bằng nhiều sự xác minh của Dunkin ($p = 0,05$)

Tham chiếu đến bảng 9, được chứng minh rằng, kết quả ghép đất với tác nhân gây bệnh sau khi xử lý 3 ngày của đất với huyền phù của chủng YC7007 và điều tra nghiên cứu tác dụng kiểm soát, nhóm kiểm soát chỉ được xử lý bằng cách sử dụng tác nhân gây bệnh mà có mức độ tấn công bệnh là 3,4, trong khi nhóm được xử lý chủng có mức độ tấn công bệnh là 1,4, do đó thể hiện trị số điều chỉnh là 58,8%. Do đó, tác dụng gây kháng bệnh cây chủ ưu việt được xác nhận.

Thử nghiệm về tính hiệu quả thúc đẩy sự tăng trưởng của lúa bằng cách xử lý sử dụng chủng YC7007

Để xem xét tính hiệu quả thúc đẩy sự tăng trưởng của lúa bằng cách xử lý chủng YC7007, điều tra nghiên cứu về tính hiệu quả thúc đẩy sự tăng trưởng thực vật được thực hiện như sau.

Sau khi trộn đều 1 kg đất nuôi cấy lúa với 200 ml huyền phù của chủng (2×10^7 cfu/ml), các hạt giống lúa được này mầm được gieo ở đó. Sau khi gieo, mức độ tăng trưởng của thân cây và rễ lần lượt được điều tra nghiên cứu sau 10 ngày (giai đoạn cây giống), 30 ngày (giai đoạn đâm chồi) và 75 ngày (giai đoạn trổ bông), trong khi nuôi cấy các hạt giống lúa trong buồng phát triển thực vật (từ 28 đến 30°C, độ ẩm tương đối là 80% hoặc lớn hơn). Như nhóm kiểm soát, đất chỉ được trộn với cùng lượng dung dịch đệm 10 mM $MgSO_4$ được sử dụng. Để duy trì mật độ của vi

khuẩn 30 ngày sau khi ghép và trong giai đoạn đâm chồi, 5 ml huyền phù của chủng YC7007 được làm ướt lại trong đất tại phần rễ lúa. Mỗi xử lý được lặp lại ba lần, và 10 cây được sử dụng cho mỗi lần lặp lại.

Bảng 10 sau đây minh họa các kết quả điều tra nghiên cứu về tính hiệu quả thúc đẩy sự tăng trưởng của lúa bằng chủng YC7007.

[Bảng 10]

Xử lý	Trạng thái tăng trưởng					
	Giai đoạn cây giống		Giai đoạn đâm chồi		Giai đoạn trổ bông	
	Thân (cm)	Rễ (cm)	Thân (cm)	Số lượng đâm chồi	Thân (cm)	Số lượng đâm chồi
Không xử lý	11,7±0,3 b	2,7±0,3 b	36,5±1,2b	1,9±0,2b	55,3±0,3b	5,3±0,7 b
YC7007	19,3±0,3a	7,7±0,3a	46,3±2,0a	2,9±0,1a	61,0±2,0a	7,0±0,6a

(*) Các ký tự tiếng Anh khác nghĩa là sự khác biệt đáng kể có thể xảy ra bằng nhiều sự xác minh của Dunnett ($p = 0,05$)

Tham chiếu đến bảng 10, được chứng minh rằng, kết quả xử lý đất nền nuôi cấy lúa có chủng YC7007, nuôi cấy chúng trong chậu và điều tra nghiên cứu các tác dụng thúc đẩy sự tăng trưởng trong mỗi khoảng thời gian phát triển, nhóm được xử lý chủng YC7007 có chiều dài của thân và rễ dài hơn đáng kể là 19,3 cm và 7,7 cm trong giai đoạn cây giống, hơn 11,7 cm và 2,7 cm của nhóm không được xử lý. Tương tự, chiều dài của thân trong giai đoạn đâm chồi được tăng nhiều hơn bằng 27,4% và số lượng đâm chồi cũng lớn hơn khoảng 52%. Ngoài ra, trong giai đoạn trổ bông, nhóm được xử lý chủng YC7007 được thể hiện 10,8% được tăng nhiều hơn chiều dài của thân và số lượng đâm chồi lớn hơn khoảng 32%. Do đó, tính hiệu quả thúc đẩy sự tăng trưởng của lúa bằng cách xử lý chủng YC7007 được xác nhận.

Điều tra nghiên cứu về sự sản xuất và tác dụng của vật liệu kháng vi khuẩn ức chế gây bệnh

Để xác nhận rằng sự ức chế của tác nhân gây bệnh bằng chủng YC7007 xảy ra bằng cách sản xuất vật liệu kháng vi khuẩn, vật liệu kháng vi khuẩn được sản xuất ở môi trường chất lỏng 1/10 TSB hoặc không được nghiên cứu. Mức độ tác dụng ức chế vật liệu kháng vi khuẩn được xác định bằng cách đo khoảng cách ức chế tăng trưởng của sợi nấm hoặc các tế bào vi khuẩn được tạo ra xung quanh đĩa giấy theo phương pháp khuếch tán đĩa. Sau khi nuôi cấy lắc chủng YC7007 trong môi trường chất lỏng tại nhiệt độ 28°C (180 rpm) trong khoảng 72 giờ và quay ly tâm tại 9000 g trong khoảng 10 phút, phần lọc nuôi cấy được lọc thông qua máy lọc Millipore (0,2 µm), sau đó xác định hoạt động kháng vi khuẩn trong thời gian nuôi cấy.

FIG. 6 là (a) biểu đồ và (b) hình vẽ minh họa tác dụng kháng vi khuẩn của dung dịch nuôi cấy chủng YC7007 trong mỗi khoảng thời gian nuôi cấy, trong khi FIG. 7 là biểu đồ minh họa tác dụng kháng vi khuẩn của dung dịch nuôi cấy chủng YC7007 trong mỗi nhiệt độ xử lý.

Đầu tiên, tham chiếu đến FIG. 6, liên quan đến tác dụng kháng vi khuẩn của chủng phần lọc nuôi cấy trong mỗi khoảng thời gian nuôi cấy, có thể thấy rằng, trong trường hợp vi khuẩn gây bệnh ở lúa (*B. glume*, *X. oryzae*) và bệnh nấm vi khuẩn (*G. fujikuroi*), tác dụng ức chế được tăng khi thời gian nuôi cấy chủng được tăng, do đó, tác dụng ức chế ưu việt nhất thu được trong phần lọc nuôi cấy trong khoảng 60 giờ. Tuy nhiên, được chứng minh rằng tác dụng được giảm nhanh chóng trong phần lọc nuôi cấy trong khoảng 72 giờ.

Ngoài ra, tham chiếu đến FIG. 7, kết quả điều tra tính ổn định của phần lọc nuôi cấy đối với nhiệt, hoạt động kháng vi khuẩn được duy trì cho đến khi xử lý tại nhiệt độ 90°C, tuy nhiên, tác dụng ức chế được giảm không đáng kể nếu nhiệt độ

vượt quá 100°C. Từ kết quả này, có thể được hiểu rằng vật liệu kháng vi khuẩn được sản xuất bởi chủng YC7007 có thể tương đối ổn định nhiệt.

Điều chế chủng YC7007

Để duy trì hoạt tính của chủng YC7007 và mật độ trong khi bảo quản, chủng YC7007 được điều chế ở dạng bột và lỏng như sau.

Dung dịch nuôi cấy vi khuẩn thu được bằng cách ủ chủng trong chất gây men với kích cỡ lớn (1 tấn hoặc lớn hơn) hoặc thân nấm thu được sau khi quay ly tâm được trộn với khoáng chất đất sét bất kỳ như cao lanh, bentonit, than bùn, v.v.. ở tỷ lệ 1:100, được làm khô ở nhiệt độ thấp, và sau đó, được nghiền đều để tạo ra vật liệu đất ở dạng bột. Đồng thời, sản phẩm nuôi cấy nấm được trộn với khoáng chất đất sét ở tỷ lệ là 1:100 cũng điều chế dạng huyền phù lỏng.

Kết quả kiểm tra cường độ của mẫu được điều chế như được mô tả nêu trên, được phát hiện ra rằng hầu hết các chế phẩm được bao gồm chủng với lượng là 10^8 cfu/g hoặc lớn hơn, và huyền phù lỏng được trộn và được điều chế với khoáng chất đất sét có mật độ là 10^8 cfu/ml hoặc lớn hơn.

Ví dụ 2

Được cho rằng lúa là thực phẩm chính của hơn một nửa dân số thế giới và đã được sản xuất khoảng 745 triệu tấn trong năm 2013. Lúa chủ yếu được sản xuất trong Khu vực Châu Á, tuy nhiên, do các bệnh là lý do hạn chế chính, bao gồm sự giảm từ 24 đến 41% mỗi năm (Anonymous 2014. Rice market monitor. In: Monthly report, Tổ chức thực phẩm và nông nghiệp của liên hợp quốc, vol. 17, iss. 1, pp 1-4(<http://www.fao.org/3/a-i3735e.pdf>).; Savary, S., Willocquet, L., Elazegui, F. A., Castilla, N. P. và Teng, P. S. 2000. Các hạn chế các sâu bệnh ở lúa trong vùng nhiệt đới Châu Á: Xác định số lượng về sự hao hụt xuất xứ do các sâu bệnh ở lúa trong vùng một loạt tình huống sản xuất. Plant Dis. 84:357-369.). Đối với lúa, ít nhất 70 loại bệnh gây ra bởi nấm, vi khuẩn, virus và tuyến trùng đã được

báo cáo. Cụ thể là, bệnh đạo ôn, đốm lá do vi khuẩn, bệnh thối hạt và bệnh nấm là bệnh lây truyền hạt nghiêm trọng nhất làm giảm lượng thu hoạch (Ou, S. H. 1985. Rice disease. 2nd ed. Commonwealth Mycol. Inst., 361 pp. Key, England.). Đối với trường hợp, bạc lá lúa gây ra bởi *Xanthomonas oryzae* PV. *oryzae* có thể giảm từ 10 đến 50% tổng sản lượng lúa phụ thuộc vào hoàn cảnh, do đó chuyên gia ảnh hưởng lớn đến xã hội (Mew, T. W. 1992. Foliar disease, bacterial blight. In: Bản tóm tắt về các bệnh của lúa, eds. by R. K. Webster and P. S. Gunnell, pp. 10-11.). Theo một cách khác, các bệnh do vi khuẩn khác như bạc lá và thối cây giống, thối bẹ lá, nâu lá, tàn rụi, thối hạt và héo do vi khuẩn gây ra bởi *Burkholderia glumae* có thể đôi khi giảm thậm chí 75% sản lượng (Croplife 2015. Tàn rụi chùy do vi khuẩn, bệnh có ảnh hưởng lớn nhất đến vụ lúa. (<http://www.croplife.org/en/disease-of-the-month.html?id=182>); Kim, J., Kang, Y., Kim, J. G., Choi, O. và Hwang, I. 2010. Occurrence of *Burkholderia glumae* on rice và field crops in Korea. Plant Pathol. J. 26:271-272.; Ura, H., Furuya, N., Iiyama, K., Hidaka, M., Tsuchiya, K. và Matsuyama, N. 2006. *Burkholderia gladioli* kết hợp với triệu chứng thối hạt và nâu bẹ lá do vi khuẩn của cây lúa. J. Gen. Plant Pathol. 72:98-103.). Ngoài ra, sự giảm năng xuất do bệnh nấm gây ra bởi *Fusarium fujikuroi* được ước tính khoảng 10 đến 50% vùng nuôi cấy lúa của khu vực Châu Á (Bonman, J. M. 1992. Bệnh ở ngọn và rễ, bệnh nấm. In: Bản tóm tắt về các bệnh của lúa, eds. by R. K. Webster và P. S. Gunnell, p. 27.). Để kiểm soát thuốc từ sâu về các bệnh nêu trên, thuốc diệt vi khuẩn hóa học đã được sử dụng rộng rãi ở hầu hết các nước Châu Á trong khoảng vài chục năm cuối, tuy nhiên, tính hiệu quả của thuốc diệt vi khuẩn gần đây đã được giảm do sự xuất hiện của tolerance (Yang, Y. R., Kim, Y. C., Lee, S. W., Lee, S. W., An, G. G. và Kim, I. S. 2012. Bao gồm hệ thống vận chuyển cây chủ động ra với sự kháng prochloraz của *Fusarium fujikuroi* CF245 gây ra bệnh nấm. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 55:571-574.). Ngoài ra, sử dụng sai thuốc diệt vi

khuẩn hóa học có thể gây ra ảnh hưởng xấu đến môi trường nông nghiệp và người lao động. Do đó, phát triển phương tiện kiểm soát thuốc trừ sâu có khả năng thay thế thuốc diệt vi khuẩn hóa học nếu trên đã được cố gắng, cụ thể là, trong các nước Châu Á mà sự kiểm soát sinh học sử dụng vi khuẩn đối kháng (Gnanamanickam, S. S. 2009. Sự khái quát về sự tiến bộ với sự kiểm soát sinh học. Trong sự kiểm soát sinh học về các bệnh của lúa, sự tiến bộ về sự kiểm soát sinh học, ed. Bởi S. S. Gnanamanickam, vol. 8, pp. 43-51. Springer, Netherlands.).

Sự kiểm soát sinh học bằng cách sử dụng vi khuẩn đối kháng có thể được biểu hiện bằng các phương tiện quản lý bệnh được hợp nhất và sự an toàn môi trường. Loại vi sinh vật đa dạng như *Bacillus*, *Burkholderia*, *Lysobacter*, *Pantoea*, *Pseudomonas* và *Streptomyces* đã được sử dụng làm các chế phẩm sinh học cho nhiều bệnh cây trồng nông nghiệp. Tuy nhiên, liên quan đến sự kiểm soát sinh học về các bệnh của lúa, chỉ một vài nghiên cứu đã được báo cáo (Bouizgarne, B. 2013. Vi khuẩn dùng cho sự thúc đẩy phát triển thực vật và sự quản lý bệnh. Trong vi khuẩn trong nông sinh học, sự quản lý bệnh, ed. bởi D. K. Maheshwari, pp. 15-34. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.; McSpadden Gardener, B. 2010. Sự kiểm soát sinh học của tác nhân gây bệnh thực vật và sự thúc đẩy phát triển thực vật bởi *Bacillus*. Trong sự phát triển gần đây trong quản lý bệnh thực vật, bệnh học thực vật ở thế kỷ 21. eds. bởi U. Gisi, I. Chet và M. L. Gullino, chapt. 6, pp. 71-79. Springer-Amsterdam.). Nhiều vi khuẩn đối kháng *Streptomyces* và *Bacillus* đã được cố gắng để kiểm soát bệnh khô vằn lá lúa (Sung, K. C. và Chung, Y. R. 1997. Sự ngăn ngừa tăng cường của bệnh khô vằn lá lúa bằng cách sử dụng sự kết hợp vi khuẩn mà tạo ra chitinaza hoặc chất kháng sinh. Trong tiến trình hội thảo quốc tế lần thứ tư về tình trạng của sáng chế về vi khuẩn vùng rễ thúc đẩy sự tăng trưởng thực vật và các viễn cảnh tương lai, eds. Bởi A. Ogoshi, K. Kobayashi, Y. Homma, F. Kodama, N. Konodo và S. Akino, pp. 370-373. OECD, Paris.). Bệnh đạo ôn và

bệnh bạc lá lúa được ngăn ngừa hiệu quả bởi *Bacillus vallismortis* EXTN-1 và hai vi khuẩn đối kháng, cụ thể là, vi khuẩn gram âm mc75 và pc78 được ngăn ngừa hiệu quả (Choi, G. J., Kim, J. C., Park, E. J., Choi, Y. H., Jang, K. S., Lim, H. K., Cho, K. Y. và Lee, S. W. 2006. Sự kiểm soát sinh học hoạt tính của hai phân lập của vi khuẩn gram âm phòng bệnh khô vằn lá lúa. *Plant Pathol. J.* 22:289-294.; Park, K. S., Paul, D. và Yeh, W. H. 2006. Sự thúc đẩy tăng trưởng làm trung gian *Bacillus vallismortis* EXTN-1 và sự ngăn ngừa bệnh ở lúa. *Plant Pathol. J.* 22:278-282.). Bệnh nấm và thối hạt lúa cũng được ngăn ngừa bởi Bệnh lúa von, *F. fujikuroi*, và vi khuẩn đối kháng như *P. fluorescens* và *Bacillus cereus* (Kazempour, M. N. và Elahinia, S. A. 2007. Sự kiểm soát sinh học của *Fusarium fujikuroi*, tác nhân gây bệnh của bệnh nấm bởi vi khuẩn đối kháng được kết hợp với lúa. *Bulg. J. Agric. Sci.* 13:393-408.; Rosales, A. M. và Mew, T. W. 1997. Sự ngăn ngừa bệnh lúa von ở lúa bởi vi khuẩn đối kháng kết hợp với lúa. *Plant Dis.* 81:49-52.). Trong số vi khuẩn đối kháng khác nhau, loài *Bacillus* khác nhau được phát triển làm các gốc sinh học bán sẵn trên thị trường. Lý do của sự phát triển này là loài *Bacillus* có thể tạo ra các nội bào tử và được duy trì trong môi trường tự nhiên trong khoảng thời gian dài sau khi xử lý (Hu, X., Roberts, D. P., Maul, J. E., Emche, S. E., Liao, X., Guo, X., Liu, Y., McKenna, L. F., Buyer, J. S. và Liu, S. 2011. Các chế phẩm của *Bacillus* sống trong mô vi sinh *subtilis* Tu-100 ngăn ngừa *Sclerotinia sclerotiorum* trên bắp hạt có dầu và cải thiện sức sống của thực vật trong các thử nghiệm tại chỗ được thực hiện tại các vị trí khác nhau. *Can. J. Microbiol.* 57:539-546.).

Loài *Bacillus* được sử dụng rộng rãi với sự kiểm soát sinh học của nhiều bệnh thực vật ở các cây chủ khác nhau có thể bao gồm, ví dụ, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pasteurii*, *B. cereus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus mycoides* và *Bacillus sphaericus* (Kloepper, J. W., Ryu, C. M. and Zhang,

S. 2004. Sự kháng toàn thân được cảm ứng và sự thúc đẩy sự tăng trưởng của thực vật bởi *Bacillus* spp. *Phytopathology* 94:1259-1266.; McSpadden Gardener, B. 2010. Biocontrol của các tác nhân gây bệnh thực vật và sự thúc đẩy tăng trưởng thực vật bởi *Bacillus*. Trong sự phát triển gần đây trong việc quản lý bệnh thực vật, bệnh học thực vật trong thế kỷ 21. eds. bởi U. Gisi, I. Chet và M. L. Gullino, chapt. 6, pp. 71-79. Springer-Amsterdam.). Được chứng minh rằng *B. subtilis* GB03 và *B. amyloliquefaciens* IN937 có thể ngăn ngừa sự gây bệnh do vi khuẩn, cụ thể là, *Erwinia Carotovora* subsp. *Carotovora* in *Arabidopsis* (Ryu và các đồng tác giả, 2004). Ngoài ra, *B. cereus* AR156 và *B. subtilis* được chứng minh để cảm ứng tolerance và kiểm soát *Pseudomonas syringae* PV. *tomato* DC3000 trong *Arabidopsis* (Niu, D. D., Liu, H. X., Jiang, C. H., Wang, Y. P., Wang, Q. Y., Jin, H. L. và Guo, J. H. 2011. Rhizobacterium *Bacillus cereus* AR156 thúc đẩy sự tăng trưởng thực vật cảm ứng sự kháng toàn thân trong *Arabidopsis thaliana* cùng một lúc hoạt động đường dẫn tín hiệu phụ thuộc salicylat-và jasmonat/etylen. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 24:533-542.). Một số loài *Bacillus* này có các đặc điểm cụ thể theo khía cạnh về đặc tính trị nấm, đặc tính kháng vi khuẩn, sự thúc đẩy phát triển thực vật và tolerance bao gồm các hoạt tính (Park, K. S., Paul, D., Kim, J. S. và Park, J. W. 2009. Sự kháng toàn thân được cảm ứng vùng rễ làm tăng thêm L-alanin trong cây dưa chuột. *Folia Microbiol.* 54:322-326.; Ryu, C, M. 2013. Thúc đẩy bảo vệ thực vật bởi vi khuẩn kết hợp với rễ. *Plant Pathol. J.* 29:123-124.). Loài *Bacillus* khác nhau đã được phân lập từ thực vật và cây chịu mặn trong đất đa dạng, và một số vi khuẩn này thể hiện nội sinh (xem tài liệu không phải là sáng chế 7). Chi vi khuẩn hình que bao gồm 299 loại hiện nay, và nhiều hơn 30 loại đã được báo cáo trong khoảng 5 năm qua dựa trên sự nghiên cứu nhiều pha bao gồm trình tự gen 16S rARN, thử nghiệm lai giống ADN-ADN, mẫu axit béo, và thí nghiệm hóa

học vật lý (LPSN. 2015. *List of prokaryotic names with standing in nomenclature* . (<http://www.bacterio.net/bacillus.html>)).

Theo ví dụ thực hiện sáng chế, liên quan đến hai chủng YC7007 và YC7010 hình que khác nhau được phân lập từ rễ lúa, sự phát triển của chế phẩm thuốc trừ sâu sinh học có hoạt tính đa chức năng được thảo luận, và sự phân loại của chúng được đặc trưng theo cách tiếp cận nhiều pha. Ngoài ra, tính hiệu quả kiểm soát các chủng YC7007 và YC7010 đã được điều tra nghiên cứu thông qua không chỉ sự thúc đẩy sự tăng trưởng của lúa mà còn sự cảm ứng của tolerance phòng bạc lá lúa và tàn rụi.

Vật liệu và phương pháp

(1) Sự phân lập và nuôi cấy vi khuẩn sống trong mô

Từ rễ lúa được thu gom từ ruộng lúa trong nông trại của đại học quốc gia Gyeongsang (Jinju city, Korea), các chủng vi khuẩn sống trong mô được phân lập. Nhằm phân lập các chủng, đoạn mẫu được rửa bằng cách phun nước vài lần, được đưa vào khử trùng bề mặt bằng 70% etanol trong khoảng 5 phút, với 1,2% natri hypoclorit (NaOCl) trong khoảng 10 phút. Cuối cùng, mẫu được rửa bằng nước được khử trùng và được tinh chế vài lần. Để xác nhận sự khử trùng, đoạn được rửa được đặt trong 1/10 TSA (canh đậu nành thạch nồng độ một phần mười) tại nhiệt độ 28°C trong khoảng 3 ngày, và sau khi, vi khuẩn tăng trưởng được quan sát. Sau khi xác nhận không có sự tồn tại của vi khuẩn khuếch tán, đoạn mẫu được khử trùng lại bằng 70% etanol trong khoảng vài giây, nước được khử trùng với áp suất cao được cấp liệu vào máy khử trùng áp suất cao, và sau đó, nghiền bằng các phương tiện bất được khử trùng và cối giã (xem tài liệu không phải là sáng chế 7). Một phần chất lỏng chứa đoạn được nghiền được pha loãng bằng nước được khử trùng với áp suất cao 10 lần theo thứ tự, sau đó đặt một phần của nó (0,1 ml) trong môi trường 1/10 TSA được mang với xycloheximit và nuôi cấy chúng trên tấm tại nhiệt

độ 30°C trong khoảng 3 ngày. Khuẩn lạc vi khuẩn phát triển trong môi trường được chọn dựa trên dạng trong của khuẩn lạc. Chủng vi khuẩn được phân lập hoàn toàn được nuôi cấy cấp hai trong môi trường 1/10 TSA và được bảo quản tại nhiệt độ -70°C để sử dụng sau đó. Để tiến hành nuôi cấy chủng vi khuẩn, môi trường bao gồm 10 g proteaza pepton, 10 g của dịch chiết nấm men, 4g amoni clorua, 4g magiê sunfat, 10 g glucoza và 15g thạch mỗi lít nước được tinh chế được điều chế.

(2) Hoạt tính đối kháng tác nhân gây bệnh do vi khuẩn và nấm

Liên quan đến vi khuẩn sống trong mô, các thí nghiệm sử dụng tác nhân gây bệnh nấm thực vật chính như *Alternaria panax* KACC 42461, *F. fujikuroi* KACC 44022, *F. oxysporum* KCTC 16909, *Sclerotinia sclerotiorum* GSCC 50501, *Pythium ultimum* GSCC 50651, *Bipolaris oryzae* KACC 40853, *Botrytis cinerea* KCTC 6973, *Magnaporthe grisea* KACC 40415, *Botryosphaeria dothidea* GSCC 50201, và *Rhizoctonia solani* KCTC 40101 được thực hiện. Hoạt tính đối kháng của chủng vi khuẩn được đánh giá bằng cách đo vùng ức chế tăng trưởng sợi nấm của tác nhân gây bệnh nấm trong môi trường thạch dextroza của khoai tây (PDA) bằng cách sử dụng mẫu sống kiểm soát trong intro (xem tài liệu không phải là sáng chế 7). Lần lượt đối với thí nghiệm kháng vi khuẩn, *B. glumae* KACC10359 và *X. oryzae* PV. *Oryzae* KACC 10208 phát triển trong R2A (một nửa sức bền R2A) và môi trường YGC (10 g glucoza, 30 g CaCO₃, 5 g dịch chiết nấm men và 15 g thạch mỗi lít nước được tinh chế), thí nghiệm ức chế hoạt tính được thực hiện bằng phương pháp đĩa giấy khuếch tán. Phần lọc nuôi cấy của chủng vi khuẩn YC7007 được điều chế từ dung dịch nuôi cấy tại thời điểm nuôi cấy khác bằng cách lọc qua máy siêu lọc thông qua sự quay ly tâm (5,000 g, 10 phút) và máy lọc Millipore (0,2 µm).

(3) Thử nghiệm sự kháng cảm ứng đối với tác nhân gây bệnh do vi khuẩn

Để cảm ứng về sự kháng của loại YC7007 đối với bệnh bạc lá lúa và tàn rụi lần lượt do *X. oryzae* PV. *Oryzae* KACC 10208 và *B. glumae* KACC10359, việc đánh giá được thực hiện. Sau khi khử trùng bề mặt của hạt thóc *Oryza sativa* L. cultivar DongJin trong dung dịch 1,2% natri hyperchlorit lần lượt trong khoảng 10 phút và trong 70% etanol trong khoảng 5 phút, hạt thóc được khử trùng được rửa bằng nước được khử trùng và được tinh chế ba lần và được bảo quản trong phòng tối tại nhiệt độ 30°C trong khoảng 3 ngày để nảy mầm, và nước được thay mỗi ngày. Hạt nảy mầm được gieo trong đất ươm giống (Dasuran Sangto, Youngnong Sun Up, Korea), và sau đó, được đặt trong nhà kính để nuôi cấy. Sau đó, mầm thóc 2 tuần tuổi được cấy trong chậu dẻo ($9,5 \times 8 \times 7 \text{ cm}^3$) bao gồm 150 g đất mà được khử trùng dưới áp suất cao tại nhiệt độ 121°C trong khoảng 2 ngày với tỷ lệ là 20 phút mỗi ngày. Để điều chế huyền phù vi khuẩn YC7007, các tế bào vi khuẩn được nuôi cấy trong canh trường sinh khối lỏng (160 rpm, 28°C) trong khoảng 2 ngày, sau đó sự quay ly tâm (5,000 g, 10 phút), và sau đó, huyền phù được đưa vào và được điều chỉnh đến các nồng độ khác nhau ($5,6 \times 10^5$, $3,6 \times 10^6$, 2×10^7 CFU/ml) trong chất đệm (10 mM MgSO₄). Trong khi cấy thóc 2 tuần tuổi, huyền phù tế bào YC7007 (15 ml) được làm ướt trong chậu dẻo bao gồm đất được khử trùng với áp suất cao (150 g). YC7007 có nồng độ tối ưu (2×10^7 CFU/ml) được sử dụng cho sự kháng bổ sung bao gồm thử nghiệm đối với bệnh bạc lá lúa và tàn rụi. Phân lọc nuôi cấy của chủng YC7007 được điều chế từ dung dịch nuôi cấy 60h được pha loãng 10 lần ở 10 mM magiê sunfat được phun trên lá cây cho đến khi các giọt chất lỏng đã được tạo ra trên đó để điều tra nghiên cứu các tác dụng kiểm soát. Sau đó, 5 ngày sau khi xử lý YC7007, tác nhân gây bệnh do vi khuẩn được ghép. Chất đệm được sử dụng làm nhóm kiểm soát và tất cả các thí nghiệm được tiến hành bằng cách sử dụng 10 cây với ba lần lặp lại cho mỗi xử lý.

(4) Sự điều chế chất cấy đối với tác nhân gây bệnh do vi khuẩn

Như chất cấy của hai tác nhân gây bệnh do vi khuẩn, *B. glumae* KACC10359 và *X. oryzae* PV. *Oryzae* KACC 10208 được điều chế bằng cách lần lượt nuôi cấy các chất này trong môi trường R2A và YGC, trên trên máy rung quay (160 rpm, 28°C) và bằng cách sử dụng huyền phù tế bào. Dung dịch nuôi cấy *B. glumae* được đưa vào sự quay ly tâm (5,000 g, 10 phút) và huyền phù của các hạt tế bào trong chất đệm (10 mM MgSO₄) có nồng độ được điều chỉnh là 6×10^7 CFU/ml. Để ghép bản cách sử dụng huyền phù *B. glumae*, thử nghiệm sinh học, cụ thể là, thử nghiệm bằng kim châm được thực hiện. Bó 3 đến 4 đinh ghim/kim được cắm vào huyền phù và lá cây được chon ra bằng cách sử dụng kim trong bó. Sau khi ghép lúa 5 tuần tuổi với tác nhân gây bệnh, mức độ tấn công bệnh được đánh giá tại 5 ngày như sau. 0 = không có triệu chứng, 1 = nhiễm nhẹ nhưng rất ít tổn thương, 2 = hoàn toàn thương tổn agglutinin được nhuộm màu nâu, 3 = không có phần mô tả sẵn (Cottyn, B., Cerez, M. T., Van Outryve, M. F., Barroga, J., Swings, J. và Mew, T. W. 1996. Các bệnh do vi khuẩn của lúa. I. Vi khuẩn gây bệnh kết hợp với phức thời bẹ và sự tẩy màu hạt của lúa ở Philippines. Plant Dis. 80:429-437.). Đối với bệnh bạc lá lúa, huyền phù *X. oryzae* PV. *Oryzae* được điều chế theo cùng phương pháp như trường hợp của *B. glumae*., và có nồng độ được điều chỉnh là $1,2 \times 10^7$ CFU/ml. Thử nghiệm sinh học được thông qua bệnh bạc lá lúa là sinh thử nghiệm xén mà phương pháp cắt phía trên lá cây bằng cách sử dụng cặp kéo chứa huyền phù. Sau khi ghép 7 ngày, mức độ tấn công bệnh được đánh giá theo phương pháp từ điểm 1 đến 9 (Misra, J. K., Mew, T. W. và Merca, S. D. 1994. Field inspection. Theo cách thử nghiệm sức khỏe hạt giống lúa, eds. by T. W. Mew và J. K. Misra, pp. 52-55. International Rice Research Institute, Philippines.). Sự giảm bệnh (%) được tính theo phương trình 2 sau đây.

[Phương trình 2]

Sự giảm bệnh (%) = [(Mức độ tấn công bệnh của nhóm kiểm soát – mức độ tấn công bệnh của nhóm được xử lý)/(mức độ tấn công bệnh của nhóm kiểm soát)] x 100

(5) Xác định sự thúc đẩy tăng trưởng

Sự thúc đẩy tăng trưởng lúa bằng cách xử lý sử dụng huyền phù tế bào của chủng YC7007 (2×10^7 CFU/ml) được nghiên cứu trong khoảng thời gian nuôi cấy. Trong ống thử nghiệm (chiều dài 18 cm) chứa môi trường (môi trường 10 ml 1/2 MS có 0,8% thạch), huyền phù tế bào YC7007 (1 ml) được làm ướt vùng rễ của lúa 5 tuần tuổi. Sau khi xử lý vi khuẩn 7 ngày, mức độ tăng trưởng được ghi (vào ngày 12). Đối với đánh giá, lúa 2 tuần tuổi được cấy vào chậu dẻo bao gồm 150 g của đất được khử trùng với áp suất cao và huyền phù vi khuẩn 15 ml, sau đó làm ướt ở ngày 7 sau khi cấy. Sau khi xử lý vi khuẩn 9 ngày, mức độ tăng trưởng được ghi (vào ngày 30). Ngoài ra, sau khi làm ướt huyền phù vi khuẩn (15 ml) trong giai đoạn đâm chồi (vào ngày 30) và 40 ngày sau khi xử lý vi khuẩn từ giai đoạn đâm chồi, mức độ tăng trưởng được ghi tại giai đoạn trổ bông (vào ngày 70). Trong ống thử nghiệm và việc đánh giá, việc xử lý được thực hiện bằng cách sử dụng 10 cây với ba lần lặp lại đối với mỗi xử lý để tiến hành thí nghiệm về sự thúc đẩy tăng trưởng hoạt tính. Ở đây, chất đệm được sử dụng làm nhóm kiểm soát.

(6) Phân tích hệ thống dựa vào trình tự gen 16S rARN và sự lai giống ADN-ADN

Sử dụng các đoạn mồi (đoạn mồi tổng thể vi khuẩn 27F và 1492R), gen 16S rARN được khuếch đại từ hệ gen ADN được chiết bằng cách sử dụng bộ chiết có bán sẵn trên thị trường (Intron Biotech, Seoul, Korea). PCR được làm sạch được đưa vào trình tự (GenoTech Inc., Daejeon, Korea). Trình tự (Lane, D. J. 1991. 16S/23S rARN. In: Nucleic acid techniques in bacterial systematics, eds. bởi E. Stackebrandt và M. Goodfellow, pp. 115-175. Chichester: Wiley). Để nhận biết vị

trí hệ thống của vi khuẩn sống trong mô so với loại khác cùng giống, trình tự gen 16S rARN của chúng so với trình tự tồn tại thu được từ cơ sở dữ liệu (NCBI và máy chủ dữ liệu EzTaxon-e) (Kim, O. S., Cho, Y. J., Lee, K., Yoon, S. H., Kim, M., Na, H., Park, S. C., Jeon, Y. S., Lee, J. H., Yi, H., Won, S. và Chun, J. 2012. Đưa EzTaxon-e: Cơ sở dữ liệu trình tự gen prokaryotic 16S rRN với phylotypes mà loại được cây biểu diễn. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62:716-721.). Nhiều liên kết trình tự được thực hiện bằng cách sử dụng phần mềm CLUSTAL_X (Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. và cửa sổ giao diện Higgins, D. G. 1997. CLUSTAL_X: chiến lược linh hoạt đối với nhiều liên kết trình tự được hỗ trợ bằng các dụng cụ phân tích chất lượng. *Axit nucleic Res.* 25:4876-4882.), và sau đó, chỗ trống ở giữa được soạn thảo theo chương trình BioEdit (Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user friendly biological sequence aligned editor và analysis program for Windows 95/98/NT. *Axit nucleic Symp. Ser.* 41:95-98.). Để tạo ra cây phát sinh loài có trị số bầy khởi động thu được từ 1000 lần lặp lại, phương pháp liên kết vùng lân cận (phương pháp liên kết vùng lân cận; Saitou, N. và Nei, M. 1987. Phương pháp liên kết vùng lân cận: Phương pháp khôi phục cây phát sinh loài. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425.), maximum-parsimony (maximum-parsimony; Fitch, W. M. 1972. Hướng tới xác định quá trình tiến hóa: sự thay đổi nhỏ nhất đối với cấu trúc liên kết của cây cụ thể. *Syst. Biol.* 20:406-416.), thuật toán có thể đúng nhiều nhất trong phần mềm MEGA 5,10 (thuật toán có thể đúng nhiều nhất; Tamura, K., PetXerson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. và Kumar, S. 2011. MEGA5: phân tích sự di truyền học tiến hóa phân tử bằng cách sử dụng phương pháp hợp lý cực đại, khoảng cách tiến triển, và hà tiện tối đa. *Mol. Biol. Evol.* 28:2731-2739.), v.v.. được sử dụng (Felsenstein, J. 1985. Các giới hạn tin cậy về sự phát sinh loài: sự tiếp cận bằng cách sử dụng bầy khởi động. *Evolution* 39:783-791.). Để xác định trị số tương đồng ADN-ADN giữa các chủng ADN-ADN, sự lai

giống ADN-ADN bằng cách sử dụng kit (gắn nhãn DIG ADN và bộ dò, Roche Applied Science) được thực hiện theo sự hướng dẫn của nhà sản xuất cũng như các phương pháp được mô tả nêu trên (Lee, S. H., Shim, J. K., Kim, J. M., Choi, H. K. và Jeon, C. O. 2011. *Henriciella litoralis* sp. nov., được phân lập từ vùng bãi lộ do triều, sự nhượng của *Maribaculum marinum* Lai và các đồng tác giả đến genus *Henriciella* as *Henriciella aquimarina* nom. nov. và phân mô tả được sửa của genus *Henriciella*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 61:722-727.).

(7) Các đặc trưng phân loại hình thái, biểu hiện và phân loại

Hình thái học của các tế bào được quan sát bằng kính hiển vi quang học (Nikon, $\times 1000$), và sự tồn tại của roi được quan sát bằng kính hiển vi điện tử truyền qua (Hitachi, model H-600) bằng cách sử dụng dung dịch nuôi cấy tế bào được tăng trưởng trong môi trường R2A tại nhiệt độ 28°C trong khoảng 24 giờ. Bằng cách sử dụng kit (bioMerieux Gram stain kit), phản ứng gram được nghiên cứu theo sự hướng dẫn của nhà sản xuất. Thí nghiệm thủy phân của chủng được thực hiện bằng cách sử dụng casein, esculin, gelatin, tinh bột, L-tyrosin, ure, Tween 20 và Tween 80 theo giao thức tiêu chuẩn (Smibert, R. M. và Krieg, N. R. 1994. Phenotypic characterization. In: : Methods for general and molecular bacteriology, eds. by P. Gerhardt, R. G. E. Murray, W. A. Wood và N. R. Krieg, pp. 607-654. American Society for Microbiology, Washington, DC.; Reichenbach, H. 1992. The order Cytophagales. In: The Prokaryotes, eds. by A. Balows, H. G. Truper, M. Dworkin, W. Harder và K. H. Schleifer, 2nd ed., vol. 4, pp. 3631-3675. Springer, New York.). Liên quan đến hoạt tính enzym, sự sản xuất axit từ carbohydrat khác nhau, sự hấp thụ các chủng khác nhau và tăng trưởng trong carbohydrat, việc điều tra nghiên cứu được thực hiện bằng cách sử dụng hệ bán sẵn trên thị trường (lần lượt kit API ZYM, API 20E, API 20NE và API 50CH) tại nhiệt độ 28°C theo sự hướng dẫn của nhà sản xuất (BioMerieux). Ngoài ra, liên quan đến sự tăng trưởng

ở nhiệt độ và trị số nồng độ pH khác nhau (nồng độ pH từ 4,0 đến 14,0 tại khoảng là 0,5 pH đơn vị), việc điều tra nghiên cứu được thực hiện sau khi nuôi cấy trong dung dịch nuôi cấy R2A bằng cách sử dụng các chất đệm mong muốn trong khoảng 5 ngày (Xu, P., Li, W. J., Tang, S. K., Zhang, Y. Q., Chen, G. Z., Chen, H. H., Xu, L. H. và Jiang, C. 2005. *Naxibacter alkalitolerans* gen. nov., sp. nov., thành phần của họ 'Oxalobacteraceae' được phân lập từ China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55:1149-1153.). Ngoài ra, sau khi nuôi cấy tại nhiệt độ 28°C trong khoảng 5 ngày, sự kháng muối được đánh giá bằng cách sử dụng dung dịch nuôi cấy R2A được bổ sung từ 1 đến 14% natri clorua (w/v, ở khoảng 1%). Thí nghiệm sự nhạy kháng sinh nhân đôi được thực hiện bằng cách sử dụng nhiều chất kháng sinh (10 µg ampicillin, 30 µg chloramphenicol, 10 µg penicillin, 10 µg gentamycin, 3 µg kanamycin, 30 µg vancomycin, 30 µg streptomycin và 30 µg tetracyclin) theo phương pháp khuếch tán đĩa (thử nghiệm khuếch tán đĩa bằng giấy lọc) (Yasir, M., Aslam, Z., Song, G. C., Jeon, C. O. và Chung, Y. R. 2010. *Sphingosinicella vermicomposti* sp. nov., được phân lập từ vermicompost, và phần mô tả được sửa của genus *Sphingosinicella*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60:580-584.). Sự chuẩn bị vách tế bào và phân tích peptidoglycan được thực hiện theo phương pháp Schleifer biến đổi, trong đó TLC được tiến hành bằng cách sử dụng tấm xenluloza thay vào đó là phép sắc ký giấy (Schleifer, K. H. 1985. Phân tích chế phẩm hóa học và cấu trúc cơ bản của murein. *Methods Microbiol.* 18:123-156.). Để phân tích axit béo tế bào, chủng vi khuẩn được nuôi cấy trong dung dịch nuôi cấy R2A tại nhiệt độ 28°C và các tế bào vi sinh vật được thực hiện trong pha tăng trưởng giữa hàm số mũ ($OD_{600} = 0,4-0,5$). Phân tích các este của axit béo methyl được thực hiện theo sự hướng dẫn của hệ đồng nhất hóa vi khuẩn (MIDI; Microbial ID, Inc.). Phân chiết được phân tích thông qua GC (Agilent 6890), và mẫu axit béo được so sánh và được nhận biết bằng cách sử dụng cơ sở dữ liệu TSBA 40e được tạo ra bởi phần

mềm Sherlock (ver. 4,0). Các axit amino của toàn bộ chất thủy phân tế bào của chủng vi khuẩn được chiết và được phân tích bằng phương pháp Stanek và Roberts (Stanek, J. L. và Roberts, G. D. 1974. Sự tiếp cận được đơn giản hóa đối với sự đồng nhất hóa của khuẩn tia ura khí bằng phép sắc ký lớp mỏng. *Appl. Microbiol.* 28:226-231.). Isoprenoid quinines được chiết và được phân tích thông qua pha đảo ngược HPLC theo phương pháp của Komagata và Suzuki (Komagata, K. và Suzuki, K. 1987. Lipit và sự phân tích vách tế bào trong hệ thống vi khuẩn. *Methods Microbiol.* 19:161-207.). Để đo hàm lượng G + C của nhiễm sắc thể ADN, ADN hệ gen của chủng YC7010 được chiết và được làm sạch bằng phương pháp của Ausubel và các đồng tác giả (Ausubel, F. W., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. và Struhl, K. 1995. *Current Protocols in Molecular Biology*, New York: Wiley.), sau đó đo nucleosit được phân hủy bằng enzym và hàm lượng G + C thông qua cột C18 của pha đảo ngược (Mesbah, M., Premachandran, U. và Whitman, W. B. 1989. Phép đo chính xác về hàm lượng G + C của deoxyriboaxit nucleic bằng phép sắc ký lỏng với năng suất cao. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39:159-167.). Theo phương pháp được biến đổi về Minnikin và các đồng tác giả (1984), lipit có cực được chiết và được phân lập thông qua TLC bằng cách sử dụng Merck Kieselgel 60-HPTLC. Ngoài ra, sau khi phun dung dịch ninhydrin (0,2% (w/v) dung dịch ninhydrin trong butanol được bão hòa với nước) trên tấm, tấm được làm nóng tại nhiệt độ 105°C trong khoảng 10 phút để phát hiện amino-lipit (Ross, H. N. M., Grant, W. D. và Harris, J. E. 1985. Các Lipit trong sự phân loại giới vi khuẩn cổ. In: *Chemical Methods in Bacterial Systematics* eds. by M. Goodfellow và D. E. Minnikin, pp. 289-300. Academic Press, London.). Ngoài ra, phospholipit được phát hiện bằng cách phun chất phản ứng Zinzadze của Dittmer và Lester (Dittmer, J. C. và Lester, R. L. 1964. Sự phun cụ thể đơn giản để phát hiện các phospholipit trên sắc ký lớp mỏng. *J. Lipit Res.* 15:126-127) trên tấm.

Ngoài ra, glycolipit được phát hiện bằng cách làm nóng chúng bằng cách sử dụng chất phản ứng phun 1-naphthol trong khoảng 3 đến 5 phút (Jacin, H. và Mishkin, A. R. 1965. Sự ngăn carbohydrat trên borat được nhúng tấm gel silica G plates. J. Chromatogr. 18:170-173.). Sự phát hiện phosphatidyl cholin được tiến hành bằng cách sử dụng Dragendorff reagent (Sigma-Aldrich; St. Louis, Mo). Ngoài ra, toàn bộ mẫu lipid được phát hiện bằng cách, sau khi phun dung dịch axit phosphomolybdic (Sigma-Aldrich; St. Louis, Mo), làm nóng tấm tại nhiệt độ 150°C trong khoảng 10 phút.

(8) Phân tích thống kê

Trong trường hợp phân tích trong intro, phân tích được bố trí sự phân bố với thành phần duy nhất ngẫu nhiên hoàn thành được sử dụng để phân tích dữ liệu, trong khi phân tích bố trí chặn ngẫu nhiên hoàn thành được sử dụng trong trường hợp phân tích trong vivo. Ngoài ra, độ lệch trung bình được so sánh theo phương pháp của Duncan (thử nghiệm đa đoạn của Duncan (DMRT)). Trong tất cả các phân tích này, phần mềm SPSS (ver. 17; SPSS Inc. in Chicago) được sử dụng.

Kết quả thí nghiệm

(1) Hoạt tính đối kháng của chủng được phân lập

Được chứng minh rằng, trong số 250 chủng vi khuẩn được phân lập từ rễ cây lúa, 15 vi khuẩn sống trong mô thể hiện hoạt tính ức chế đối với sợi nấm tăng trưởng của *F. fujikuroi* nằm trong khoảng từ 2 đến 20 mm hoặc lớn hơn. Dựa trên trình tự gen 16S rARN, được xác nhận rằng vi khuẩn này được kết hợp với *PaeniBacillus polymyxa*, *Bacillus siamensis*, *PaeniBacillus jamilae*, *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus thuringiensis*, *B. cereus*, *Bacillus simplex* and *Bacillus daliensis*. Các vi khuẩn được phân lập này được nhận biết qua thí nghiệm và thuộc về loại cùng giống bởi vì sự giống nhau của chúng nằm trong khoảng từ 99,27 đến 100%. Cụ thể là, trong số vi khuẩn được phân lập, hai chủng, cụ thể là, YC7007 và

YC7010 có tính giống nhau cao nhất đối với *B. siamensis*, do đó thể hiện hoạt tính đối kháng mạnh to *F. fujikuroi* (> 20 mm vùng ức chế) (xem bảng 11 dưới đây). Ngoài ra, YC7007 được thể hiện hoạt tính đối kháng mạnh đối với tác nhân gây bệnh lúa khác nhau, cụ thể là, *B. oryzae*, *M. grisea*, *F. fukikuroi* và tác nhân gây bệnh thực vật nghiêm trọng khác cũng nằm trong khoảng từ 10 đến 29 mm vùng ức chế trên PDA (xem bảng 12 dưới đây). Ngoài ra, phần lọc nuôi cấy của chủng YC7007 được điều chế ở thời gian nuôi cấy khác nhau cũng được thể hiện khả năng ức chế tăng trưởng thuận lợi đối với không chỉ *F. fujikuroi* mà còn *B. glumae* và *X. oryzae* PV. *Oryzae*, mà hai tác nhân gây bệnh do vi khuẩn xuất phát từ hạt chính (xem FIG. 8). Phần lọc nuôi cấy của dung dịch nuôi cấy 60 giờ tuổi được thể hiện hoạt tính mạnh nhất đối với *F. fujikuroi*, *X. oryzae* PV. *Oryzae* và *B. glumae* trong môi trường tương ứng, lần lượt trong khoảng 30 mm, 24 mm và 19,7 mm vùng ức chế.

[Bảng 11]

Gốc	Chủng liên quan chặt chẽ	%	Sự ức chế ^b
			<i>Fusarium fujikuroi</i>
YC7005	<i>Paenibacillus polymyxa</i> (AFOX01000032)	99.77	+
YC7006	<i>Paenibacillus polymyxa</i> (AFOX01000032)	99.77	+
YC7007	<i>Bacillus siamensis</i> (AJVF01000043)	99.67	++++
YC7008	<i>Paenibacillus polymyxa</i> (AFOX01000032)	99.27	+
YC7009	<i>Paenibacillus jamilae</i> (AJ271157)	100	+
YC7010 ^a	<i>Bacillus siamensis</i> (AJVF01000043)	99.67	+++
YC7012	<i>Bacillus siamensis</i> (AJVF01000043)	99.60	++
YC7013	<i>Bacillus methylotrophicus</i> (EU194897)	99.37	++
YC7014	<i>Bacillus methylotrophicus</i> (EU194897)	99.62	++
YC7015	<i>Bacillus methylotrophicus</i> (EU194897)	99.68	++
YC7016	<i>Bacillus methylotrophicus</i> (EU194897)	99.64	++
YC7022	<i>Bacillus thuringiensis</i> (ACNF010000156)	99.87	++
YC7023	<i>Bacillus cereus</i> (AE016877)	100	++
YC7025	<i>Bacillus simplex</i> (AB363738)	98.88	++
YC7027	<i>Bacillus daliensis</i> (ACNF010000156)	100	++

^a Dựa trên sự phân tích một phần của trình tự gen 16S rARN.

^b Sự tăng trưởng bề mặt của tác nhân gây bệnh của vi khuẩn đối kháng được xác định làm vùng ức chế

trên PDA. +: 2-10, ++: 10-15, +++: 15-20, và ++++: > 20 mm.

[Bảng 12]

Tác nhân gây bệnh thực vật	Vùng ức chế ^a (mm)
<i>Fusarium fujikuroi</i> KACC 44022	28.0 ± 0.6
<i>Magnaporthe grisea</i> KACC 40415	29.0 ± 0.6
<i>Bipolaris oryzae</i> KACC 40853	27.6 ± 0.3
<i>Rhizoctonia solani</i> KCTC 40101	23.6 ± 0.3
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> GSCC 50501	28.0 ± 0.6
<i>Botrytis cinerea</i> KCTC 6973	27.3 ± 0.3
<i>Fusarium oxysporum</i> KCTC 16909	25.0 ± 0.6
<i>Botryosphaeria dothidea</i> GSCC 50201	24.6 ± 0.3
<i>Pythium ultimum</i> GSCC 50651	28.3 ± 0.3
<i>Alternaria panax</i> KACC 42461	10.0 ± 0.6

(2) Sự cảm ứng của sự kháng mắc phải toàn thân đối với bệnh tàn rụi và bạc lá lúa

Liên quan đến chủng YC7007, sự kháng mắc phải toàn thân đối với bệnh bạc lá lúa và tàn rụi được nghiên cứu. Do đó sự làm ướt chủng YC7007 ở nồng độ khác nhau ($5,6 \times 10^5$, $3,6 \times 10^6$ và 2×10^7 CFU/ml) trong đất, được phát hiện ra rằng, so với nhóm kiểm soát có mức độ tấn công bệnh thối lá (2,5), chủng nêu trên có thể lần lượt giảm đáng kể mức độ tấn công bệnh đến 1,4, 0,9 và 0,8, ($p < 0,05$)

(xem FIG. 9). Tuy nhiên, không khác biệt đáng kể ở nồng độ giữa 10^6 và 10^7 . Khi sự làm ướt chủng YC7007 ở nồng độ là 2×10^7 CFU/ml trong đất rhizospheric, có thể thấy rằng tác dụng lần lượt ngăn ngừa bệnh tàn rụi và bạc lá lúa là 65,2% và 61,2%, do đó là ưu việt. Ngoài ra, trong trường hợp phun lá phân lọc nuôi cấy, có thể thấy rằng mức độ tấn công bệnh tàn rụi và bạc lá lúa lần lượt được giảm đáng kể khoảng 70,8% và 70,5%, so với nhóm kiểm soát (xem bảng 13 dưới đây). Do đó, có thể thấy rằng chủng YC7007 được giảm đáng kể mức độ tấn công bệnh tàn rụi và bạc lá lúa ($p < 0,01$), so với nhóm kiểm soát.

[Bảng 13]

Xử lý [†]	Tính nghiêm trọng của bệnh		%Giảm bệnh	
	<i>B. glumae</i>	<i>X. oryzae</i> pv.	<i>B. glumae</i>	<i>X. oryzae</i> pv.
	Tác nhân gây bệnh [‡]			
	<i>oryzae</i>	<i>oryzae</i>		
Kiểm soát	2.50 ± 0.08 a	5.67 ± 0.13 a	.	.
YC7007(huỳnh phù)	0.87 ± 0.12 b	2.20 ± 0.23 b	65.2	61.2
YC7007(phân lọc canh trường)	0.73 ± 0.07 b	1.67 ± 0.13 bc	70.8	70.5

Ký hiệu khác nhau xác định trị số mà chênh lệch đáng kể ($P < 0.01$) bởi thử nghiệm nhiều khoảng của Duncan.

Nghĩa ± SE; lỗi tiêu chuẩn được tính bằng cách sử dụng 10 thực vật với 3 lần lặp lại đối với mỗi xử lý

(3) Sự thúc đẩy tăng trưởng bởi YC7007

So với nhóm kiểm soát, chủng YC7007 được thể hiện thường có hoạt tính thúc đẩy sự tăng trưởng cao ($p < 0,05$) trong các giai đoạn thí nghiệm bao gồm cây

giống, đâm chồi và giai đoạn trổ bông của lúa. Trong giai đoạn cây giống, chiều dài của mầm trong ống thử nghiệm được tăng từ 11,67 cm đến 19,33 cm bằng cách xử lý rễ cây lúa bằng cách sử dụng huyền phù vi khuẩn (2×10^7 CFU/ml). Tương tự, chiều dài của mầm lần lượt được tăng từ 36,45 cm đến 46,33 cm trong giai đoạn đâm chồi trong khi tăng từ 55,33 cm đến 61,0 cm trong giai đoạn trổ bông. Ngoài ra, chiều dài của rễ chính được tăng từ 2,67 cm đến 7,67 cm trong giai đoạn cây giống, trong khi số lượng chồi lần lượt được tăng từ 1,9 đến 2,9 và từ 5,3 đến 7,0, trong giai đoạn đâm chồi và giai đoạn trổ bông (xem bảng 14 dưới đây).

[Bảng 14]

Xử lý	Hoạt động thúc đẩy tăng trưởng					
	Giai đoạn cây giống ¹		Giai đoạn đâm chồi ¹		Giai đoạn trổ bông ¹	
	Chiều dài chồi (cm)	Chiều dài rễ (cm)	Chiều dài chồi (cm)	Chồi số	Chiều dài chồi (cm)	Chồi số
Kiểm soát	11.67 ± 0.33 b	2.67 ± 0.33 b	36.45 ± 1.18 b	1.89 ± 0.22 b	55.33 ± 0.33 b	5.33 ± 0.67 b
YC7007	19.33 ± 0.33 a	7.67 ± 0.33 a	46.33 ± 2.0 a	2.89 ± 0.11 a	61.0 ± 2.00 a	7.00 ± 0.58 a

Các ký hiệu khác nhau xác định sự chênh lệch đáng kể thống kê giữa các xử lý bởi thử nghiệm t

Số trung bình ± SE, lỗi tiêu chuẩn được tính bằng cách sử dụng 10 thực vật với ba lần lặp lại đối với mỗi xử lý.

(4) Sự đồng nhất hóa của vi khuẩn đối kháng YC7007 và YC7010

Hai vi khuẩn sống trong mô YC7007 và YC7010 có hoạt tính mạnh nhất đối kháng trong số 15 vi khuẩn đối kháng được đưa vào sự đồng nhất hóa thông qua sự tiếp cận nhiều pha. Hai chủng này có trình tự gen 16S rARN lần lượt kéo dài liên tục bằng 1,513 bp, trong đó chủng này được sắp xếp ở cùng dạng ngoại trừ đối với hai nucleotit (số lượng thêm vào cơ sở dữ liệu KP203893 (YC7007) và KP201498 (YC7010^T) trong GenBank/EMBL/DDBJ) (xem FIG. 1). Bằng cách phân tích trình tự gen 16S rARN, được chứng minh rằng cả hai chủng này đều có mặt trong nhánh gai nổi có cùng chiều dài nhánh trong cây phát sinh loài, và được thể hiện tính giống nhau cao nhất đối với *B. siamensis* KACC 15859^T (99,67%), *B. metylotrophicus* KACC 13105^T (99,65%), *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* KACC 17177^T (99,60%) và *B. tequilensis* KACC 15944^T (99,45%) (xem bảng 11 nêu trên và FIG. 2). Trị số tương đồng ADN-ADN giữa chủng YC7010 và chủng cùng giống tương tự nhất, cụ thể là, *B. siamensis* KACC 15859^T, was 50,4±3,5. Tuy nhiên, trị số tương đồng ADN-ADN giữa YC7007 và YC7010 là 91,5±11,0% (xem bảng 2 nêu trên). Hai chủng nêu trên là gam dương, có tính chuyển động với dạng thanh và thể hiện sự tăng trưởng được ưu tiên tại nhiệt độ nằm trong khoảng từ 13 đến 60°C (thích hợp nhất là từ 28 đến 30°C) và nồng độ từ pH 4 đến 12 (thích hợp nhất là nồng độ pH 7). Các chủng này có thể được phát triển trong môi trường 0,1 TSA chứa từ 1 đến 13% (w/v) natri clorua, tuy nhiên, không cần thiết yêu cầu natri clorua dùng cho sự tăng trưởng. Các chủng có sự kháng đối với cloramphenicol tại nồng độ là 30 µg/ml. Ngoài ra, chủng được bao gồm axit meso-diaminopimelic làm axit đối kháng diamino trong peptidoglycan của vách tế bào, và MK-7 làm hệ quinon hô hấp chính. Các đặc tính sinh lý học và hóa sinh khác của chủng YC7007 và YC7010 được thể hiện trong bảng 1 nêu trên. Có thể lần lượt thấy rằng các axit béo chính của chủng YC7007 và YC7010s, là anteiso-C_{15:0} (38,4 và 32,0%) và iso C_{15:0} (28,1 và 27,7%). Mẫu axit béo của tế bào khác YC7010 được bao gồm

C_{16:0} (7,7%), iso C_{17:0} (6,4%), anteiso-C_{17:0} (5,3%), iso C_{16:0} (5,2%), C_{18:0} (5,1%), C_{16:1} ω7c alcohol (3,4%), iso C_{14:0} (2,9%), iso-C_{17:1} ω10c (1,7%), C_{16:1} ω11c (1,4%), C_{14:0} (1,1%) và C_{20:1} ω7c (0,2%) (xem bảng 3 nêu trên). Hàm lượng G + C của hệ gen ADN trong chủng YC7007 và YC7010s lần lượt là 50,5 mol% và 51,2 mol%. Các chủng được thể hiện lipid cụ thể có cực mẫu bao gồm phosphatidyletanolamin (PE), phosphatidylglycerol (PG), diphosphatidylglycerol (DPG), glycolipit (GL) chưa biết và aminolipids (AL1-2) chưa biết. Do đó sự phân tích trình tự gen 16S rARN, trị số tương đồng ADN-ADN, chế phẩm của axit béo, và các đặc tính hóa sinh và sinh lý học, chủng YC7007 và YC7010s được nhận biết làm loài *Bacillus* genus, do đó được đề xuất làm *Bacillus oryzicola* sp. nov.

(5) Phần mô tả về *Bacillus oryzicola* YC7010^T sp. nov.

Tế bào là gam dương có dạng thanh (0,8-0,9 × 2,0-3,0 μm). Sự phát triển của khuẩn lạc trong môi trường thạch R2A tại nhiệt độ 28°C trong khoảng 2 ngày có màu trắng kem và ở dạng cột cao tròn và phẳng với toàn bộ biên. Tế bào là roi có cực đơn có tính chuyển động. Vách tế bào là axit diamino đối kháng và chứa axit meso-diaminopimelic. Thông thường, tế bào được biểu hiện là catalaza-dương và oxidaza-âm một mình hoặc theo cặp, và sự tăng phát triển ở nhiệt độ từ 13 đến 60°C và nồng độ pH từ 4 đến 12,0. Tế bào là dương đối với sự thủy phân casein và gelatin nhưng âm đối với tinh bột, Tween 20, Tween 80, tyrosin và carboxymethyl xenluloza. Ngoài ra, tế bào dùng D-glucosa, D-fructosa, D-mannoza, D-mannitol, methyl-α-D-glucopyranosit, N-axetyl-glucosamin, amygdalin, arbutin, esculin ferric xitrat, salixin, D-celiobioza, D-maltoza, D-lactoza, D-saccharoza, D-trehalose, D-raffinoza, tinh bột, glycogen, gentiobioza, trinatri, xitrat và delatin của Kohn. Ngoài ra, kết quả kit API ZYM, tế bào thể hiện hoạt tính enzymatical của esteraza (C4), esteraza lipase (C8), naphthol-AS-BI-phosphohydrolaza và N-axetyl-β-glucosaminidaza, tuy nhiên, không thể hiện hoạt tính đối với lipaza (C-14), leuxin

arylamidaza, valine arylamidaza, xystin arylamidaza, trypsin, α -chymotrypsin, α -galactosidaza, β -galactosidaza, β -glucosidaza, α -mannosidaza và α -fucosidaza. Ngoài ra, tế bào có sự kháng đối với cloramphenicol và streptomycin tại nồng độ là 30 $\mu\text{g/ml}$, tuy nhiên, có thể chấp nhận ampicillin, penicillin và gentamycin tại nồng độ là 10 $\mu\text{g/ml}$ và kanamycin, vancomycin và tetracyclin tại nồng độ là 30 $\mu\text{g/ml}$. Sự tăng trưởng của tế bào có thể được quan sát trong dung dịch nuôi cấy R2A chứa 13% (w/v) natri clorua, tuy nhiên, không trong cùng dung dịch nuôi cấy chứa 14% (w/v) natri clorua. Quinon chính là MK-7. Lipit có cực có thể bao gồm phosphatidyletanolamin (PE), phosphatidylglycerol (PG), diphosphatidylglycerol (DPG), glycolipit (GL) chưa biết và aminolipit (AL1-2) chưa biết. Hàm lượng ADN G + C của chủng mẫu là 51,2 mol%. Chủng mẫu YC7010^T (= KACC18228^T) được phân lập từ rễ lúa (Jinju, Hàn Quốc).

Như được mô tả nêu trên, ví dụ thực hiện theo sáng chế được chứng minh rằng, trong số các chủng sống trong mô khác nhau được phân lập từ rễ lúa, 6% giống *Bacillus* đối kháng và có thể ức chế sự tăng trưởng của sợi nấm của tác nhân gây bệnh thực vật. Theo nghiên cứu trước, được báo cáo khoảng 9% giống *Bacillus* và vi khuẩn gram âm khác chứa vi khuẩn sống trong mô được phân lập từ thực vật sống trong bãi đất lầy đối kháng đối với oomycetous phytopathogens (xem tài liệu không phải là sáng chế 7). Theo trình tự gen 16S rARN, một số chủng của sáng chế thuộc giống *Bacillus* được chứng minh có hoạt tính đối kháng đối với chủ yếu tác nhân gây bệnh do vi khuẩn và nấm của lúa thử nghiệm trong vitro và vivo. Trong số đó chủng được phân lập, chủng YC7007 và YC7010 có tính giống nhau cao nhất đối với *B. siamensis* được thể hiện hoạt tính đối kháng mạnh để ức chế sự tăng trưởng của sợi nấm *F. fujikuroi*, mà tác nhân gây bệnh nấm và tác nhân xuất phát từ hạt lúa đáng kể nhất. Ngoài ra, sự lọc nuôi cấy YC7007 cũng có hoạt tính ức chế mạnh đối với bệnh nấm, bệnh bạc lá lúa và thối hạt của lúa, và do đó, có thể

được công nhận làm chủng tạo ra vật liệu kháng nấm. Một số trong giống *Bacillus* có thể tạo ra lượng peptit và lipopeptit nhỏ như fengycin, iturin và surfactin, và đã được báo cáo để thể hiện tính hiệu quả ức chế tốt đối với tác nhân gây bệnh thực vật (Bais, H. P., Fall, R. và Vivanco, J. M. 2004. Sự kiểm soát của *Bacillus subtilis* chống lại sự nhiễm trùng của rễ *Arabidopsis* bằng *Pseudomonas syringae* được làm dễ dàng bởi sự hình thành màng sinh học và sự tạo ra surfactin. Plant Physiol. 134:307-319; Crane, J. M., Gibson, D. M., Vaughan, R. H. và Bergstrom, G. C. 2013. Các mức độ Iturin trên gai của cây lúa mì được kết hợp với sự kiểm soát sinh học của Fusarium head blight by *Bacillus amyloliquefaciens*. Phytopathology 103:146-155.; Dimkic, I., Zivkovic, S., Beric, T., Ivanovic, Z., Gavrilovic, V., Stankovic, S. and Fira, D. 2013. Sự đặc trưng và sự đánh giá về hai chủng *Bacillus*, SS-12,6 và SS-13,1, làm các chất tiềm tàng để kiểm soát nấm và vi khuẩn gây bệnh thực vật. Biol. Control 65:312-321.). Được phát hiện từ việc đánh giá rằng sự tấn công bệnh tàn rụi và bạc lá lúa có thể được ức chế bằng cách làm ướt huyền phù tế bào của chủng YC7007, và kết quả này có thể có nghĩa là sự cảm ứng của sự kháng toàn thân. Mức độ tấn công bệnh tàn rụi được giảm bằng cách xử lý sử dụng chủng YC 7007 tại nồng độ là 10^5 (CFU/ml), và tại nồng độ cao hơn từ 10^6 đến 10^7 CFU/ml, sự tấn công bệnh được ức chế bằng 62% hoặc lớn hơn. Ngoài ra, phần lọc nuôi cấy YC7007 được giảm 70% hoặc lớn hơn của sự tấn công bệnh tàn rụi và bạc lá lúa, so với nhóm kiểm soát. Cũng được phát hiện rằng việc xử lý bằng cách sử dụng huyền phù tế bào *B. subtilis* ($2,5 \times 10^8$ CFU/ml) và *B. cereus* AR156 (5×10^8 CFU/ml) có thể lần lượt kiểm soát bệnh tạo vết đốm của rễ và lá cây *Arabidopsis*, (Bais và các đồng tác giả, 2004; Niu, D. D., Liu, H. X., Jiang, C. H., Wang, Y. P., Wang, Q. Y., Jin, H. L. và Guo, J. H. 2011. Rhizobacterium *Bacillus cereus* AR156 thúc đẩy sự tăng trưởng thực vật cảm ứng sự kháng toàn thân trong *Arabidopsis thaliana* cùng một lúc hoạt động cách tín

hiệu phụ thuộc salicylat-và jasmonat/etylen. Mol. Plant-Microbe Interact. 24:533-542.). Do nồng độ vi khuẩn của *B. subtilis* và *B. cereus* AR156 là 10^8 CFU/ml, mà 100 lần cao hơn YC7007 (10^6 CFU/ml), không thực hiện sử dụng thực tế các vi khuẩn này bằng nhà nông trại nông nghiệp. Để phát triển vi khuẩn đối kháng làm thuốc diệt sinh vật hại sinh học, nồng độ tối ưu có thể là ở mức 10^7 CFU/ml hoặc nhỏ hơn, khi xem xét hệ số pha loãng để sử dụng cuối cùng bởi người sử dụng (Chen, X. H., Scholz, R., Borriss, M., Junge, H., Mogel, G., Kunz, S. and Borriss, R. 2009. Difficidin and bacilysin được sản xuất bởi hiệu quả *Bacillus amyloliquefaciens* được kết hợp thực vật trong việc kiểm soát bệnh làm thối lè, táo. J. Biotechnol. 140:38-44). Bằng cách làm ướt huyền phù vi khuẩn có hoạt tính đối kháng đối với tác nhân gây bệnh vào rễ và lá lúa phun phân lọc nuôi cấy, chủng YC7007 có thể tương tác trực tiếp và/hoặc gián tiếp giữa tác nhân gây bệnh. Bệnh tàn rụi và bạc lá lúa có thể được ngăn ngừa bằng cách xử lý làm ướt hoặc phun lá, và được cho rằng ngăn ngừa có thể thu được từ chủng YC7007 hoạt động thông qua sự kháng toàn thân được cảm ứng (ISR) hoặc sự kháng mắc phải toàn thân (SAR), do đó ức chế bệnh (Ahn, I. P., Lee, S. W. và Suh, S. C. 2007. Sự miễn nước được cảm ứng vùng rễ trong *Arabidopsis* phụ thuộc vào etylen, axit jasmonic, và NPR1. Mol. Plant-Microbe Tương tác. 20:759-768.; Niu và các đồng tác giả, 2011). Cơ chế phản ứng cần phải xác định theo khía cạnh của tín hiệu hormone thông qua đường salicylic, jasmonic hoặc etylen đến SAR hoặc ISR.

Các loài *Bacillus* có khả năng duy trì trong khoảng thời gian dài ngay cả trong môi trường không thuận lợi, do đó được thương mại hóa làm thuốc diệt sinh vật hại sinh học. Một số loại có thể gây ra sự kháng mắc phải toàn thân, và do đó, chức năng hiện nay trong các thực vật khác nhau (Hu và các đồng tác giả, 2011; Kloepper và các đồng tác giả, 2004). *B. vallismortis* EXTN-1 và *B. cereus* đã được sử dụng để ngăn ngừa bệnh đạo ôn, bệnh khô vằn lá lúa và bệnh nấm (Kazempour

và Elahinia, 2007; Park và các đồng tác giả, 2006). Được cho là sự phát hiện chủng *Bacillus* YC7007 như vậy có hoạt tính duy trì lâu dài đối với chủ yếu các bệnh do vi khuẩn như tàn rụi và bạc lá lúa được báo cáo theo nghiên cứu của sáng chế trong khoảng thời gian đầu tiên. Tuy nhiên, được chứng minh rằng chủng YC7007 có hiệu quả thúc đẩy sự tăng trưởng của lúa bằng cách áp dụng huyền phù vi khuẩn một lần trong giai đoạn cây giống ngay sau khi nảy mầm. So với nhóm kiểm soát, chủng YC7007 được tăng không chỉ chiều dài của mầm và rễ bằng 1,1 đến 2,9 lần trong giai đoạn cây giống, giai đoạn đâm chồi và giai đoạn trổ bông, mà còn số lượng chồi trong giai đoạn đâm chồi và giai đoạn trổ bông. Các phát hiện này nghĩa là hoạt động đối với sự cảm ứng của sự kháng và sự thúc đẩy sự tăng trưởng bởi vi khuẩn probiotic YC7007 được liên tục trong khoảng thời gian dài từ giai đoạn cây giống đến giai đoạn trổ bông (Picard, C., Baruffa, E. and Bosco, M. 2008. Làm màu mỡ và đa dạng các vi sinh vật probiotic thực vật trong vùng rễ của cây ngô lai trong bốn chu kỳ tăng trưởng. Soil Biol. Biochem. 40:106-115.). Được biết rằng sự cảm ứng của sự kháng cây chủ có thể tác dụng bất lợi thực vật chủ, do ức chế sự tăng trưởng kết hợp với hoocmon tăng trưởng thực vật như axit gibberellin và oxin. Hệ thống miễn dịch được kiểm soát bởi brassinosteroid và axit salicylic mà ít nhất ức chế một phần axit gibberellin và oxin thông qua sự tương tác với hoocmon (xuyên âm) trong lúa và *Arabidopsis* (De Vleeschauwer, D., Van Buyten, E., Satoh, K., Balidion, J., Mauleon, R., Choi, I. R., Vera Cruz, C., Kikuchi, S. và Hofte, M. 2012. Brassinosteroids antagonize gibberellin và salicylat qua trung gian miễn dịch rễ lúa. Plant Physiol. 158:1833-1846.; Wang, D, Mukhtar, K. P., Culler, A. H. và Dong, X. 2007. Axit salicylic ức sự tăng trưởng gây bệnh ở thực vật thông qua sự ngăn ngừa của đường tín hiệu auxin. Curr.Biol. 17:1784-1790.). Các dẫn xuất hóa học của axit salicylic và benzothiadiazol (BTH) có thể gây ra sự kháng mắc phải toàn thân đối với tác nhân gây bệnh biotrophic thông qua mạng lưới tín

hiệu axit salicylic trong lúa, cây dưa chuột, *Arabidopsis*, và hạt tiêu, trong khi ức chế phản ứng oxin để làm chậm sự tăng trưởng của thực vật. Ngược lại, một số vi khuẩn sống trong rễ bao gồm loài *Bacillus* có thể làm tăng sự cảm ứng của sự kháng mà không tác dụng phụ đến sự tăng trưởng của thực vật (Ahn et al., 2005; Ryu et al., 2004; Yang, J. W., Yu, S. H. and Ryu, C. M. 2009. Việc tạo đoạn môi của gen liên quan đến sự phòng thảo luận sự kháng toàn thân được cảm ứng được luận ra việc tạo khuẩn lạc của rễ cây hạt tiêu. *Plant Pathol. J.* 25:389-399.). Đối với các khía cạnh này, được xem là chủng YC7007 có thể là ứng cử tốt cho sự phát triển của thuốc diệt sinh vật hại sinh học có đa chức năng như sự cảm ứng của sự kháng và sự thúc đẩy tăng trưởng trong lúa mà không tác dụng phụ bất kỳ. Ngoài ra, cho rằng chủng YC7007 có hoạt tính kháng nấm và kháng vi khuẩn thông qua sự sản xuất vật liệu kháng sinh.

Theo sáng chế, hai chủng sống trong mô được gọi là YC7007 và YC7010 được đặc trưng dựa trên nhiều nghiên cứu thời kỳ bao gồm trình tự gen 16S rARN, sự lai giống ADN-ADN, sự phân tích axit béo và thí nghiệm hóa học vật lý khác. Các chủng này được nhận biết làm giống *Bacillus* trong nhánh gai nổi có cùng chiều dài nhánh trong cây phát sinh loài. Hai chủng này có cùng tỷ lệ phân nhánh trình tự như nhau, tuy nhiên, khác so với loại khác cùng giống trong nhánh gai nổi của cây phát sinh loài. chủng YC7007 và YC7010s được thể hiện 100% tương tự với nhau và trị số tương đồng ADN-ADN cũng khá cao là 91,5%, do đó, cả hai chủng này được chứng minh là cùng loài *Bacillus*. So với chủng mẫu YC7010, trị số lai giống ADN-ADN của các chủng cùng giống khác như *B. siamensis*, *B. metylotrophicus*, *B. subtilis* subsp. *inaquosorum*, *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* và *B. tequilensis*, hoặc các chủng tương tự, thường ít hơn 70%. Do đó, có thể được hiểu rằng chủng YC7010 là loại (Goris, J., Konstantinidis, K. T., Klappenbach, J. A., Coenye, T., Vandamme, P. và Tiedje, J. M. 2007. Trị số lai

giống ADN-ADN và mối quan hệ của chúng đối với sự tương tự của toàn bộ bộ gen. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57:81-91; Stackebrandt, E. và Goebel, B. M. 1994. Ghi chú sự phân loại: Vị trí đối với sự kết hợp lại ADN-ADN và phân tích trình tự 16s rARN theo định nghĩa loại của sáng chế trong bacteriology. Int. J. Syst. Bacteriol. 44:846-849.). Ngoài ra, hai chủng này được thể hiện hầu hết các đáp ứng tương tự trong thí nghiệm hóa học vật lý bằng cách sử dụng kit API, trong khi có các đáp ứng khác nhau đến các chủng mẫu liên quan khác. Do đó, có thể được hiểu rằng hai chủng nêu trên có thể phân biệt từ chủng *Bacillus* cùng giống khác. Do chấp nhận đối với natri clorua, hai chủng được sống sót cho đến 13% natri clorua. Ngược lại, *B. metylotrophicus* không được sống sót ngay cả khi ở 10% natri clorua (xem tài liệu không phải là sáng chế 1). Các axit béo chính của YC7007 và YC7010 là anteiso-C_{15:0} và iso C_{15:0}, mà tương tự với các axit béo của loại khác cùng giống của *Bacillus* genus. Ngược lại, lượng nhỏ của axit béo khác trong hai chủng này khác với lượng nhỏ của chủng *Bacillus* loại cùng giống. Vi khuẩn riêng lẻ có mẫu axit béo khác nhau, và phân tích axit béo này được sử dụng hiệu quả với sự đồng nhất hóa của vi khuẩn (Kampfer, P. 1994. Giới hạn và khả năng của toàn bộ sự phân tích axit béo đối với sự phân loại và sự đồng nhất hóa của *Bacillus* species. Syst. Appl. Microbiol. 17:86-98.). Giống như chủng mẫu của *Bacillus* genus, isoprenoid quinon chính của chủng YC7007 và YC7010s là menaquinon-7 (MK-7) (Chen, J. H., Tian, X. R., Ruan, Y., He, Z. Q., Tang, S. K., Li, W. J., Shi, H. và Chen, Y. G. 2015. *Bacillus crassostreae* sp., nov., được phân lập từ con hàu ở biển phía nam Trung Quốc. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. Doi:10.1099/ijms. 0,000139.; Kang, H., Weerawongwiwat, V., Kim, J. H., Sukhoom, A. và Kim, W. 2013. *Bacillus songkensis* sp. nov., được phân lập từ soil. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 6/3:4189-4195.). Hàm lượng ADN G + Cs của hai chủng tương tự với nhau và nằm trong khoảng từ 50,5 đến 51,2 mol%, mà tuy nhiên cao

hơn một chút so với loài *Bacillus* khác (xem tài liệu không phải là sáng chế 1 và tài liệu không phải là sáng chế 17). Các lipit có cực khác của hai chủng là PE, PG, và DPG mà tương ứng các lipit có cực khác của *B. siamensis* và *B. songklensis* (Kang và các đồng tác giả, 2013; Tài liệu không phải là sáng chế 17).

Dựa trên tất cả dữ liệu của nhiều nghiên cứu thời kỳ, hai chủng YC7007 và YC7010 thuộc về *Bacillus* genus, và do đó, các chủng này YC7007 và YC7010 được đề xuất làm loại mới và được gọi là *Bacillus oryzicola* YC7010^T sp. nov. làm chủng mẫu. Do đó, chủng sống trong mô *B. oryzicola* YC7007 là chủng có hoạt tính đa chức năng, thể hiện ức chế trực tiếp sự gây bệnh do vi khuẩn và nấm, sự cảm ứng của sự kháng mắc phải toàn thân và sự tăng trưởng thực vật thúc đẩy các tác dụng, do đó có thể áp dụng thực tế làm chất cây vi sinh vật trong nhà nông trại nông nghiệp.

Các phương án được ưu tiên của sáng chế được mô tả nêu trên đã được đề xuất để giải quyết các vấn đề kỹ thuật thông thường, và các chuyên gia có kinh nghiệm trong lĩnh vực kỹ thuật sẽ được hiểu rõ rằng việc thay đổi, biến đổi và bổ sung khác nhau là có thể trong phạm vi tinh thần của sáng chế. Việc thay đổi và biến đổi như vậy được bao gồm đủ trong yêu cầu bảo hộ kèm theo.

1) SEQ ID NO: 1 biểu thị trình tự gen 16S rARN của chủng *Bacillus oryzicola* YC7007 theo sáng chế.

2) SEQ ID NO: 2 biểu thị trình tự gen 16S rARN của chủng *Bacillus oryzicola* YC7010 theo sáng chế.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chủng vi sinh vật *Bacillus oryzae* YC7007 (mã số hộp lưu: KCCM11275P).
2. Chủng vi sinh vật *Bacillus oryzae* theo điểm 1, trong đó *Bacillus oryzae* bao gồm 16S rARN có trình tự cơ bản là SEQ ID NO: 1.
3. Chủng vi sinh vật *Bacillus oryzae* theo điểm 1, trong đó *Bacillus oryzae* có tính hiệu quả cảm ứng kháng bệnh của thực vật.
4. Chủng vi sinh vật *Bacillus oryzae* theo điểm 3, trong đó bệnh thực vật ít nhất một được chọn từ nhóm bao gồm bệnh thối hạt, bệnh bạc lá lúa, bệnh tàn rụi và bệnh nấm.
5. Chủng vi sinh vật *Bacillus oryzae* theo điểm 3, trong đó *Bacillus oryzae* còn có tính hiệu quả ức chế tác nhân gây bệnh thực vật, tính hiệu quả thúc đẩy sự tăng trưởng thực vật và tính hiệu quả tăng cường thực vật.
6. Chủng vi sinh vật *Bacillus oryzae* theo điểm 5, trong đó tính hiệu quả thúc đẩy sự tăng trưởng thực vật là tính hiệu quả thúc đẩy sự tăng trưởng thực vật đối với lúa.
7. Chế phẩm vi sinh vật dùng cho phân bón, bảo vệ thực vật và sử dụng tăng cường thực vật, bao gồm chủng vi sinh vật theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1, 2, 3 đến 6, và dung dịch nuôi cấy hoặc phân lọc nuôi cấy của nó làm thành phần hoạt tính.

[Giấy chứng nhận nộp lưu – YC7007]



**BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE**

INTERNATIONAL FORM

To: Young Kyun Chung
Department of Research & Development,
JGreen Inc., Changnyeong 633-806, Korea/
Division of Applied Life Science,
Gyeongsang National University,
Jinju 660-701, Republic of Korea

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL
Issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY:
Identified as the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR : <i>Bacillus oryzae</i> YC7007	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: KCCMI1275P
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by: ☐ a scientific description ☐ a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on April 18, 2012, (date of the original deposit) ¹	
IV. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name : Korean Culture Center of Microorganisms Address : 361-221, Yurim B/D Hongje-1-dong Seodaejeon-gu SEOUL 120-091 Republic of Korea	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s): Date: April 18, 2012.

¹ Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired; where a deposit made outside the Budapest Treaty after the acquisition of the status of international depositary authority is converted into a deposit under the Budapest Treaty, such date is the date on which the microorganism was received by the international depositary authority.

Form BP/4

Sole page

(revised)

한국미생물보존센터

KCCMI (KOREAN CULTURE CENTER OF MICROORGANISMS)

2/2

[Giấy chứng nhận nộp lưu – YC7010]

**KOREAN Agricultural Culture Collection (KACC)**

National Agrobiodiversity Center

National Academy of Agricultural Science

166, Nongsaeangmyeong-ro, Iseo-myeon,

Wanju-gun, Jeollabuk-do 565-851, Republic of Korea

Phone : +82-63-238-3024

Fax : +82-63-238-3849

E-mail : swkwon1203@korea.kr

Homepage : www.genebank.go.kr**Certificate of Deposition and Availability of a Microorganism**

The strain *Bacillus* sp. YC7010 has been deposited in the Korean Agricultural Culture Collection (KACC) under the number of

KACC 18228

This strain will available to the public without restriction after publication by author(s) of the scientific paper.

S. W. Kwon

24 October 2014

Curator responsible for the strain

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110>	Jgreen Inc. ĐẠI HỌC QUỐC GIA GYEONGSANG THÀNH LẬP SỰ HỢP TÁC HỌC VIỆN CÔNG NGHIỆP	
<120>	Vi khuẩn <i>Bacillus oryzicola</i> sống trong mô được phân lập từ vùng rễ lúa và sự phát triển của thuốc trừ sâu tự nhiên và thực vật tăng cường hơn bằng cách sử dụng chúng	
<130>	NP14-05084	
<160>	2	
<170>	KopatentIn 2.0	
<210>	1	
<211>	1513	
<212>	ARN	
<213>	<i>Bacillus oryzicola</i>	
<400>	1	
	cgagtttgat catggctcag gacgaacgct ggcggcgtgc ctaatacatg caagtcgagc	60
	ggacagatgg gagcttgctc cctgatgtta gcggcggacg ggtgagtaac acgtgggtaa	120
	cctgcctgta agactgggat aactccggga aaccggggct aatactggat ggttgtttga	180
	accgcatggt tcagacataa aaggtggctt cggctaccac ttacagatgg acccgcggcg	240
	cattagctag ttggtgaggt aacggctcac caaggcgacg atgcgtagcc gacctgagag	300
	ggtgatcggc cacactggga ctgagacacg gccagactc ctacgggagg cagcagtagg	360
	gaatcttccg caatggacga aagtctgacg gagcaacgcc gcgtgagtga tgaaggtttt	420
	cggatcgtaa agctctgttg ttagggaaga acaagtgccg ttcaaataagg gcggcacctt	480
	gacggtacct aaccagaaaag ccacggctaa ctacgtgcc a gcagccgcgg taatacgtag	540
	gtggcaagcg ttgtccggaa ttattgggcg taaagggctc gcaggcggtt tcttaagtct	600
	gatgtgaaaag ccccggtc aaccggggag ggtcattgga aactggggaa cttgagtgca	660
	gaagaggaga gtggaattcc acgtgtagcg gtgaaatgcg tagagatgtg gaggaacacc	720
	agtggcgaag gcgactctct ggtctgtaac tgacgctgag gagcgaaagc gtggggagcg	780
	aacaggatta gataccctgg tagtccacgc cgtaaacgat gagtgctaag tgtaggggg	840
	tttccgcccc ttagtgctgc agctaacgca ttaagcactc cgctggggga gtacggtcgc	900
	aagactgaaa ctcaaaggaa ttgacggggg cccgcacaag cgggtggagca tgtggtttaa	960
	ttcgaagcaa cgcaagaac cttaccaggt cttgacatcc tctgacaatc ctagagatag	1020

gacgtcccct tcgggggcag agtgacaggt ggtgcatggt tgtcgtcagc tcgtgtcgtg 1080
 agatgttggg ttaagtcccg caacgagcgc aacccttgat cttagttgcc agcattcagt 1140
 tgggcactct aaggtgactg ccggtgacaa accggaggaa ggtggggatg acgtcaaate 1200
 atcatgcccc ttatgacctg ggctacacac gtgctacaat ggacagaaca aagggcagcg 1260
 aaaccgagag gttaagccaa tcccacaaat ctgttctcag ttccggatcgc agtctgcaac 1320
 tcgactgcgt gaagctggaa tcgctagtaa tcgcggatca gcatgccgcg gtgaatacgt 1380
 tcccgggcct tgtacacacc gcccgtcaca ccacgagagt ttgtaacacc cgaagtcggt 1440
 gaggtaacct tttaggagcc agccgccgaa ggtgggacag atgattgggg tgaagtcgta 1500
 acacgtaacc gta 1513

<210> 2
 <211> 1513
 <212> ARN
 <213> *Bacillus oryzicola*

<400> 2
 agagtttgat cctggctcag gacgaacgct ggcggcgtgc ctaatacatg caagtcgagc 60
 ggacagatgg gagcttgctc cctgatgtta gcggcggacg ggtgagtaac acgtgggtaa 120
 cctgcctgta agactgggat aactccggga aaccggggct aatactggat ggttgtttga 180
 accgcatggt tcagacataa aaggtggctt cggctaccac ttacagatgg acccgcggcg 240
 cattagctag ttggtgaggt aacggctcac caaggcgacg atgcgtagcc gacctgagag 300
 ggtgatcggc cacactggga ctgagacacg gccagactc ctacgggagg cagcagtagg 360
 gaatcttccg caatggacga aagtctgacg gagcaacgcc gcgtgagtga tgaaggtttt 420
 cggatcgtaa agctctgttg ttagggaaga acaagtgccg ttcaaataagg gcggcacctt 480
 gacggtacct aaccagaaag ccacggctaa ctacgtgcca gcagccgcg taatacgtag 540
 gtggcaagcg ttgtccgga ttattgggcg taaagggtc gcaggcggtt tcttaagtct 600
 gatgtgaaag cccccggctc aaccggggag ggtcattgga aactggggaa cttgagtga 660
 gaagaggaga gtggaattcc acgtgtagcg gtgaaatgcg tagagatgtg gaggaacacc 720
 agtggcgaag gcgactctct ggtctgtaac tgacgctgag gagcgaaagc gtggggagcg 780
 aacaggatta gataccctgg tagtccacgc cgtaaacgat gagtgctaag tgttaggggg 840
 tttccgcccc ttagtgctgc agctaacgca ttaagcactc cgctggggga gtacggtcgc 900

aagactgaaa ctcaaaggaa ttgacggggg cccgcacaag cgggtggagca tgtgggttaa	960
ttcgaagcaa cgcaagaac cttaccaggt cttgacatcc tctgacaatc ctagagatag	1020
gacgtcccct tcgggggcag agtgacaggt ggtgcatggt tgtcgtcagc tcgtgtcgtg	1080
agatgttggg ttaagtcccg caacgagcgc aacccttgat cttagttgcc agcattcagt	1140
tgggcactct aaggtgactg ccggtgacaa accggaggaa ggtggggatg acgtcaaatc	1200
atcatgcccc ttatgacctg ggctacacac gtgctacaat ggacagaaca aagggcagcg	1260
aaaccgagag gttaagccaa tcccacaaat ctgttctcag ttcggatcgc agtctgcaac	1320
tcgactgcgt gaagctggaa tcgctagtaa tcgcggatca gcatgccgcg gtgaatacgt	1380
tcccgggcct tgtacacacc gcccgtcaca ccacgagagt ttgtaacacc cgaagtcggt	1440
gaggtaacct tttaggagcc agccgccgaa ggtgggacag atgattgggg tgaagtcgta	1500
acaaggtgcc gta	1513

Fig. 1

CGAGTTTGATCATGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGA
 CGGGTGAAGTAACACGTGGGTAACTGCGCTGTAAAGCTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACTGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTACAGAC
 ATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACCTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAACGGCTCACCAGGCGACGATGCGTAGCCGACG
 TGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGTAGGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGA
 GCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCT
 AACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGG
 TTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAAGAAGAGAGAGTGGAAATCCACGTGT
 AGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGAGCGAACA
 GGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCG
 CCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGAAAGCAACGCGAAGAAC
 CTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTACGCTCGTGTG
 TGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTCAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGA
 GGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTA
 AGCCAATCCACAAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGT
 GAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCAGAGAGTTGTAAACCCGAAAGTCGGTGAGGTAACTTTTAGGAGCCAGCCGCCGAA
 GGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACACGTAAACCGTA

(a)

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGA
 CGGGTGAAGTAACACGTGGGTAACTGCGCTGTAAAGCTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACTGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTACAGAC
 ATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACCTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAACGGCTCACCAGGCGACGATGCGTAGCCGACG
 TGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGTAGGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGA
 GCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCT
 AACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGG
 TTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAAGAAGAGAGAGTGGAAATCCACGTGT
 AGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGAGCGAACA
 GGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCG
 CCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGAAAGCAACGCGAAGAAC
 CTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTACGCTCGTGTG
 TGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTCAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGA
 GGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTA
 AGCCAATCCACAAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGT
 GAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCAGAGAGTTGTAAACCCGAAAGTCGGTGAGGTAACTTTTAGGAGCCAGCCGCCGAA
 GGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAAGGTGCCGTA

(b)

Fig. 2

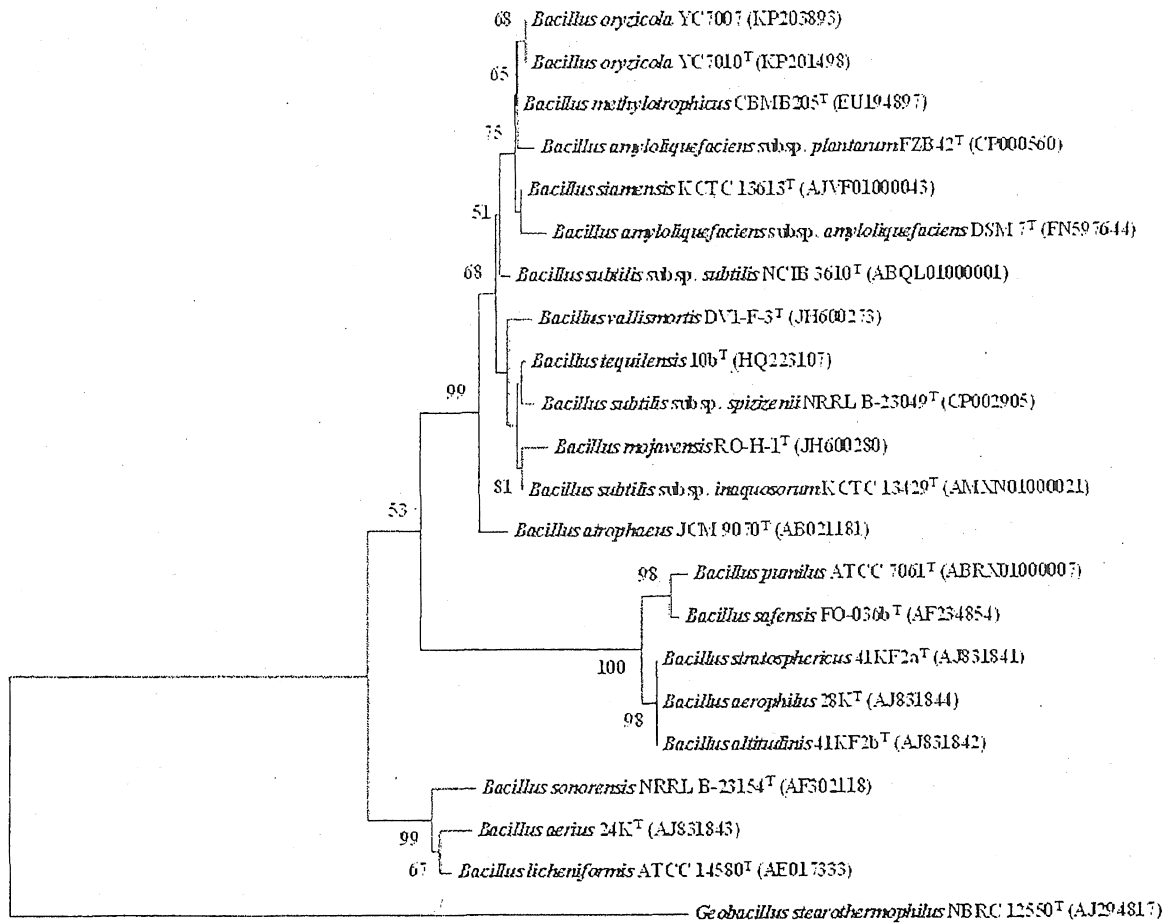


Fig. 3

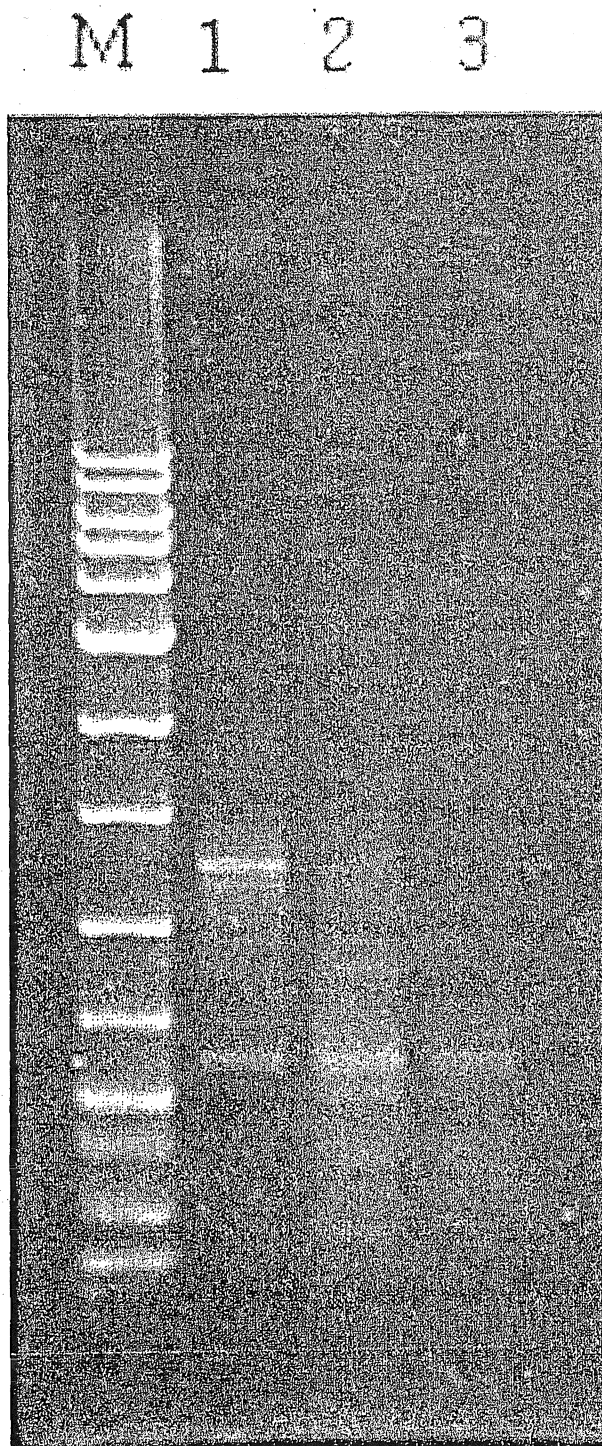


Fig. 4

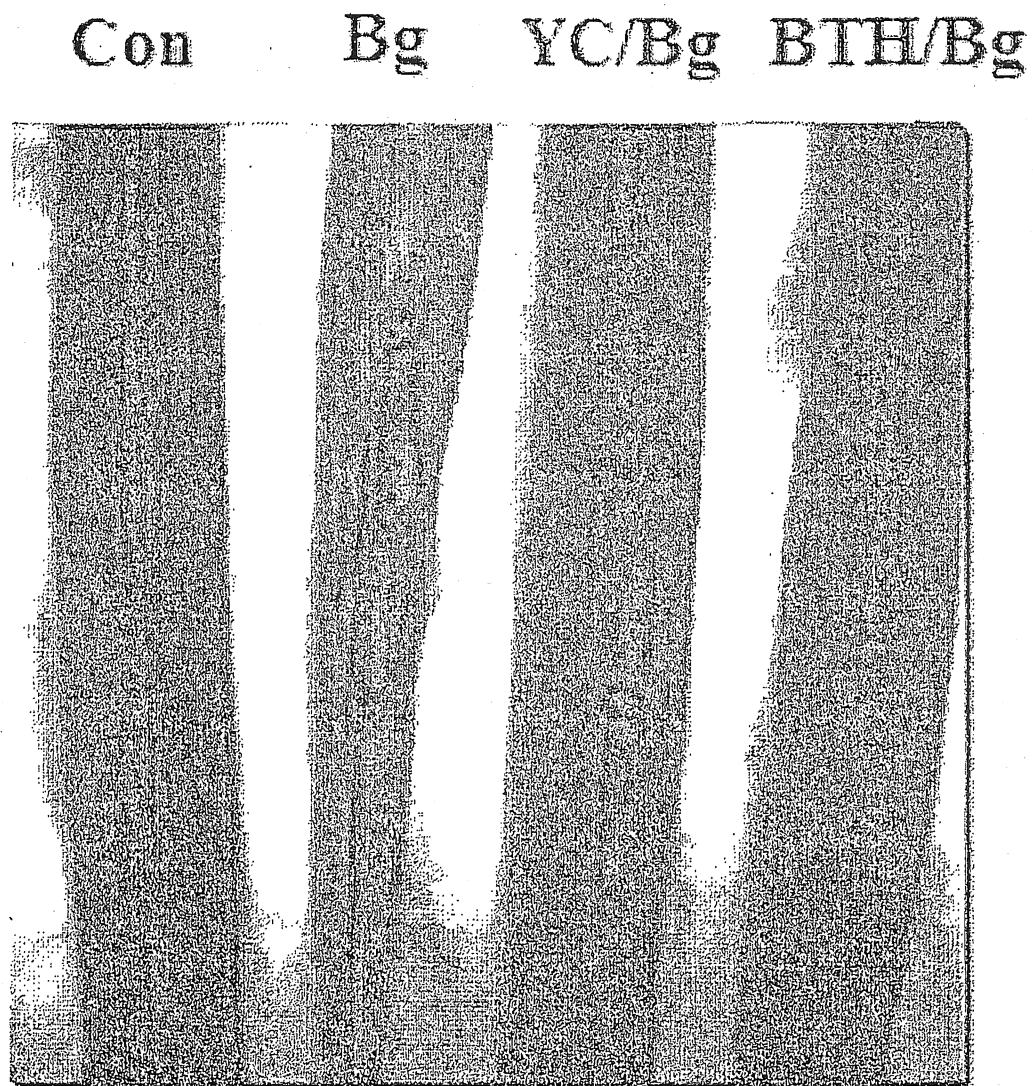


Fig. 5

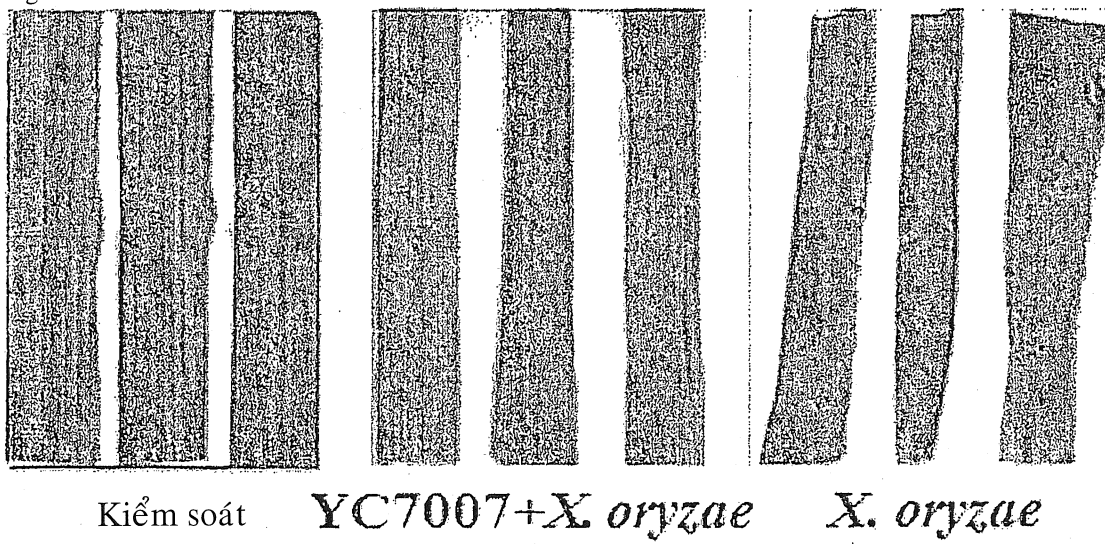
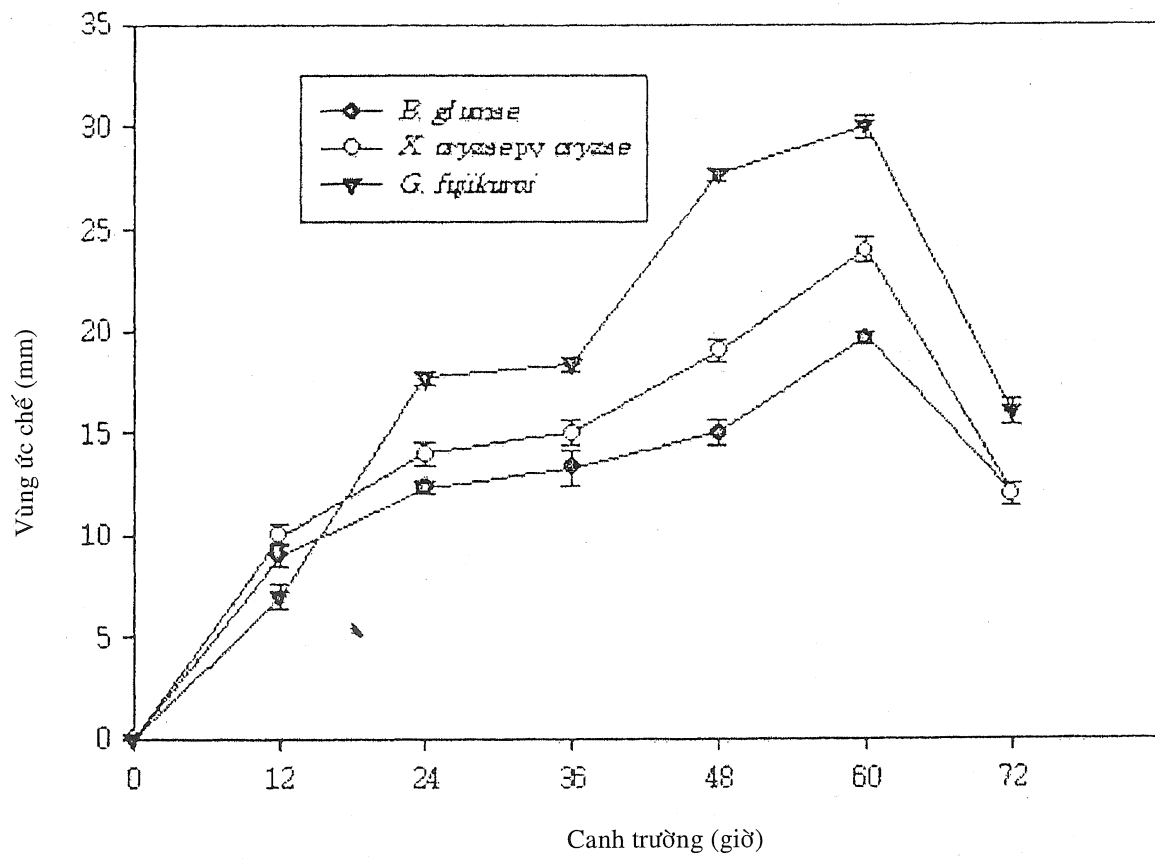
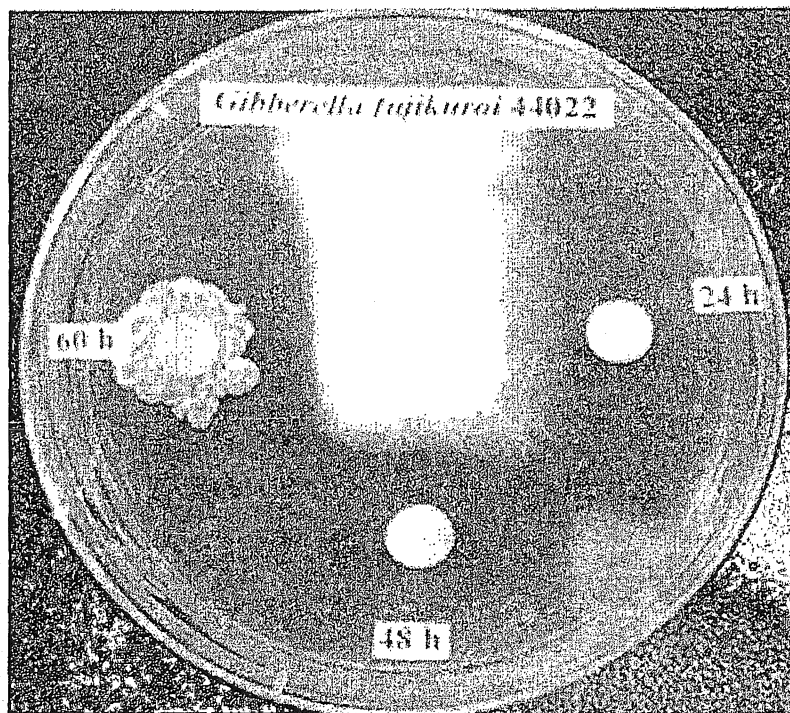


Fig. 6



(a)



(b)

Fig. 7

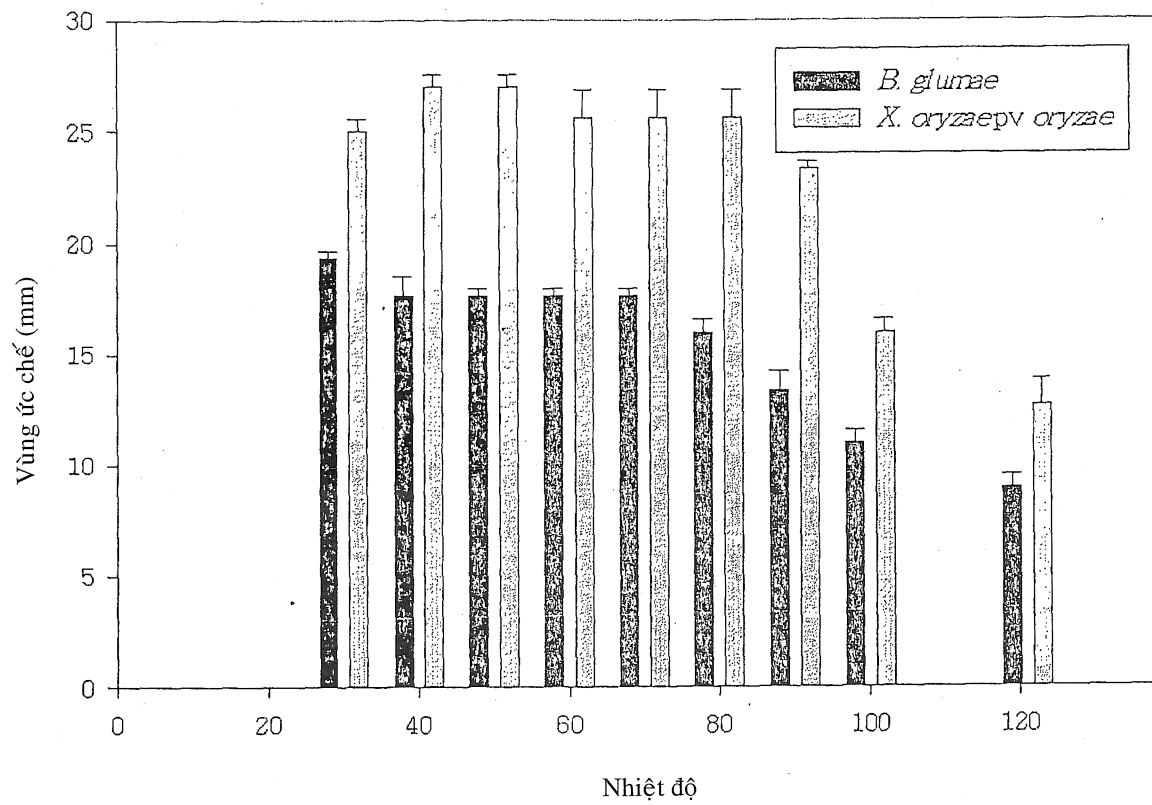


Fig. 8

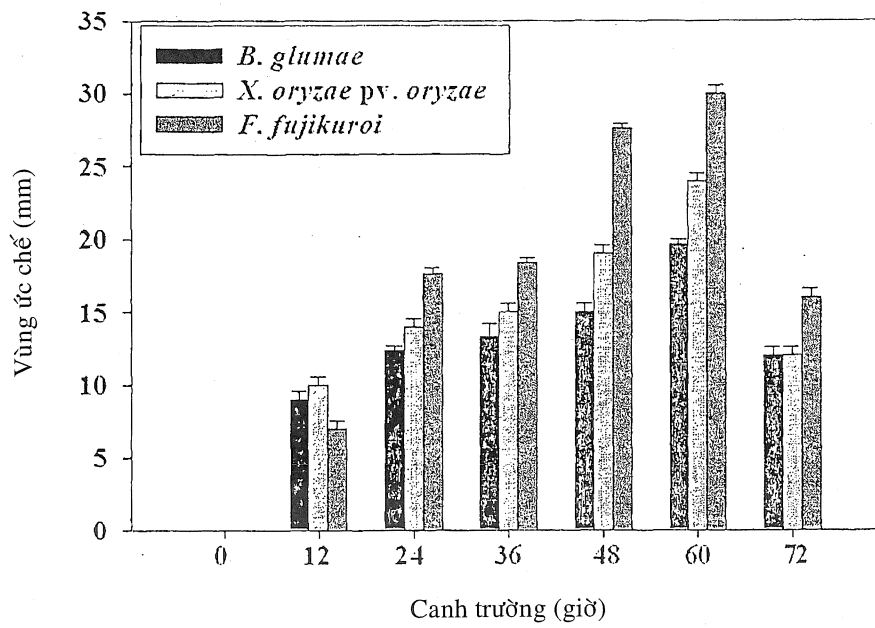


Fig. 9

