

## KHẢ NĂNG ỨC CHẾ NẤM *Magnaporthe oryzae* GÂY BỆNH ĐẠO ÔN TRÊN CÂY LÚA CỦA MỘT SỐ CHỦNG XẠ KHUẨN PHẦN LẬP

Nguyễn Thị Thanh Lợi, Nguyễn Trần Mai Anh, Nguyễn Văn Thế,  
Phạm Quỳnh Anh, Lê Thị Thanh Xuân, Phí Quyết Tiến\*

Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

### TÓM TẮT

Xạ khuẩn là nhóm sinh vật được chứng minh có tiềm năng thúc đẩy sự phát triển của cây chủ và ức chế một số mầm bệnh thực vật. Nghiên cứu này nhằm xây dựng được bộ sưu tập chủng xạ khuẩn mang đặc tính đối kháng nấm gây bệnh đạo ôn *Magnaporthe oryzae* đồng thời thúc đẩy sinh trưởng ở cây lúa. Tiền hành phân lập xạ khuẩn ở vùng rễ và các mô rễ, thân lúa khỏe và nhiễm bệnh đạo ôn trên ba loại môi trường khác nhau, đã thu nhận được 35 chủng xạ khuẩn. Sàng lọc khả năng kháng nấm bệnh đạo ôn chủng *M. oryzae* PO và SH của các chủng xạ khuẩn đã chỉ ra 11/35 chủng có hoạt tính đối kháng (*in vitro*). Đánh giá mức độ ức chế sinh trưởng nấm bệnh của 11 chủng xạ khuẩn lựa chọn theo phương pháp đồng nuôi cây trên đĩa thạch cho thấy, tỷ lệ ức chế tương đối (RI%) nấm bệnh trong phạm vi tương ứng 20-38% và 42-53%. Hai chủng xạ khuẩn L2k3 và D2b2 thể hiện mức độ ức chế chủng PO và SH cao nhất tương ứng 38,3% và 52,9%. Trong số này, 8/11 chủng thể hiện hoạt tính enzyme ngoại bào cellulase và chitinase, 4/11 chủng có hoạt tính amylase và 2/11 chủng biểu hiện hoạt tính protease. Hai chủng xạ khuẩn R4b1 và R4b3 đều có hoạt tính mạnh của các enzym amylase, cellulase và chitinase. Sự sản sinh hormone tăng trưởng IAA được ghi nhận ở tất cả các chủng lựa chọn với hàm lượng đạt được từ 3,8-10,8 µg/mL, cao nhất được thể hiện ở chủng xạ khuẩn R4b1. Tỷ lệ các chủng có hoạt tính phân giải phosphat và kẽm khó tan, tương ứng 1/11 (9,09%) và 5/11 (45,5%) chủng xạ khuẩn được xác định. Những kết quả nhận được làm tăng thêm hiểu biết về sự phong phú và vai trò hữu ích của các chủng xạ khuẩn được phân lập là tiền đề để tạo chế phẩm sinh học kiểm soát bệnh đạo ôn trên cây lúa.

*Từ khóa:* Bệnh đạo ôn, cây lúa, kiểm soát sinh học, *Magnaporthe oryzae*, xạ khuẩn.

### MỞ ĐẦU

Lúa là một trong những cây trồng chính cung cấp lương thực cho khoảng một nửa dân số thế giới. Các hệ thống nông nghiệp hiện đại đã mang lại sự gia tăng đáng kể năng suất gạo trong những thập kỷ qua. Tuy nhiên, các bệnh hại trên cây lúa như bệnh đạo ôn, bệnh bạc lá do vi khuẩn, bệnh thối cổ rễ, v.v... là những vấn đề lớn trong canh tác lúa gạo trên toàn thế giới (Narasimhamurthy *et al.*, 2021). Để phát triển một hệ thống nông nghiệp bền vững, cần có những phương pháp vừa đảm bảo canh tác thân thiện với môi trường vừa kiểm soát được các bệnh hại ngày càng tốt hơn.

Bệnh đạo ôn do nấm *Pyricularia oryzae/Magnaporthe oryzae* gây hại lúa nghiêm trọng nhất do mức độ phân tán rộng và nhanh trong điều kiện thuận lợi. Nấm bệnh phát triển mạnh ở nhiệt độ tương đối thấp (20-23°C), độ ẩm không khí cao và thời tiết âm u. Những triệu chứng bệnh xuất hiện sớm trên lá, lúc đầu vết bệnh nhỏ như đầu kim có màu xám xanh. Sau lan rộng thành hình thoi, xung quanh màu nâu sẫm, giữa màu trắng. Khi bệnh diễn biến nặng, các vết bệnh liên kết với nhau tạo mảng lớn, làm lá bị khô cháy, héo cây. Mầm bệnh đạo ôn có thể xâm nhập vào các mô của cây lúa ở bất kỳ giai đoạn phát triển nào và có thể gây mất mùa (Zewdu, 2021).

Các vi sinh vật tồn tại trong đất ở vùng rễ (rhizosphere) hoặc nội sinh trong các mô như rễ, thân và lá (endophytes) có khả năng kích thích quá trình sinh trưởng và phát triển của thực vật (cây lương thực và cây dược liệu) đồng thời hỗ trợ chống lại bệnh hại hoặc tác động bất lợi của các yếu tố phi sinh học. Bên cạnh nhóm vi khuẩn hữu ích, thì xạ khuẩn cũng là nhóm sinh vật nhân sơ có giá trị kinh tế và công nghệ sinh học bởi chúng sinh ra các hợp chất có hoạt tính sinh học như kháng sinh, chất chống ung thư, chất kích thích sinh trưởng, tăng cường khả năng chịu hạn, mặn. Một số chi xạ khuẩn nội sinh như *Actinomyces*, *Streptomyces*, *Microbispora*, *Kineococcus*, *Pseudonocardia*, *Nocardia* được tìm thấy ở các mô của cây lúa (Kampapongsa và Kaewkla, 2016; Tian *et al.*, 2007), các cây trồng khác (ngô, cà chua, chuối) hay cây dược liệu (Qin *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2018). Chúng thể hiện hoạt tính kháng khuẩn hoặc kháng nấm bệnh thực vật như *Xanthomonas oryzae*, *Magnaporthe oryzae*, *Rhizoctonia solani*, và *Fusarium moniliforme*.

Nghiên cứu này nhằm xây dựng một bộ sưu tập các chủng xạ khuẩn vùng rễ và trong các mô cây lúa mang các đặc tính đối kháng với nấm bệnh đạo ôn và kích thích sinh trưởng cây lúa. Từ đó sàng lọc những chủng tiềm năng vừa kiểm soát sinh học vừa thúc đẩy sinh trưởng giúp phòng bệnh đạo ôn an toàn, hiệu quả và bền vững đối với hệ sinh thái.

## NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Nguyên liệu

Các hóa chất sử dụng trong nghiên cứu được cung cấp từ các hãng khác nhau: Invitrogen, Sigma-Aldrich, Merck, Roche, Qiagen, Trung Quốc và Việt Nam. Mẫu lúa không biểu hiện bệnh và nhiễm bệnh đạo ôn được thu thập tại Nam Định, Hưng Yên và Bắc Ninh, Việt Nam. Phần đất bao quanh rễ lúa được thu riêng, loại bỏ những phần thối hỏng, rễ lúa được rửa bỏ hết đất, cắt riêng khỏi phần thân lá. Các mẫu đất, rễ và thân lá này được sử dụng cho phân lập xạ khuẩn. Hai chủng nấm gây bệnh đạo lúa *Magnaporthe oryzae* PO và SH được cung cấp bởi phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học. Các dụng cụ, môi trường, dung dịch cho thí nghiệm được vô trùng trước khi sử dụng.

Môi trường được sử dụng cho phân lập xạ khuẩn như sau: môi trường CA (Citrate Agar) (g/L) chứa: Citric acid 0,12; NaNO<sub>3</sub> 1,5; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.3H<sub>2</sub>O 0,4; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,1; CaCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O 0,05; EDTA 0,02; Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,2; thạch 17; pH 7,2; môi trường CP (Cellulose-Proline) (g/L) chứa: Cellulose 2,5; Sodium pyruvate 2; Proline 1; KNO<sub>3</sub> 0,25; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,2; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2; CaCl<sub>2</sub> 0,5; FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,01; thạch 15; pH 7,2–7,4; proline được thêm sau khi khử trùng, trước khi đổ đĩa thạch; và môi trường HV (g/L) chứa: Humic acid 1; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,5; KCl 1,7; CaCl<sub>2</sub> 0,05; FeSO<sub>4</sub> 0,01; thạch 18; pH 6, các vitamin được thêm vào môi trường với tỷ lệ 0,00005% sau khi khử trùng: thiamine HCl, riboflavin, niacin, pyridoxine–HCl, inositol, Ca-pantothenate, p-aminobenzoic acid, 0,000025% biotin. Sau khi khử trùng, các môi trường được bổ sung các kháng sinh: Nystatin 50 mg/L; K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 25 mg/L; Nalidixic acid 25 mg/L để hạn chế sự sinh trưởng của vi khuẩn và nấm (Qin *et al.*, 2009; Musa *et al.*, 2020).

### Phương pháp nghiên cứu

#### Phân lập xạ khuẩn

Đối với đất vùng rễ lúa, hòa tan 1 g đất trong 9 mL nước cất. Pha loãng đến các nồng độ 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup> và 10<sup>-3</sup> và cấy trang 0,1mL ở mỗi nồng độ lên ba loại môi trường khác nhau CA, CP và HV. Đối với rễ và thân lá lúa, các mẫu được cắt ngắn khoảng 5 cm, xử lý bề mặt bằng các dung dịch, lần lượt là Tween 80 0,1%, NaOCl 5% và Na<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S<sub>3</sub> 2,5%, cồn 70%, NaHCO<sub>3</sub>, nước khử trùng và được nghiền nhỏ trong cối chày sứ. Đặt mẫu nghiền lên đĩa thạch chứa ba loại môi trường như trên bằng dụng cụ vô trùng. Ủ đĩa trong tủ ổn nhiệt ở 30°C trong thời gian từ 2-8 tuần. Các khuẩn lạc rời được lựa chọn và làm thuần khiết bằng cách cấy chuyển nhiều lần sang môi trường mới. Quan sát hình thái khuẩn lạc, ghi lại hình ảnh và lưu chủng thuần khiết trong môi trường lỏng chứa 30% glycerol, ở -70°C để cho các thí nghiệm tiếp theo.

#### Khả năng ức chế nấm đạo ôn *in vitro*

Các chủng xạ khuẩn phân lập được kiểm tra khả năng ức chế nấm bệnh đạo ôn *M. oryzae* SH và PO bằng phương pháp đồng nuôi cấy theo Qi và đồng tác giả (2019). Đặt miếng thạch nấm có diện tích 1 cm<sup>2</sup> của chủng nấm PO hoặc SH (đã được hoạt hóa 3 ngày trước) trên mặt thạch PDA (khoai tây 200 g/L, Dextrose 20 g/L, thạch 20 g/L, pH = 7,4) cách mép đĩa 2 cm. Sau 2 ngày được ủ ở 30°C, chủng xạ khuẩn được vạch một đường có chiều dài khoảng 3 cm ở phía đối diện, cách miếng thạch nấm 2 - 3 cm. Tiếp tục ủ đĩa ở 30°C trong 5 ngày. Đĩa không có chủng xạ khuẩn được sử dụng làm đĩa đối chứng. Quan sát sự ức chế sinh trưởng của sợi nấm, so sánh với đĩa đối chứng. Tỷ lệ ức chế tương đối (Relative Inhibition - RI%) sự sinh trưởng của chủng nấm *M. oryzae* PO và SH được xác định dựa vào đường kính của nấm trên đĩa đối chứng và đĩa có chủng ức chế, theo công thức: RI% = ((D1-D2)/D1) x 100%, trong đó: D1 - đường kính (mm) khuẩn lạc nấm ở đĩa đối chứng; D2 - đường kính (mm) khuẩn lạc nấm trên đĩa đối kháng. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

#### Hoạt tính enzyme ngoại bào

Những chủng xạ khuẩn có hoạt tính ức chế nấm PO và SH cao hơn được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo. Hoạt tính enzyme ngoại bào amylase, cellulase, protease và chitinase của các chủng xạ khuẩn được xác định bằng phương pháp nuôi cấy trên đĩa thạch theo Gomez Ramirez và đồng tác giả (2004). Môi trường thạch YIM38 (Cao malt 4 g/L; cao nấm men 4 g/L; glucose 4 g/L; vi lượng YIM38 1 mL; H<sub>2</sub>O 1L điều chỉnh tới pH =7) được bổ sung tinh bột 2 g/L (đã được hồ hóa), hoặc CMC (carboxymethyl cellulose) 0,5%, hoặc casein 1% trong NaOH 1N, hoặc bột chitin colloidal 0,2% để kiểm tra lần lượt các hoạt tính enzyme trên. Cấy chấm điểm từng chủng xạ khuẩn lên đĩa môi trường, ủ đĩa ở 30°C trong 24 - 48 giờ. Hoạt tính amylase, cellulase và chitinase được xác định bằng cách đo ngập dung dịch Lugol 1% (w/v) vào đĩa trong 5 phút, sau đó rửa lại với dung dịch NaCl 1M. Đối với hoạt tính protease, TCA 1% (w/v) được sử dụng. Những chủng có hoạt tính sẽ xuất hiện vòng tròn phân giải trong suốt xung quanh khuẩn lạc. Đo đường kính vòng phân giải (D - mm) và đường kính khuẩn lạc (d - mm). Hoạt tính tương đối của enzyme được tính toán theo công thức: Hoạt tính = D - d (mm), tỷ lệ thuận với đường kính vòng phân giải cơ chất. Đối chứng âm được thực hiện bằng cách nhỏ môi trường LB lỏng lên đĩa thạch. Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

#### Sự sản sinh hormone kích thích sinh trưởng IAA

Thành phần IAA từ dịch nuôi cấy xạ khuẩn, được xác định dựa vào phản ứng màu với dung dịch thuốc thử Salkowski theo Glickmann và Dessau (1995). Phản ứng được thực hiện với 1 mL dịch nuôi cấy đã được ly tâm

và loại bỏ tế bào, bổ sung 0,5 mL thuốc thử Salkowski (được chuẩn bị mới), ủ mẫu trong 30 phút (tránh ánh sáng). Sự thay đổi màu của phản ứng thành màu hồng chỉ ra sự có mặt IAA. Hàm lượng IAA được xác định bằng cách đo dung dịch phản ứng ở bước sóng OD<sub>540nm</sub> và dựa vào đường chuẩn IAA.

**Khả năng hòa tan phosphat, kẽm**

Khả năng hòa tan phosphat, kẽm khó tan được xác định theo phương pháp của Pikovskaya với sự thay đổi nhỏ. Chia đĩa thạch thành 4 phần, đặt 10 µL dịch nuôi cấy từng chủng xạ khuẩn ở 1/4 đĩa thạch chứa môi trường P1 (g/L) có thành phần: glucose 10, NaCl 1, NH<sub>4</sub>Cl 5, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 1, thạch 15, pH 7.0 được bổ sung Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 0,2% (w/v), đặt đĩa thạch ở 30°C trong 7 ngày. Hoạt tính được xác định khi xuất hiện vòng tròn phân giải trong suốt xung quanh khuẩn lạc. Sự phân giải kẽm cũng được xác định theo cách tương tự, trong đó môi trường Z1 (g/L) được sử dụng, chứa: glucose 10, NaCl 1, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1, KCl 0,2, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 1, thạch 15, pH 7.0 được bổ sung ZnO 0,2% (w/v).

**Xử lý số liệu**

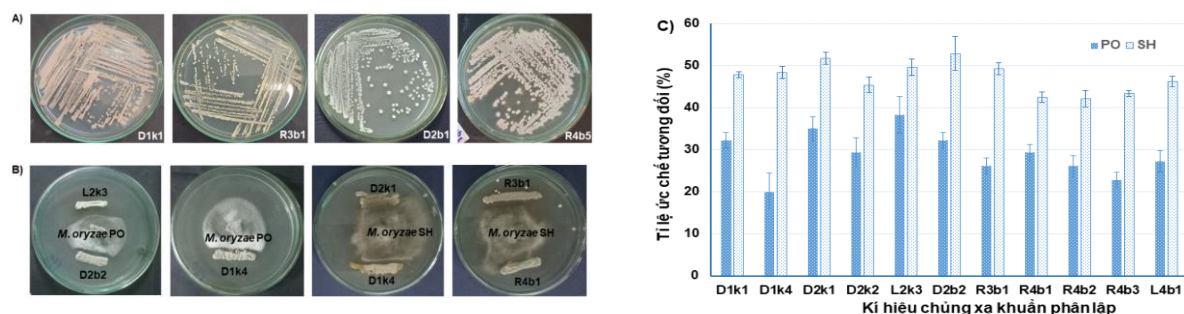
Các thí nghiệm được thực hiện lặp lại 3 lần. Kết quả được tính toán bằng phần mềm Excel 2010 và được trình bày dưới dạng giá trị trung bình ± sai số.

**KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**Phân lập và đánh giá khả năng ức chế nấm gây bệnh đạo ôn của các chủng xạ khuẩn**

Với 3 loại môi trường CA, CP và HV được sử dụng, căn cứ vào đặc điểm hình thái khuẩn lạc, đặc biệt ở sự hình thành của khuẩn ty cơ chất và khuẩn ty khí sinh, tổng số 35 khuẩn lạc xạ khuẩn được phân lập từ các mẫu đất và lúa không bệnh và nhiễm bệnh đạo ôn. Các chủng xạ khuẩn này được làm thuần khiết bằng cách cấy trải nhiều lần trên môi trường phân lập tương ứng. Trong số đó, 11 chủng xạ khuẩn được phân lập từ đất vùng rễ lúa và 24 chủng nội sinh từ rễ và thân lá lúa. Quan sát đặc điểm nuôi cấy các chủng xạ khuẩn trên ba loại môi trường cho thấy, chúng phát triển chậm, màu sắc khuẩn lạc chủ yếu là màu trắng có 15 chủng (chiếm 42,85%), tiếp sau là khuẩn lạc màu nâu có 11 chủng (chiếm 31,42%), màu xám có 6 chủng (chiếm 17,1%) và còn lại 3 chủng có màu vàng (chiếm 8,6%) (Hình 1A). Để có thể phân loại đến chi của các chủng xạ khuẩn này cần có các nghiên cứu sâu hơn nữa về đặc điểm vi hình thái, phân tích trình tự gen 16S rRNA, ...

Nhằm thu được đa dạng phân loài xạ khuẩn từ thực vật, nhiều nghiên cứu đã sử dụng các loại môi trường khác nhau để phân lập được nhiều nhất có thể. Qin *et al.* (2009) và Musa *et al.* (2020) đã sử dụng hàng chục môi trường khác nhau cho phân lập xạ khuẩn nội sinh từ cây dược liệu. Trên cây lúa, Kampapongsa và Kaewkla (2016) cũng đã sử dụng 4 môi trường khác nhau để phân lập xạ khuẩn nội sinh từ rễ, thân và lá lúa. Những nghiên cứu đã cho thấy, các môi trường dinh dưỡng đơn giản có chứa các vitamin (như vitamin nhóm B) hoặc axit amin (như asparagine, glutamine, serine, proline, alanine, aspartic acid) đem lại hiệu quả cao cho phân lập xạ khuẩn. Ở đó, chi xạ khuẩn thu nhận chiếm đa số hơn 50% là *Streptomyces*, ngoài ra còn có các chi khác như *Actinomycete*, *Microbispora*, *Kineococcus*, *Pseudonocardia*, *Nocardiosis*, ... Trong đất vùng rễ cây trồng (rhizosphere), sự phân lập các chủng xạ khuẩn cũng được tiến hành trên nhiều loại môi trường khác nhau (Nalini *et al.*, 2020).



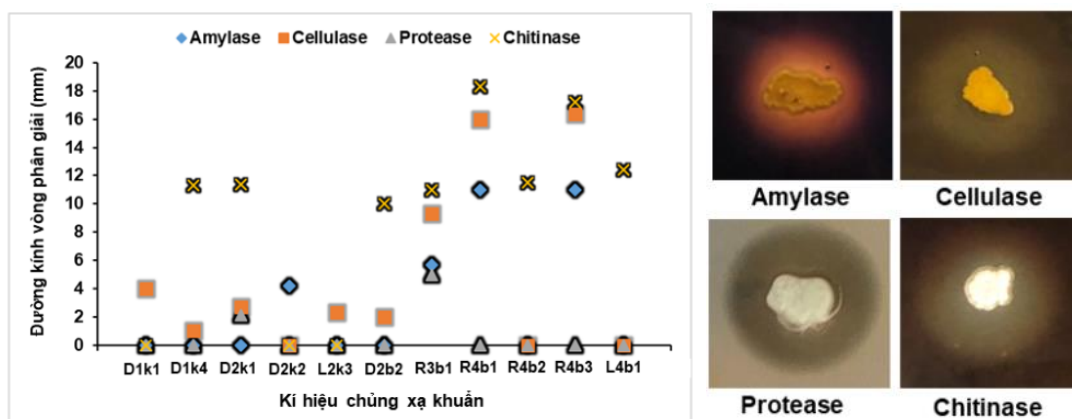
**Hình 1. Chủng xạ khuẩn phân lập (A) và khả năng ức chế sinh trưởng nấm gây bệnh đạo ôn *M. oryzae* PO và SH (B, C)**

Kết quả kiểm tra hoạt tính ức chế sinh trưởng nấm bệnh đạo ôn với hai chủng *M. oryzae* PO và SH *in vitro* của các chủng xạ khuẩn phân lập cho thấy 11/35 chủng thể hiện khả năng kháng nấm với mức độ ức chế khác nhau, bao gồm D1k1, D1k4, D2k1, D2k2, L2k3, D2b2, R3b1, R4b1, R4b2, R4b3 và L4b1 (Hình 1B và 1C). Tỷ lệ ức chế tương đối (RI%) của 11 chủng xạ khuẩn với hai chủng nấm đạo ôn là khác nhau. Đối với chủng nấm PO, giá trị RI% không cao, dao động từ 20 – 38%, trong đó chủng L2k3 có mức ức chế cao nhất tương ứng 38,3 ± 4,41%. Đối với chủng nấm SH, các chủng xạ khuẩn có mức ức chế không chênh lệch nhau đáng kể với giá trị RI% trong khoảng từ 42 – 53%, trong đó chủng D2b2 đạt cao nhất 52,9 ± 4,02% (Hình 1C). Như vậy, 11 chủng xạ khuẩn phân lập có khả năng ức chế chủng nấm SH cao hơn chủng PO. Tuy nhiên, không có chủng xạ khuẩn nào (được phân lập ở cả hai loại mẫu lúa không bệnh và bệnh đạo ôn) thể hiện hoạt tính ức chế mạnh với hai chủng nấm

thử nghiệm. Kết quả này đồng nhất với công bố của Kampapongsa và Kaewkla (2016), trong đó hơn 50% các chủng xạ khuẩn nội sinh được phân lập từ giống lúa nước *Oryza sativa* L. KDML 105 chỉ ra mức độ ức chế thấp với chủng nấm đạo ôn *Pyricularia oryzae* 61119, một nửa (50%) số chủng xạ khuẩn còn lại không thể hiện hoạt tính ức chế với nấm đạo ôn (Kampapongsa và Kaewkla, 2016).

### Hoạt tính enzyme ngoại bào của các chủng xạ khuẩn phân lập

Các enzyme thủy phân ngoại bào như amylase, cellulase, protease và chitinase đóng vai trò quan trọng đối với sự sống của vi sinh vật và đóng góp vào sự ức chế mầm bệnh thực vật (Bardin *et al.*, 2015; Rais *et al.*, 2016). Trong nghiên cứu này, hoạt tính của bốn loại enzyme ngoại bào trên được đánh giá *in vitro* dựa vào sự thủy phân các cơ chất tương ứng là tinh bột, CMC, casein và chitin. Trong số 11 chủng xạ khuẩn được kiểm tra, 8/11 chủng (72,7%) thể hiện hoạt tính cellulase và chitinase, 4/11 chủng (36,4%) thể hiện hoạt tính amylase và chỉ có 2/11 chủng (18,2%) có hoạt tính protease. Số chủng biểu hiện hoạt tính chitinase và cellulase là cao nhất với đường kính vòng phân giải khá cao từ 10÷18 mm (chitinase) và 1÷16 mm đối với cellulase. Số chủng có hoạt tính amylase giảm đáng kể với đường kính vòng phân giải chỉ từ 4÷11 mm và ít nhất là đối với protease với đường kính chỉ đạt 2÷5 mm (Hình 2). Quan sát kết quả trên hình 2 cho thấy, hai chủng xạ khuẩn R4b1 và R4b3 đều có hoạt tính mạnh nhất ở cả ba enzyme amylase, cellulase và chitinase so với các chủng còn lại. Không có chủng xạ khuẩn nào có đường kính vòng phân giải cao hơn 20 mm, và có 5/11 chủng xạ khuẩn chỉ thể hiện duy nhất một hoạt tính enzyme ngoại bào (D1k1, D2k2, L2k3, R4b2 và L4b1). Điều này cũng có thể giải thích phần nào khả năng ức chế các chủng nấm bệnh đạo ôn của các chủng xạ khuẩn phân lập. Một số nghiên cứu trước đã chỉ ra vai trò của enzyme chitinase, protease đến sự ức chế sinh trưởng và kiểm soát mầm bệnh nấm nhờ hoạt tính phân hủy thành tế bào nấm (Singh *et al.*, 2014; Chaiharin *et al.*, 2018).

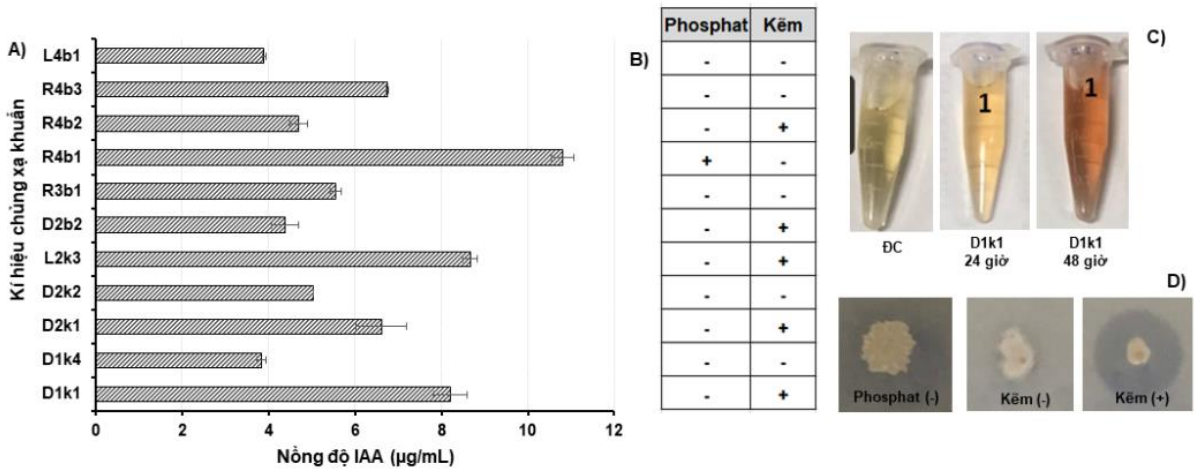


Hình 2. Hoạt tính enzyme ngoại bào của các chủng xạ khuẩn phân lập

### Khả năng sản sinh hormone IAA và phân giải phosphat, kẽm của các chủng xạ khuẩn phân lập

Các chủng vi sinh vật hữu ích cộng sinh với cây trồng kích thích sinh trưởng trực tiếp bằng sự tiết hormone thực vật hoặc gián tiếp thông qua cạnh tranh dinh dưỡng, phân giải phosphat và kẽm khó tan hoặc cảm ứng tính đề kháng bệnh phổ rộng ở thực vật như kích thích sự đề kháng hệ thống, hoặc sản sinh các chất hóa học đối kháng (Compant *et al.*, 2005). Kiểm tra khả năng sản sinh IAA cho thấy, tất cả các chủng xạ khuẩn đều tổng hợp IAA với nồng độ dao động từ 3,8÷10,8 µg/mL, trong đó chủng R4b1 đã sản sinh IAA đạt mức cao nhất 10,8 ± 0,26 µg/mL (Hình 3A, 3C).

Các nghiên cứu cũng chỉ ra rằng, ngoài hormone IAA giúp kích thích sinh trưởng và phát triển ở thực vật, những vi sinh vật hữu ích trong đất, rễ hay nội sinh ở các mô còn có khả năng phân giải phosphat và kẽm khó tan. Nhờ quá trình đó, vi sinh vật sẽ chuyển hóa hai thành phần này thành dạng hòa tan giúp cho thực vật dễ dàng hấp thụ để phát triển. Ở nghiên cứu này, khi kiểm tra khả năng phân giải phosphat và kẽm khó tan trong điều kiện *in vitro* của các chủng xạ khuẩn phân lập cho thấy, tỷ lệ chủng xuất hiện vòng tròn phân giải phosphat rất thấp chỉ 1/11 chủng (9,09%) trong khi tỷ lệ chủng có hoạt tính phân giải kẽm là 5/11 chủng (chiếm 45,5%) (Hình 3B, 3D). Kết quả này cho thấy, hoạt tính phân giải phosphat và kẽm ở các chủng xạ khuẩn được kiểm tra không phải là đặc tính ưu thế. Song sự nghiên cứu sâu hơn về hỗ trợ quá trình sinh trưởng và phát triển ở thực vật được dựa vào khả năng cố định ni-tơ, sự sản sinh các siderophore ở các chủng xạ khuẩn này có thể được tiến hành kiểm tra. Những đặc tính này được chỉ ra ở nhiều chi xạ khuẩn được phân lập từ các thực vật khác nhau (Singh và Dubey, 2018) và ở nhiều chủng vi khuẩn vùng rễ lúa thuộc các chi *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* và *Leclercia* (Kumar *et al.*, 2020; Melo *et al.*, 2016).



Hình 3. Khả năng sản sinh IAA (A, C) và hoạt tính phân giải phosphat, kẽm (B, D) của các chủng xạ khuẩn phân lập.

Dấu (+): Có hoạt tính; dấu (-): Không có hoạt tính; DC: Đối chứng.

## KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã phân lập được 35 chủng xạ khuẩn từ vùng rễ và các mô khác nhau của cây lúa được thu thập từ các tỉnh Bắc Ninh, Hưng Yên và Nam Định, trong đó có 11 chủng thể hiện sự đối kháng nấm bệnh đạo ôn *M. oryzae* PO và SH với RI% trong khoảng tương ứng 20-38% và 42-53%. Hai chủng xạ khuẩn L2k3 và D2b2 thể hiện mức độ ức chế PO và SH cao nhất lần lượt tương ứng với 38,3% và 52,9%. Hoạt tính enzyme ngoại bào cellulase và chitinase được thể hiện ở 8/11 chủng, amylase với 4/11 chủng và protease với 2/11 chủng, trong đó hai chủng xạ khuẩn R4b1 và R4b3 đều có hoạt tính mạnh của các enzym amylase, cellulase và chitinase. Sự sản sinh hormone tăng trưởng IAA được ghi nhận ở tất cả các chủng kiểm tra với giá trị từ 3,8-10,8 µg/mL, trong đó chủng R4b1 đã sản sinh IAA đạt mức cao nhất 10,8 µg/mL. Tỷ lệ các chủng có hoạt tính phân giải phosphat và kẽm khó tan, tương ứng 1/11 (9,09%) ở chủng R4b1 và 5/11 (45,5%) chủng xạ khuẩn được xác định.

**Lời cảm ơn:** Công trình này được thực hiện nhờ sự hỗ trợ kinh phí của Đề tài: Nghiên cứu hệ vi sinh vật trên cây lúa nhiễm bệnh đạo ôn tại vùng đồng bằng sông Hồng và định hướng kiểm soát bệnh bằng giải pháp sinh học. Đề tài thuộc các hướng khoa học và công nghệ ưu tiên cấp Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, mã số: VAST02.03/22-23.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bardin M, Ajouz S, Comby M, Lopez-Ferber M, Graillot B, Siegwart M, Nicot PC (2015) Is the efficacy of biological control against plant diseases likely to be more durable than that of chemical pesticides? *Front Plant Sci* 6: 566.
- Chaiham M, Sujada N, Pathom-Aree W, Lumyong S (2018) The antagonistic activity of bioactive compound producing *Streptomyces* of Fusarium wilt disease and sheath blight disease in rice. *Chiang Mai J Sci* 45(4): 1680-1698
- Compant S, Duffy B, Nowak J, Clément C, Barka EA (2005) Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl Environ Microbiol* 71(9): 4951.
- Kampapongsa D, Kaewkla O (2016) Biodiversity of endophytic actinobacteria from jasmine rice (*Oryza sativa* L. KDML 105) grown in Roi-Et Province, Thailand and their antimicrobial activity against rice pathogens. *Ann Microbiol* 66: 587-595.
- Kumar V, Jain L, Jain SK, Chaturvedi S, Kaushal P (2020) Bacterial endophytes of rice (*Oryza sativa* L.) and their potential for plant growth promotion and antagonistic activities. *S Afr J Bot* 134: 50-63.
- Melo J, Carolino M, Carvalho L *et al.* (2016) Crop management as a driving force of plant growth promoting rhizobacteria physiology. *Springerplus* 5, 1574: 1-16.
- Musa Z, Ma J, Egamberdieva D, Abdelshafy Mohamad OA, Abaydulla G, Liu Y, Li W-J and Li L (2020) Diversity and antimicrobial potential of cultivable endophytic actinobacteria associated with the medicinal plant thymus roseus. *Front Microbiol* 11:191.
- Nalini BS, Muthuraju R, Vendan T, Brahmaprakash GP, YA NR, Nagaraju N, & Anil VS (2020). Isolation of plant growth promoting actinobacteria from the rhizosphere of finger millet and cowpea. *J Pharmacogn Phytochem*, 9(6): 1103-1107.
- Narasimhamurthy HB, Naik G, Sehgal M, & Malik M (2021). Integrated management of rice diseases. *J Adv Agric Technol*, 4(2): 13-24.
- Qin S, Li J, Chen HH, Zhao GZ, Zhu WY, Jiang CL, ... & Li WJ (2009). Isolation, diversity, and antimicrobial activity of rare actinobacteria from medicinal plants of tropical rain forests in Xishuangbanna, China. *Appl Environ Microbiol* 75(19): 6176-6186.
- Rais A, Shakeel M, Hafeez FY, Hassan MN (2016) Plant growth promoting rhizobacteria suppress blast disease caused by *Pyricularia oryzae* and increase grain yield of rice. *BioControl* 61: 769-780.
- Singh G, Bhalla A, Bhatti JS, Chandel S, Rajput A, Abdullah A, Andrabi W, Kaur P (2014) Potential of chitinases as a biopesticide against agriculturally harmful fungi and insects. *Res Rev J Microbiol Biotechnol* 3: 27-32.

Singh R and Dubey AK (2018) Diversity and applications of endophytic actinobacteria of plants in special and other ecological niches. *Front. Microbiol.* 9:1767.

Zewdu Z (2021). Rice blast biology and reaction of host to the disease. *World News of Natural Sciences*, 39: 11-21.

## INHIBITORY CAPACITY OF ACTINOBACTERIAL ISOLATES AGAINST RICE BLAST FUNGUS *Magnaporthe oryzae*

Nguyen Thi Thanh Loi, Nguyen Tran Mai Anh, Nguyen Van The, Pham Quynh Anh, Le Thi Thanh Xuan, Phi Quyet Tien\*

*Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology*

### SUMMARY

Actinobacteria are a group of organisms demonstrated to have the potential to promote host plant growth and inhibit several plant pathogens. This study aims to establish a collection of actinobacterial strains showing antagonistic properties against the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* and promoting growth in rice. Actinobacteria were isolated from the rhizosphere and root, stem, and leaf tissues of both healthy and rice blast-infected plants on three different media, which resulted in 35 actinobacterial isolates. Screening for antifungal activity against *M. oryzae* strains PO and SH revealed that 11 out of the 35 isolates exhibited antagonistic activity (*in vitro*). The degree of fungal inhibition by the 11 selected actinobacterial isolates was assessed through a co-culture method on agar plates, showing relative inhibition percentages (RI%) that ranged from 20-38% (for the PO strain) and 42-53% (for the SH strain). Two isolates, L2k3 and D2b2, demonstrated the highest inhibition levels at 38.3% and 52.9%, respectively. Among these, 8 out of 11 isolates demonstrated extracellular enzyme activities of cellulase and chitinase, 4 out of 11 showed amylase activity, and 2 out of 11 exhibited protease activity. Both of R4b1 and R4b3 isolates showed the strongest activity of amylase, cellulase and chitinase. The production of the growth hormone IAA was recorded in all selected isolates with concentrations ranging from 3.8 to 10.8 µg/mL, the highest being shown by R4b1 isolate. The proportions of isolates that catalyzed insoluble phosphate and zinc solubilization were 1/11 (9.09%) and 5/11 (45.5%), respectively. These results provide new insights into the diversity and beneficial roles of the isolated actinobacteria and serve as a basis for developing bio-preparations to control rice blast disease.

**Keywords:** Blast disease, rice plant, biocontrol, *Magnaporthe oryzae*, actinobacteria.

---

\* Author for correspondence: Tel: +84-976860676; Email: tienpq@ibt.ac.vn