



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

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

(11)



2-0003298

(51) **C12N 1/20; C02F 3/12**
2022.01

(13) **Y**

(21) 2-2023-00034

(22) 05/02/2021

(67) 1-2021-00696

(45) 25/08/2023 425

(43) 26/04/2021 397

(73) Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội (VN)
Nhà E2, 144 Xuân Thủy, Cầu Giấy, Hà Nội

(72) Đinh Thúy Hằng (VN); Nguyễn Duy Tới (VN); Nguyễn Thị Hiếu Thu (VN); Nguyễn Kim Nữ Thảo (VN).

(54) **CHỦNG VI KHUẨN NỘI SINH RỄ LÚA *BACILLUS VELEZENSIS* VY03 CÓ HOẠT
TÍNH ĐỐI KHÁNG PHỔ RỘNG VỚI VI SINH VẬT GÂY BỆNH THỰC VẬT ĐỂ ỨNG
DỤNG TRONG KIỂM SOÁT SINH HỌC**

(57) Sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn *Bacillus velezensis* VY03 thuần khiết về mặt sinh học phân lập được từ rễ lúa giống Bắc Thơm ở Thái Bình. Chủng *B. velezensis* VY03 có khả năng kháng nhiều loài vi sinh vật gây bệnh thực vật, gồm có vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) gây bệnh bạc lá lúa, vi khuẩn *Dickeya zeae* (Dz) gây bệnh thối gốc, vi nấm *Alternaria alternata* gây bệnh đốm lá, vi nấm *Colletotrichum gloeosporioides* gây bệnh thán thư ở thực vật.

Chủng *Bacillus velezensis* VY03 còn có khả năng xâm nhập vào rễ lúa ở mức cao (đạt $8,3 \times 10^5$ CFU/g rễ sau 6 ngày tiếp xúc) và thực hiện đời sống sinh trưởng nội sinh. Với những đặc điểm sinh lý này, chủng *Bacillus velezensis* VY03 có tiềm năng cao cho ứng dụng trong kiểm soát sinh học, phát triển nông nghiệp hữu cơ.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn nội sinh thực vật *Bacillus velezensis* VY03 được phân lập từ rễ lúa sau khi đã khử trùng bề mặt, có phổ đối kháng rộng với nhiều loài vi sinh vật gây bệnh ở cây trồng. Chủng *B. velezensis* VY03 đồng thời cũng thể hiện khả năng xâm nhập lại vào rễ lúa rất cao. Với các đặc tính sinh học này, chủng *B. velezensis* VY03 có giá trị ứng dụng cao trong kiểm soát sinh học đối với một số bệnh do vi sinh vật gây ra ở cây trồng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Trong canh tác nông nghiệp, bệnh thực vật là một vấn đề lớn gây ảnh hưởng đến năng suất cây trồng. Bệnh trên thực vật được gây ra bởi nhiều tác nhân, trong đó vi sinh vật (như vi khuẩn, nấm) là nhóm có tác hại nghiêm trọng, làm giảm tới 25% sản lượng cây trồng thế giới mỗi năm (Lugtenberg, 2015).

Bệnh thực vật do nấm gây ra: Nấm là nguyên nhân gây ra tới 2/3 các bệnh ở thực vật. Một số loài nấm gây hại cho cây trồng đáng chú ý như *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Alternaria alternata*, *Colletotrichum gloeosporioides*. Các loài *F. oxysporum* và *R. solani* gây ra các bệnh thối rễ, lở cổ rễ, thối thân, bệnh đốm lá trên nhiều loại cây ngũ cốc (lúa, ngô, khoai tây), rau (cà chua, bắp cải, rau diếp), cây ăn quả và cây công nghiệp (lạc, đậu, bông, cao su) (Baysal *et al.*, 2008). Đáng chú ý là *R. solani* và *F. oxysporum* có thể tồn tại lâu trong đất và trong các mô của cây đã chết, trở thành mầm bệnh đe dọa các vụ canh tác kế tiếp (Nelson, Summerll, 1989). *Alternaria alternata* là nấm gây bệnh đốm lá trên hơn 380 loài thực vật chủ, tạo các mảng màu nâu nhạt đến nâu sẫm hình bầu dục tròn có đường kính từ 1 đến 2 mm trong giai đoạn đầu, sau đó mở rộng, dần tạo ra lỗ thủng trên lá (Nagrle *et al.*, 2012). *Colletotrichum gloeosporioides* là nấm gây bệnh thán thư, được ghi nhận trên 470 chi thực vật khác nhau, bao gồm cả cây một lá mầm và cây hai lá mầm, ở các bộ phận của cây từ lá, cành, chồi non, quả non (Cannon *et al.*, 2000).

Bệnh thực vật do vi khuẩn gây ra: Nhiều bệnh thực vật do vi khuẩn gây ra có mức độ nghiêm trọng cao do tốc độ lây lan rất nhanh và rộng. Theo công bố của Mansfield và cs. (2012) thì 10 loài vi khuẩn gây bệnh được đánh giá quan trọng nhất xét theo tiêu chí khoa học và kinh tế, gồm có: (1) *Pseudomonas syringae* nhiều pv.; (2) *Ralstonia solanacearum*; (3) *Agrobacterium tumefaciens*; (4) *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*; (5) *Xanthomonas campestris* nhiều pv.; (6) *Xanthomonas axonopodis* nhiều

pv.; (7) *Erwinia amylovora*; (8) *Xylella fastidiosa*; (9) *Dickeya dadantii* và *D. solani*; (10) *Pectobacterium carotovorum* và *P. atrosepticum*.

Pseudomonas syringae là loài vi khuẩn gây bệnh trên thực vật được nghiên cứu sâu sắc nhất, các kết quả nghiên cứu được sử dụng như mô hình giải thích mối quan hệ giữa vi khuẩn gây bệnh và cây trồng (Mansfield, 2012). *P. syringae* gây bệnh cho cây trồng nhờ tiết ra protein độc tố vào tế bào thực vật, ức chế hàng rào tự vệ của cây chủ. Trên 60 loại protein độc tố đã được xác định ở *P. syringae*, mỗi loại đặc hiệu cho một cây chủ, bao gồm cây một lá mầm, hai lá mầm, cây thân gỗ (như dẻ, sồi) và thân thảo (chur cà chua, thuốc lá) (Kennelly *et al.*, 2007).

Vi khuẩn *Xanthomonas* spp. gồm ít nhất 27 loài gây bệnh phát hiện trên 400 loài thực vật khác nhau. Điển hình nhất là *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* gây bệnh bạc lá trên cây lúa, *X. citri* subsp. *citri* gây bệnh loét trên nhiều loại cây có múi (cam, chanh), *X. euvesicatoria*, *X. perforans*, *X. vesicatoria*, *X. gardneri* gây bệnh đốm lá trên nhiều loại thực vật (Potnis *et al.*, 2015; Mew *et al.*, 1993). Vi khuẩn *Xanthomonas* spp. thường sinh polysaccharide ngoại bào (EPS) và tạo cấu trúc màng sinh học (biofilm) bền vững giúp chúng chống lại các tác nhân bất lợi từ môi trường như tia UV, điều kiện khô hạn hay thậm chí các loại thuốc bảo vệ thực vật (An *et al.*, 2019). Vi khuẩn *Xanthomonas* spp. thường xâm nhập vào cây thông qua các lỗ thủy khổng, khí khổng hay các vết thương trên lá cây, sau đó sinh trưởng trong các mô dẫn và lây lan toàn bộ cây, dẫn đến nhiễm trùng toàn thân (Huang *et al.*, 1997).

Vi khuẩn *Dickeya* spp. gây bệnh thối gốc trên nhiều đối tượng cây chủ, gồm các loại cây lương thực (lúa, khoai tây, ngô), cây ăn quả (thanh long, chuối), cây cảnh (hoa lan) (Kumar *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2014). Cây bị bệnh có triệu chứng nhũn ở gốc thân, héo xanh và đổ gục. Một số loài vi khuẩn thuộc chi *Dickeya* gây bệnh trên thực vật như *D. zeae* gây bệnh thối gốc lúa, *D. solani* gây bệnh nhũn thân ở khoai tây, *D. dadantii* gây bệnh thối củ ở hành tây (Toth *et al.*, 2011).

Vi khuẩn *Burkholderia* spp. như *B. gladioli* và *B. glumae* gây bệnh thối đen hạt (Bacteria Panicle Blight, BPB) và bệnh vàng cuống lá (leaf-sheath browning) ở cây lúa, là nguyên nhân gây thiệt hại cho năng suất lúa ở nhiều quốc gia trên thế giới (Ura *et al.*, 2006).

Kiểm soát bệnh thực vật do vi sinh vật gây ra. Việc kiểm soát bệnh thực vật do nấm và vi khuẩn chiếm một phần chi phí đáng kể trong sản xuất nông nghiệp. Các cách tiếp cận truyền thống gồm có tạo giống cây trồng kháng bệnh, sử dụng hạt giống không bị nhiễm bệnh hoặc sử dụng thuốc bảo vệ thực vật để tiêu diệt mầm bệnh trong đất... Ảnh hưởng của thuốc bảo vệ thực vật hóa học tới môi trường sinh thái và

vấn đề dư lượng các chất này trong nông phẩm tạo áp lực dẫn tới tăng nhu cầu sử dụng biện pháp kiểm soát sinh học đối với các bệnh thực vật. Ưu điểm chính của các biện pháp kiểm soát sinh học là hiệu quả (nhờ tính đặc hiệu cao của tác nhân kiểm soát trên đối tượng gây bệnh) và an toàn đối với môi trường, do vậy được thị trường đón nhận (Bảng 1).

Bảng 1 - Một số sản phẩm kiểm soát sinh học thương mại (O'Brien, 2017)

Tác nhân kiểm soát sinh học	Bệnh thực vật	Nhà cung cấp	Quốc gia
<i>B. subtilis</i> MB1600	Các bệnh do nấm ở cây bông và đậu tương	Beker Underwood	USA
<i>B. subtilis</i> MB1600 và <i>Rhizobium</i>	Các bệnh do nấm ở đậu tương và đậu phộng	Beker Underwood	USA
<i>Bacillus subtilis</i> QST 713	Bệnh ở rau, quả	AgraQuest	USA
<i>Coniothyrium minitans</i>	Bệnh thối rễ	Prophyta Biologischer	Đức
<i>Trichoderma harzianum</i>	Bệnh thối rễ	Efal Agri	Israel
<i>Trichoderma</i> spp.	Bệnh thối rễ	Bioplant	Đan Mạch
<i>Trichoderma viride</i>	Bệnh thối rễ	Ecosense Laboratories	Ấn Độ
<i>Pseudomonas syringae</i> phage	Bệnh ở rau, quả do vi khuẩn	Omnilytics	USA

Các tác nhân kiểm soát sinh học thường được phân lập qua sàng lọc từ hệ vi sinh vật nội sinh hoặc sinh trưởng ở vùng rễ thực vật có khả năng ức chế sự phát triển của tác nhân gây bệnh, thường gặp là các loài thuộc *Actinomycetes*, *Pseudomonas* và *Bacillus* (O'Brien, 2017). Ở Việt Nam, các nghiên cứu về kiểm soát sinh học bệnh thực vật đang được quan tâm, tuy nhiên ứng dụng thực tế còn ở mức hạn chế. Đứng trước tình hình hội nhập quốc tế, nền nông nghiệp Việt Nam rất cần tăng cường phát triển hướng sản xuất hữu cơ, giảm thiểu việc sử dụng thuốc hóa học để nâng cao chất lượng nông sản.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất chủng vi khuẩn nội sinh thực vật *Bacillus velezensis* VY03 phân lập từ rễ lúa (sau khi đã khử trùng bề mặt), có khả năng kháng một số loài vi khuẩn và nấm gây bệnh trên cây trồng. Ngoài ra, chủng *Bacillus velezensis* VY03 có thể xâm

nhập tốt vào cây lúa thông qua rễ. Với các đặc tính sinh học này, chủng *Bacillus velezensis* VY03 có tiềm năng cao trong ứng dụng cho kiểm soát sinh học một số bệnh ở thực vật.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là hình ảnh thể hiện hình thái khuẩn lạc (A) và tế bào của chủng *Bacillus velezensis* VY03 dưới kính hiển vi phản pha (B).

Hình 2 là hình ảnh cây phân loại dựa trên trình tự gần đủ của gen 16S rADN của chủng *Bacillus velezensis* VY03 so với các loài gần gũi trên ngân hàng dữ liệu GenBank.

Hình 3 là biểu đồ thể hiện sinh trưởng của chủng *Bacillus velezensis* VY03 ở các điều kiện nuôi cấy khác nhau. (A) – Nhiệt độ; (B) – pH; (C) – Độ muối; (D) – Nguồn nitơ; (E) – Nguồn cacbon

Hình 4 là hình ảnh chủng *Bacillus velezensis* VY03 kháng các loài vi khuẩn gây bệnh thực vật (A) – *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) gây bệnh bạc lá lúa và (B) – *Dickeya zeae* (Dz) gây bệnh thối gốc (B).

Hình 5 là hình ảnh chủng *Bacillus velezensis* VY03 kháng các loài nấm gây bệnh thực vật (A) – *Alternaria alternata* gây bệnh đốm lá và (B) – *Colletotrichum gloeosporioides* gây bệnh thán thư ở thực vật.

Hình 6 là hình sơ đồ biểu thị số lượng tế bào chủng *Bacillus velezensis* VY03 xâm nhập vào rễ cây lúa sau 6 ngày trong thí nghiệm *in planta*.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập tới chủng vi khuẩn nội sinh *Bacillus velezensis* VY03 có khả năng kháng các loài vi sinh vật gây bệnh thực vật, gồm vi khuẩn (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* gây bệnh bạc lá lúa và *Dickeya zeae* gây bệnh thối gốc) và vi nấm (*Alternaria alternata* gây bệnh đốm lá và *Colletotrichum gloeosporioides* gây bệnh thán thư). Ngoài ra, chủng *Bacillus velezensis* VY03 xâm nhập tốt vào cây lúa thông qua rễ và không gây ảnh hưởng xấu đến cây. Chủng *Bacillus velezensis* VY03 có giá trị ứng dụng cao trong kiểm soát sinh học bệnh ở thực vật.

Chủng VY03 được phân lập từ rễ lúa (giống Bắc Thơm) ở Thái Bình. Cây lúa khỏe mạnh trong vùng bị bệnh bạc lá được thu thập về phòng thí nghiệm để phân lập vi khuẩn nội sinh có ích (lợi khuẩn thực vật). Trước khi phân lập, rễ lúa được xử lý bằng cách khử trùng bề mặt với dung dịch hypoclorit 50% và cồn 75%. Sau đó, rễ đã khử trùng bề mặt được nghiền và pha loãng trong đệm PBS 1× vô trùng rồi cấy trải trên đĩa môi trường thạch TSA 1/6, ủ ở 30°C trong 48 giờ. Mẫu cấy trải từ nước rửa rễ

được sử dụng làm đối chứng. Các khuẩn lạc xuất hiện ở mẫu rễ đã khử trùng về mặt và nghiền nhỏ, nhưng không có trong mẫu nước rửa rễ được thu nhận và tiếp tục tinh sạch cho tới khi có được chủng thuần khiết.

Khuẩn lạc của chủng VY03 có hình tròn, đường kính 0,5 – 1 cm, màu trắng đục, lồi ở giữa. Chủng VY03 sau đó được nghiên cứu chi tiết về các đặc điểm hình thái tế bào, vị trí phân loại dựa trên trình tự 16S rADN, các yếu tố ảnh hưởng đến sinh trưởng (nguồn cacbon, nguồn nitơ, pH, nhiệt độ, độ muối), khả năng đối kháng với một số loài vi sinh vật gây bệnh ở thực vật và khả năng xâm nhập rễ lúa trong các thí nghiệm *in planta*.

Chủng VY03 phân lập được có trình tự 16S rADN có chiều dài 1431 bp, có độ tương đồng cao nhất với loài *Bacillus velezensis* là 99,87 và được đăng ký trên GenBank với mã số MT256303 (SEQ ID NO: 01). Chủng VY03 được định danh là *Bacillus velezensis* VY03.

Chủng *Bacillus velezensis* VY03 có các đặc tính sau đây:

- Có khả năng kháng nhiều loài vi sinh vật gây bệnh thực vật, gồm vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) gây bệnh bạc lá lúa, vi khuẩn *Dickeya zeae* (Dz) gây bệnh thối gốc, vi nấm *Alternaria alternata* gây bệnh đốm lá, vi nấm *Colletotrichum gloeosporioides* gây bệnh thán thư ở thực vật;

- Có khả năng xâm nhập tốt vào rễ lúa.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Phân lập chủng VY03 từ rễ lúa

A. Thu và xử lý mẫu

Cây lúa khỏe mạnh (giống Bắc Thơm) trong vùng nhiễm bệnh bạc lá lúa ở Thái Bình được đưa về phòng thí nghiệm để phân lập vi khuẩn nội sinh.

* Khử trùng bề mặt:

- Rửa sạch cây lúa dưới vòi nước máy và cắt lấy phần rễ ở vị trí dưới cuống rễ
- Lần lượt đưa mẫu rễ qua các bước khử trùng bề mặt như sau:
 - + Ngâm trong cồn 75% trong 2 phút, rửa sạch bằng nước vô trùng.
 - + Ngâm trong dung dịch hypoclorit 50% (7% Cl hoạt động) trong 2 phút, rửa sạch bằng nước vô trùng.
 - + Ngâm trong cồn 75% trong 1 phút, rửa sạch bằng nước vô trùng.
 - + Rửa sạch bằng nước vô trùng 5 lần

Kiểm tra mức độ sạch của mẫu bằng cách cấy 0,1 mL nước rửa cuối và một phần mẫu nguyên sau khi rửa lên đĩa môi trường TSA 1/6 (Bảng 2) trong 60 phút trước khi tiến hành nghiền mẫu. Kiểm tra sinh trưởng của vi khuẩn sau 72 giờ.

Bảng 2- Thành phần môi trường TSA 1/6

TT	Thành phần	Nồng độ (g/L)
1	Trypton	2,5
2	Soyton	0,83
3	NaCl	0,83
4	Aga	15

B. Phân lập và tinh sạch

- Dùng chày và cối sứ vô trùng nghiền mẫu rễ đã được khử trùng bề mặt trong 10 ml đệm PBS 1× (NaCl 8 g/L; KCl 0,2 g/L; Na₂HPO₄ 1,42 g/L; KH₂PO₄ 0,24 g/L).
- Cấy trái dịch nghiền rễ trên môi trường thạch đĩa TSA 1/6 ở các nồng độ pha loãng khác nhau.
- Nuôi ở nhiệt độ 28 – 30°C, 48 giờ.

Các khuẩn lạc có hình tròn, màu trắng đục được cấy chuyển sang các đĩa TSA 1/6 mới thêm 1-2 lần để đảm bảo thu được chủng thuần khiết đồng nhất về hình dạng tế bào khi được quan sát dưới kính hiển vi.

Ví dụ 2: Nghiên cứu đặc điểm hình thái của chủng VY03

Quan sát hình thái khuẩn lạc: Hình thái khuẩn lạc của chủng VY03 được quan sát trên môi trường đĩa thạch TSA sau 24 h nuôi cấy có hình tròn kích thước 0,5 – 1 cm, màu trắng đục, lõi ở giữa (Hình 1A).

Quan sát tế bào trên kính hiển vi phản pha: Lấy 1 mL dịch nuôi vi khuẩn thu ở pha log của chu kỳ sinh trưởng, ly tâm 10.000 vòng/phút trong thời gian 10 phút tại 4°C. Sinh khối tế bào sau đó được hòa trong 100 µL nước muối sinh lý vô trùng. Lấy 20 – 30 µL dịch tế bào đưa lên lam kính phủ thạch (2%) và chụp ảnh trên kính hiển vi phản pha (Axiostar Plus, Zeiss) vật kính 40× bằng camera chuyên dụng (Axiocam ICc3, Zeiss). Chủng VY03 gồm các tế bào que, tròn hai đầu, kích thước 10,7–14,3 × 36–65 µm (Hình 1B).

Ví dụ 3: Xác định vị trí phân loại của chủng VY03 dựa trên so sánh trình tự 16S rADN

A. Tách ADN hệ gen của chủng VY03: Sử dụng phương pháp do Marmur mô tả (Marmur, 1961), gồm các bước như sau:

- 1 ml dịch tế bào được ly tâm 5000 – 10 000 vòng/phút trong 5 phút, sau đó rửa với 1 ml đệm TE (pH 8) rồi hòa tế bào trong 0,5 mL 5 mM EDTA (pH 8).
- Thêm 50 µL lysozym (40 mg/mL), trộn đều và ủ trong bể ổn nhiệt ở 37°C trong 1 giờ.

- Thêm 50 μL SDS (20%) và 50 μL proteinaza K (4 mg/mL), trộn đều và ủ trong bể ổn nhiệt ở 55°C trong 1 giờ.
- Thêm 400 μL PCI, trộn đều trong 1 – 3 phút, ly tâm 13000 vòng/phút ở 4°C trong 15 phút. Chuyển lớp dịch trong ở trên sang ống eppendorf mới. Lặp lại bước vừa rồi thêm 1 lần.
- Chuyển lớp dịch trong ở trên sang ống eppendorf mới. Thêm 1/10 thể tích dung dịch 3M Na-axetat (độ pH = 5,2) và 2 lần thể tích dung dịch 2-propanol (để lạnh –20°C), trộn đều và giữ ở –20°C trong 1 giờ.
- Ly tâm 13000 vòng/phút ở 4°C trong 15 phút, chất dịch trên để thu kết tủa ADN.
- Rửa ADN trong ethanol 70% (để lạnh –20°C) trong 1 phút, ly tâm 13000 vòng/phút, đổ cồn, làm khô ADN ở nhiệt độ phòng.
- Hòa tan ADN trong 50 μL MQ vô trùng (hoặc đệm TE) và bảo quản tại –20°C cho các thí nghiệm tiếp theo.

B. Khuếch đại trình tự 16S rADN trong phản ứng PCR

ADN hệ gen sau đó được sử dụng làm khuôn để khuếch đại các trình tự 16S rADN sử dụng cặp mồi 27F (5'–AGAGTTTGATCCTGG CTCAG–3') và 1492R (5'–GGTTACCTTGTTACGACTT–3') với chu trình nhiệt như sau: 94°C 3 phút, (94°C 30 giây, 55°C 45 giây, 72°C 1,5 phút) $\times$ 35 chu kỳ, 72°C 7 phút, kết thúc 4°C (Weisburg *et al.*, 1991).

Sản phẩm PCR của 16S rADN (~1500 bp) sau đó được tinh sạch bằng PCR purification Kit (Bioneer, Hàn Quốc) rồi tiến hành phản ứng đọc trình tự với ABI Prism BigDye Terminator cycle sequencing kit và đọc trình tự trên máy tự động 3110 Avant Applied Biosystems.

Trình tự sau đó được phân tích, so sánh với trình tự 16S rADN của các loài có liên quan hiện đã công bố trên ngân hàng dữ liệu GenBank sử dụng phần mềm BLAST Search. Cây phân loại được dựng theo phương pháp neighbour-joining (Hình 2) (Saitou, Nei, 1987), trong đó định dạng cây được tiến hành dựa trên 1000 phép so sánh đa chiều (Felsenstein, 1985). Kết quả thu được trình tự 16S rDNA của chủng VY03 dài 1431 bp, có độ tương đồng cao nhất với loài *Bacillus velezensis* là 99,87 và được đăng ký trên GenBank với mã số MT256303 (SEQ ID NO: 01).

Ví dụ 4: Nghiên cứu đặc tính sinh trưởng của chủng *Bacillus velezensis* VY03

Đặc tính sinh trưởng của chủng *B. velezensis* VY03 được nghiên cứu trong môi trường Landy (Bảng 4, Wu *et al.*, 2015). Các điều kiện sinh trưởng của chủng VY03 được nghiên cứu bao gồm: nguồn cacbon (glucoza, sucroza, acetat, methanol, ri đường),

nguồn nitơ (cao nấm men, cao thịt, pepton, casein), pH (5-9), nhiệt độ (25-42°C), độ mặn (NaCl 1-20 g/L). Sinh trưởng của chủng VY03 được đánh giá thông qua thay đổi của mật độ quang đo ở bước sóng 600 nm (OD_{600}) sau 40 h nuôi cấy (Hình 3).

Bảng 4 - Thành phần môi trường Landy (Wu *et al.*, 2015)

TT	Thành phần	Hàm lượng (g/L)
1	Glucosa	20
2	KH_2PO_4	1
3	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5
4	$FeSO_4 \cdot 6H_2O$	0,0012
5	$CuSO_4 \cdot 7H_2O$	0,0016
6	$MnSO_4$	0,0004
7	L-glutamic axit	1
8	Cao nấm men	10
10	Nước cất	Đủ 1 lít

Kết quả nghiên cứu (Hình 3) cho thấy, chủng VY03 sinh trưởng tối ưu trong môi trường Landy có nguồn cacbon là sucroza, nguồn nitơ là cao thịt, độ muối 10 g/L, pH 7 và nhiệt độ 37°C. Tuy nhiên, điều kiện tối ưu để chủng VY03 tạo hoạt tính kháng các vi sinh vật gây bệnh thực vật là môi trường Landy, pH7, nguồn cacbon là glucosa (20 g/L), nguồn nitơ là cao nấm men (10 g/L), độ muối 10 g/L ở điều kiện 25°C, lắc 160 vòng/phút trong 40 giờ.

Ví dụ 5: Nghiên cứu khả năng đối kháng của chủng *Bacillus velezensis* VY03 đối với các loài vi sinh vật gây bệnh thực vật

- Chủng VY03 được nuôi trong môi trường Landy dịch thể ở điều kiện tối ưu để tạo hoạt tính kháng vi sinh vật gây bệnh thực vật.
- Ly tâm dịch nuôi cấy trong các ống falcon 50 mL ở 4000 vòng/phút trong 20 phút, thu dịch trên và bỏ sinh khối.
- Bổ sung dung dịch etyl axetat vào dịch chiết theo tỷ lệ 1:1, lắc đều 10 phút, để lắng 10 phút (lặp lại bước lắc và để lắng 3 lần), thu phần dịch nổi.
- Sử dụng máy cô quay để bay hơi dung môi (chế độ vận hành như sau: Nhiệt độ dưới 10°C, nhiệt độ của bể nước 30°C, thời gian 20 phút cho 100 mL dung môi). Thu lại cặn hoạt chất

A. Xác định hoạt tính kháng vi khuẩn gây bệnh thực vật khuẩn của chủng VY03:

- Chuẩn bị dịch nuôi của các chủng vi khuẩn kiểm định bao gồm: *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo, gây bệnh bạc lá lúa) (Môi trường PDA: Khoai tây 200 g/L, sucroza 20 g/L), *Dickeya zae* (Dz, gây bệnh thối rễ) (Môi trường TSB 1/2: trypton

8,5 g/L, soyton 1,5 g/L, glucoza 1,25 g/L, NaCl 2,5 g/L) và *Pseudomonas syringae* (Môi trường LB: Trypton 10 g/L, cao nấm men 5 g/L, NaCl 5 g/L).

- Hòa tan hoạt chất tách chiết thô của chủng VY03 trong dung môi DMSO (tỉ lệ 1/50 so với thể tích mẫu ban đầu).
- Môi trường thạch (phù hợp với từng loại vi khuẩn kiểm định: PDA cho *X. oryzae*, TSA 1/2 cho *D. zaeae*, LB cho *P. syringae*) được khử trùng, sau đó để nguội xuống nhiệt độ 40°C rồi bổ sung dịch nuôi chủng vi khuẩn kiểm định theo tỷ lệ 1% (v/v), lắc nhẹ và đổ vào đĩa petri (25 mL/đĩa) rồi để đông. Tiến hành đục các lỗ thạch đường kính 5 mm trên đĩa vi khuẩn kiểm định, sau đó nhỏ 40 µL/lỗ dịch chiết thô từ chủng VY03 và ủ các đĩa thử hoạt tính ở nhiệt độ 30°C trong 24 giờ. Đối chứng âm là dung môi DMSO.
- Quan sát, đọc kết quả và chụp ảnh đĩa thử hoạt tính sau 24 giờ. Khả năng kháng khuẩn của chủng VY03 được đánh giá theo kích thước vùng kháng khuẩn (ΔD) ở xung quanh lỗ thạch, tính theo công thức: $\Delta D = D - d$

Trong đó: D là đường kính vùng kháng khuẩn (mm)

d là đường kính lỗ thạch (mm)

B. Xác định hoạt tính kháng nấm gây bệnh thực vật của chủng VY03:

- Chuẩn bị đĩa petri chứa môi trường PDA (khoai tây 200 g, glucoza 20 g, aga 15 g, nước cất 1 L). Lấy 1 thỏi thạch (đường kính 5 mm) từ khuẩn lạc nấm kiểm định (*Alternaria alternata*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Phytophthora capsici*) đặt vào giữa đĩa petri theo tư thế úp để sợi nấm và bào tử tiếp xúc với môi trường.
- Đục lỗ thạch cách thỏi nấm 1,5 cm và nhỏ 40 µL dịch chiết thô từ chủng VY03 vào lỗ thạch, ủ đĩa ở 30°C trong 3 ngày. Đối chứng là lỗ thạch bổ sung 40 µL dung môi DMSO.

- Khả năng kháng nấm kiểm định của chủng VY03 được đánh giá theo tỷ lệ phần trăm vùng khuẩn lạc nấm bị thu nhỏ ở phía gần lỗ thạch chứa dịch chiết vi khuẩn.

Kết quả thu được về hoạt tính kháng vi khuẩn gây bệnh thực vật là chủng *B. velezensis* VY03 có hoạt tính đối kháng tốt với *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* gây bệnh bạc lá lúa (đường kính vòng kháng khuẩn là 25,5 mm $\pm$ 0,5 mm) và *Dickeya zaeae* gây bệnh thối gốc (đường kính vòng kháng khuẩn là 16,5 mm $\pm$ 0,5 mm), nhưng không có khả năng đối kháng với loài *Pseudomonas syringae* (Hình 4).

Về hoạt tính kháng nấm gây bệnh thực vật, chủng VY03 cũng có khả năng ức chế mạnh đối với loài *Alternaria alternata* gây bệnh đốm lá (tỷ lệ giảm kích thước khuẩn lạc nấm là 24,28% $\pm$ 3,3) và *Colletotrichum gloeosporioides* gây bệnh thán thư (tỷ lệ giảm kích thước khuẩn lạc nấm là 31,7% $\pm$ 4,4), nhưng không có khả năng đối kháng *Phytophthora capsici* gây bệnh thối nhũn gốc (Hình 5).

Ví dụ 6: Nghiên cứu khả năng xâm nhập rễ lúa của chủng *Bacillus velezensis* VY03

- Hạt thóc (giống Bắc Thơm) được khử trùng bề mặt bằng cách ngâm trong dung dịch NaClO 5% trong 30 phút và rửa sạch bằng nước cất vô trùng 5 lần. Sau đó, hạt được đặt trong đĩa Petri chứa dung dịch Hoagland để nảy mầm ở 30°C trong 1 tuần ở điều kiện tránh ánh sáng.
- Cây con 1 tuần tuổi được trồng vào ống falcon 50 mL chứa 35 mL môi trường Hoagland 1/2 (Bảng 5), thạch 0,3% ở điều kiện chiếu sáng 16 h, tối 8 h, độ ẩm 80%, 30°C. Cây được tưới 2 ngày/lần bằng nước cất vô trùng.
- Chủng *Bacillus velezensis* VY03 được gây đột biến kháng kháng sinh bằng cách cấy trải trên môi trường TSA 1/6 chứa 50 µg/mL Rifamicin, thu nhận thể đột biến VY03 Rf-r.
- Tạo dịch nuôi thể đột biến VY03 Rf-R có OD₆₀₀ = 0,3 và nhúng toàn bộ phần rễ của cây lúa 2 tuần tuổi trong dịch nuôi trong 60 phút.
- Trồng lại cây trong các ống Falcon 50 mL chứa môi trường Hoagland 1/2 thạch 0,3% mới trong điều kiện chiếu sáng, độ ẩm, nhiệt độ như trên.
- Sau 6 ngày, 6 cây lúa thí nghiệm được thu hoạch, rễ được rửa nhiều lần với nước cất và để khô trong không khí 10 phút.
- Xác định số lượng tế bào ở bề mặt rễ (epiphytic): Rễ của mỗi cây được cân và rửa trong 5 mL đệm PBS 1× bằng cách vortex 5 lần, mỗi lần 30 s. Nước rửa này được pha loãng đến 10⁻³ và cấy trải trên môi trường thạch TSA 1/6 chứa 50 µg/mL Rifamicin, ủ ở 28°C trong 3 ngày nhằm đếm mật độ tế bào chủng VY03 trên bề mặt rễ.
- Sau khi rửa trong dung dịch PBS 1×, rễ lúa được khử trùng bề mặt theo quy trình như sau: ngâm cồn 75% trong 2 phút, rửa lại bằng nước cất vô trùng, ngâm trong dung dịch hypoclorit 50% (7% active Cl) trong 2 phút, rửa lại bằng nước cất vô trùng, cuối cùng ngâm trong cồn 75% trong 1 phút, rửa lại bằng nước cất vô trùng 5 lần. Nước rửa cuối được cấy trải trên đĩa thạch TSA 1/6 chứa 50 µg/mL Rifamicin để kiểm tra quy trình khử trùng bề mặt.
- Xác định số lượng tế bào nội sinh (endophytic): Phần rễ đã khử trùng bề mặt được nghiền trong 10 mL đệm PBS 1×, sau đó 100 µL dịch nghiền rễ ở các độ pha loãng 10⁰ và 10⁻¹ được cấy trải trên đĩa thạch TSA 1/6 chứa 50 µg/mL Rifamicin ủ ở 28°C trong 3 ngày để đếm số lượng tế bào chủng VY03 trong rễ.

Bảng 5 - Thành phần dung dịch Hoagland (Hoagland *et al.*, 1950)

Thành phần	Dung dịch mẹ	Thể tích dung dịch mẹ để pha dung dịch Hoagland 1×
KNO ₃	1M	6 mL
Ca(NO ₃) ₂	1M	4 mL
NH ₄ H ₂ PO ₄	1M	1 mL
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1M	2 mL
Fe-EDTA	1000 mg Fe/L	5 mL
Vi lượng (Bảng 6)		1 mL
H ₂ O		Tối 1 lít

Bảng 6 - Thành phần vi lượng (Hoagland *et al.*, 1950)

Thành phần	Hàm lượng
H ₃ BO ₃	2,86 g
MnCl ₂ ·4 H ₂ O	1,81 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,22 g
CuSO ₄ ·5 H ₂ O	0,08 g
MoO ₃ ·H ₂ O 85%	0,02 g
H ₂ O	Tối 1 lít

Kết quả (Hình 6) cho thấy số lượng tế bào chủng VY03 trên bề mặt rễ là $2,5 \times 10^3$ CFU/g rễ, số lượng tế bào chủng VY03 xâm nhập vào bên trong rễ lúa đạt $8,3 \times 10^5$ (CFU/g rễ). Không có tế bào trong nước rửa rễ, chứng tỏ quy trình khử trùng bề mặt đã loại hoàn toàn các tế bào sinh trưởng trên bề mặt rễ. Như vậy, chủng *B. velezensis* VY03 có khả năng xâm nhập rễ rất tốt, là đặc tính rất quan trọng giúp chủng có thể tương tác tốt đối với cây chủ trong việc kiểm soát sự xâm nhập của các vi sinh vật gây bệnh.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Kiểm soát sinh học trong nông nghiệp là hướng phát triển bền vững nhằm làm tăng chất lượng của sản phẩm nông nghiệp, đồng thời giảm thiểu ảnh hưởng tới môi trường do thay thế các hóa chất bảo vệ thực vật bằng các hoạt chất sinh học từ vi sinh vật hay các loài thực vật khác. Chủng *Bacillus velezensis* VY03 được mô tả trong sáng chế này có phổ kháng rộng đối với một số loài vi khuẩn và vi nấm gây bệnh phổ biến ở thực vật, đồng thời có khả năng xâm nhập tốt vào rễ lúa và thực hiện phương thức sống nội sinh. Với các đặc tính sinh học quý này, chủng *Bacillus velezensis* VY03 có tiềm năng ứng dụng cao trong kiểm soát sinh học các bệnh do nấm và vi khuẩn gây ra ở cây trồng. Do có khả năng xâm nhập vào trong rễ nên hiệu quả phòng chống bệnh của chủng VY03 sẽ cao và bền vững hơn so với các chủng chỉ bám dính trên bề mặt rễ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

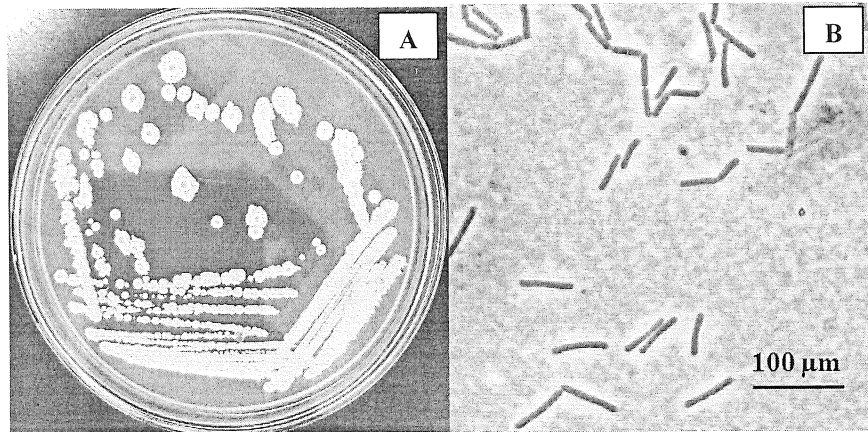
1. An SQ, Potnis N, Dow M, Vorhölter FJ, He YQ, Becker A, et al. (2019) Mechanistic insights into host adaptation, virulence and epidemiology of the phytopathogen *Xanthomonas*. *FEMS Microbiol. Rev.* 44(1):1-32.
2. Baysal F, Benitez MS, Kleinhenz M, Miller SA, McSpadden Gardener BB (2008) Field management effects on damping-off and early season vigor of crops in a transitional organic cropping system. *Phytopathol* 98: 562-570.
3. Cannon PF, Bridge PD and Monte E (2000) Linking the past, present and future of *Colletotrichum* systematics. In: *Colletotrichum – Host Specificity, Pathology and Host-Pathogen Interaction* (eds. D Prusky, S Freeman, MB Dickman). APS Press, St Paul, Minnesota. pp. 1-20.
4. Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
5. Hoagland DR, Arnon DI (1950) The water-culture method for growing plants without soil. *Circular. California agricultural experiment station, 347* (2nd ed.).
6. Huang N, Angeles E, Domingo J, Magpantay G, Singh S, Zhang G, Kumaravadivel N, Bennett J, Khush G (1997) Pyramiding of bacterial blight resistance genes in rice: marker-assisted selection using RFLP and PCR. *TAG. Theoret. Appl. Gen.* 95(3):313-320.
7. Kennelly MM, Cazorla FM, de Vicente A, Ramos C, Sundin GW (2007) *Pseudomonas syringae* diseases of fruit trees: Progress toward understanding and control. *Plant Disease.* 91 (1): 4–17.
8. Kumar A, Hunjan M, Kaur H, Dhillon H, Singh P (2017) Biochemical responses associated with resistance to bacterial stalk rot caused by *Dickeya zae* in maize. *J. Phytopathol.* 165(11-12):822-832.
9. Lugtenberg BJJ (2015) Introduction to plant-microbe-interactions. In: Lugtenberg BJJ (ed.) *Principles of plant-microbe interactions*. Microbes for Sustainable Agriculture. Springer, Berlin, pp 1–2.
10. Mansfield J (2012) Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology". *Mol. Plant Pathol.* 13 (6): 614–29.
11. Marmur J (1961) A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.* 3: 208-218.

12. Mew TW, Alvarez AM, Leach JE, Swings J (1993). "Focus on bacterial blight of rice". *Plant Disease*. 77: 5–13.
13. Nagrale DT, Gaikwad AP, Goswami S, Sharma L (2012) Fungicidal management of *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler causing blight of gerbera (*Gerbera jamesonii* H. Bolus ex J.D. Hook). *J. Appl. Nat. Sci.* 4 (2): 220-227
14. Nelson LW, Summerll BA (1989) Variability and stability of morphological characters in *Fusarium oxysporum*. *Mycologia* 81: 811–818.
15. O'Brien PA (2017) Biological control of plant diseases. *Aust. Plant Pathol.* 46(4): 293 – 304.
16. Potnis N, Timisina S, Strayer-Scherer A *et al.* (2015) Bacterial spot of tomato and pepper: Diverse *Xanthomonas* species with a wide variety of virulence factors posing a worldwide challenge. *Mol. Plant Pathol.* 16(9):907 – 920.
17. Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
18. Toth I, van der Wolf J, Saddler G, Lojkowska E, Hélias V, Pirhonen M, Tsrör Lahkim L, Elphinstone J (2011) *Dickeya* species: an emerging problem for potato production in Europe. *Plant Pathol.* 60(3):385-399.
19. Ura H, Furuya N, Liyama K, Hidaka M, Tsuchiya K, Matsuyama N (2006) *Burkholderia gladioli* associated with symptoms of bacterial grain rot and leaf-sheath browning of rice plants. *J. Gen. Plant Pathol.* 72:98–103
20. Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173, 697-703.
21. Wu L, Wu H, Chen L, Yu X, Borriss R, Gao X (2015) Difficidin and bacilysin from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 have antibacterial activity against *Xanthomonas oryzae* rice pathogens. *Sci. Rep.* 5:12975.
22. Zhang J, Shen H, Pu X, Lin B, Hu J (2014) Identification of *Dickeya zeae* as a causal agent of bacterial soft rot in banana in China. *Plant Disease* 98(4):436-442.

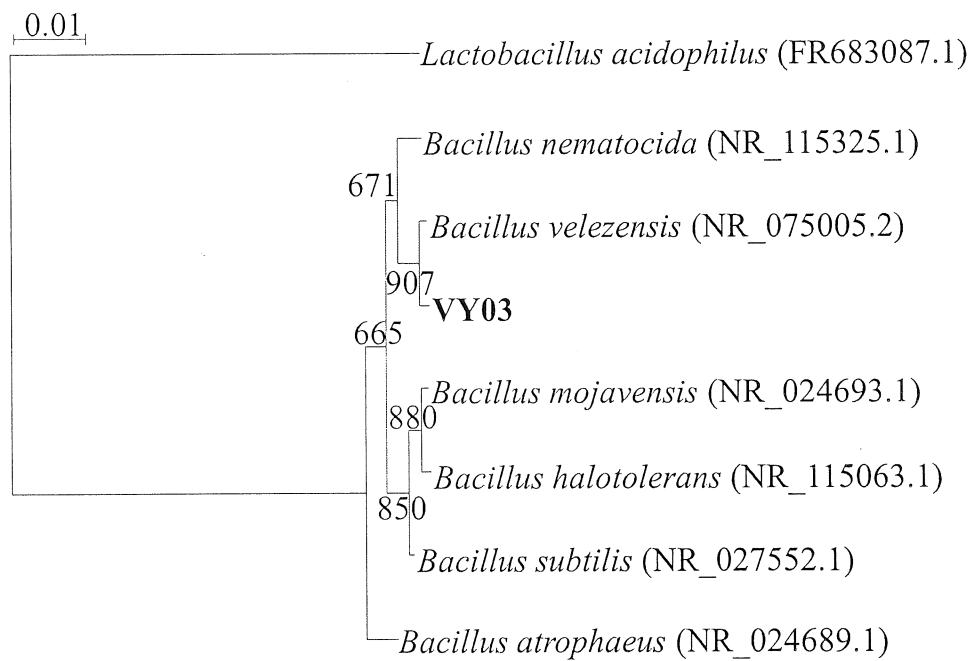
YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chủng vi khuẩn *Bacillus velezensis* VY03 thuần khiết về mặt sinh học có trình tự 16S rADN được đăng ký tại GenBank với số hiệu MT256303 có trình tự SEQ ID NO: 01 và có các đặc tính sinh học như sau:

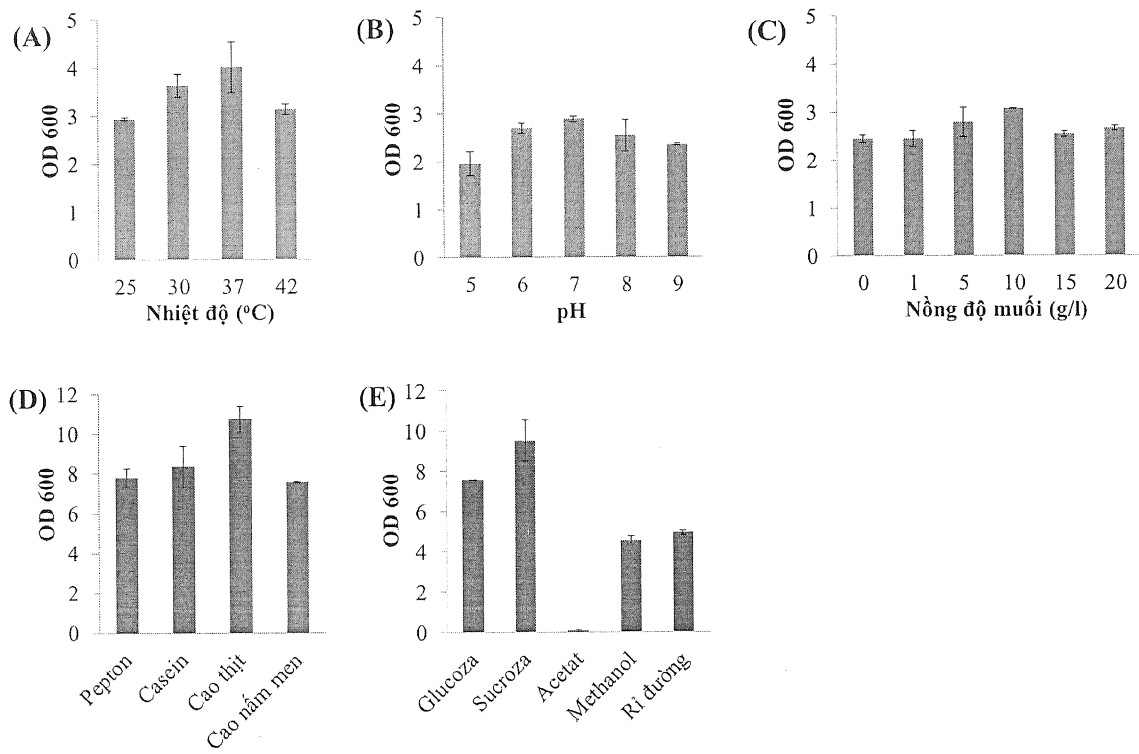
- Có khả năng kháng nhiều loài vi sinh vật gây bệnh thực vật, gồm vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) gây bệnh bạc lá lúa, vi khuẩn *Dickeya zeae* (Dz) gây bệnh thối gốc, vi nấm *Alternaria alternata* gây bệnh đốm lá, vi nấm *Colletotrichum gloeosporioides* gây bệnh thán thư ở thực vật; và
- Có khả năng xâm nhập tốt vào rễ lúa, đạt $8,3 \times 10^5$ CFU/g rễ, sau 6 ngày tiếp xúc và sinh trưởng nội sinh.



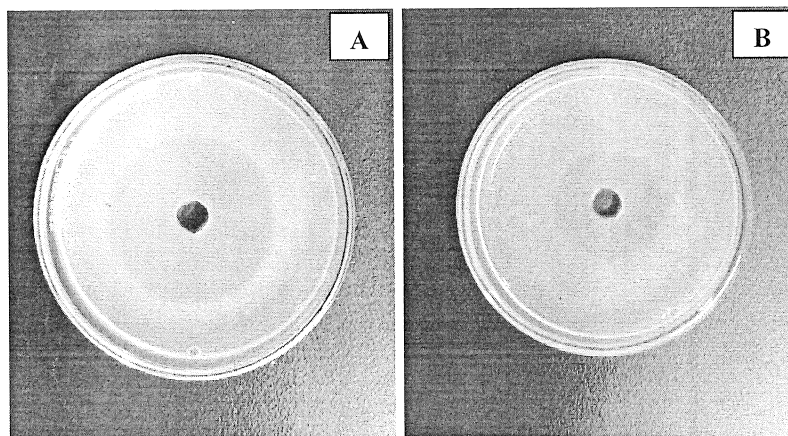
Hình 1



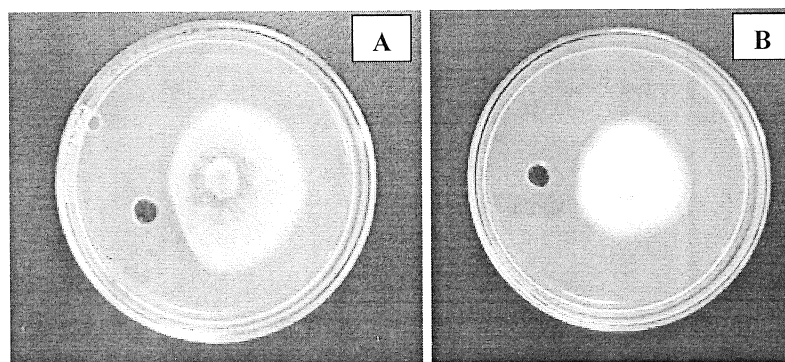
Hình 2



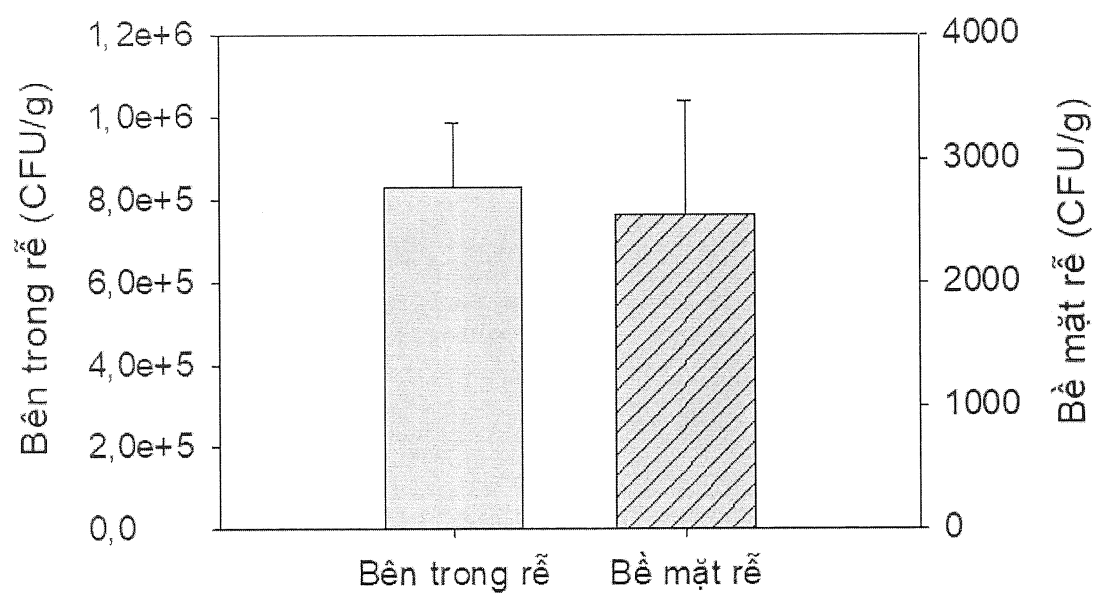
Hình 3



Hình 4



Hình 5



Hình 6

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học – Đại học Quốc gia Hà Nội

<120> **CHŨNG VI KHUẨN NỘI SINH RỄ LÚA *Bacillus velezensis* VY03 CÓ HOẠT TÍNH ĐỐI KHÁNG PHỔ RỘNG VỚI VI SINH VẬT GÂY BỆNH THỰC VẬT ĐỂ ỨNG DỤNG TRONG KIỂM SOÁT SINH HỌC**

<160> 1

<210> 1

<211> 1431

<212> rADN

<213> *Bacillus velezensis*

<400> 1

```

1  ctcaggacga acgctggcgg cgtgcctaata acatgcaagt cgagcggaca gatgggagct
61  tgctccctga tgttagcggc ggacgggtga gtaacacgtg ggtaacctgc ctgtaagact
121  gggataactc cggaaccg gggctaatac cggatggttg tctgaaccgc atggttcaga
181  cataaaagggt ggcttcggct accacttaca gatggaccgc cggcgatta gctagttggt
241  gaggtaacgg ctcaccaagg cgacgatgcg tagccgacct gagagggtga tcggccacac
301  tgggactgag acacggccca gactcctacg ggaggcagca gtagggaatc ttccgcaatg
361  gacgaaagtc tgacggagca acgcgcgtg agtgatgaag gttttcggat cgtaaagctc
421  tgttgttagg gaagaacaag tgccgttcaa ataggcgccg accttgacgg tacctaacca
481  gaaagccacg gctaactacg tgccagcagc cgcgtaata cgtagggtgg aagcgttgct
541  cggaattatt gggcgtaaag ggctcgcagg cggtttctta agtctgatgt gaaagcccc
601  ggctcaaccg gggagggtca ttggaaactg gggaaactga gtgcagaaga ggagagtggg
661  attccacgtg tagcgggtga atgcgtagag atgtggagga acaccagtgg cgaaggcgac
721  tctctggtct gtaactgacg ctgaggagcg aaagcgtggg gagcgaacag gattagatac
781  cctggtagtc cacgccgtaa acgatgagtg ctaagtgtta gggggtttcc gcccttagt
841  gctgcagcta acgcattaag cactccgcct ggggagtagc gtcgcaagac tgaaactcaa
901  aggaattgac gggggccgc acaagcgtg gagcatgtg tttaattcga agcaacgcga
961  agaaccttac caggtcttga catcctctga caatcctaga gataggacgt ccccttcggg
1021  ggcagagtga caggtggtgc atggttgctg tcagctcgtg tcgtgagatg ttgggttaag
1081  tcccgcaacg agcgcaacc ttgatcttag ttgccagcat tcagttgggc actctaaggt
1141  gactgccggt gacaaaccg aggaaggtgg ggatgacgac aaatcatcat gcccttatg
1201  acctgggcta cacacgtgct acaatggaca gaacaaagg cagcgaaacc gcgaggttaa
1261  gccaatccca caaatctgtt ctcagttcgg atcgagctc gcaactcgac tcgctgaagc
1321  tggaatcgct agtaatcgcg gatcagcatg ccgcggtgaa tacgttcccc ggccttgtag
1381  acaccgcccg tcacaccag agagtttgta acaccgaag tcggtgaggt a

```