

Đánh giá khả năng tiết chitinase ngoại bào và đối kháng nấm *Pyricularia oryzae* của vi khuẩn và xạ khuẩn phân lập từ đất vùng rễ lúa ở tỉnh Kiên Giang

Evaluation of chitinase production ability to antagonize *Pyricularia Oryzae* of bacteria and actinomycete strains isolated from rice root soil in Kien Giang Province

Đinh Anh Hòa^{1*}, Trần Thị Phấn¹, Trần Thùy Trang¹, Nguyễn Thị Ánh Nguyệt¹,
Nguyễn Thị Thùy Dương¹, Nguyễn Hải An¹, Lê Thị Mai Châm¹

¹Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

*Tác giả liên hệ, Email: dinhanhhoa.ahi@gmail.com

THÔNG TIN

DOI: 10.46223/HCMCOUJS.
tech.vi.19.2.3507.2024

Ngày nhận: 20/06/2024

Ngày nhận lại: 09/08/2024

Duyệt đăng: 28/08/2024

Từ khóa:

bacillus sp., bệnh đạo ôn;
pyricularia oryzae;
streptomyces carpinensis;
vi sinh vật vùng rễ

Keywords:

bacillus sp.; rice blast disease;
pyricularia oryzae;
streptomyces carpinensis;
rhizosphere microorganisms

TÓM TẮT

Nấm *Pyricularia oryzae* là một trong những đối tượng gây bệnh đạo ôn ở cây lúa. Cơ chế lây nhiễm là xâm nhiễm trực tiếp qua màng sinh chất, tiết ra độc tố tế bào và hình thành tế bào truyền nhiễm chuyên gây bệnh cho cây lúa ở một số loài (Muni & Nadarajah, 2014). Vì vậy, chế phẩm chứa các hoạt chất sinh học từ vi sinh vật có khả năng kháng nấm gây bệnh và không gây hại cho con người với môi trường, là biện pháp đầy tiềm năng để quản lý nấm gây bệnh trên lúa. Thuộc nhóm vi sinh vật có lợi, vi khuẩn và xạ khuẩn vùng rễ được biết đến là nhóm ứng dụng khả năng đối kháng trong việc phòng trị bệnh do nấm gây ra. Nghiên cứu này đã sàng lọc được 11 chủng xạ khuẩn và 10 chủng vi khuẩn có hoạt tính chitinase cao, từ 09 mẫu đất vùng rễ lúa tại tỉnh Kiên Giang. Trong đó, chủng B.KG4.1 và S.KG1.1 có tiềm năng ức chế nấm *Pyricularia oryzae* mạnh bằng phương pháp đồng nuôi cấy với hiệu suất đối kháng lần lượt đạt 90.9% và 87.41% sau 15 ngày. Hiệu suất đối kháng với nấm *Pyricularia oryzae* của các chủng vi khuẩn có mối tương quan tỷ lệ thuận với khả năng tiết chitinase ngoại bào của chúng. Dựa trên đặc điểm mô tả hình thái và giải trình tự gen 16S-rRNA, chủng S.KG1.1 được xác định là *Streptomyces carpinensis* và chủng B.KG4.1 thuộc nhóm *Bacillus amyloliquefaciens*. Với những đặc điểm trên, *Bacillus amyloliquefaciens* B.KG4.1 và *Streptomyces carpinensis* S.KG1.1 có tiềm năng khai thác trong sản xuất chế phẩm chứa các hoạt chất sinh học trong phòng trừ nấm *Pyricularia oryzae* gây bệnh trên lúa.

ABSTRACT

The fungus *Pyricularia oryzae* is one of the agents causing rice blast disease. The mechanism of the infection is directing penetration through the plasma membrane, secreting cytotoxins, and forming infectious cells specialized for causing

disease in rice plants in some species (Muni & Nadarajah, 2014). Therefore, biological products containing microorganisms that can antagonize fungal pathogens and are environmentally friendly, are promising measure to control this disease. Among the beneficial microorganisms, bacteria and rhizosphere actinomycetes are known as potential antagonistic groups in disease prevention caused by fungi. This study screened 11 actinomycetes and 10 bacteria with high chitinase activity from 09 rice rhizosphere soil samples in Kien Giang province. Among them, strains B.KG4.1 and S.KG1.1 have strong potential to inhibit *Pyricularia oryzae* fungus by co-culture method with antagonistic effectiveness reaching 90.9% and 87.41% after 15 days, respectively. Antagonistic activity to fungal pathogens of bacterial strains was positively correlated with their ability to secrete extracellular chitinase. Based on the morphological characteristics and 16S-rRNA gene sequencing, strain S.KG1.1 was identified as *Streptomyces carpinensis* and strain B.KG4.1 belongs to the *Bacillus amyloliquefaciens* group. With these characteristics, *Bacillus amyloliquefaciens* B.KG4.1 and *Streptomyces carpinensis* S.KG1.1 have the potential to be exploited in the production of biological products to control the fungus *Pyricularia oryzae* causing rice blast disease.

1. Giới thiệu

Cây lúa gạo (*Oryza sativa* L.) thường được trồng ở khu vực Đồng Bằng Sông Cửu Long (ĐBSCL) và là một trong những cây trồng cung cấp dinh dưỡng quan trọng của nước ta. Trong thời gian gần đây, bệnh đạo ôn trên cây lúa đã trở nên phức tạp hơn tại tỉnh Kiên Giang, ảnh hưởng đến năng suất và sản lượng lúa, gạo (P. T. T. Nguyen, 2016; Vu & ctg., 2020). Nấm *Pyricularia oryzae* Cav. gây bệnh đạo ôn là trong những dịch hại nghiêm trọng nhất trên cây lúa ở ĐBSCL (Nguyen & Nguyen, 2016). Bệnh đạo ôn trên cây lúa (*Pyricularia oryzae*) thường xuất hiện trên đốt thân, lá, cổ bông và gây hại ở các quá trình sinh trưởng của cây lúa (Muni & Nadarajah, 2014; Nguyen & Nguyen, 2016). Nhiều giống lúa cải tiến có chứa gen kháng bệnh được đưa vào canh tác, nhưng hầu như khả năng kháng bệnh của các giống lúa này chỉ kéo dài hơn 03 năm, bởi vì các nấm gây bệnh đạo ôn dễ phát sinh loài có độc tính mới (Fukata, Erbon, & Kobayashi, 2007). Do đó, một hướng tiếp cận khác là chế phẩm chứa hoạt chất sinh học từ các vi sinh vật có tiềm năng kiểm soát dịch bệnh và vừa thân thiện hơn với con người, môi trường. Trong nhóm vi sinh vật có ích được ứng dụng trong quản lý dịch hại trên cây trồng, vi khuẩn và xạ khuẩn vùng rễ được biết đến như nhóm vi sinh vật có tiềm năng ức chế và phòng trừ một số bệnh hại do nấm gây ra (Nguyen, Nguyen, & Nguyen, 2014; Nguyen & Nguyen, 2016). Cơ chế đối kháng như: tiết enzymes chitinases ly giải vách tế bào nấm bệnh, hình thành siderophores, sản xuất kháng sinh có phổ tác dụng rộng, cạnh tranh nguồn dưỡng chất, không gian sinh sống với các tác nhân gây bệnh. Ngoài ra, vi khuẩn và xạ khuẩn còn có khả năng thúc đẩy tính kháng bệnh của cây trồng (Jog, Nareshkumar, & Rajkumar, 2012; Nguyen & ctg., 2014). Các loại thuốc sinh học được hình thành và phát triển dựa trên các cơ chế này. Đặc biệt, việc phát triển thuốc trừ nấm có chứa các hoạt tính sinh học cao từ quá trình nhân nuôi vi sinh vật đối kháng để phòng trừ bệnh ở phần trên mặt đất là chiến lược đúng đắn. Do đó, hướng nghiên cứu này được thực

hiện nhằm mục tiêu (i) lựa chọn các chủng vi sinh vật đối kháng trong đất trồng lúa và (ii) đánh giá sự tương quan giữa khả năng tiết enzyme chitinase ngoại bào và đối kháng nấm bệnh của các chủng vi sinh vật này. Các thí nghiệm được thực hiện nhằm mục đích phát triển thuốc sinh học dạng lỏng chứa enzyme chitinase ngoại bào và các hợp chất khác để phòng trừ nấm *Pyricularia oryzae*, làm giảm đi ô nhiễm môi trường do các loại hóa chất nông nghiệp khó phân hủy, có hoạt tính tương tự.

2. Cơ sở lý thuyết

Enzyme chitinase có khả năng phân hủy chitin, thành phần chính hình thành tế bào của nấm mốc cũng như các loại nấm gây bệnh trên thực vật. Các chủng vi sinh vật phân lập từ đất vùng rẫy cây trồng có khả năng phân giải chitin thông qua việc sinh tổng hợp enzyme chitinase xúc tác thủy phân liên kết 1.4 glucoside (Dai, Hu, Huang, & Li, 2011). Enzyme chitinase từ vi sinh vật có hoạt tính cao ngày càng được chú ý, tạo điều kiện cho việc nghiên cứu, sản xuất các chế phẩm chitinase và ứng dụng chúng trong đời sống. Nhiều chủng vi khuẩn, xạ khuẩn vùng rẫy có khả năng kích thích sinh trưởng thực vật và sinh enzyme chitinase được sử dụng như tác nhân kiểm soát sinh học nấm bệnh (Nguyen & ctg., 2014).

Xạ khuẩn (Actinobacteria) thuộc một trong nhiều nhóm Phòng Trừ Sinh Học (PTSH) có tiềm năng đáng kể trong việc sản xuất nhiều enzyme thủy giải (chitinase, cellulase, protease) với hoạt tính mạnh, cũng như tổng hợp các hợp chất kháng sinh có tiềm năng chống lại nấm cao. Xạ khuẩn còn tham gia vào các chu trình chuyển hóa vật chất tự nhiên và kích thích quá trình sinh trưởng của cây trồng (L. T. P. Nguyen, 2016).

Vi khuẩn vùng rẫy kích thích tăng trưởng thực vật (PGPR) là nhóm vi sinh vật có khả năng thúc đẩy sự phát triển của cây trồng. *Pseudomonas* và *Bacillus* là hai chi vi khuẩn thường được tìm thấy trong nhóm PGPR. Chúng có khả năng cải thiện sự phát triển của cây trồng bằng cách tạo ra các chất thúc đẩy tăng trưởng và bảo vệ cây khỏi các tác nhân gây bệnh. Chúng có nhiều cơ chế phòng bệnh như: tiết siderophores, hình thành hoạt chất kháng sinh có phổ tác dụng rộng, tiết enzymes chitinase, glucanase phá hủy vách tế bào nấm bệnh, xâm chiếm không gian sống với các tác nhân gây hại. Ngoài ra, PGPR còn có tiềm năng thúc đẩy tính kháng bệnh ở cây trồng (Nguyen & ctg., 2014).

Nguồn vi sinh vật bản địa có ích trên hệ sinh thái vùng lúa ĐBSCL rất đa dạng về chủng loài, đang được nghiên cứu, ứng dụng và bảo tồn. Việc khai thác hệ vi sinh vật bản địa có ích này rất quan trọng để giúp ngành sản xuất lúa ở nước ta duy trì và phát triển nền nông nghiệp bền vững. PTSH là hướng nghiên cứu đang được khai thác và có tiềm năng ứng dụng trong canh tác nông nghiệp sạch. Do đó, PTSH cần nghiên cứu thêm các khía cạnh tích cực của nguồn tài nguyên phong phú này. Điều này giúp tái thiết lập cân bằng trong hệ sinh thái và tạo nền tảng cho nông nghiệp sạch, hướng đến sản phẩm nông nghiệp an toàn.

3. Phương pháp nghiên cứu

3.1. Thu và xử lý mẫu

Các ruộng lúa vào thời gian đẻ nhánh đến trổ bông được chọn để thu mẫu. Ở mỗi ruộng thu 05 điểm theo đường chéo góc (Amin, Ashraf, & Khosrow, 2014). Mỗi điểm chọn 01 bụi lúa phát triển bình thường và không nhiễm bệnh để thu mẫu. Tiến hành nhổ bụi lúa lên khỏi mặt đất, sau đó dùng tay giữ nhẹ phần đất dính trên bề mặt rễ lúa. Các mẫu đất được bảo quản trong bao zipper riêng, ghi rõ địa chỉ và lưu giữ lạnh ở 4°C.

3.2. Phân lập xạ khuẩn và vi khuẩn từ các mẫu đất thu thập

Phương pháp phân lập xạ khuẩn: Pha loãng mẫu đất bằng nước cất tiệt trùng, trải mẫu đều lên đĩa Petri có chứa môi trường Gause I (tinh bột tan - 20.0 g/l; K_2HPO_4 - 0.5 g/l; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0.5 g/l; KNO_3 - 1.0 g/l; NaCl - 0.5 g/l; $FeSO_4$ - 0.01 g/l và agar - 20.0 g/l; pH 7.2) với 100 μ l dung dịch mẫu pha loãng và ủ ở 37°C trong 05 đến 07 ngày. Quan sát và xác định các hình thái đặc trưng của nhóm xạ khuẩn bằng cách cấy chuyển chúng trên môi trường Gause I cho đến khi thu được các chủng thuần, không bị nhiễm tạp loài khác (Nguyen & ctg., 2021). Đặc điểm cấu trúc chuỗi sinh bào tử được xác định trên tiêu bản phòng ẩm bằng kính hiển vi quang học với vật kính 100X. Bảo quản các chủng phân lập bằng glycerol 15%, ở -80°C.

Phương pháp phân lập vi khuẩn: Mẫu đất thu thập được pha loãng và trải đều trên môi trường TSA, King's B, ủ ở 30°C trong 48 giờ, sau đó sẽ cấy chuyển từng chủng với hình thái khuẩn lạc khác nhau và phân loại từng chủng theo phương pháp nhuộm Gram (Nguyen, 2013; L. T. P. Nguyen, 2016). Bảo quản các chủng phân lập bằng glycerol 15%, trong điều kiện lạnh đông (-80°C).

3.3. Đánh giá khả năng phân giải chitin của vi khuẩn và xạ khuẩn được phân lập

Các chủng vi khuẩn và xạ khuẩn được sàng lọc khả năng sinh chitinase, bằng cách nuôi cấy trên môi trường dinh dưỡng có chứa nguồn cơ chất là chitin (Na_2HPO_4 - 6.0 g/l; KH_2PO_4 - 3.0 g/l; NH_4Cl - 1.0 g/l; NaCl - 0.5 g/l; yeast extract - 0.05 g/l; agar - 15.0 g/l và chitin huyền phù 1% (w/v), pH 7) (Nguyen & ctg., 2014). Ủ ở 30°C trong 05 ngày, vòng tròn phân giải biểu hiện hoạt tính chitinase được nhận diện bằng thuốc thử Lugol 1% (Dai & ctg., 2011; Nguyen, 2012). Thí nghiệm được lặp lại 03 lần/chủng vi khuẩn hoặc xạ khuẩn. Các chủng vi khuẩn và xạ khuẩn có tiềm năng phân giải chitin được chọn để thực hiện các khảo sát tiếp theo.

3.4. Đánh giá khả năng đối kháng nấm *Pyricularia oryzae* của các chủng vi sinh phân lập được trong điều kiện phòng thí nghiệm

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên (RCD) và thực hiện theo phương pháp đồng nuôi cấy trên đĩa Petri chứa môi trường PDA. Mỗi chủng vi khuẩn và xạ khuẩn được sàng lọc ở khảo sát trên là một nghiệm thức, lặp lại 03 lần. Nấm *Pyricularia oryzae* được cung cấp từ bộ chủng vi sinh vật (HBCM) thuộc trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh. Nấm *Pyricularia oryzae* được nuôi cấy trên môi trường PDB có bổ sung agar trong 07 ngày và nuôi các chủng phân lập được trên môi trường TSA (đối với vi khuẩn) và Gause I (đối với xạ khuẩn). Dùng bộ khoan đục thạch có đường kính 05mm đã được hấp vô trùng nhấn nhẹ lên bề mặt đĩa nuôi cấy để tạo tản nấm, chuyển tản nấm sang đĩa môi trường PDA, sao cho tản nấm cách mép đĩa petri là 03cm. Sinh khối của các chủng phân lập được cấy ria một đường thẳng có chiều dài 4.5cm lên bề mặt đĩa môi trường có chứa nấm *Pyricularia oryzae*. Ủ các đĩa thí nghiệm ở nhiệt độ 30°C. Đĩa đối chứng chỉ cấy nấm *Pyricularia oryzae*. Tất cả các bước trên đều được thực hiện trong tủ cấy vô trùng. Chỉ tiêu thí nghiệm được lấy sau 03, 07, 11, và 15 ngày nuôi cấy bằng cách đo bán kính tản nấm nhờ thước đo điện tử, từ đó sàng lọc được các chủng vi sinh có tiềm năng đối kháng với nấm *Pyricularia oryzae* (Nguyen & ctg., 2014; L. T. P. Nguyen, 2016).

Phần trăm ức chế tốc độ lan tỏa của nấm được xác định theo công thức: $I = ((R-r) * 100) / R$ (L. T. P. Nguyen, 2016). Trong đó, I: phần trăm ức chế tốc độ lan tỏa của nấm bởi chủng vi sinh khảo sát; R: bán kính của hệ sợi nấm trong đĩa đối chứng (mm); r: bán kính của hệ sợi nấm trong đĩa thí nghiệm có chứa chủng vi sinh khảo sát (mm).

3.5. Định danh chủng vi khuẩn và xạ khuẩn có khả năng đối kháng mạnh với nấm gây bệnh

Chủng vi khuẩn và xạ khuẩn khảo sát ở thí nghiệm trên được tách DNA tổng số dựa vào phương pháp của Cinkocki và cộng sự (2021). DNA sau tách chiết được khuếch đại vùng gen 16S-rRNA bằng phản ứng PCR (Polymerase Chain Reaction) với cặp mồi 20F (AGAGTTTGATCATGGCTCAG), 1500R (GGTTACCTTGTTACGACTT) theo Chutima, Sompong, Chanitchote, Sudathip, và Jirawan (2017) với chu trình PCR như sau 95°C - 05 phút, 30 chu kỳ lặp lại tiếp theo (95°C - 30 giây; 55°C - 40 giây; 72°C - 90 giây) và 72°C - 05 phút. Tổng thể tích phản ứng là 25µl (Chutima & ctg., 2017). Sản phẩm PCR được kiểm tra kích thước bằng cách chạy điện di trên nền gel agarose 0.8% với thang DNA 1kb (hãng sản xuất Fermentas, Đức). Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng kit Isolate II PCR (hãng sản xuất Bioline, Anh). DNA sau khi tinh sạch được giải trình tự đoạn gen 16S-rDNA bằng bộ hóa chất BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (hãng sản xuất Thermo Fisher Scientific, Hoa kỳ) trên máy ABI 3500 (3500 Series Genetic Analyzers) (Chutima & ctg., 2017). Kết quả giải trình tự được đánh giá, phân tích với cơ sở dữ liệu vùng gen 16S-rRNA trên trung tâm Thông tin Công nghệ sinh học Quốc gia (NCBI) bằng công cụ ATCC và BLASTN. Xây dựng cây phả hệ theo phương pháp Neighbor Joining bằng phần mềm Mega11 với bootstrap 1,000 lần lặp lại.

3.6. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu đường kính vòng phân giải chitin và số liệu thí nghiệm khả năng đối kháng được đánh giá thống kê bằng phần mềm SAS 8.1 trong phân tích ANOVA qua phép thử Duncan ở mức ý nghĩa 5%. Đồ thị thể hiện sự tương quan được vẽ bằng phần mềm Microsoft Excel 2019 (Clustered column - Line on Secondary Axis: Cột được nhóm - Đường trên trục phụ).

4. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

4.1. Kết quả phân lập xạ khuẩn và vi khuẩn từ mẫu đất vùng rễ trồng lúa ở tỉnh Kiên Giang

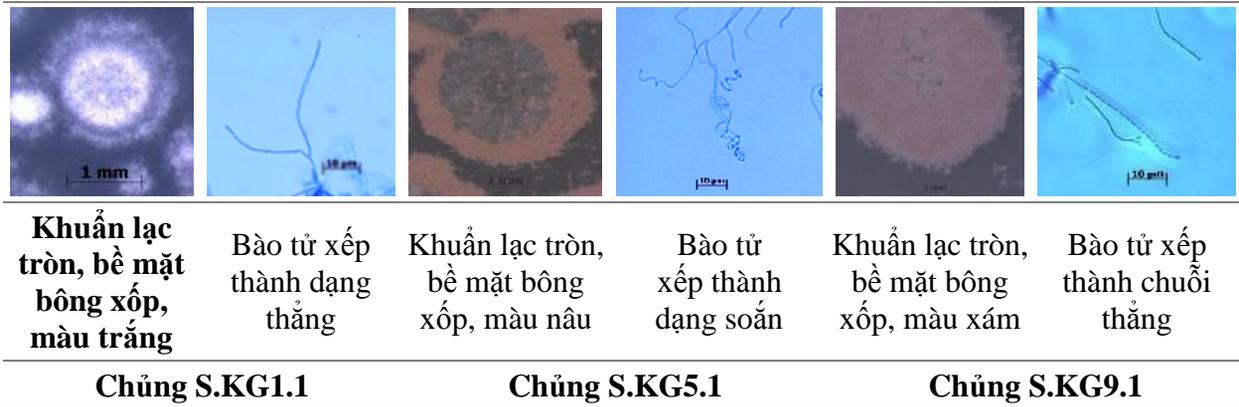
Các vườn trồng lúa tại tỉnh Kiên Giang có pH đất dao động từ 3.8 đến 7.5, phần lớn trồng lúa nước với giống trồng rất đa dạng (ST25, RVT, Đài thơm 8), được ghi nhận trong quá trình thu thập mẫu (Hình 1).



Hình 1. Bản đồ thu thập mẫu tại khu vực tỉnh Kiên Giang

Nguồn: Kết quả thu thập của nhóm nghiên cứu và được vẽ bằng phần mềm Google Earth Pro

Từ 09 mẫu đất vùng rẫy lúa đã phân lập được 30 chủng vi sinh vật trên môi trường đặc trưng với các đặc điểm khuẩn lạc khác nhau. Trong đó, hình dạng chuỗi bào tử, màu sắc khuẩn lạc dựa trên bảng màu chi *Streptomyces* của nghiên cứu Tresner và Backus cho thấy 14/30 chủng vi sinh thuộc nhóm xạ khuẩn (Tresner & Backus, 1963). Các chủng này có chuỗi bào tử dạng thẳng hoặc dạng xoắn với ba nhóm màu (Xám, nâu, và trắng) xuất hiện với số lượng và tỷ lệ khác nhau (Hình 2 và Bảng 1).



Hình 2. Đặc điểm màu sắc khuẩn lạc và chuỗi bào tử đại diện cho 03 nhóm xạ khuẩn được phân lập tại 09 ruộng trồng lúa tại Kiên Giang trên môi trường Gause I

Nguồn: Kết quả quan sát hình ảnh của nhóm thực hiện

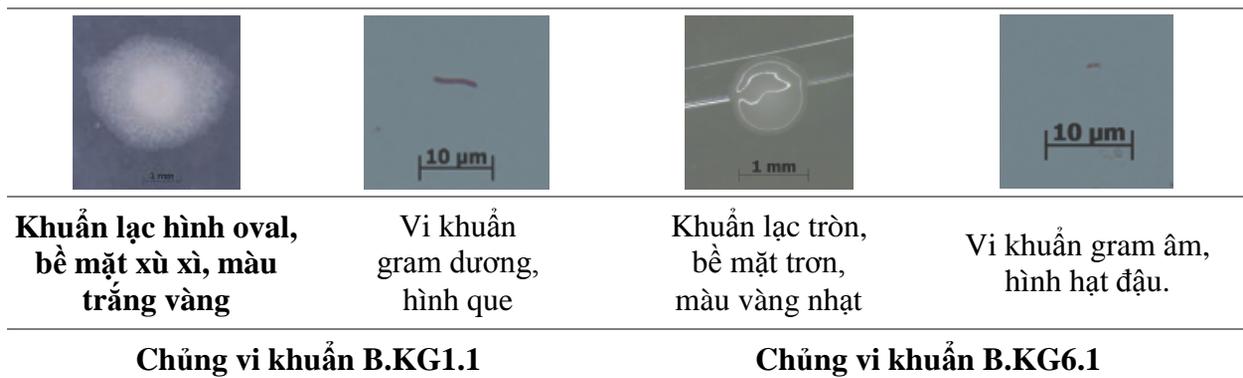
Bảng 1

Sự phân bố theo nhóm màu của 14 chủng xạ khuẩn

STT	Nhóm màu	Số chủng	Tỷ lệ (%)
1	Xám	9	64.29
2	Nâu đất	2	14.29
3	Trắng	3	21.42

Nguồn: Kết quả thống kê dữ liệu của nhóm thực hiện

Dựa vào đặc điểm khuẩn lạc (hình tròn, oval và elip) với kết quả nhuộm gram của 16/30 chủng vi sinh còn lại được phân lập cho thấy chúng thuộc nhóm vi khuẩn. Trong đó, tế bào của 16 chủng vi khuẩn phần lớn là hình que và hạt đậu (Hình 3), được phân thành 02 nhóm: Vi khuẩn gram dương (B.KG1.1; B.KG1.2; B.KG2.1; B.KG2.2; B.KG3.1; B.KG4.1; B.KG5.1; B.KG7.2; B.KG7.3; B.KG9.1; B.KG9.2; B.KG9.3) và vi khuẩn gram âm (B.KG3.2; B.KG3.3; B.KG6.1; B.KG7.1).



Hình 3. Hình ảnh đại thể và vi thể chủng B.KG1.1 và B.KG 6.1 trên môi trường TSA

Nguồn: Kết quả quan sát dữ liệu của nhóm thực hiện

4.2. Kết quả khả năng phân giải chitin của vi khuẩn và xạ khuẩn được phân lập

Sự hình thành enzyme chitinase của các chủng xạ khuẩn và vi khuẩn được quan sát trên môi trường thạch chứa cơ chất chitin. Sau 05 ngày ủ, 10/16 chủng vi khuẩn (chiếm 62.5%) và 11/14 chủng xạ khuẩn (chiếm 78.57%) hình thành vòng phân giải chitin (vòng sáng) xung quanh khuẩn lạc nên có khả năng hình thành enzyme chitinase (Bảng 2). Khả năng tổng hợp enzyme chitinase được nhận biết dựa trên sự phân giải cơ chất chitin chứa trong môi trường, bằng thuốc thử Lugol 1%. Dựa vào vòng sáng hình thành xung quanh khuẩn lạc, các chủng có đường kính vòng phân giải chitin dao động từ 15mm đến 41mm (Bảng 2, Hình 4), cao hơn nghiên cứu của Nguyen và Nguyen (2016), Nguyen và cộng sự (2021) về đánh giá tiềm năng hình thành enzyme chitinase của các chủng vi khuẩn và xạ khuẩn. Chủng vi sinh vật có khả năng phân giải chitin được chọn để tiếp tục thực hiện đánh giá khả năng đối kháng nấm *Pyricularia oryzae*.

Bảng 2

Đường kính vòng phân giải chitin của các chủng vi khuẩn và xạ khuẩn phân lập được, sau 05 ngày

STT	Chủng vi sinh vật	Đường kính vòng phân giải chitin (mm)
1	B.KG1.1	0 ^k
2	B.KG1.2	33.23 ^b
3	B.KG2.1	29.60 ^d
4	B.KG2.2	0 ^k
5	B.KG3.1	18.33 ⁱ
6	B.KG3.2	0 ^k
7	B.KG3.3	21.33 ^h
8	B.KG4.1	41.67 ^a
9	B.KG5.1	27.80 ^{ef}
10	B.KG6.1	0 ^k
11	B.KG7.1	19.17 ⁱ
12	B.KG7.2	0 ^k
13	B.KG7.3	27.37 ^{ef}
14	B.KG9.1	16.17 ^j
15	B.KG9.2	31.23 ^c
16	B.KG9.3	0 ^k
17	S.KG1.1	29.63 ^d
18	S.KG2.1	28.73 ^{de}
19	S.KG3.1	28.57 ^{de}
20	S.KG3.2	31.47 ^c
21	S.KG3.3	26.17 ^f
22	S.KG4.1	26.90 ^f

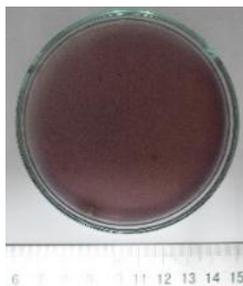
STT	Chủng vi sinh vật	Đường kính vòng phân giải chitin (mm)
23	S.KG5.1	15.83 ^j
24	S.KG5.2	0 ^k
25	S.KG6.1	15.87 ^j
26	S.KG7.1	24.53 ^g
27	S.KG7.2	0 ^k
28	S.KG7.3	22.27 ^h
29	S.KG8.1	0 ^k
30	S.KG9.1	15.07 ^j
Trung bình		17.69
CV (%)		5.28
P		< .0001

Ghi chú:

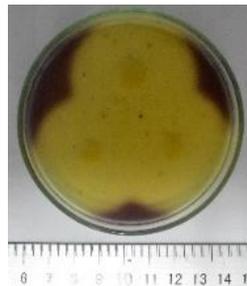
- Số liệu được chuyển đổi sang $(X+0.5)/2$ trước khi thống kê bằng phần mềm SAS 8.1

- Trên cùng một cột, các số liệu trung bình có kí tự theo sau giống nhau được xem không có sự khác biệt qua phép kiểm định Duncan

Nguồn: Kết quả phân tích và xử lý số liệu của nhóm nghiên cứu



Đôi chứng



B.KG4.1



S.KG1.1

Hình 4. Vòng phân giải chitin (vòng sáng) xung quanh khuẩn lạc của chủng B.KG4.2 và chủng S.KG1.1

Nguồn: Kết quả quan sát hình ảnh của nhóm nghiên cứu

4.3. Kết quả đánh giá khả năng đối kháng nấm *Pyricularia oryzae* của các chủng phân lập được trong điều kiện phòng thí nghiệm

Từ kết quả thí nghiệm trên, các chủng sàng lọc có tiềm năng sinh tổng hợp enzyme chitinase được sử dụng cho thử nghiệm này. Kết quả khả năng đối kháng nấm *Pyricularia oryzae* của các chủng xạ khuẩn và vi khuẩn sau 03 ngày, 07 ngày, 11 ngày, và 15 ngày được thể hiện thông qua phần trăm ức chế tốc độ lan tỏa nấm ở các nghiệm thức đồng nuôi cấy với chủng sàng lọc so với nghiệm thức đối chứng (Bảng 3, Bảng 4 và Hình 5).

Bảng 3

Phần trăm ức chế tốc độ lan tơ nấm *Pyricularia oryzae* của 10 chủng vi khuẩn phân lập trong đất vùng rẫy lúa tại tỉnh Kiên Giang

Phần trăm ức chế tốc độ lan tơ nấm (%)

STT	Tên chủng	Sau 03 ngày	Sau 07 ngày	Sau 11 ngày	Sau 15 ngày
1	B.KG1.2	0 ^d	63.97 ^b	73.43 ^b	81.03 ^b
2	B.KG2.1	0 ^d	63.69 ^b	71.75 ^{bc}	80.12 ^b
3	B.KG3.1	4.20 ^c	13.69 ^d	13.98 ^f	45.78 ^f
4	B.KG3.3	17.23 ^b	66.48 ^b	69.59 ^c	80.12 ^b
5	B.KG4.1	60.08^a	79.75^a	85.34^a	90.90^a
6	B.KG5.1	0 ^d	49.30 ^c	58.66 ^d	69.88 ^c
7	B.KG7.1	0 ^d	52.65 ^c	60.33 ^d	67.47 ^d
8	B.KG7.3	0 ^d	52.51 ^c	32.09 ^e	57.23 ^e
9	B.KG9.1	7.52 ^c	14.53 ^d	10.43 ^g	38.55 ^g
10	B.KG9.2	0 ^d	63.97 ^b	72.64 ^{bc}	79.52 ^b
Trung bình		8.90	52.05	54.82	69.06
CV (%)		22.19	5.17	3.26	1.23
P		< .0001	< .0001	< .0001	< .0001

Ghi chú:

- Số liệu được chuyển đổi sang $(X+0.5)/2$ trước khi thống kê bằng phần mềm SAS 8.1

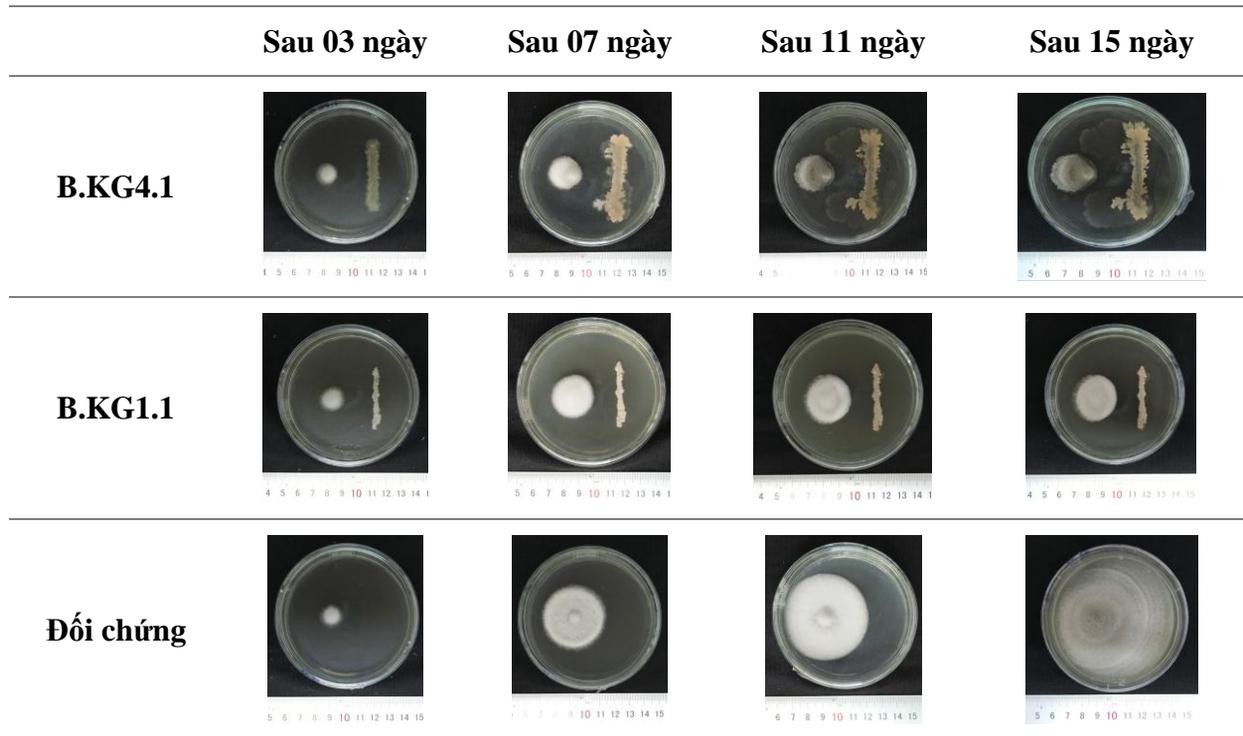
- Trên cùng một cột, các số liệu trung bình có kí tự theo sau giống nhau được xem không có sự khác biệt qua phép kiểm định Duncan

Nguồn: Kết quả xử lý và phân tích số liệu của nhóm thực hiện

Sau 03 ngày theo dõi, 04/10 chủng vi khuẩn trong nghiên cứu có khả năng ức chế hệ sợi nấm phát triển với phần trăm ức chế trung bình là 8.9% (Bảng 3). Tại thời điểm này, có thể một số chủng vi khuẩn đang dần thích ứng với điều kiện sinh trưởng mới và bắt đầu kích hoạt cơ chế đối kháng. Sau 07 ngày, phần trăm ức chế nấm bệnh trung bình đạt 52.09%. Trong đó, chủng B.KG4.1 có phần trăm ức chế cao nhất sau 07 ngày (79.75%). Sau 11 ngày, phần trăm ức chế trung bình của 10 chủng vi khuẩn này tăng lên, đạt 54.82%. Bán kính tản nấm trong các đĩa đồng nuôi cấy phần lớn không tăng, có xu hướng giảm đi khi các sợi nấm tiếp xúc gần với khuẩn lạc vi khuẩn và có dấu hiệu bị ngưng phát triển so với sợi nấm ở đĩa đối chứng. Ở ngày thứ 15, phần trăm ức chế nấm bệnh trung bình của 10 chủng vi khuẩn tăng 1.25 lần so với 11 ngày (phần trăm ức chế trung bình sau 15 ngày đạt 69.06%). Trong đó, chủng B.KG4.1 có phần trăm ức chế nấm là 90.9% sau 15 ngày. Sự khác biệt giữa các số liệu có ý nghĩa về mặt phân hạng thống kê qua phần mềm SAS 8.1 so với 10 chủng vi khuẩn còn lại (Hình 5).

Sự ức chế phát triển nấm *Pyricularia oryzae* của các chủng vi khuẩn trong nghiên cứu này ở ngày thứ 07 cao hơn so với nghiên cứu của Phung, Tran, và Ho (2023) khi hiệu quả ức chế trung bình của vi khuẩn *Bacillus* spp. đến tốc độ sinh trưởng của sợi nấm chỉ đạt 53.72% ở ngày thứ 09 (Phung & ctg., 2023). Khả năng cũng như tiềm năng đối kháng nấm *Pyricularia oryzae*

của các chủng vi khuẩn phân lập từ đất vùng rẫy lúa với tỷ lệ đối kháng cao trên 50% đã được chứng minh trong nghiên cứu của Dang (2013); Nabila và Kasiamdari (2021). Trong thí nghiệm này, chủng vi khuẩn B.KG4.1 được đánh giá là có tiềm năng sinh chitinase và đối kháng nấm *Pyricularia oryzae* tương đối tốt qua các ngày theo dõi, đạt phần trăm ức chế nấm cao nhất sau 15 ngày (90.9%). Do đó, chủng vi khuẩn B.KG4.1 được chọn định danh sinh học phân tử.



Hình 5. Khuẩn lạc nấm *Pyricularia oryzae* ở nghiệm thức đồng nuôi cấy với chủng vi khuẩn B.KG4.1 và xạ khuẩn S.KG1.1 so với nghiệm thức đối chứng, sau các mốc thời gian theo dõi

Nguồn: Kết quả quan sát và ghi nhận hình ảnh của nhóm thực hiện

Bảng 4

Phần trăm ức chế tốc độ lan tơ nấm *Pyricularia oryzae* của 11 chủng xạ khuẩn phân lập trong đất vùng rẫy lúa tại tỉnh Kiên Giang

Phần trăm ức chế tốc độ lan tơ nấm (%)

STT	Tên chủng	Sau 03 ngày	Sau 07 ngày	Sau 11 ngày	Sau 15 ngày
1	S.KG1.1	26.47 ^a	73.18 ^a	79.82 ^a	87.41 ^a
2	S.KG2.1	0.56 ^{bc}	13.27 ^c	32.38 ^{de}	61.45 ^{de}
3	S.KG3.1	0 ^c	40.36 ^b	54.73 ^c	66.02 ^{cd}
4	S.KG3.2	2.4 ^b	12.01 ^c	12.40 ^f	42.35 ^f
5	S.KG3.3	0.56 ^{bc}	48.60 ^b	62.40 ^b	75.91 ^b
6	S.KG4.1	0.56 ^{bc}	13.69 ^c	29.52 ^e	55.24 ^e
7	S.KG5.1	0 ^c	3.28 ^d	13.50 ^f	22.53 ^g

STT	Tên chủng	Sau 03 ngày	Sau 07 ngày	Sau 11 ngày	Sau 15 ngày
8	S.KG6.1	0 ^c	12.85 ^c	34.55 ^{de}	56.87 ^e
9	S.KG7.1	0 ^c	48.60 ^b	64.56 ^b	75.90 ^b
10	S.KG7.3	0 ^c	14.25 ^c	37.40 ^d	59.11 ^e
11	S.KG9.1	0 ^c	44.13 ^b	58.66 ^{bc}	70.48 ^{bc}
Trung bình		2.78	29.48	43.63	61.21
CV (%)		31.75	11.09	4.17	3.02
P		< .0001	< .0001	< .0001	< .0001

Ghi chú:

- Số liệu được chuyển đổi sang $(X+0.5)/2$ trước khi thống kê bằng phần mềm SAS 8.1

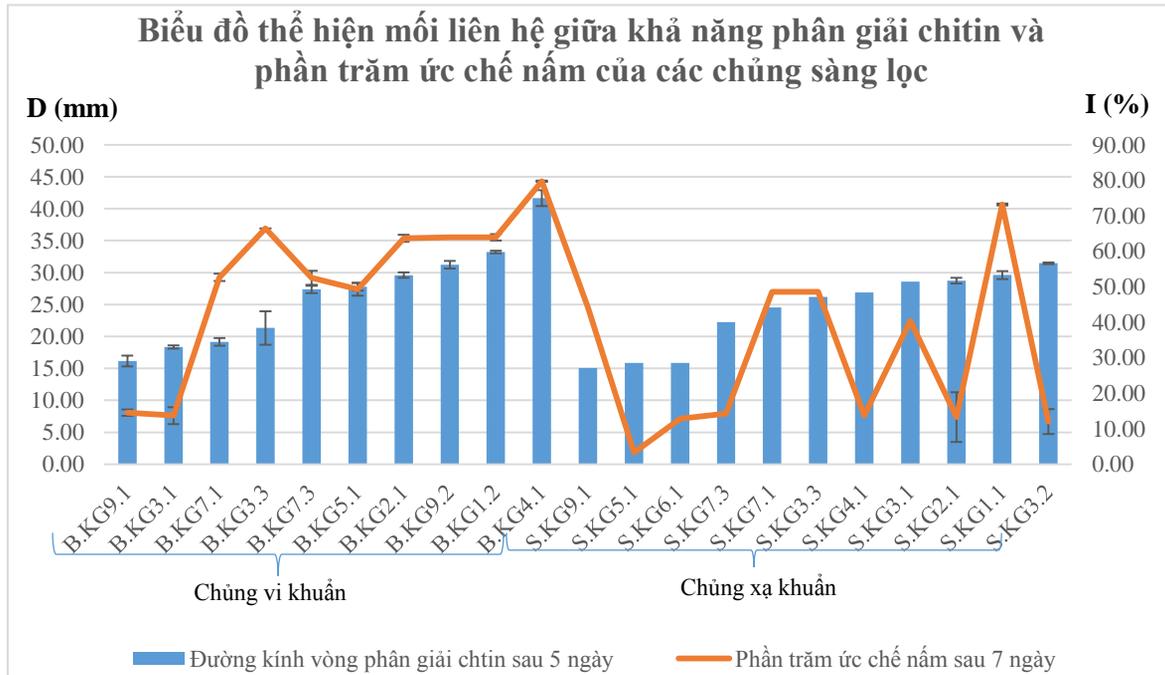
- Trên cùng một cột, các số liệu trung bình có kí tự theo sau giống nhau được xem là không có sự khác biệt qua phép kiểm định Duncan

Nguồn: Kết quả xử lý và phân tích số liệu của nhóm thực hiện

Kết quả số liệu ở Bảng 4 cho thấy, 11 chủng xạ khuẩn tồn tại trong đất vùng rẫy lúa, ngoài tiềm năng sản xuất và tổng hợp enzyme chitinase mà còn có tiềm năng ức chế nấm *Pyricularia oryzae*. Sau 03 ngày, 04/11 chủng xạ khuẩn được khảo nghiệm có khả năng ức chế tốc độ phát triển của sợi nấm, phần trăm ức chế trung bình sau 03 ngày đạt 18.06% (Bảng 4). Tại thời điểm này, một số chủng xạ khuẩn đang dần thích nghi với môi trường và bắt đầu kích hoạt cơ chế đối kháng. Sau 07 ngày, 11 chủng xạ khuẩn được nhận xét đều có khả năng ức chế tốc độ sinh trưởng của sợi nấm với phần trăm ức chế trung bình đạt 29.48%. Chủng S.KG1.1 có phần trăm ức chế nấm bệnh cao nhất ở ngày thứ 07 (73.18%). Sau 11 ngày, phần trăm ức chế trung bình của 11 chủng xạ khuẩn này tăng 1.47 lần so với sau 07 ngày (phần trăm ức chế nấm bệnh trung bình sau 11 ngày đạt 43.63%). Tại thời điểm này, tốc độ lan tỏa nấm ở vùng tiếp giáp với khuẩn lạc xạ khuẩn trong các đĩa đồng nuôi cấy hầu như không phát triển đối với đĩa nấm đối chứng. Ở ngày thứ 15, phần trăm ức chế nấm bệnh trung bình của 11 chủng xạ khuẩn tăng 1.4 lần so với ngày thứ 11 (phần trăm ức chế trung bình sau 15 ngày đạt 61.21%). Trong đó, chủng S.KG1.1 có phần trăm ức chế cao, sau 15 ngày (đạt 87.41%). Sự khác biệt giữa các số liệu có ý nghĩa về mặt phân hạng thống kê qua phần mềm SAS 8.1 với 11 chủng xạ khuẩn còn lại (Hình 5).

Nghiên cứu này cho thấy, phần trăm ức chế tốc độ sinh trưởng của tơ nấm *Pyricularia oryzae* tại thời điểm 07 ngày cao hơn so với khảo sát của Đặng Nguyệt Quế về hiệu suất đối kháng của chủng xạ khuẩn S17-MBL và S31-MCM lên sự sinh trưởng của sợi nấm chỉ đạt 60.74% ở ngày thứ 07 (Dang, 2023). Hiệu suất đối kháng nấm *Pyricularia oryzae* của các chủng xạ khuẩn sàng lọc từ đất vùng rẫy lúa ở tỉnh Kiên Giang cũng tương đồng trong kết quả nghiên cứu của Chaiharn, Theantana, và Pathom-aree (2020), Nguyen và cộng sự (2021) với hiệu suất đối kháng trên 60%. Trong thí nghiệm này, chủng xạ khuẩn B.KG4.1 có tiềm năng sản xuất enzyme chitinase và ức chế nấm *Pyricularia oryzae* tương đối tốt qua các ngày theo dõi, đạt phần trăm ức chế nấm cao nhất sau 15 ngày (đạt 87.41%). Vì vậy, Chủng xạ khuẩn S.KG1.1 được chọn để tiến hành danh sinh học phân tử.

4.4. Đánh giá mối quan hệ giữa khả năng phân giải chitin và phần trăm ức chế nấm *Pyricularia oryzae* của các chủng vi khuẩn và xạ khuẩn được sàng lọc trong đất vùng rẫy lúa tại tỉnh Kiên Giang



Hình 6. Biểu đồ thể hiện mối liên hệ giữa đường kính vòng phân giải chitin sau 05 ngày và phần trăm ức chế nấm sau 07 ngày của các chủng xạ khuẩn và vi khuẩn phân lập được

Nguồn: Kết quả xử lý số liệu của nhóm thực hiện

Hình 6 cho thấy có mối liên hệ giữa chitinase ngoại bào và tiềm năng ức chế nấm *Pyricularia oryzae* của các chủng vi khuẩn phân lập được trong đất trồng lúa ở tỉnh Kiên Giang. Thật vậy, hầu hết các chủng vi khuẩn phân lập có đường kính vòng phân giải chitin cao thì cho hiệu suất đối kháng cao. Chủng B.KG4.1 có đường kính vòng phân giải chitin cao nhất sau 05 ngày (41.67 mm) thì có hiệu suất đối kháng nấm mạnh nhất (đạt 79.67% sau 07 ngày) theo thống kê phân hạng của phần mềm SAS 8.1. Trong khi đó, 02 chủng B.KG9.1 và B.KG3.1 có đường kính vòng phân giải chitin thấp hơn thì tỷ lệ phần trăm ức chế nấm bệnh cũng thấp hơn so với các chủng còn lại (Hình 6). Kết quả này cũng phù hợp với sự tương quan tỷ lệ thuận giữa bán kính vòng phân giải chitin với tỷ lệ ức chế nấm trong nghiên cứu đánh giá khả năng đối kháng nấm của vi khuẩn sinh chitinase phân lập từ đất vùng rẫy lúa (Nguyen & ctg., 2014). Nhiều nghiên cứu cho thấy, ngoài chitinase ngoại bào, vi khuẩn còn có thể hình thành protease, cellulase, β -1,3-glucanase và siderophore cũng ức chế sự phát triển của nấm gây bệnh thực vật (Zhou & ctg., 2022).

Bệnh cạnh đó, không có mối liên hệ nào giữa hoạt tính hệ enzyme ngoại bào chitinase và khả năng ức chế sự phát triển với nấm bệnh *Pyricularia oryzae* ở xạ khuẩn. Chủng S.KG3.2 có đường kính vòng phân giải chitin cao nhất nhưng tỷ lệ phần trăm ức chế sự phát triển của nấm bệnh của chủng S.KG1.1 lại cao nhất so với các chủng còn lại (Hình 6). Ngược lại, đường kính vòng phân giải chitin của chủng S.KG5.1 cao hơn chủng S.KG9.1 nhưng hiệu suất đối kháng lại thấp nhất so với các chủng xạ khuẩn còn lại (Hình 6). Các dẫn chứng trên cho thấy cơ chế ức chế nấm bệnh của xạ khuẩn dường như không phụ thuộc hệ enzyme ngoại bào. Nhiều nghiên cứu trước đây cho thấy xạ khuẩn nổi bật với tiềm năng hình thành và sản xuất các hợp chất kháng

sinh, ức chế nấm (Amin & ctg., 2014; Jog & ctg., 2012). Nghiên cứu của nhóm tác giả Chaiharn và cộng sự (2020) cho thấy, cơ chế ức chế sự phát triển tơ nấm *Pyricularia* sp. của các chủng xạ khuẩn chủ yếu dựa vào sinh hợp chất thứ cấp với tỷ lệ ức chế trên 80%.

Bên cạnh khả năng đối kháng nấm, tiết chitinase ngoại bào, nhiều nghiên cứu cũng chứng minh các chủng xạ khuẩn và vi khuẩn còn có tiềm năng sản xuất, tổng hợp IAA, cố định đạm và các hợp chất thứ cấp khác (Nguyen, 2013). Từ những kết luận trên, chủng vi khuẩn B.KG4.1 và chủng xạ khuẩn S.KG1.1 có tiềm năng áp dụng cao trong thực tiễn sản xuất chế phẩm sinh học, vừa quản lý dịch bệnh do nấm *Pyricularia oryzae* gây ra nhưng cũng vừa hỗ trợ tăng cường sinh trưởng cây trồng.

4.5. Đình danh sinh học phân tử chủng vi khuẩn B.KG1.1 và chủng xạ khuẩn S.KG1.1 sinh chitinase có khả năng đối kháng nấm *Pyricularia Oryzae*

Từ kết quả sàng lọc trên, chủng vi khuẩn B.KG4.1 và chủng xạ khuẩn S.KG1.1 được lựa chọn để xác định loài cụ thể trong nghiên cứu ứng dụng tiếp theo. DNA tổng số của chủng vi khuẩn B.KG4.1 và chủng xạ khuẩn S.KG1.1 được tách chiết, tinh sạch và thực hiện phản ứng khuếch đại vùng gen 16S-rRNA với cặp mồi 20F, 1500R. Sản phẩm PCR của chủng vi khuẩn B.KG4.1 và chủng xạ khuẩn S.KG1.1 được xác định với kích thước khoảng 1,400bp trên gel Agarose 0.8%, tương đồng với kết quả thí nghiệm của Chutima và cộng sự (2017), Malisorn và cộng sự (2020). Sản phẩm PCR của chủng B.KG4.1 và S.KG1.1 được loại bỏ các tạp chất bằng bộ kit Isolate II PCR (hãng sản xuất Bioline, Anh). và thực hiện giải trình tự trên máy ABI 3500. Trình tự được xử lý bằng phần mềm ATGC và BLAST kiểm tra với ngân hàng gen NCBI. Sơ đồ cây phả hệ với các loài gần được lắp ráp với hệ số bootstrap 1,000 lần lặp lại thông qua phần mềm Mega 11. Kết quả so sánh cho thấy, chủng xạ khuẩn S.KG1.1 có mức độ tương đồng 99.78% với trình tự gen vùng 16S-rRNA của chủng *Streptomyces carpinensis* (Bảng 5 và Hình 7). Các công bố trước đây, *Streptomyces carpinensis* được chứng minh có nhiều tiềm năng trong sản xuất các enzyme ngoại bào, các hợp chất ức chế nấm và vi khuẩn (Challis & Hopwood, 2003; Jog & ctg., 2012) và chưa có công bố nào về khả năng gây bệnh của loài này trên cây trồng, người và động vật, trong những năm gần đây.

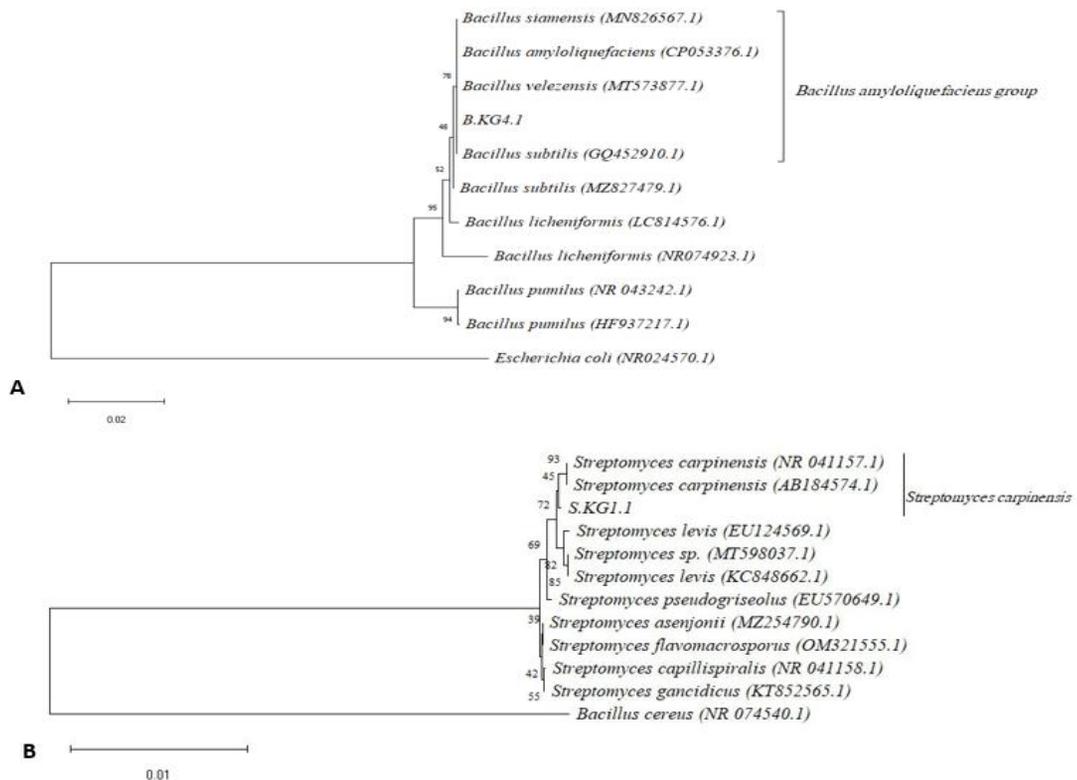
Bên cạnh đó, chủng vi khuẩn B.KG4.1 có độ bao phủ 100% với vùng gen 16s-rRNA của chi *Bacillus* sp. (*Bacillus siamensis*, *Bacillus velezensis*, *Bacillus amyloliquefaciens*). Theo nghiên cứu trước đây, chi *Bacillus* bao gồm 318 loài có tên được công bố hợp lệ với *Bacillus subtilis* là loài điển hình (Gordon, Haynes, & Pang, 1973; Skerman, McGowan, & Sneath, 1980). Các loài thuộc chi *Bacillus* được chia thành 04 nhóm: *Bacillus subtilis*; *Bacillus amyloliquefaciens*; *Bacillus licheniformis* và *Bacillus pumilus*. Mỗi nhóm là đại diện cho một nhóm các loài đồng nhất về phát sinh chủng loại, kiểu hình và được gọi tên theo thông dụng là phức hợp loài *B. subtilis* (Fritze, 2004). Nghiên cứu của Fan, Blom, Klenk, và Borriss (2017), *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis* và *Bacillus siamensis* thuộc nhóm *Bacillus amyloliquefaciens* trong phức hợp loài *B. subtilis* và có hệ gen cũng như con đường sinh hóa giống nhau (Chun, Kim, Jeong, & Jeon, 2019). Dựa vào các công bố trên và cây phát sinh loài (Hình 7), chủng vi khuẩn B.KG4.1 được kết luận thuộc nhóm *Bacillus amyloliquefaciens* với mức độ tương đồng 100% với chủng *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis* và *Bacillus siamensis*. Các loại thuộc nhóm *Bacillus amyloliquefaciens* đều có tiềm năng sản xuất và hình thành nhiều loại enzyme và các hợp chất thứ cấp có ít trong nông nghiệp và thực phẩm (Dang, 2013; Chun & ctg., 2019).

Bảng 5

Kết quả so sánh vùng gen 16S rRNA của vi khuẩn B.KG4.1 và chủng xạ khuẩn S.KG1.1 với ngân hàng gen NCBI

Tên chủng	Mã số chủng so sánh	Mức độ tương đồng (%)	Mức độ bao phủ (%)	Tên loài
B.KG4.1	MT573877.1	100	100	<i>Bacillus velezensis</i>
	MN826567.1	100	100	<i>Bacillus siamensis</i>
	CP053376.1	100	100	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
S.KG1.1	NR-041157.1	100	99,78	<i>Streptomyces carpinensis</i>

Nguồn: Kết quả thu thập và so sánh dữ liệu của nhóm thực hiện



Hình 7. Cây Phát sinh loài thể hiện mối quan hệ di truyền (vùng trình tự 16S- rRNA) giữa chủng B.KG4.1 (A) và S.KG1.1 (B) được xây dựng bằng phần mềm Mega 11 theo phương pháp Neighbor Joining với bootstrap 1,000 lần lặp lại

5. Kết luận & gợi ý

Từ 09 mẫu đất vùng rẫy trồng lúa tại tỉnh Kiên Giang và thí nghiệm sàng lọc trong phòng thí nghiệm, chủng vi khuẩn B.KG4.1 và chủng xạ khuẩn S.KG1.1 có hiệu suất đối kháng nấm *Pyricularia Oryzae* vượt trội hơn các chủng còn lại (tỷ lệ đối kháng nấm đạt lần lượt là 90.9% và 87.41% ở ngày thứ 15). Đặc biệt, tiềm năng đối kháng nấm bệnh của các chủng vi khuẩn trong bài báo này hầu hết tỷ lệ thuận với đường kính vòng phân giải chitin trên

môi trường nhân tạo. Trong khi đó, không tìm thấy mối tương quan nào giữa tiềm năng đối kháng nấm bệnh và enzyme chitinase ngoại bào đối với xạ khuẩn. Kết quả định danh loài bằng kỹ thuật sinh học phân tử cho thấy, chủng xạ khuẩn S.KG1.1 có mức độ tương đồng 99.78% với trình tự vùng gen 16S-rRNA của chủng *Streptomyces carpinensis* NR-041157.1 và chủng vi khuẩn B.KG4.1 thuộc *Bacillus amyloliquefaciens* group với độ tương đồng 100%. Trước khi ứng dụng ngoài đồng ruộng của chủng B.KG4.1 và S.KG1.1, cần phải đánh giá thêm về các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình sinh trưởng, thời gian nhân nuôi và khả năng phòng trừ nấm *Pyricularia Oryzae* trong điều kiện nhà kính.

Tài liệu tham khảo

- Amin, H., Ashraf, K., & Khosrow, I. (2014). *Streptomyces*: Characteristics and their antimicrobial activities. *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, 2(1), 63-75.
- Chaiharn, M., Theantana, T., & Pathom-aree, W. (2020). Evaluation of biocontrol activities of *Streptomyces* spp. against rice blast disease Fungi. *Pathogens*, 9(2), Article 126. doi:10.3390/pathogens9020126
- Challis, G. L., & Hopwood, D. A. (2003) Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(suppl_2), 14555-14561.
- Chun, B. H., Kim, K. H., Jeong, S. E., & Jeon, C. O. (2019). Genomic and metabolic features of the *Bacillus amyloliquefaciens* group - *B. amyloliquefaciens*, *B. velezensis*, and *B. siamensis*— revealed by pan-genome analysis. *Food Microbiology*, 77, 146-157. doi:10.1016/j.fm.2018.09.001
- Chutima, K., Sompong, S., Chanitchote, D., Sudathip, C., & Jirawan, A. (2017). Fermentable sugars production from lignocellulosic materials hydrolysis by thermophilic enzymes from *Bacillus subtilis* J12. *Energy Procedia*, 2017(138), 151-156.
- Cinkocki, R., Lipková, N., Javoreková, S., Petrová, J., Maková, J., Medo, J., & Dučay, L. (2021). The impact of growth-promoting *Streptomyces* isolated from Rhizosphere and bulk soil on oilseed rape (*Brassica napus* L.) growth parameters. *Sustainability*, 13(10), Article 5704. doi:10.3390/su13105704
- Dai, D., Hu, W., Huang, G., & Li, W. (2011). Purification and characterization of a novel extracellular chitinase from thermophilic *Bacillus* sp. Hu1. *African Journal of Biotechnology*, 10(13), 2476-2485.
- Dang, Q. N. (2023). *Nghiên cứu và ứng dụng xạ khuẩn trong phòng trị bệnh đạo ôn hại lúa do nấm Pyricularia oryzae Cav. Trên vùng đất nhiễm mặn [Research and application of actinomycetes in the prevention and control of rice blast disease caused by Pyricularia oryzae Cav. on saline soil]* (Master's thesis). Can Tho University, Can Tho, Vietnam.
- Dang, V. T. T. (2013). *Phân lập và nhận diện vi khuẩn Bacillus sp. đối kháng nấm Pyricularia oryzae L. từ đất và cây lúa cao sản trồng ở Đồng bằng sông Cửu Long [Isolation and identification of Bacillus sp. bacteria antagonistic to Pyricularia oryzae L. fungus from soil and high-yielding rice plants grown in the Mekong Delta]* (Master's thesis). Can Tho University, Can Tho, Vietnam.

- Fan, B., Blom, J., Klenk, H.-P., & Borriss, R. (2017). *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*, and *Bacillus siamensis* form an “Operational Group *B. amyloliquefaciens*” within the *B. subtilis* species complex. *Frontiers in Microbiology*, 8(22). doi:10.3389/fmicb.2017.00022
- Fritze, D. (2004). Taxonomy of the genus *Bacillus* and related genera: The aerobic endospore-forming bacteria. *Phytopathology*, 94(11), 1245-1248. doi:10.1094/PHYTO.2004.94.11.1245
- Fukata, Y., Erbon, L. A., & Kobayashi, N. (2007). Genetic and breeding analysis of blast resistance in elite indica-type Rice (*Oryza sativa* L.) Bred in international rice resisearch institute. *Japan Agriculture Resisearch Quartely*, 41(2), 101-114.
- Gordon, R. E., Haynes, W. C., & Pang, C. H. N. (1973). *The genus bacillus*. Washington, D.C.: United States Department of Agriculture.
- Jog, R., Nareshkumar, G., & Rajkumar, S. (2012). Plant growth promoting potential and soil enzyme production of the most abundant *Streptomyces* spp. from wheat rhizosphere, *Journal of Applied Microbiology*, 113(5), 1154-1164. doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05417.x
- Malisorn, K., Embaen, S., Sribun, A., Saeng-In, P., Phongsopitanun, W., & Tanasupawat, S. (2020). Identification and antimicrobial activities of *Streptomyces*, *Micromonospora*, and *Kitasatospora* strains from rhizosphere soils. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 10(2), 123-128.
- Muni, N. M., & Nadarajah, K. (2014). Morphological and molecular characterization of *Magnaporthe oryzae* (fungus) from infected rice leaf samples. *AIP Conference Proceedings*, 1614(1), 756-760. doi:10.1063/1.4895296
- Nabila, N., & Kasiamdari, R. S. (2021). Antagonistic activity of siderophore-producing bacteria from black rice rhizosphere against rice blast fungus *Pyricularia oryzae*. *Microbiology and Biotechnology Letters*, 49(2), 217-224. doi:10.48022/mbi.2011.11009
- Nguyen, D. T. M. (2013). *Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn vùng rễ lúa thuộc đất nhiễm mặn có khả năng cố định đạm và tổng hợp IAA [Isolation and selection of rice rhizosphere bacteria in saline soil with the ability to fix nitrogen and synthesize IAA]* (Graduation thesis). Can Tho University, Can Tho, Vietnam.
- Nguyen, H. T. (2012). Tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy chủng *Aspergillus protuberus* sinh tổng hợp enzyme chitinase được phân lập từ rừng ngập mặn Cần Giờ [Optimization of culture conditions of *Aspergillus protuberus* strain producing chitinase enzyme isolated from Can Gio mangrove forest]. *Tạp chí Khoa học trường Đại học Cần Thơ*, 22b, 26-35.
- Nguyen, H. T. D., Hua, C. T., Dang, N. B., Nguyen, T. T. T., Nguyen, A. N., & Pham, V. T. (2021). Phân lập và tuyển chọn xạ khuẩn có khả năng sinh các hợp chất có hoạt tính cao [Isolation and selection of actinomycetes capable of producing highly active compounds]. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, 53B(1), 56-67.
- Nguyen, L. T. P. (2016). *Nghiên cứu phòng trừ bệnh đạo ôn (Pyricularia oryzae) hại lúa bằng vi sinh vật đối kháng Streptomyces và Bacillus bản địa ở đồng bằng Sông Cửu Long [Research on rice blast disease control (Pyricularia oryzae) by antagonistic microorganisms Streptomyces and Bacillus indigenous to the Mekong Delta]* (Doctoral dissertation). Vietnam Academy of Agricultural Sciences, Vinh Quynh, Thanh Tri, Hanoi, Vietnam.

- Nguyen, M. T. X., & Nguyen, C. D. (2016). Đánh giá khả năng đối kháng của vi khuẩn *Pseudomonas* phát huỳnh quang đối với nấm *Pyricularia oryzae* gây bệnh đạo ôn trên lúa và cơ chế có liên quan trong điều kiện phòng thí nghiệm [Evaluation of the antagonistic ability of fluorescent *Pseudomonas* bacteria against *Pyricularia oryzae* fungus causing rice blast disease and related mechanisms under laboratory conditions]. *Tạp chí Khoa học Công nghệ Việt Nam*, 6(67), 34-39.
- Nguyen, P. T. T. (2016). Giải pháp tài chính thúc đẩy xuất khẩu gạo vùng Đồng bằng sông Cửu Long [Financial solutions to promote rice export in the Mekong Delta]. *Tạp chí tài chính*, 1(1), 79-81.
- Nguyen, P. T., Nguyen, O. T. P., & Nguyen, H. H. (2014). Khả năng đối kháng *Pyricularia oryzae* của vi khuẩn sinh chitinase phân lập từ đất vùng rễ lúa [Antagonistic ability of chitinase-producing bacteria isolated from rice rhizosphere soil against *Pyricularia oryzae*]. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ, Phần B: Nông nghiệp, Thủy sản và Công nghệ Sinh học*, 31(2014), 7-11.
- Phung, P. N. Y., Tran, P. V., & Ho, U. X. (2023). Tuyển chọn Chủng vi khuẩn *Bacillus* có hiệu quả kiểm soát bệnh đạo ôn do nấm *Pyricularia oryzae* được phân lập từ vùng trồng lúa ở đồng bằng sông Cửu Long [Selection of *Bacillus* strains effective in controlling rice blast disease caused by *Pyricularia oryzae* isolated from rice growing areas in the Mekong Delta]. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Đại học Thái nguyên*, 228(13), 490-497.
- Sette, L. D., DeOliveira, V. M., & Manfio, G. P. (2005). Isolation and characterization ofalachlor-degrading actinomycetes from soil. *Antonie van Leeuwenhoek*, 87(2), 81-89. doi:10.1007/s10482-004-1129-2
- Skerman, V. B. D., McGowan, V., & Sneath, P. H. A. (Eds.). (1980). Approved lists of bacterial names. *Journal of Systematic Bacteriology (IJSB)*, 30(1), 225-420. doi:10.1099/00207713-30-1-225
- Tresner, H. D., & Backus, E. J. (1963). System of color wheels for *Streptomyces* taxonomy. *Applied Microbiology*, 11(4), 335-338.
- Vu, N. T. T., Le, L. Q., Huynh, D. T., Pham, V. A., Tran, N. T. M., Tran, K. T., & Nguyen, D. H. (2020). Xác định các loài nấm gây bệnh trên cây lúa (*Oryza Sativa*) tại tỉnh Kiên Giang [Identification of fungal species causing diseases on rice (*Oryza Sativa*) in Kien Giang province]. *Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc, Đại học Huế, Công nghệ Sinh học Môi trường và Nông nghiệp*, 556-561.
- Zhou, J., Xie, Y., Liao, Y., Li, X., Li, Y., Li, S., ... He, Y. Q. (2022). Characterization of a *Bacillus velezensis* strain isolated from *Bolbostemma Rhizoma* displaying strong antagonistic activities against a variety of rice pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 13(2022), Article 983781. doi:10.3389/fmicb.2022.983781

