

ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC TỰ NHIÊN

Nguyễn Thị Thanh Mai

NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC, DI TRUYỀN
CỦA MỘT SỐ CHỦNG XẠ KHUẨN CÓ HOẠT TÍNH ĐỐI
KHÁNG NẤM *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* GÂY BỆNH
HÉO VÀNG TRÊN CÂY CHUỐI TẠI VIỆT NAM

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

Hà Nội - 2025

ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC TỰ NHIÊN

Nguyễn Thị Thanh Mai

NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC, DI TRUYỀN
CỦA MỘT SỐ CHỦNG XẠ KHUẨN CÓ HOẠT TÍNH ĐỐI
KHÁNG NẤM *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* GÂY BỆNH
HÉO VÀNG TRÊN CÂY CHUỐI TẠI VIỆT NAM

Chuyên ngành: Vi sinh vật học

Mã số: 9420101.07

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

1. PGS.TS. Nguyễn Xuân Cảnh
2. PGS.TS. Trần Văn Tuấn

Hà Nội - 2025

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của tôi dưới sự hướng dẫn của PGS.TS. Nguyễn Xuân Cảnh và PGS.TS. Trần Văn Tuấn. Các số liệu trong luận án là trung thực, một phần đã được công bố trên các Tạp chí khoa học trong nước và quốc tế, phần còn lại chưa từng được ai công bố trong bất kỳ công trình nào khác.

Hà Nội, ngày tháng năm 2025

Tác giả luận án

Nguyễn Thị Thanh Mai

LỜI CẢM ƠN

Lời đầu tiên, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành và sâu sắc tới **PGS.TS. Nguyễn Xuân Cảnh**, Trưởng Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam đã luôn động viên và tận tình chỉ bảo, hướng dẫn tôi thực hiện luận án này. Trong thời gian thực hiện luận án nghiên cứu sinh (NCS), tôi đã trưởng thành hơn rất nhiều trong lĩnh vực nghiên cứu khoa học.

Tôi xin bày tỏ lòng cảm ơn tới **PGS.TS. Trần Văn Tuấn**, Trưởng Bộ môn Vi sinh vật học - Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQGHN đã truyền đạt nhiều kinh nghiệm quý báu, luôn ủng hộ và giúp đỡ, động viên tôi trong suốt quá trình học tập và làm luận án.

Tôi xin trân trọng cảm ơn tập thể giảng viên, cán bộ Bộ môn Vi sinh vật học, Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQGHN và tập thể cán bộ, giảng viên Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam đã giảng dạy, truyền đạt cho tôi những kiến thức mới và luôn luôn tạo mọi điều kiện để tôi có thể hoàn thành các thí nghiệm và khóa học này.

Tôi xin trân trọng cảm ơn lãnh đạo, toàn thể cán bộ, đồng nghiệp tại Trung tâm Sinh học Thực nghiệm – Viện Ứng dụng Công nghệ đã hỗ trợ và tạo điều kiện thuận lợi để tôi có thời gian học tập và thực hiện luận án.

Để hoàn thành luận án này, tôi đã nhận được sự hỗ trợ từ đề tài KH&CN tiềm năng cấp Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn (mã số ĐTTN.13/21), đề tài KH&CN cấp Quốc gia (mã số NVQG-2021/ĐT.01) và Chương trình học bổng đào tạo thạc sỹ, tiến sỹ trong nước của Quỹ Đổi mới sáng tạo Vingroup (VINIF), (mã số VINIF.2022.TS071 và VINIF.2023.TS085). Tôi luôn trân trọng những sự hỗ trợ này.

Cuối cùng tôi gửi lời cảm ơn tới gia đình, bạn bè, người thân đã luôn động viên, ủng hộ và tạo điều kiện về mọi mặt trong suốt thời gian tôi học tập và nghiên cứu.

Hà Nội, ngày tháng năm 2025

Tác giả luận án

Nguyễn Thị Thanh Mai

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
MỤC LỤC	1
CHỮ VIẾT TẮT.....	5
DANH MỤC BẢNG.....	8
DANH MỤC HÌNH.....	9
MỞ ĐẦU	12
Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	16
1.1. TỔNG QUAN VỀ BỆNH HÉO VÀNG TRÊN CÂY CHUỐI	16
1.1.1. Tình hình bệnh héo vàng trên cây chuối.....	16
1.1.2. Đặc điểm, cơ chế và tác nhân gây bệnh héo vàng trên cây chuối.	18
1.1.3. Kiểm soát bệnh dịch héo vàng trên cây chuối	24
1.2. CÁC HỢP CHẤT THỨ CẤP CÓ HOẠT TÍNH ĐỐI KHÁNG NẤM TỪ XẠ KHUẨN.....	27
1.2.1. Tình hình nghiên cứu hợp chất thứ cấp có hoạt tính kháng nấm từ xạ khuẩn	27
1.2.2. Cơ chế đối kháng với mầm bệnh của xạ khuẩn.	32
1.3. THU NHẬN HỢP CHẤT THỨ CẤP TỪ XẠ KHUẨN	38
1.3.1. Phân lập hợp chất thứ cấp từ xạ khuẩn	39
1.3.2. Xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất thứ cấp từ xạ khuẩn	40
1.3.3. Nhóm các hợp chất kháng nấm phân lập từ xạ khuẩn	41
1.4. THÔNG TIN DI TRUYỀN HỆ GEN XẠ KHUẨN LIÊN QUAN ĐẾN HOẠT TÍNH KHÁNG NẤM	43
1.4.1. Phương pháp khai thác hệ gen xạ khuẩn.....	43
1.4.2. Các công cụ và phần mềm tin sinh học trong khai thác hệ gen xạ khuẩn	45

1.4.3.	Đặc điểm hệ gen xạ khuẩn thuộc chi <i>Streptomyces</i>	50
Chương 2.	VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	53
2.1.	VẬT LIỆU.....	53
2.1.1.	Đối tượng nghiên cứu	53
2.1.2.	Hóa chất và trang thiết bị.....	53
2.2.	PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	55
2.2.1.	Sơ đồ nghiên cứu	55
2.2.2.	Phương pháp lấy mẫu	55
2.2.3.	Phương pháp phân lập, tuyển chọn, xác định đặc điểm sinh học của vi sinh vật	56
2.2.4.	Phương pháp tái lây nhiễm nấm gây bệnh nhân tạo trong phòng thí nghiệm trên cây chuối.....	59
2.2.5.	Phương pháp định danh vi sinh vật.....	60
2.2.6.	Phương pháp đánh giá mức độ an toàn của các chủng xạ khuẩn tuyển chọn	63
2.2.7.	Các phương pháp trong giải trình tự hệ gen xạ khuẩn.....	64
2.2.8.	Phân tích hệ gen của chủng xạ khuẩn tuyển chọn	66
2.2.9.	Nghiên cứu các điều kiện lên men nhằm tăng khả năng kháng nấm <i>Foc</i> TR4 của chủng xạ khuẩn tuyển chọn	68
2.2.10.	Phương pháp xác định khả năng đối kháng nấm gây bệnh thực vật của xạ khuẩn.....	69
2.2.11.	Xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) và nồng độ diệt nấm tối thiểu (MFC) [172].....	70
2.2.12.	Ảnh hưởng của cao chiết xạ khuẩn lên sinh trưởng hệ sợi.	71
2.2.13.	Ảnh hưởng của cao chiết xạ khuẩn lên khả năng hình thành bào tử. .	72
2.2.14.	Phương pháp phân tách và xác định các hoạt chất thứ cấp	73
2.2.15.	Phương pháp xử lý số liệu	75

Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	76
3.1. Phân lập, tuyển chọn nấm <i>Foc</i> TR4 gây bệnh héo vàng trên cây chuối tại Việt Nam	76
3.1.1. Phân lập, tuyển chọn nấm <i>Foc</i>	76
3.1.2. Tái lây nhiễm các chủng nấm gây bệnh trong phòng thí nghiệm.....	78
3.1.3. Định danh các chủng nấm gây bệnh héo vàng trên cây chuối.....	82
3.2. Sàng lọc và tuyển chọn chủng xạ khuẩn có khả năng đối kháng nấm gây bệnh héo vàng trên cây chuối.....	87
3.2.1. Tuyển chọn xạ khuẩn có khả năng đối kháng nấm gây bệnh héo vàng trên chuối.	87
3.2.2. Nghiên cứu đặc điểm sinh học của các chủng xạ khuẩn.	89
3.2.3. Đánh giá hoạt tính sinh học của các chủng xạ khuẩn nghiên cứu	96
3.2.4. Định danh các chủng xạ khuẩn.	100
3.2.5. Đánh giá mức độ an toàn của các chủng xạ khuẩn tuyển chọn	101
3.2.6. Lựa chọn các điều kiện lên men thích hợp nhằm tăng khả năng kháng nấm <i>Foc</i> TR4 VCM1520 của chủng xạ khuẩn VNUA116	103
3.2.7. Đánh giá hoạt tính kháng nấm <i>Foc</i> TR4 VCM1520 của chủng xạ khuẩn VNUA116	107
3.3. Phân lập và xác định cấu trúc hóa học các hợp chất từ chủng xạ khuẩn <i>Streptomyces lilacinus</i> VNUA116.....	112
3.3.1. Xử lý mẫu, tạo cặn chiết	112
3.3.2. Phân lập các chất từ các cặn chiết.....	113
3.3.3. Thông số vật lí và dữ liệu phổ của các hợp chất phân lập được từ chủng <i>Streptomyces lilacinus</i> VNUA116.....	115
3.4. Phân tích đặc tính di truyền hệ gen chủng xạ khuẩn VNUA116.....	122
3.4.1. Giải trình tự hệ gen chủng xạ khuẩn VNUA116	122
3.4.2. Phân tích đặc điểm di truyền hệ gen chủng xạ khuẩn VNUA116	124

3.4.3. Các cụm gen sinh tổng hợp hợp chất thứ cấp của chủng xạ khuẩn VNUA116.....	131
3.4.4. Tìm kiếm con đường liên quan đến sinh tổng hợp hoạt chất kháng nấm của chủng xạ khuẩn VNUA116.....	132
KẾT LUẬN	147
KIẾN NGHỊ	149
DANH MỤC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC CỦA TÁC GIẢ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN.....	150
TÀI LIỆU THAM KHẢO	152
PHỤ LỤC	183

CHỮ VIẾT TẮT

Chữ viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
AntiSMASH	Antibiotics & Secondary Metabolite Analysis Shell	Công cụ phân tích hệ gen tạo ra các hợp chất chuyển hóa thứ cấp
ATCC	American Type Culture Collection	Bảo tàng giống chuẩn Hoa Kỳ
BCA	Biological Control Agent	Tác nhân kiểm soát sinh học
BGCs	Biosynthetic Gene Clusters	Cụm gen sinh tổng hợp
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool	Công cụ tìm kiếm và đối sánh trình tự
CAS	Chemical Abstracts Service	Cơ sở dữ liệu hóa học
CC	Column Chromatography	Sắc ký cột
CDS	Coding DNA Sequence	Trình tự mã hóa của gen
COG	Cluster of orthologous groups	Cơ sở dữ liệu COG
CSDL		Cơ sở dữ liệu
DNA	Deoxyribonucleic acid	Axit deoxyribonucleic
DNBSEQ	DNA Nanoball Sequencing	Nền tảng giải trình tự đoạn ngắn
ESI-MS	Electrospray Ionisation Mass Spectrometry	Phổ khối ion hóa phun mù điện tử
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations	Tổ chức Nông lương Liên hợp quốc
<i>Foc</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	-
<i>Foc TR4</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> race 4	-
GI	Growth Inhibition	Ức chế sinh trưởng
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation	Phổ tương tác dị hạt nhân qua nhiều liên kết

HPLC	High-performance liquid chromatography	Sắc ký lỏng hiệu năng cao
HR-ESI-MS	High-Resolution Electrospray Ionization Mass Spectrometry	Phổ khối lượng phân giải cao
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation	Phổ tương tác dị hạt nhân qua 1 liên kết
IAA	Indole-3-acetic acid	Chất tăng trưởng thực vật nhóm auxin
ISR	Induced Systemic Resistance	Cảm ứng kháng hệ thống
ITS	Internal transcribed spacer of ribosomal DNA	Vùng ITS của rDNA
JA/ET	Jasmonic acid/ethylene	Axit jasmonic/ etylen
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes	Cơ sở dữ liệu KEGG
KTCC	-	Khuẩn ty cơ chất
KTKS	-	Khuẩn ty khí sinh
MFC	Minimum fungicidal concentration	Nồng độ diệt nấm tối thiểu
MIC	Minimum inhibitory concentration	Nồng độ ức chế tối thiểu
NMR	Nuclear Magnetic Resonance	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân
NP	Natural Products	Sản phẩm từ thiên nhiên
NRP	Non-Ribosomal Peptide	-
PDA	Potato dextrose agar	Môi trường thạch khoai tây
PDB	Potato dextrose broth	Môi trường khoai tây dạng dịch
PIRG	Percent inhibition of radical growth	Hiệu lực ức chế sinh trưởng
PKS	Polyketide Synthase	-
PSGI	Percentage of Spore Germination	Phần trăm ức chế sự nảy

	Inhibition	mãm của bào tử
RNA	Ribonucleic acid	Axit ribonucleic
SAR	Systemic Acquired Resistance	Kích kháng bệnh lưu dẫn
SMRT	Single Molecule Real-Time	Giải trình tự theo thời gian thực phân tử đơn
TLC	Thin Layer Chromatography	Sắc ký lớp mỏng
VOC	Volatile Organic Compound	Hợp chất hữu cơ dễ bay hơi

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Tính phân cực của một số dung môi [15].....	39
Bảng 2.1. Các cặp môi đặc trưng được sử dụng trong nghiên cứu.....	62
Bảng 3.1. Số lượng các chủng nấm <i>Foc</i> phân lập được tại một số tỉnh của Việt Nam	77
Bảng 3.2. Mức độ biểu hiện bệnh của các chủng nấm phân lập sau 90 ngày thí nghiệm.....	80
Bảng 3.3. Định danh các chủng nấm phân lập bằng các cặp môi đặc trưng.....	86
Bảng 3.4. Đặc điểm nuôi cấy của chủng xạ khuẩn nghiên cứu trên môi trường Gause I và ISP.....	91
Bảng 3.5. Đặc điểm sinh lý, sinh hóa của các chủng xạ khuẩn tuyển chọn.....	94
Bảng 3.6. Mức độ an toàn sinh học của các chủng xạ khuẩn tuyển chọn.....	102
Bảng 3.7. Nồng độ ức chế của cao chiết lên sinh trưởng nấm <i>Foc</i> TR4 VCM1520.	109
Bảng 3.8. Các hợp chất phân lập được trong dịch lên men chủng xạ khuẩn VNUA116.....	115
Bảng 3.9. Tính chất các hợp chất phân lập được.....	121
Bảng 3.10. Thông số hệ gen chủng xạ khuẩn VNUA116 theo nền tảng DNBSEQ	122
Bảng 3.11. Thông số hệ gen chủng xạ khuẩn VNUA116 theo nền tảng PacBio....	123
Bảng 3.12. Đặc điểm hệ gen chủng xạ khuẩn VNUA116.....	124
Bảng 3.13. Số lượng các nhóm gen CAZyme của chủng xạ khuẩn VNUA116 (theo CAZy database).....	128
Bảng 3.14. Các cụm gen sinh tổng hợp chất kháng nấm được dự đoán trong hệ gen chủng xạ khuẩn VNUA116.....	133

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Các triệu chứng bệnh héo vàng trên chuối gây ra do nấm <i>Foc</i> [230]	20
Hình 1.2. Chu kỳ gây bệnh của nấm <i>Foc</i> trên cây chuối [228]	21
Hình 1.3. Các mốc thời gian phát hiện nấm <i>Foc</i> TR4 [78].....	23
Hình 1.4. Các cơ chế kháng nấm gây bệnh thực vật của xạ khuẩn [196]	33
Hình 1.5. Các nhóm chức năng của siderophore	35
Hình 1.6. Cơ chế hoạt động của siderophore [213]	36
Hình 1.7. Cảm ứng kháng hệ thống (ISR) ở thực vật	38
Hình 1.8. Cấu trúc của các chất chính nhóm polyene macrolide.....	41
Hình 1.9. Cấu trúc của các chất chính nhóm echinocandin	43
Hình 1.10. Tổng quan về phương pháp khai thác các sản phẩm tự nhiên từ xạ khuẩn [184]	44
Hình 1.11 Các công cụ và phần mềm tin sinh học trong khai thác hệ gen[132]	46
Hình 1.12. Sơ đồ biểu diễn ứng dụng Blast2GO	48
Hình 1.13. Số lượng hệ gen xạ khuẩn được công bố trên NCBI RefSeq đến 6/2023 [144]	51
Hình 2.1. Sơ đồ nghiên cứu.....	55
Hình 2.2. Sơ đồ quy trình phân tích hệ gen xạ khuẩn.....	66
Hình 3.1. Các vị trí lấy mẫu trên cây chuối bị bệnh héo vàng.....	76
Hình 3.2. Tái lây nhiễm các chủng nấm điển hình gây bệnh héo vàng trên cây chuối	80
Hình 3.3. Tái lây nhiễm các chủng nấm điển hình gây bệnh héo vàng trên lá chuối	82
Hình 3.4. Cây phát sinh chủng loại của các chủng nấm gây bệnh héo vàng đại diện.	84
Hình 3.5. Hình ảnh PCR nhân gen bằng cặp mồi <i>Foc</i> TR4-F/ <i>Foc</i> TR4-R.....	85
Hình 3.6. Đánh giá hoạt tính kháng nấm của bộ sưu tập xạ khuẩn.....	87

Hình 3.7. Khả năng kháng nấm <i>Foc</i> TR4 VCM1520 của 03 chủng xạ khuẩn tuyển chọn.....	88
Hình 3.8. Hình thái khuẩn lạc của các chủng xạ khuẩn trên các môi trường nuôi cấy.	90
Hình 3.9. Đặc điểm hình thái của các chủng xạ khuẩn nghiên cứu.....	93
Hình 3.10. Khả năng sinh sắc tố melanin của 3 chủng xạ khuẩn nghiên cứu.....	94
Hình 3.11. Khả năng sinh enzyme ngoại bào của 3 chủng xạ khuẩn nghiên cứu.....	97
Hình 3.12. Khả năng sinh IAA của 3 chủng xạ khuẩn nghiên cứu.....	98
Hình 3.13. Khả năng sinh siderophore của 3 chủng xạ khuẩn nghiên cứu.....	99
Hình 3.14. Cây phát sinh chủng loại 3 chủng xạ khuẩn tuyển chọn.....	101
Hình 3.15. Ảnh hưởng của một số điều kiện trong quá trình lên men chủng xạ khuẩn VNUA116	105
Hình 3.16. Khả năng ức chế nấm <i>Foc</i> TR4 VCM1520 của chủng xạ khuẩn VNUA116	106
Hình 3.17. Tác động của cao chiết xạ khuẩn đến sự phát triển của nấm <i>Foc</i> TR4 VCM1520.....	107
Hình 3.18. Tác động của cao chiết xạ khuẩn VNUA116 đến khả năng nảy mầm bào tử nấm <i>Foc</i> TR4 VCM1520	108
Hình 3.19. Khả năng ức chế một số nấm gây bệnh thực vật của chủng xạ khuẩn VNUA116	111
Hình 3.20. Sơ đồ tạo cao chiết tổng chủng xạ khuẩn VNUA116.....	113
Hình 3.21. Sơ đồ phân lập chất trong mẫu xạ khuẩn VNUA116	114
Hình 3.22. Cấu trúc hợp chất XK4N13.1.....	115
Hình 3.23. Dữ liệu phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất XK4N13.1	116
Hình 3.24. Cấu trúc hợp chất XK4N17.1.....	116
Hình 3.25. Dữ liệu phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất XK4N17.1	117
Hình 3.26. Dữ liệu phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của hợp chất XK4N17.1	118

Hình 3.27. Dữ liệu phổ HMBC của hợp chất XK4N17.1	118
Hình 3.28. Cấu trúc hợp chất XK4N5.5.....	119
Hình 3.29. Dữ liệu phổ ¹ H-NMR của hợp chất XK4N5.5	120
Hình 3.30. Dữ liệu phổ ¹³ C-NMR của hợp chất XK4N5.5.....	120
Hình 3.31. Bản đồ hệ gen chủng xạ khuẩn VNUA116.....	123
Hình 3.32. Phân loại các nhóm gen chức năng của hệ gen chủng xạ khuẩn VNUA116 trên kết quả chú thích GO.....	125
Hình 3.33. Số lượng protein được định danh của chủng xạ khuẩn VNUA116 so sánh với cơ sở dữ liệu của InterProScan	126
Hình 3.34. Phân loại các nhóm gen chức năng của hệ gen chủng xạ khuẩn VNUA116 trên cơ sở dữ liệu COG.....	127
Hình 3.35. Phân tích các CAZyme của chủng xạ khuẩn VNUA116.....	130
Hình 3.36. Các cụm gen sinh tổng hợp có tỷ lệ tương đồng với các cụm gen đã biết trên 90%	131
Hình 3.37. Dữ liệu so sánh cụm gen 6 trên MIBiG	135
Hình 3.38. Dữ liệu so sánh cụm gen 41 trên MIBiG	137
Hình 3.39. Các cụm gen sinh tổng hợp NI-siderophore của hệ gen chủng VNUA116	139
Hình 3.40. Thông tin các gen mã hóa carboxylate siderophore của chủng xạ khuẩn VNUA116 trên AntiSMASH.	141
Hình 3.41. Thông tin các cụm gen mã hóa hydroxamate siderophore của chủng xạ khuẩn VNUA116 trên AntiSMASH	143
Hình 3.42. Con đường sinh tổng hợp siderophore của chủng xạ khuẩn VNUA116	145

MỞ ĐẦU

1. TÍNH CẤP THIẾT CỦA ĐỀ TÀI

Bệnh héo vàng lá chuối còn được gọi là bệnh héo *Fusarium* hoặc bệnh héo Panama là một bệnh phổ biến trên cây chuối, gây ra bởi một loại nấm bệnh có tên là *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*). Bệnh héo vàng lá chuối là một trong những bệnh gây hại nghiêm trọng tại các vùng trồng chuối ở Việt Nam nói riêng và trên thế giới nói chung. Ước tính khoảng 80% diện tích trồng chuối trên toàn cầu trong đó có Việt Nam, Đài Loan, Malaysia, Bắc Úc đang bị đe dọa bởi nấm *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4 (*Foc* TR4) và gây thiệt hại nghiêm trọng ước tính hàng tỷ USD mỗi năm. Mặc dù chưa có số liệu ước tính cụ thể trên thế giới, nhưng thống kê từ một số quốc gia cho thấy vấn đề này đã ảnh hưởng đến khoảng 15.700/440.000 ha trồng chuối tại Philipin, khoảng 70% diện tích trồng chuối tại Quảng Đông và Hải Nam (Trung Quốc). Tổn thất kinh tế hàng năm do nấm *Foc* TR4 gây ra cho Philipin 400 triệu USD, Malaysia 14 triệu USD, Đài Loan (Trung Quốc): 253 triệu USD và Indonesia 121 triệu USD. Bệnh này không chỉ gây thiệt hại về kinh tế mà còn ảnh hưởng đến sinh kế của hơn 400 triệu người phụ thuộc vào chuối làm nguồn lương thực và thu nhập.

Hiện nay để phòng trừ bệnh, các biện pháp tập trung chủ yếu vào tác nhân gây bệnh là nấm *Foc*. Tuy nhiên *Foc* là loài nấm đặc biệt khó kiểm soát vì nhiều lý do như: chúng tấn công vào hệ thống mạch dẫn trong cây nên rất khó để tiêu diệt; bào tử nấm phát tán dễ dàng thông qua quá trình sinh trưởng của cây chuối, qua đất bị nhiễm nấm, nước tưới... Đặc biệt các vùng trồng chuối thường là vùng chuyên canh, nấm bệnh tồn tại lâu dài trong đất nên rất dễ lan truyền qua các vụ dẫn đến vùng nhiễm bệnh ngày càng mở rộng và khó kiểm soát.

Một số phương pháp phòng trừ, quản lý dịch bệnh do nấm *Foc* đã được nghiên cứu và ứng dụng. Các biện pháp vật lý, hoá học chính vẫn là sử dụng các thuốc diệt nấm hoặc khử trùng đất bằng hoá chất. Mặc dù các biện pháp này cho hiệu quả nhanh chóng nhưng không loại được bào tử nấm trong đất dẫn đến việc tái nhiễm bệnh ở các vụ mùa kế tiếp, sự tồn dư của các chất hoá học gây ô nhiễm thứ

cấp... Biện pháp kiểm soát sinh học trong phòng trừ các bệnh do nấm đang được quan tâm do tính an toàn và hiệu quả phòng bệnh lâu dài. Trong số các nhóm vi sinh vật có khả năng kháng nấm *Foc*, xạ khuẩn là nhóm đang được quan tâm do có khả năng sản xuất nhiều loại kháng sinh và các hợp chất thứ cấp có hoạt tính kháng nấm. Các nghiên cứu gần đây đã cho thấy tiềm năng kháng nấm gây bệnh trên thực vật từ xạ khuẩn là rất cao, phòng trừ nhiều bệnh khác nhau như bệnh thán thư, bệnh nấm trắng, bệnh héo rũ...trong đó có bệnh héo vàng do nấm *Foc*.

Việt Nam là nước có mức độ đa dạng sinh học rất cao, với nhiều tiềm năng để phát hiện những hợp chất mới có nguồn gốc từ vi sinh vật trong đó có xạ khuẩn. Hiện nay, nhiều gen sinh tổng hợp các hợp chất thứ cấp của xạ khuẩn vẫn đang được nghiên cứu và là một nguồn gen tiềm năng vô giá để khám phá ra các loại thuốc trong phòng trừ nấm *Foc* trên cây chuối. Việc nghiên cứu đặc tính sinh học, phân tích hệ gen và nhận diện các gen chức năng của các chủng xạ khuẩn nguồn gốc bản địa có hoạt tính kháng nấm *Foc* sẽ có ý nghĩa quan trọng trong kiểm soát nấm *Foc* tại Việt Nam. Bên cạnh đó, việc nghiên cứu, xác định các cơ chế tác động của xạ khuẩn đối với nấm *Foc* sẽ tìm được chủng xạ khuẩn có tiềm năng ứng dụng trong phát triển các chế phẩm sinh học an toàn, hiệu quả để bảo vệ cây chuối khỏi bệnh héo vàng. Đề tài: “**Nghiên cứu đặc điểm sinh học, di truyền của một số chủng xạ khuẩn có hoạt tính đối kháng nấm *Fusarium oxysporum* f. sp *cubense* gây bệnh héo vàng trên cây chuối tại Việt Nam**” được thực hiện nhằm mục đích nghiên cứu, tìm kiếm các chủng xạ khuẩn bản địa có khả năng đối kháng với nấm gây bệnh héo vàng trên chuối tại Việt Nam đồng thời dự đoán cơ chế kháng nấm dựa trên phân tích hệ gen xạ khuẩn từ đó làm tiền đề cho ứng dụng sản xuất các chế phẩm sinh học từ xạ khuẩn dùng trong phòng trừ bệnh héo vàng lá chuối do nấm *Foc* gây ra.

2. MỤC TIÊU NGHIÊN CỨU

- Phân lập, lựa chọn được chủng nấm *Foc* TR4 gây bệnh héo vàng điển hình trên cây chuối tại một số vùng trồng chuối của Việt Nam.

- Tuyển chọn được chủng xạ khuẩn trong bộ sưu tập giống có khả năng kháng nấm *Foc* TR4 mạnh nhất.

- Phân tích, xây dựng cơ sở dữ liệu hệ gen của chủng xạ khuẩn tuyển chọn đồng thời phân lập, xác định được một số chất có khả năng kháng nấm *Foc* TR4 từ dịch lên men chủng xạ khuẩn tạo tiền đề cho việc phát triển các sản phẩm kháng nấm từ các chủng xạ khuẩn này.

3. NỘI DUNG NGHIÊN CỨU

Nội dung 1: Phân lập, tuyển chọn nấm *Foc* TR4 gây bệnh héo vàng trên cây chuối tại Việt Nam.

Nội dung 2: Tuyển chọn và nghiên cứu đặc điểm sinh học của xạ khuẩn có khả năng đối kháng nấm *Foc* TR4 gây bệnh héo vàng trên cây chuối.

Nội dung 3: Xác định và thu nhận hoạt chất kháng nấm *Foc* TR4 từ xạ khuẩn được tuyển chọn

Nội dung 4: Phân tích hệ gen, nhận dạng các gen liên quan đến khả năng sinh tổng hợp hoạt chất kháng nấm của chủng xạ khuẩn tuyển chọn.

4. Ý NGHĨA KHOA HỌC VÀ Ý NGHĨA THỰC TIỄN CỦA LUẬN ÁN

Kết quả nghiên cứu của luận án là nguồn tài liệu tham khảo có ý nghĩa khoa học, đáng tin cậy có thể dùng trong giảng dạy, nghiên cứu khoa học trong các lĩnh vực như: vi sinh vật nông nghiệp, công nghệ sinh học và sinh học.

Luận án cũng đã tuyển chọn được các chủng nấm *Foc* TR4 gây bệnh héo vàng trên cây chuối tại một số tỉnh trồng chuối của Việt Nam. Đây sẽ là các dữ liệu quan trọng cho các nhà quản lý, các nhà nghiên cứu trong công tác kiểm soát, phòng trừ các bệnh trên cây trồng, đặc biệt là trên cây chuối – một loại cây trồng có giá trị xuất khẩu cao.

Các kết quả nghiên cứu trong luận án này cũng phân lập và lựa chọn được chủng xạ khuẩn *Streptomyces lilacinus* VNUA116 từ đất trồng chuối có khả năng kháng nấm *Foc* TR4 với hoạt lực diệt nấm cao (trên 70%). Việc sử dụng các công cụ tin sinh học trong phân tích hệ gen đã giúp phân tích và giải mã các dữ liệu gen của chủng xạ khuẩn VNUA116, từ đó đã làm rõ được cơ chế di truyền, cấu trúc gen,

dự đoán các gen liên quan đến khả năng kháng nấm *Foc* TR4 của chủng xạ khuẩn này. Đây sẽ là nguồn dữ liệu về hệ gen cần thiết và có giá trị khoa học cho các nghiên cứu về xạ khuẩn, là nguồn tham khảo có ý nghĩa cho các hướng nghiên cứu về xạ khuẩn tại Việt Nam cũng như trên thế giới. Các kết quả về phân lập, xác định một số hoạt chất kháng nấm trong cao chiết từ dịch lên men chủng xạ khuẩn VNUA116 đồng thời đánh giá khả năng ức chế sự nảy mầm bào tử và sự phát triển hệ sợi cũng sẽ chứng minh đánh giá hiệu quả kháng nấm của xạ khuẩn này và xác định được cơ chế kháng nấm của chúng. Đây sẽ là tiền đề quan trọng để ứng dụng chủng xạ khuẩn VNUA116 trong sản xuất chế phẩm phòng và điều trị bệnh héo vàng trên cây chuối do nấm *Foc* Tr4 gây ra. Những kết quả thu được từ luận án không chỉ chứng minh được vai trò, cơ chế kháng nấm của chủng xạ khuẩn nghiên cứu mà còn có giá trị ứng dụng thực tiễn lớn trong sản xuất chế phẩm sinh học phòng và điều trị bệnh héo vàng trên cây chuối, từ đó giúp giảm thiểu sự phụ thuộc vào thuốc bảo vệ thực vật hoá học và góp phần vào sự phát triển của nền nông nghiệp an toàn, bền vững.

5. NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

- Đây là nghiên cứu mới có tính toàn diện và có hệ thống về các chủng nấm *Foc* gây bệnh héo vàng trên cây chuối tại một số địa phương trồng chuối tại Việt Nam.

- Tuyển chọn và sử dụng vi sinh vật bản địa (tính mới về tiếp cận nguồn vi sinh vật phù hợp với điều kiện Việt Nam).

- Lần đầu tiên công bố trình tự toàn bộ hệ gen, kết quả phân tích hệ gen, nhận biết các gen liên quan đến khả năng sinh tổng hợp hoạt chất kháng nấm *Foc* TR4 của chủng xạ khuẩn bản địa *Streptomyces lilacinus* VNUA116 phân lập tại các vùng trồng chuối của Việt Nam. Toàn bộ hệ gen và các dữ liệu liên quan của chủng xạ khuẩn này đã được công bố trên Ngân hàng gen với mã số CP130487.

- Đã phân lập, thu nhận, tinh sạch và xác định cấu trúc 3 chất p-hydroxybenzadehyde, 4-hydroxysattabacin và oxindole được dự đoán có tiềm năng kháng nấm *Foc* TR4 từ dịch lên men của chủng xạ khuẩn *Streptomyces lilacinus* VNUA116.

Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. TỔNG QUAN VỀ BỆNH HÉO VÀNG TRÊN CÂY CHUỐI

1.1.1. Tình hình bệnh héo vàng trên cây chuối

Bệnh héo vàng hay còn gọi là bệnh héo *Fusarium*, bệnh héo rũ trên cây chuối đang ngày càng trở nên nguy hiểm đối với ngành sản xuất chuối toàn cầu [122, 165]. Bệnh héo vàng là một bệnh phổ biến trên cây chuối và đã được rất nhiều công bố khẳng định nguyên nhân do nấm bệnh *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*) gây ra. Tác nhân gây bệnh chính là nấm *Foc* truyền qua đất và gây bệnh cho cây chuối. Người ta ước tính rằng 80% sản lượng chuối trên toàn cầu trong đó có Việt Nam, Đài Loan, Malaysia, Bắc Úc đang bị đe dọa bởi nấm *F. oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4 (*Foc* TR4) - đây là một trong những chủng nấm có sức tàn phá và có thể gây thiệt hại đáng kể về kinh tế.

Chuối là một trong những loại trái cây quan trọng nhất thế giới, cung cấp nguồn thực phẩm chính cho hàng trăm triệu người, đặc biệt tại các nước đang phát triển. Theo Tổ chức Lương thực và Nông nghiệp Liên Hợp Quốc (FAO), xuất khẩu chuối toàn cầu đạt 19,3 triệu tấn vào năm 2023, giảm 1,2 triệu tấn so với năm 2021 do nhiều nguyên nhân trong đó có nguyên nhân do nấm *Foc* TR4. Bệnh héo vàng do nấm *Foc* TR4 gây ra đang đe dọa sinh kế của nông dân và sự ổn định của chuỗi cung ứng toàn cầu. Điển hình, tại Philipin – một trong những nước xuất khẩu chuối lớn nhất thế giới- bệnh này đã làm giảm sản lượng xuất khẩu chuối xuống còn 2,3 triệu tấn vào năm 2022, giảm 8,2% so với năm 2021. Ở Colombia, năm 2019, chính phủ đã phải ban bố tình trạng khẩn cấp khi *Foc* TR4 được phát hiện, đồng thời tiêu hủy hàng loạt diện tích canh tác để ngăn dịch lan rộng. Nếu không có biện pháp kiểm soát hiệu quả, bệnh này có thể dẫn đến sự sụp đổ của ngành trồng chuối thương mại, đặc biệt là giống chuối Cavendish - chiếm hơn 50% sản lượng chuối xuất khẩu toàn cầu. Trong vài thập kỷ tới, các chuyên gia cảnh báo rằng, nếu *Foc* TR4 tiếp tục lây lan mà không có giống chuối kháng bệnh thay thế thì thị trường chuối toàn cầu có thể đối mặt với cuộc khủng hoảng nghiêm trọng [229].

Trên thế giới

Bệnh héo vàng trên cây chuối phân bố ở các vùng sản xuất chuối trên toàn cầu cả vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới [164]. Tổ chức BAPNET (Hiệp hội chuối Châu Á Thái Bình Dương) đã điều tra bệnh héo vàng trên chuối trong giai đoạn 2006-2009 tại 12 nước châu Á cho thấy rằng bệnh này xuất hiện phổ biến ở Trung Quốc, Đài Loan, Philippine, Indonesia, Malaysia nhưng chưa xuất hiện ở Việt Nam [98].

Tại Úc nấm *Foc* TR4 được phát hiện tại Queensland vào năm 2015 và gây thiệt hại đáng kể cho các đồn điền trồng chuối tại địa phương này. Ước tính có hơn 9.000 ha trồng chuối bị nhiễm bệnh [165].

Tại Trung Quốc, Yi và cs (2007) đã báo cáo rằng khoảng 6.700 ha chuối tại các đồn điền trồng chuối lớn tại Quảng Đông bị nhiễm mầm bệnh *Fusarium*. Hơn 10 năm sau, bệnh héo *Fusarium* đã xuất hiện khắp các vùng trồng chuối của Trung Quốc và gây ra tổn thất về sản lượng thu hoạch của hơn 40.000 ha diện tích trồng chuối tại Quảng Tây và đảo Hải Nam [127]. Sự lây lan dễ dàng và nhanh chóng của loại nấm có nguồn gốc từ đất này đang là mối đe dọa nghiêm trọng tới ngành sản xuất chuối trên toàn cầu [225]

Tại Malaysia và Indonesia là các nước nhiệt đới- bệnh héo vàng phát hiện vào đầu những năm 1990 [136] và lan rộng khắp Đông Nam Á và Úc trong vòng chưa đầy một thập kỷ, gây thiệt hại đáng kể và ảnh hưởng đến thu nhập của nhiều nông dân trong các nước này.

Tại Philipin, nấm *Foc* đã được phát hiện từ năm 1970, nhưng đến năm 2006 mới phát hiện ra nấm *Foc* TR4. Sau đó, hàng ngàn ha diện tích trồng chuối bị nông dân bỏ hoang vì nhiễm nấm *Foc* TR4 khiến mỗi năm lỗ 3 tỷ đô la và khoảng 66.000 hộ gia đình mất sinh kế [145].

Tại Campuchia, năm 2023 khu liên hợp nông nghiệp Snuol đã có 3,25% diện tích trồng chuối bị nhiễm nấm *Foc* và gây mất trắng trên diện tích 85ha/2.557 ha trồng chuối.

Tại Việt Nam

Vào những năm 1967 - 1968 lần đầu tiên bệnh héo vàng được nghiên cứu bởi nhà khoa học Vakili và cs [18] và lần thứ hai vào năm 1995 ở miền Bắc và miền Trung. Kết quả điều tra cho thấy tại miền Nam có tới 70% diện tích trồng chuối bị nhiễm bệnh héo vàng trong đó nhiều vùng thiệt hại nhiều nhất lên tới hơn 85% năng suất, đồng thời cũng cho thấy bệnh vàng lá xuất hiện trên phạm vi cả nước. Bentley và cs (1998), công bố kết quả thu thập mẫu bệnh ở cả miền Bắc, miền Trung và miền Nam Việt nam trên chuối Tây và chuối Ngóp cũng bị nhiễm bệnh, các mẫu nấm này cũng thuộc chủng 1 [37]. Nguyễn Văn Khiêm (2000) nghiên cứu 60 mẫu nấm *Foc* tại 7 tỉnh bao gồm Hà Nội, Hà Tây, Hưng Yên, Phú Thọ, Vĩnh Phúc, Bắc Ninh, và Thừa Thiên Huế đã xác định là nấm gây bệnh héo vàng lá chuối ở Việt Nam thuộc *Foc* 1, chưa phát hiện ra bệnh này trên chuối tiêu [14]. Năm 2018, Trần Ngọc Hùng và cs đã lần đầu tiên phát hiện ra nấm *Foc* TR4 và công bố bệnh héo vàng gây hại trên chuối tiêu do *Foc*-TR4 gây ra tại Hà Nội (2014), Hưng Yên (2015) và Lào Cai (2017). Hay gần đây nhất công bố của Lê Thị Loan (2024) bệnh héo vàng lá chuối xuất hiện ở tất cả 10 tỉnh trồng chuối được điều tra tại miền Bắc trong đó Vĩnh Phúc, Hưng Yên có tỷ lệ bệnh gây hại từ 15 – 30% (Vĩnh Phúc), thậm chí lên tới 90% (Khoái Châu, Hưng Yên) [12].

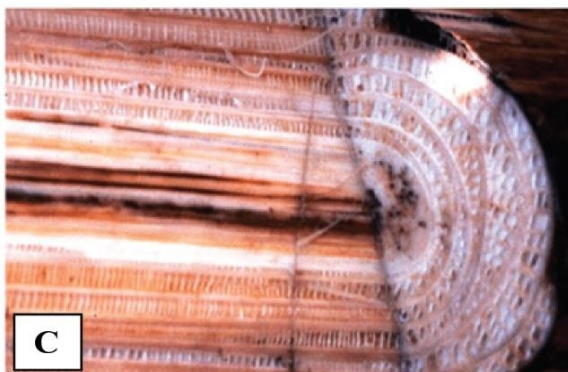
1.1.2. Đặc điểm, cơ chế và tác nhân gây bệnh héo vàng trên cây chuối.

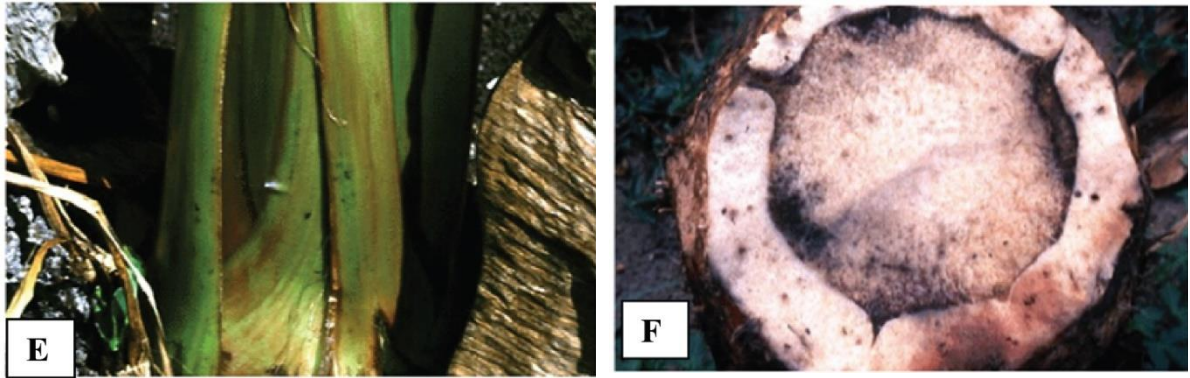
1.1.2.1. Đặc điểm của bệnh héo vàng trên cây chuối

Triệu chứng bệnh héo vàng bên ngoài có thể quan sát thấy trên lá, thân giả và củ. Đặc điểm gây hại đặc trưng trên các cây bị bệnh là mạch dẫn chuyển màu nâu đỏ ở thân củ, thân giả và ở cả bẹ lá. Hội chứng điển hình trên lá là hội chứng vàng lá và hội chứng xanh lá [197]. Hội chứng vàng lá là triệu chứng cổ điển của bệnh héo *Fusarium* trên chuối. Những lá già nhất chuyển từ màu xanh nhạt sang vàng nhạt bắt đầu với những mảng hoặc vệt ở gốc cuống lá, gần với gân giữa và rú xuống, lá chết xung quanh thân giả. Hội chứng xanh lá trái ngược với hội chứng vàng lá. Lá vẫn xanh cho đến khi cuống lá uốn cong và xẹp xuống. Các triệu chứng khác bao gồm mép không đều, nhợt nhạt trên các lá mới và các phiến lá bị nhăn và

biến dạng, các lông cũng có thể ngừng lại. Triệu chứng bên trong đặc trưng của bệnh héo vàng là sự đổi màu mạch dẫn. Sự đổi màu thay đổi từ vàng nhạt trong giai đoạn đầu sang đỏ sẫm hoặc gần như đen trong giai đoạn sau. Ở giai đoạn đầu, các bẹ lá phía ngoài cùng và lá già nhất bị bệnh, sau đó biến đổi màu trên toàn bộ thân giả và cuống quả ở giai đoạn bệnh sau và kèm theo đó là sự hoại tử các mạch xylem ở thân ngầm và thân giả. Nấm bệnh xâm nhập chủ yếu qua chóp rễ hoặc qua vết thương ở rễ, rồi vào bó mạch, phát triển trong mạch dẫn làm cản trở quá trình vận chuyển nước trong cây từ đó gây ra triệu chứng héo vàng trên lá và thậm chí bệnh nặng gây chết cây [1]. Bệnh héo vàng thường xảy ra ở tất cả các giai đoạn sinh trưởng của cây chuối nhưng tấn công mạnh nhất ở giai đoạn cây trưởng thành và giai đoạn ra hoa tạo quả làm cho cây bị héo vàng rồi chết [163].

Các triệu chứng trên lá của bệnh héo vàng có thể bị nhầm lẫn với bệnh héo do vi khuẩn. Các triệu chứng bệnh bị ảnh hưởng bởi nấm *Fusarium* tiến triển từ lá già đến lá non. Ở những cây bị ảnh hưởng bởi vi khuẩn, quá trình héo có thể bắt đầu từ bất kỳ lá nào và dịch rỉ vi khuẩn có thể được quan sát thấy trên bề mặt cắt tiếp xúc.





Hình 1.1. Các triệu chứng bệnh héo vàng trên chuối gây ra do nấm *Foc* [230]
 (A, B)- Cây chuối bị bệnh héo *Fusarium*, (C) Thân chuối nhiễm nấm *Fusarium* cắt dọc, (D) Thân chuối nhiễm nấm *Fusarium* cắt ngang, (E) Phần gốc của thân giả bị tách ra do nhiễm nấm *Fusarium*, (F) Mô mạch thân rễ nhiễm nấm *Fusarium*

1.1.2.2. Cơ chế gây bệnh héo vàng trên cây chuối

Chu kỳ bệnh héo vàng trên cây chuối bắt đầu khi tác nhân gây bệnh - chính là nấm *Foc* - xâm nhập vào vật chủ tiềm năng thông qua phần chóp rễ. Khi xâm nhập vào rễ, nhờ chất dinh dưỡng của cây chủ, bào tử nấm nảy mầm tạo hệ sợi phát triển. Sợi nấm sau đó lây nhiễm sang các rễ bên và tiến tới xâm lấn vào các mạch xylem trong cây [164]. Khi vào bên trong mạch xylem, nấm *Foc* cư trú trong thân rễ và đi lên mô phân sinh, chặn các mạch xylem dẫn nước và do đó ngăn cản sự vận chuyển nước, chất dinh dưỡng từ rễ đến các bộ phận phía trên của cây [163]. Bào tử nhỏ (Microconidia) được hình thành từ các sợi nấm tại các mạch gỗ và được lan truyền qua hệ thống mạch đến các mạch gỗ mới – là nơi chúng có thể nảy mầm. Sau đó các sợi nấm được tạo ra ở vị trí mới và lặp lại chu kỳ mới [62]. Bên trong cây, các triệu chứng đầu tiên trở nên rõ ràng trong các mạch xylem (dẫn nước) của rễ và thân rễ chuyển từ màu nâu đỏ thành màu hạt dẻ khi nấm mọc qua các mô (Hình 1.2). Khi cắt ngang thân cây bệnh, sự đổi màu xuất hiện theo hình tròn xung quanh tâm của thân, vùng bị bệnh tập trung do sự sắp xếp của các mạch. Khi triệu chứng lan sang thân giả, các đường liên tục đổi màu có thể quan sát được khi cây bị cắt theo chiều dọc. Nấm có thể di chuyển đến tận đỉnh của thân giả. Trong trường hợp nghiêm trọng, nó thậm chí có thể xâm nhập vào bẹ lá và cuống lá (bó cuống) của

cây. Tuy nhiên, chưa có phát hiện nào cho thấy nấm có thể xâm nhập vào quả chuối.



Hình 1.2. Chu kỳ gây bệnh của nấm *Foc* trên cây chuối [228]

Nấm *Foc* khó bị loại bỏ trong đất do tồn tại ở trạng thái bào tử nghỉ, gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến việc trồng và thu hoạch vụ tiếp theo. Bệnh xuất hiện hầu hết ở các vùng trồng chuối, gây hại ở tất cả các giai đoạn sinh trưởng của cây chuối. Ở những vùng bị nhiễm bệnh nặng tỷ lệ mắc bệnh thay đổi từ 10% đến 30%, thậm chí lên tới 90% [97]. Vì vậy, nấm *Fusarium* không chỉ có tác động đến năng suất trong thời gian cây trồng bị nhiễm bệnh mà còn tồn tại trong đất trồng trong 20 năm sau mặc dù đã loại bỏ hoàn toàn tất cả các cây bị nhiễm bệnh.

1.1.2.3. Tác nhân gây bệnh héo vàng trên cây chuối

Đã có rất nhiều nghiên cứu công bố, bệnh héo vàng trên chuối do nấm *Foc* gây ra. Các nghiên cứu về bệnh héo vàng đã cho thấy quan hệ giữa các tác nhân gây bệnh với các giống chuối khác nhau do quần thể nấm gây bệnh được chia thành 4 chủng (Race) chính mặc dù có thể còn nhiều chủng khác tồn tại:

Chủng 1 tấn công giống cây chuối (nhóm AAA) 'Gros Michel' và gây ra đại dịch thế kỷ 20. Nó cũng tấn công chuối Musa (nhóm AAB) 'Pome' và các nhóm con của nó, Musa (nhóm AAB) 'Silk' và Musa (nhóm ABB) 'Pisang Awak' [163].

Chủng 2 tấn công vào nhóm Musa (nhóm ABB) 'Bluggoe' và những giống có liên quan.

Chủng 3 tấn công giống chuối cảnh (*Heliconia spp*) và hiện nay chủng 3 không còn được coi là mầm bệnh gây bệnh trên chuối [165]

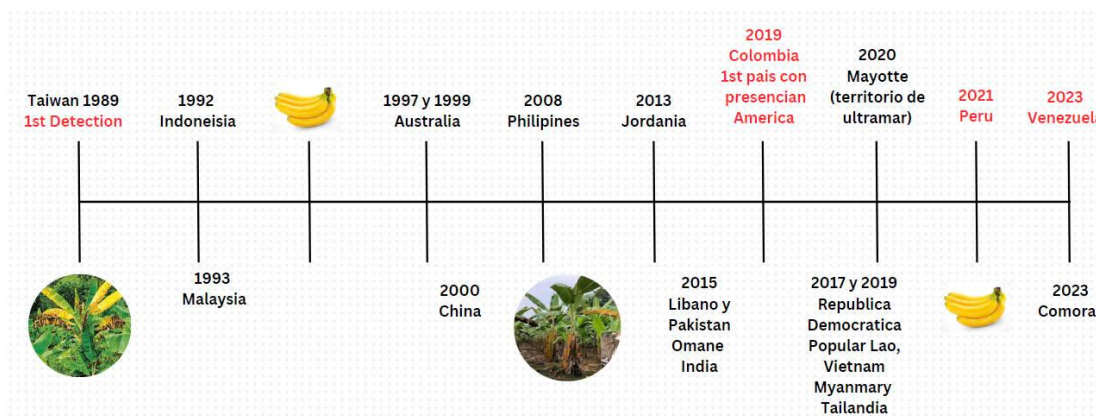
Chủng 4 tấn công giống chuối Musa (nhóm AAA) và các giống chuối mẫn cảm với chủng 1 và chủng 2. Chủng 4 được chia thành chủng *Foc* SR4- chủng cận nhiệt đới, lây nhiễm các giống cây trồng thuộc phân nhóm 'Cavendish' và các giống mẫn cảm với chủng *Foc* 1 và chủng *Foc* 2 ở vùng cận nhiệt đới mà ở đó thực vật phải đối mặt với các điều kiện khắc nghiệt như nhiệt độ thấp và hạn hán [204] và chủng *Foc* TR4- chủng nhiệt đới, lây nhiễm bệnh ở nhiều giống chuối khác nhau tương tự như chủng *Foc* SR4 nhưng trong cả điều kiện nhiệt đới và cận nhiệt đới mà không có yếu tố ảnh hưởng [165].

Chủng 1 và chủng 2 đã tàn phá nghiêm trọng ngành công nghiệp trồng chuối ở hầu hết các nước Trung và Nam Mỹ vào các năm nửa đầu thế kỷ XX. Để loại bỏ bệnh này, các giống Cavendish kháng với chủng 1 và chủng 2 được sử dụng. Tuy nhiên hiện nay, Cavendish là giống chuối xuất khẩu chính trên toàn thế giới lại đang bị đe dọa nghiêm trọng bởi chủng 4 (Tropical Race 4 - TR4). Chính chủng TR4 đã phá hủy 23.000 ha chuối Cavendish ở Đài Loan và các đồn điền trồng chuối ở một số nước cận nhiệt đới như Australia, quần đảo Canary, Nam Phi cũng như một số vùng trồng chuối nhiệt đới như Jamaica, Guadeloupe. Mặc dù chủng 4 ban đầu được mô tả ở Đài Loan vào những năm 70 của thế kỷ XX trước khi chủng TR4 được công nhận [188], nhưng các ghi nhận cho thấy rằng TR4, chứ không phải SR4, là nguyên nhân gây ra các thiệt hại ở đó [165].

Nấm *Foc* TR4 có thể tồn tại hơn 30 năm trong đất và lây nhiễm trên 80% giống chuối đang trồng trên thế giới. Cho đến nay chưa có giống thương mại nào có khả năng kháng *Foc* TR4 hiệu quả [206]. Nấm *Foc* TR4 đang có nguy cơ lan rộng

sang các nước trồng chuối trong đó có Việt Nam. Sự tồn vong của các giống chuối đang bị đe dọa nghiêm trọng nếu không có biện pháp khắc phục tạm thời. Do đó, nghiên cứu về các chủng nấm và các chủng vi sinh vật có khả năng kháng lại căn bệnh này đang nhận được sự quan tâm rất lớn từ các nhà nghiên cứu trên khắp thế giới.

Nấm *Foc* TR4 lần đầu tiên được tìm thấy ở Đài loan năm 1989 trên giống chuối Cavendish, sau đó vào những năm 1990 nấm *Foc* TR4 được phát hiện ở Indonesia và Malaysia và được cho là có nguồn gốc từ Đài Loan [135]. Hơn 20 năm sau, vào năm 2013 nấm *Foc* TR4 mới được tìm thấy tại Australia, Đài Loan, Trung Quốc và Philippin [122]. Sau năm 2013, loại nấm này đã được tìm thấy ngoài châu Á khi nó được báo cáo lần đầu tiên tại Jordan, Lebanon, Mozambique và Pakistan [77, 156]. Sau đó, nó cũng đã lan rộng ở Châu Á và Úc [154], được phát hiện ở Lào và Việt Nam năm 2015 [51, 98]. Cho đến năm 2019, TR4 vẫn chưa được báo cáo ở Mỹ Latinh. Bất chấp những nỗ lực lớn được thực hiện trong khu vực này nhằm ngăn chặn sự xâm nhập của mầm bệnh, tuy nhiên TR4 lần đầu tiên được báo cáo gây bệnh ở ít nhất ba trang trại ở Colombia (IPPC, 2019; García-Bastidas và cs., 2020b) và chỉ 2 năm sau đã xuất hiện ở Peru (IPPC, 2021) và cùng thời gian này Thổ Nhĩ Kỳ cũng đã báo cáo về căn bệnh này [20]. Xuất hiện bệnh muộn nhất là ở Venezuela vào đầu năm 2023 [141]. Loại nấm này đã lây lan nhanh chóng ở các quốc gia này và gây thiệt hại đáng kể đến năng suất và lợi nhuận cho người trồng chuối.



Hình 1.3. Các mốc thời gian phát hiện nấm *Foc* TR4 [78]

1.1.3. Kiểm soát bệnh dịch héo vàng trên cây chuối

Nhiều kỹ thuật kiểm soát bệnh dịch héo vàng lá chuối đã được thử nghiệm kể từ khi bệnh này được phát hiện nhằm giảm thiểu các tác động tiêu cực của bệnh. Tuy nhiên, hiện nay ngoài việc trồng các giống cây kháng bệnh, vẫn chưa có chiến lược phòng ngừa nào có hiệu quả [146].

Hiện nay, nhằm kiểm soát bệnh do nấm *Foc* gây ra trên chuối nhiều biện pháp khác nhau đã được nghiên cứu và áp dụng như kiểm soát sinh học, kiểm soát hóa học, kiểm soát điều kiện môi trường nuôi cấy, các chương trình chọn tạo giống kháng, nâng cao nhận thức về bệnh héo vàng lá chuối.

1.1.3.1. Kiểm soát điều kiện nuôi trồng

Do việc sản xuất đơn canh các giống mẫn cảm dễ nhiễm bệnh rất khó khăn ở những khu vực bị nhiễm bệnh, việc trồng hỗn hợp đã được đề xuất như một phương pháp thay thế. Trồng hỗn hợp trong nông nghiệp ở quy mô nhỏ trong đó các giống chuối khác nhau được trồng xen với các cây trồng khác, thường ít thiệt hại hơn so với khi trồng trong các đơn canh [187]. Trồng các giống chuối chịu *Foc* hoặc kháng *Foc* kết hợp với các phương pháp trồng xen canh giúp cải thiện tỷ lệ mắc bệnh và tăng năng suất cây trồng. Hệ thống trồng hỗn hợp bao gồm các cây họ đậu, ngũ cốc và cây đa mục đích trong trang trại trồng chuối cũng có thể cải thiện năng suất chuối và tăng khả năng chống chịu bệnh tốt hơn [85]. Để giảm số lượng nấm bệnh trong đất, luân canh cây trồng đã được sử dụng với các loại cây không phải là vật chủ của nấm gây héo *Fusarium*. Tần suất bệnh chỉ giảm tạm thời khi luân canh chuối với mía kết hợp bỏ hoang đất có chủ ý. Những đồn điền nhỏ ở Indonesia và Philippin sử dụng sắn (*Manihot esculentum*) để giảm *Foc* TR4 trong đất [145].

Biện pháp sử dụng giống chuối kháng đang là hướng nghiên cứu được chú ý. Các nghiên cứu trước đây đã chứng minh, đối với *Foc* chủng 1 thì giống kháng là cách tốt nhất để chống lại chủng nấm này. Tuy nhiên, đối với *Foc* chủng 4 thì vẫn chưa có một giống chuối thương mại nào có khả năng kháng hiệu quả. Việc tạo giống kháng bệnh trên cơ sở lai tạo chỉ góp phần tạo ra các giống kháng cho một số chủng gây bệnh nhất định, trong khi đó có rất nhiều biến chủng khác nhau của nấm.

Trong những năm gần đây việc tạo ra cây chuối biến đổi gen có khả năng kháng nấm đã mang lại những hiệu quả tích cực, nhưng trên thực tế thì có rất nhiều quốc gia vẫn nói không với cây trồng biến đổi gen.

1.1.3.2. Kiểm soát hóa học

Kiểm soát bằng hóa chất là một trong những biện pháp quản lý bệnh đối với các bệnh truyền qua đất. Tuy nhiên, cách tiếp cận này có nhiều nhược điểm vì chi phí cao, gây ảnh hưởng đến môi trường và sức khỏe cộng đồng. Đây được coi là biện pháp tạm thời và không bền vững.

Cho đến khi thực hiện thỏa thuận toàn cầu về bảo vệ tầng ozone (Nghị định thư Montreal, 1986), methyl bromide được sử dụng rộng rãi làm chất khử trùng do hiệu quả cao chống lại các bệnh truyền qua đất [84]. Các chất khử trùng thay thế methyl bromide như carbendazim, dazomet, chloropicrin và 1,3-dichloropropene nằm trong số những chất được sử dụng thường xuyên nhất hiện nay để chống héo *Fusarium*. Trước đây, chloropicrin và dazomet kiểm soát héo trên cây họ đậu ở những vùng đất bị nhiễm khuẩn nặng. Tuy nhiên, khi sử dụng chloropicrin đã gây ra hậu quả nghiêm trọng đối với quần thể vi sinh vật đất *Rhizobium Frank* tại nơi sử dụng. Việc sử dụng thường xuyên và bừa bãi các chất hóa học không chỉ làm thay đổi thành phần quần thể vi sinh vật trong đất mà còn có thể làm hỏng hệ sinh thái dưới nước và thậm chí dẫn đến khả năng kháng thuốc diệt nấm [157].

Trong một nghiên cứu, các nhà khoa học đã phát hiện ra rằng các triệu chứng bệnh héo *Fusarium* có thể được kiểm soát lên đến 80,6% khi hoạt chất benomyl và thuốc diệt nấm bằng chất ức chế khử methyl được áp dụng qua phương pháp ngâm rễ. Bên cạnh đó, một số hợp chất amoni bậc bốn cũng được báo cáo là các chất khử trùng mạnh đối với *Foc* [152]. Tương tự như kiểm soát sinh học, việc đánh giá hiệu quả của các thuốc diệt nấm chống lại bệnh héo *Fusarium* trong tương lai là cần thiết.

Việc tiêm thuốc diệt nấm vào cây chuối bị nhiễm nấm *Fusarium* cũng đã được thực hiện. Trong một nghiên cứu do Lakshmanan và cs (1987) thực hiện, thân rễ của giống "Rasthali" đã được tiêm 2% carbendazim (Bavistin 50 WP) bằng cách

sử dụng kim tiêm y tế, phần trên của thân rễ được loại bỏ một phần đất và đục một lỗ nghiêng ở góc 45° trước khi tiêm thuốc diệt nấm. Phương pháp này đã giảm tỷ lệ nhiễm bệnh lên đến 13,5% vào thời điểm thu hoạch [116]. Trong một nghiên cứu khác, Herbert và cs (1990) báo cáo rằng việc tiêm carbendazim và một số thuốc diệt nấm khác không ngăn chặn được bệnh héo *Fusarium* trên chuối ở Nam Phi. Tuy nhiên, Herbert và cs cũng đưa ra phương pháp điều trị khác chống lại bệnh héo *Fusarium* bằng cách khử trùng đất bằng methyl bromide. Tuy nhiên, các khu vực đã được khử trùng cuối cùng cũng bị tái nhiễm khiến việc sản xuất chuối trong vụ tiếp theo không khả thi [89].

1.1.3.3. Kiểm soát sinh học

Do sự lây lan liên tục của bệnh héo *Fusarium*, kiểm soát sinh học là một phương pháp quản lý bệnh phù hợp. Tuy nhiên, các kết quả nghiên cứu trong đó hầu hết các công trình đã công bố về khả năng kháng nấm *Fusarium* gây bệnh héo trên chuối mới chỉ tiến hành trong điều kiện phòng thí nghiệm hoặc trong nhà kính sử dụng các vi sinh vật khác nhau như *Pseudomonas fluorescens*, *Trichoderma viride*, *Bacillus* spp., *Serratia* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptomyces violaceusniger*, *Y-Proteobacteria*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas* spp., và *Fusarium* không gây bệnh [178]. Một số loài dược liệu của Ấn Độ như *Calotropis gigantea* L (Bông bông), *Centella asiatica* L. (Rau má), *Ocimum sanctum* L. (Hương nhu tía), *Piper betle* L. (Trầu không) và *Vitex negundo* L. (Ngũ trảo) cũng đã được tiến hành thử nghiệm trong phòng thí nghiệm như một biện pháp kiểm soát sinh học kháng nấm *Foc*. Trong đó, chiết xuất Trầu không thể hiện hoạt tính kháng nấm *Foc* cao nhất, tiếp theo là các chiết xuất của các cây Ngũ trảo, Bông bông, Rau má và Hương nhu tía [143]. Những kết quả này chứng minh rằng một số chất chiết xuất từ thực vật thể hiện hoạt tính kháng nấm và có khả năng giảm sự phát triển của sợi nấm trong cả điều kiện nhà kính và ngoài đồng ruộng. Có rất ít nghiên cứu được thực hiện kiểm soát sinh học lâu dài của bệnh héo *Fusarium* ở chuối ngoài đồng ruộng. Công bố của Thangavelu và cs (2009) đã báo cáo việc ứng dụng chủng *Fusarium* không gây bệnh trên đồng ruộng đã giảm mức độ nghiêm trọng của bệnh lên đến

89% sau ba lần điều trị [193]. Mặt khác, Belgrove và cs (2011) cũng báo cáo rằng cả *F. oxysporum* không gây bệnh và *P. fluorescens* hoặc sử dụng kết hợp cả 2 chủng đều giảm đáng kể sự phát triển của bệnh héo *Fusarium* trong điều kiện đồng ruộng [35].

1.2. CÁC HỢP CHẤT THỨ CẤP CÓ HOẠT TÍNH ĐỐI KHÁNG NẤM TỪ XẠ KHUẨN

1.2.1. Tình hình nghiên cứu hợp chất thứ cấp có hoạt tính kháng nấm từ xạ khuẩn

1.2.1.1. Trên thế giới

Trên thế giới, đã có rất nhiều công trình khoa học công bố về khả năng sinh hoạt chất sinh học từ xạ khuẩn như khả năng kháng nấm gây bệnh trên thực vật, khả năng sinh enzyme, khả năng sinh các chất kháng sinh... Nhờ khả năng tổng hợp các hợp chất có cấu trúc đa dạng và hoạt tính mạnh, xạ khuẩn đã cung cấp nhiều kháng sinh quan trọng trong y học và nông nghiệp.

Một số nghiên cứu đã ghi nhận khả năng kháng nấm gây bệnh trên thực vật của xạ khuẩn: bệnh thán thư do nấm *Colletotrichum gloesporioides* trên cây ớt [189], bệnh thán thư trên dâu tây, bệnh thán thư trên dưa leo do nấm *Collectotrichum* spp. [179], bệnh thán thư trên chuối do nấm *Collectotrichum musae* [190], bệnh thối rễ trên ớt do nấm *P. capsici* [70], bệnh héo rũ do nấm *F. oxysporum* trên ở cây mướp [125], trên cây lily [53], bệnh thối cổ rễ do nấm *Sclerotium rolfsii* trên đậu xanh [183], bệnh đốm socola trên hạt đậu răng ngựa do nấm *Botrytis cinerea* [68], bệnh nấm trắng trên dâu tây do nấm *Botrytis cinerea* [130] và bệnh trên hạt giống bắp cải do nấm *Alternaria Brassicicola* [86]. El-Mehalawy và cs (2005) đã công bố các chủng xạ khuẩn *S. graminofaciens*, *S. rochei*, *S. annulatus* và *S. gibsonii* có thể kiểm soát nấm *Cephalosporium maydis* gây bệnh héo muện ở ngô [67]. Sự thành công của các công bố coi *Streptomyces* như một tác nhân trong kiểm soát sinh học đầy tiềm năng đã khuyến khích các nhà khoa học nghiên cứu tìm kiếm tác nhân vi sinh vật mới thay thế cho thuốc diệt nấm hóa học.

Năm 2008, Lu và cs đã tuyển chọn được chủng xạ khuẩn *Streptomyces lydicus* A01 từ đất trồng có khả năng sinh natamycin và gây ức chế mạnh đến sự phát triển của 13 loại nấm gây bệnh cây trồng điều kiện phòng thí nghiệm. Trong điều kiện nhà lưới chủng *S. lydicus* A01 cũng cho thấy hiệu quả kiểm soát nấm mốc xám trên cà chua trồng trong chậu vại [130]. Awla và cs (2017) đã lựa chọn được chủng *Streptomyces* UPMRS4 phân lập từ đất có khả năng ức chế sinh trưởng của nấm *P. oryzae* gây bệnh đạo ôn trong điều kiện phòng thí nghiệm đồng thời kích thích tăng trưởng và tăng năng suất lúa trong điều kiện nhà lưới [27].

Trong nghiên cứu tìm kiếm các hợp chất thiên nhiên từ vi sinh vật biển có hoạt tính sinh học mới, Zhang và cs đã phân lập hai chất bagremycins mới có tính kháng khuẩn là F (34) và G (35) từ dịch chiết xạ khuẩn biển *Streptomyces* sp. ZZ745. Hai chất bagremycins F (1) và G (2) thể hiện hoạt tính kháng *E. coli* với giá trị MIC tương ứng là 41,8 và 61,7 μ M. [222]. Nergi và cs phát hiện và công bố bốn hợp chất bioxalomycin α 1, α 2, β 1 và β 2 (9-12) tách chiết được từ xạ khuẩn có hoạt tính kháng khuẩn rất mạnh đối với các chủng *Staphylococcus* và *Enterococcus* sp. Đặc biệt hợp chất bioxalomycin β 2 (12) thể hiện hoạt tính mạnh nhất với giá trị MIC nằm trong khoảng 0,002 đến 0,1 μ g/ml [151].

Đặc biệt có rất nhiều nghiên cứu đã công bố về khả năng kháng các chủng nấm *F. oxysporum* – tác nhân gây bệnh héo vàng trên cây chuối của xạ khuẩn. Các nghiên cứu được tiến hành từ phân lập, tuyển chọn, tối ưu hóa các điều kiện nuôi cấy đến các nghiên cứu sâu về hệ gen, các gen chức năng liên quan đến khả năng kháng nấm *Foc* của xạ khuẩn được rất nhiều nhà khoa học ở nhiều nước trên thế giới quan tâm.

FR-900848 - một loại kháng sinh kháng nấm mới được phân lập từ *Streptoverticillium ferverns* và các đặc tính lý hóa và sinh học của nó đã được Yoshida và Horikoshi lần đầu tiên công bố năm 1988 [217]. Tomita và cs (1989) đã công bố Pradimicins A, B và C là các kháng sinh kháng nấm mới từ *Streptomyces* sp [195]. Fushimi và cs (1989b) đã báo cáo kháng sinh kháng nấm phoslactomycins và làm sáng tỏ cấu trúc của phoslactomycins từ A đến F [76]. Yamaguchi và cs

(1990) đã nghiên cứu cơ chế tác động kháng nấm của axit (S)2-amino-4-oxo-5-hydroxypentanoic, RI-331 được chiết xuất từ *Streptomyces* sp. [214]. Schwartz và cs (1988) đã nghiên cứu L-671, 329- một tác nhân kháng nấm mới từ xạ khuẩn *Streptomyces* [177]. Igarashi và cs năm 2003 đã sàng lọc hợp chất kháng nấm mới có tên Yatakemycin từ *Streptomyces* TP – AO 356. Yatakemycin ức chế sinh trưởng của các loại nấm như *Aspergillus fumigatus* và *Candida albicans* với giá trị MIC 0.01 – 0.03 µg/ml cao hơn amphotericin B (MIC 0.1 – 0.5 µg/ml) và Yatakemycin cũng thể hiện tiềm năng trong ức chế các dòng tế bào ung thư với IC50 từ 0.01 – 0.3 µg/ml [100].

Jing và cs (2020) đã có những nghiên cứu kéo dài 10 năm về xạ khuẩn kháng nấm *Foc*. Với 88 chủng xạ khuẩn phân lập được từ đất trồng chuối không có triệu chứng nhiễm nấm *Foc* đã lựa chọn được chủng xạ khuẩn *Streptomyces violaceusniger* JBS5-6 có khả năng kháng mạnh với nấm *Foc* TR4 và 10 loại nấm gây bệnh thực vật khác. Đồng thời tác giả cũng đã xác định được dịch lên men chủng xạ khuẩn này chứa 16 hợp chất hóa học trong đó có 5-hydroxymethyl-2-furancarboxaldehyde là một trong những thành phần chính. Dịch lên men xạ khuẩn *S. violaceusniger* JBS5-6 có khả năng ức chế sự lây nhiễm nấm *Foc* TR4 trong điều kiện thí nghiệm trên chậu vại [102].

Các chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. H3-2 [227], *Streptomyces* sp. H4 [126], *Streptomyces* sp. YYS-7 [208], *Streptomyces* sp. Y1-14 [47] phân lập được từ đất trồng chuối bị nhiễm bệnh có khả năng ức chế sự phát triển của sợi nấm, sự nảy mầm của bào tử của nấm *Foc* TR4. Đồng thời dịch chiết của các chủng xạ khuẩn này đều có khả năng kháng nấm phổ rộng với 7-10 chủng nấm gây bệnh trên thực vật. Với những tiềm năng này các chủng xạ khuẩn này sẽ được sử dụng để tìm kiếm các hợp chất tự nhiên mới có khả năng kháng nấm cao ứng dụng trong kiểm soát bệnh trên cây chuối.

1.2.1.2. Tại Việt Nam

Xạ khuẩn được nghiên cứu rất nhiều ở Việt Nam trong các nghiên cứu đánh giá khả năng sinh enzyme và sinh các chất có hoạt tính sinh học. Đối với các chất

có hoạt tính sinh học các nghiên cứu chủ yếu tập trung vào khả năng kháng vi sinh vật, kháng các tế bào ung thư...

Những nghiên cứu trong giai đoạn đầu tiên về xạ khuẩn là tập trung vào nghiên cứu đặc điểm sinh học, tối ưu hóa các điều kiện nuôi cấy như nghiên cứu của Bùi Thị Việt Hà, 2006 [3]. Trong những năm gần đây, nhiều nghiên cứu đã công bố khả năng sinh chất kháng sinh kháng các vi sinh vật gây bệnh trên thực vật (vi khuẩn héo lá, nấm gây bệnh thực vật, nấm đạo ôn, nấm thối rễ...), những nghiên cứu về khả năng kháng các tế bào ung thư, phân lập, tách chiết hoạt chất từ xạ khuẩn và những ứng dụng xạ khuẩn trong môi trường, y dược, nông nghiệp...

Một trong những kết quả nghiên cứu đang được quan tâm là việc tìm ra các chủng vi sinh vật có khả năng đối kháng với nấm *Fusarium*, trong số này có thể kể đến việc sàng lọc và nghiên cứu đặc điểm sinh học chủng xạ khuẩn F46 phân lập từ rừng ngập mặn Cần Giờ [8]. Năm 2015, Đỗ Thu Hà đã chọn lọc được 4 chủng nấm *Trichoderma* (Tri.01, Tri.05, Tri.07, Tri.11) có khả năng đối kháng mạnh với nấm *Fusarium* [4] gây bệnh héo vàng chuối khi thử nghiệm tại Đại Lộc, tỉnh Quảng Nam. Nguyễn Đức Huy và Đỗ Thị Vĩnh Hằng (2018) cũng đã đánh giá được hoạt tính kháng nấm *Foc* của nấm *Trichoderma asperellum*. Năm 2019 nhóm nghiên cứu của Nguyễn Thành Trung cũng đã sàng lọc và tuyển chọn được chủng xạ khuẩn thuộc chi *Streptomyces* có hoạt tính đối kháng mạnh với nấm *Foc* trong điều kiện *invitro*. Hay mới đây nhất là nghiên cứu của Võ Duy Hoàng và cs năm 2024 đã đánh giá khả năng đối kháng của một số chủng xạ khuẩn đối với nấm *Fusarium moniliforme* gây bệnh lúa von trên giống lúa Jasmine 85 trong điều kiện nhà lưới. Chủng xạ khuẩn CT4.8 cho hiệu quả cao nhất với tỷ lệ cây chết là 1,27% tương đương với đối chứng thuốc (1,25%) [7].

Ngoài các công bố về khả năng kháng nấm *Fusarium* thì các công bố khác cũng đã nghiên cứu khả năng kháng các loại nấm gây bệnh trên các đối tượng thực vật khác. Năm 2005, Tăng Thị Chính và cs đã tuyển chọn được 3 chủng xạ khuẩn là HD8, HD54 và HD58 có khả năng ức chế vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* gây bệnh héo xanh ở cây cà chua và cây dưa hấu, đồng thời hai chủng HD54 và HD58

còn có khả năng ức chế mạnh vi nấm *Fusarium oxysporum* gây bệnh thối cổ rễ ở lúa [17]. Trong các nghiên cứu về các chủng xạ khuẩn kháng nấm bệnh trên cây trồng, Nguyễn Văn Giang và cs năm 2014 đã tìm được 21 chủng *Streptomyces roseosporus* và *Streptomyces albofaciens* có khả năng kháng *Fusarium oxysporum*, *Botryosphaeria dothidea*, *Phytophthora capsici*, *Sclerotium hydrophyllum*, cho vòng hoạt tính khá cao dao động từ 10 – 14 mm [10]. Đinh Anh Hòa và cs năm 2021 đã công bố chủng xạ khuẩn *Streptomyces filamentosus* LD5.4 phân lập được từ đất các vườn trồng rau ở tỉnh Lâm Đồng có hiệu quả ức chế cao nhất đối với nấm *Pythium vexans* gây ra bệnh thối rễ và ức chế sự phát triển của cây rau lên đến 51.80% [6]. Nguyễn Hoàng Nhật Tân và cs năm 2022 đã công bố chủng xạ khuẩn *Streptomyces rochei* BT02 rất có tiềm năng phát triển chế phẩm sinh học bảo vệ thực vật do có khả năng sinh các enzyme ngoại bào như lipase, protease, chitinase cao, thể hiện hoạt tính kháng khuẩn đối với 3 chủng vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* với nồng độ ức chế tối thiểu - MIC là 15 mg/ml. Đồng thời, trong điều kiện nhà lưới, chủng xạ khuẩn này có khả năng giúp giảm 43,5% bệnh héo xanh trên cây cà chua [13]. Khi nghiên cứu về hiện tượng kháng thuốc của các chủng vi sinh vật, TS. Nguyễn Phương Nhuệ và cs có nhiều công bố về hoạt chất sinh học từ xạ khuẩn như: đã tìm nguồn kháng sinh mới từ xạ khuẩn biển có thể ức chế được các vi sinh vật gây bệnh hay tuyển chọn được 2 chủng xạ khuẩn là chủng LD-X11 và chủng LM-X8 thuộc loài *Streptomyces griseorubens* LD-X11 và *Streptomyces iakyrus* LM-X8. Hai chủng này có hiệu quả phòng trừ nấm *F. oxysporum* LTM-N12 lily gây bệnh thối củ ở hoa lily tương ứng là 76,47 và 70,59%. Trần Thị Hoa và cs năm 2021 đã lựa chọn được 2 chủng xạ khuẩn từ bộ sưu tập vi sinh vật phân lập từ cây Sâm Ngọc Linh của Phòng Công nghệ tế bào thực vật - Viện CNSH và được xác định là chủng *Streptomyces* sp.X12 và *Streptomyces* sp. có khả năng kháng lại một số loại nấm như *Fumigatus Aspergillus*, *Fusarium solani*,... gây bệnh trên cây sâm Ngọc Linh đồng thời có khả năng sinh một số hoạt chất enzyme hữu ích như amylase, cellulase, protease... Năm 2021, Vũ Xuân Tạo và cs đã phân lập được 18 chủng xạ khuẩn từ đất trồng cam tại tỉnh Hà Giang, trong đó tuyển chọn được chủng xạ khuẩn

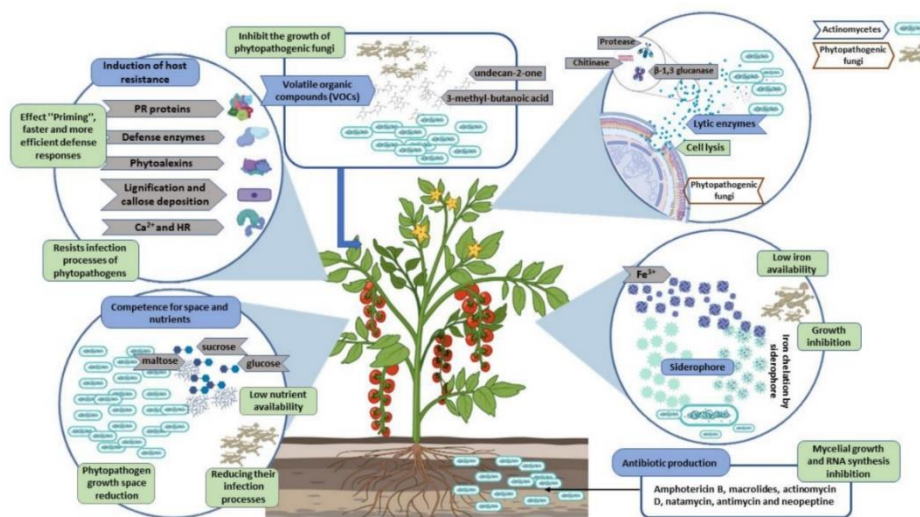
XK1 có khả năng kháng mạnh với nấm *Penicillium digitatum* và *Colletotrichum gloeosporioides* gây thối và rụng quả cam. Nguyễn Văn Hiếu và cs cũng đã tìm được chủng xạ khuẩn *Streptomyces autotrophicus* phân lập từ mẫu bùn ven biển có khả năng kháng *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Sarcina lutea* M5, *Escherichia coli* ATCC 15224 và *Sarcina lutea* với đường kính kháng dao động từ 14 – 17 mm [5]. Hay ở một công bố khác của cùng nhóm tác giả phân lập được chủng xạ khuẩn *Streptomyces orientalis* 4912 có khả năng sản sinh vancomycin. Vũ Thị Quyên và cs đã phân lập được 20 chủng xạ khuẩn từ trầm tích biển và đã sàng lọc được 2 chủng có hoạt tính kháng khuẩn và khả năng gây độc tế bào cao nhất thuộc loài *Streptomyces fradiae* và *Nocardioopsis synnemataformans* [16].

Xạ khuẩn phân lập được ở Việt Nam đã được chứng minh có khả năng sinh nhiều chất có hoạt tính sinh học với tiềm năng ứng dụng cao. Tuy nhiên, các nghiên cứu trên chỉ mới dừng lại ở việc phát hiện khả năng kháng vi sinh vật của các chủng xạ khuẩn, khả năng gây độc tế bào.... Đến nay, chưa có nhiều công bố ở Việt Nam về tinh sạch và xác định cấu trúc hóa học của các hoạt chất do xạ khuẩn thuộc chi *Streptomyces* sinh ra có khả năng sinh chất kháng nấm *Foc* TR4.

1.2.2. Cơ chế đối kháng với mầm bệnh của xạ khuẩn.

Xạ khuẩn có khả năng sinh nhiều hoạt chất được sử dụng để kiểm soát mầm bệnh (vi khuẩn và vi nấm) gây bệnh thực vật. Xạ khuẩn thể hiện khả năng đối kháng nấm gây bệnh thông qua khả năng sinh tổng hợp các hợp chất thứ cấp với nhiều cơ chế khác nhau như khả năng tiết kháng sinh [212], cạnh tranh dinh dưỡng và môi trường sống [71], sinh siderophores [140], tiết các enzyme phân giải [79], các hợp chất hữu cơ dễ bay hơi (VOC) [81] và một số cơ chế khác để kiểm soát mầm bệnh trên cây trồng. Sự ức chế mầm bệnh xảy ra do xạ khuẩn đối kháng cạnh tranh về chất dinh dưỡng, không gian sống, cư trú thông qua cơ chế tiết kháng sinh và các enzyme phân hủy vách tế bào mầm bệnh.... Các cơ chế trên tác động trực tiếp lên một hoặc nhiều giai đoạn trong chu kỳ sống của mầm bệnh. Ngoài ra, xạ khuẩn cũng có thể gián tiếp giúp cây ức chế mầm bệnh thông qua khả năng kích thích cây trồng tăng trưởng (tiết IAA, tiết enzyme phân giải phosphate), tiết

siderophore để cạnh tranh sắt với tác nhân gây bệnh đồng thời kích thích tính kháng bệnh chủ động trên cây trồng. Những xạ khuẩn thể hiện nhiều cơ chế đối kháng trong việc ngăn chặn bệnh thực vật sẽ được lựa chọn để phát triển thành các tác nhân kiểm soát sinh học (BCA).



Hình 1.4. Các cơ chế kháng nấm gây bệnh thực vật của xạ khuẩn [196]

1.2.2.1. Cơ chế cạnh tranh dinh dưỡng và môi trường sống

Cạnh tranh dinh dưỡng và môi trường sống với tác nhân gây bệnh trên thực vật của xạ khuẩn là một cơ chế gián tiếp. Khả năng cạnh tranh giữa hai hoặc nhiều vi sinh vật xảy ra khi sử dụng cùng một nguồn carbon (sucrose, glucose, maltose và fructose) hoặc cùng không gian sống [72]. Khả năng thích ứng với môi trường sinh thái và tốc độ tăng trưởng nhanh chóng của các vi sinh vật đối kháng cho phép chúng hấp thụ lượng dinh dưỡng có sẵn trong cơ thể vật chủ nhiều hơn so với nấm gây bệnh trên cây trồng. Do đó, giai đoạn nảy mầm của bào tử và quá trình lây nhiễm sang vật chủ bị giảm đi. Sự cạnh tranh cũng là một cơ chế kiểm soát sinh học hiệu quả khi chất đối kháng được tìm thấy với số lượng lớn và sự đồng hóa chất dinh dưỡng của xạ khuẩn nhanh hơn, mạnh hơn nấm gây bệnh cho cây trồng.

1.2.2.2. Cơ chế sinh chất kháng sinh

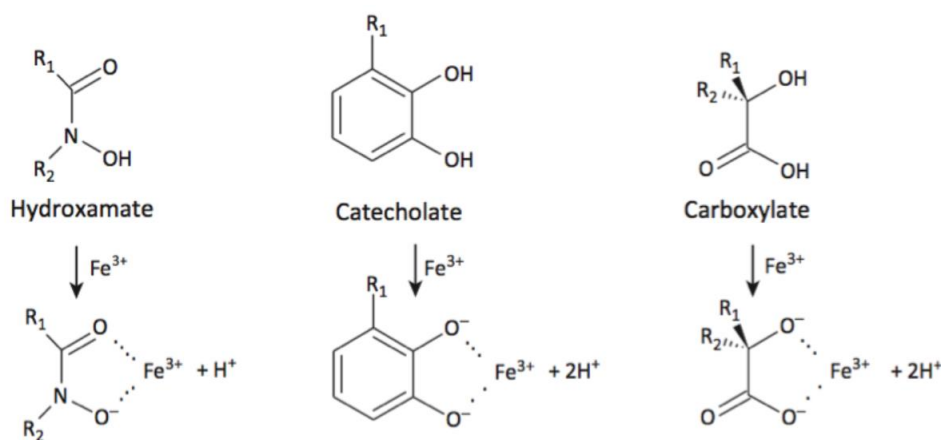
Một trong những đặc điểm sinh học quan trọng của xạ khuẩn là tạo thành các chất chuyển hóa thứ cấp có đặc tính kháng khuẩn, kháng nấm. Khoảng 80% thuộc

kháng sinh như streptomycin, spectinomycin, neomycin, tetracycline, erythromycin và nystatin được sản xuất bởi xạ khuẩn thuộc chi *Streptomyces*. Hơn nữa, nhiều chất chuyển hóa thứ cấp đã được phát hiện có đặc tính kháng khuẩn tương tự như nấm gây bệnh thực vật như amphotericin B, macrolide, actinomycin D, natamycin, antimycin và neopeptine [166]. Macrolide là một nhóm kháng sinh được sản xuất bởi xạ khuẩn có tác dụng ức chế tổng hợp protein của nấm. Amphotericin B kết hợp có chọn lọc với ergosterol trong màng tế bào nấm, tạo ra những thay đổi về tính thấm và kích thích sự phân ly tế bào. Đồng thời, khả năng sản xuất Actinomycin D của xạ khuẩn hạn chế sự phát triển của vi sinh vật và tổng hợp RNA. Natamycin ngăn chặn sự phát triển của nấm bằng cách kết hợp với ergosterol trong màng tế bào nấm. Neopeptine là chất ức chế sinh tổng hợp thành tế bào vi khuẩn ở cấp độ enzyme. Một quá trình quan trọng khác liên quan đến việc sản xuất kháng sinh là sự cộng sinh giữa xạ khuẩn và thực vật, vì kháng sinh bảo vệ thực vật khỏi nấm gây bệnh và chất tiết của thực vật giúp xạ khuẩn phát triển [166].

Các loại kháng sinh đầu tiên được phát hiện từ xạ khuẩn là actinomycin từ quá trình nuôi cấy *Streptomyces pneumoniaus*, streptothricin từ *Streptomyces lavendulae*, và streptomycin từ *Streptomyces griseus*. Các nhóm kháng sinh lâm sàng chính do xạ khuẩn sản xuất là: Aminoglycoside như neomycin, kanamycin, streptomycin; các angucyclines như auricin, ngoài ra còn có các tác nhân chống ung thư như landomycin và moromycin [108]; ansamycins như rifamycin, geldanamycin [105]; anthracyclines (chủ yếu các tác nhân chống ung thư, ví dụ, daunorubicin); glycopeptides (vancomycin, teichoplanin) [43]; lipopeptides (daptomycin) và tetracyclines [30]. Khả năng sản xuất chất kháng sinh của từng xạ khuẩn riêng lẻ cũng có thể khác nhau rất nhiều. Một số loài xạ khuẩn tạo ra một loại kháng sinh duy nhất, trong khi những loài xạ khuẩn khác có thể tạo ra một loạt các hợp chất và lớp hợp chất khác nhau. Bên cạnh thuốc kháng sinh, xạ khuẩn cũng tạo ra nhiều loại chất chuyển hóa thứ cấp khác có hoạt tính như thuốc diệt cỏ, thuốc kháng nấm, thuốc kháng ung thư hoặc thuốc ức chế miễn dịch và thuốc tẩy giun sán...

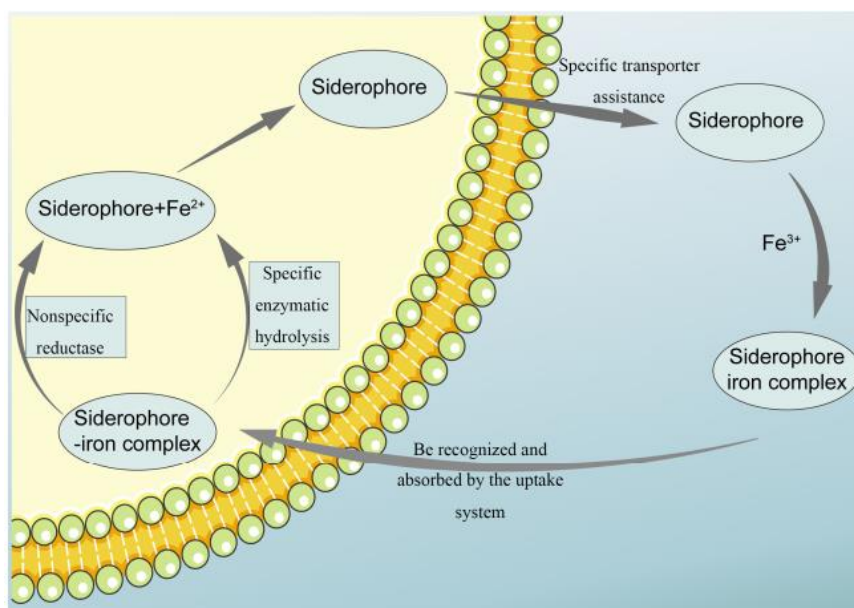
1.2.2.3. Cơ chế sinh siderophores

Siderophores là các hợp chất hữu cơ có khối lượng phân tử thấp (500-1000 Da) được tạo ra bởi các vi sinh vật và thực vật phát triển trong điều kiện sắt thấp. Vi sinh vật sử dụng các hệ thống vận chuyển Fe khác nhau qua trung gian là siderophore. Nhóm chức năng của siderophore và các phức chất hình thành khi liên kết với Fe (III) bao gồm các nhóm chức như catecholate, hydroxamate, và carboxylate. Các nhóm này đóng vai trò quan trọng trong việc tạo liên kết mạnh với ion sắt (Fe^{3+}) trong đó: nhóm catecholate: Gồm hai nhóm hydroxyl (-OH) trên vòng benzene, có khả năng chelat sắt rất mạnh, nhóm hydroxamate: Gồm nhóm chức $-C(=O)-N-OH$, có khả năng liên kết với sắt thông qua nhóm hydroxyl và oxy carbonyl và nhóm carboxylate: Gồm nhóm $-COO-$, thường liên kết với sắt qua hai nguyên tử oxy. Khi các nhóm chức này liên kết với Fe (III), chúng thường tạo ra các phức chất hexadentate (sáu vị trí liên kết) với hình học bát diện (octahedral), giúp ổn định cấu trúc của phức sắt và hỗ trợ quá trình vận chuyển sắt vào tế bào vi sinh vật. Các siderophores của vi khuẩn là catecholates (enterobactin), carboxylate (rhizobactin) và hydroxamate (ferrioxamine B). Trong đó, hydroxamate siderophores là dạng phổ biến nhất trong tự nhiên, được sản xuất bởi cả vi khuẩn và nấm. Ở vi khuẩn, các hydroxamate siderophores là các alkylamine bị acyl hóa và hydroxyl hóa [202], trong khi ở nấm, hydroxamate siderophores được tạo thành từ ornithine được hydroxyl hóa và alkyl hóa [28].



Hình 1.5. Các nhóm chức năng của siderophore

Sắt (Fe) là một trong những nguyên tố vi lượng cần thiết cho cây trồng vì nó cần thiết cho nhiều quá trình hoạt động như quang hợp, tổng hợp DNA, hô hấp và cố định đạm. Mặc dù sắt rất cần thiết cho mọi sinh vật sống nhưng khả sử dụng bị hạn chế vì phần lớn Fe tồn tại ở dạng không hòa tan. Trong điều kiện hiếu khí, sắt tồn tại chủ yếu ở dạng Fe^{3+} và dễ tạo dạng hydroxide không tan, do đó không thích hợp cho thực vật và vi sinh vật sử dụng. Siderophore đóng vai trò như tác nhân giải phóng sắt khỏi các thành phần khoáng và hữu cơ trong điều kiện thiếu sắt. Siderophore do xạ khuẩn tạo ra có thể được giải quyết vấn đề này vì chúng có khả năng chelat hóa chất Fe dưới dạng không hòa tan thành dạng Fe hòa tan cung cấp cho cây trồng và hỗ trợ sự phát triển của cây trồng [32]. Ngoài ra, các siderophore cũng tham gia vào việc bảo vệ thực vật như tác nhân kiểm soát sinh học bằng cách kết hợp chặt chẽ với sắt, làm cạn kiệt sắt của các vi sinh vật gây bệnh cây, từ đó làm cho chúng thiếu hụt sắt.



Hình 1.6. Cơ chế hoạt động của siderophore [213]

1.2.2.4. Sản sinh các enzyme phân giải

Sử dụng enzyme phân hủy thành tế bào là một trong những cơ chế chính để kiểm soát bệnh trên thực vật do nấm bệnh gây ra của xạ khuẩn. Do đó, việc tìm kiếm các chủng xạ khuẩn có khả năng sinh các enzyme phân hủy vách tế bào nấm

bệnh đóng vai trò quan trọng trong phòng trừ sinh học đối với cây trồng. Cơ chế được mô tả: (1) các enzyme phân giải thành tế bào nấm [44], (2) gây mất tính toàn vẹn của màng tế bào, (3) giải phóng chất nội bào và (4) gây chết tế bào [22]. Các enzyme ngoại bào đã được công bố như cellulase, chitinase, pectinase [42], protease [103], β -1,3 glucanase [210], keratinase [23], xylanase, lipase, peroxidase [118], amylase và hemiaellulose [94] được sản xuất bởi xạ khuẩn có tác dụng ức chế trực tiếp lên các chủng nấm gây bệnh bằng cách làm suy giảm thành tế bào của chúng vì thành phần thành tế bào nấm bệnh gồm chitin, glucan, protein, cellulose và lipid. Các enzyme β -1,3 glucanase thủy phân liên kết β -D-glycosid của β -1,3 glucan, chitinase thủy phân liên kết chitin β -1,4 N-acetyl- β -D-glycosamide, phá vỡ thành tế bào nấm. Enzyme protease thủy phân protein, đặc biệt là mannoprotein là thành phần tạo nên thành tế bào nấm gây bệnh thực vật. β -1,3-glucanase được tổng hợp trong cây trồng giữ vai trò trong bảo vệ thực vật chống lại nấm gây bệnh trên thực vật. Thành phần chính của thành tế bào nấm là chitin, β -1,3-glucan và protein. Do đó các vi sinh vật có khả năng sản xuất β -1,3-glucanase đã được ứng dụng như một tác nhân kiểm soát sinh học tiềm năng chống lại các loại nấm gây bệnh trong nông nghiệp.

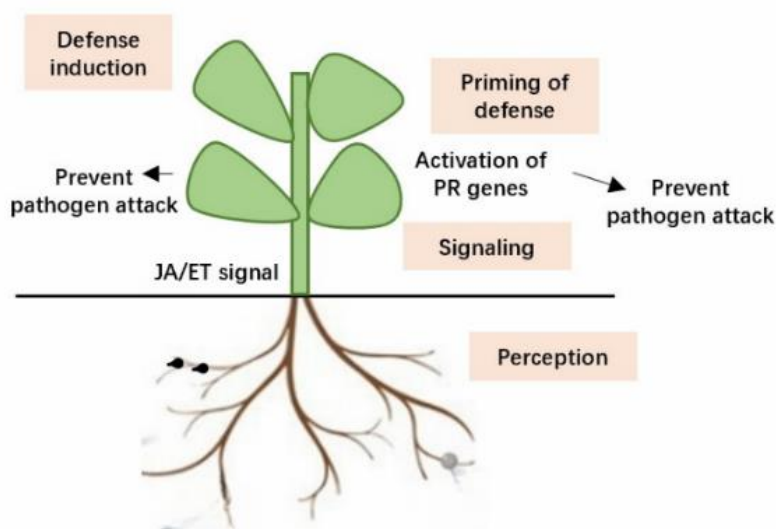
Chitin ($C_8H_{13}O_5N$)_n là một polymer chuỗi dài của liên kết β -1,4 với N-Acetyl-D-glucosamine được phân bố rộng rãi trong tự nhiên. Các enzyme thủy phân chitin thông qua việc cắt đứt liên kết β -1,4 -glycosidic của chuỗi polyme này. Nhóm enzyme chitinase được phân chia thành endochitinases, exochitinases, hoặc N-acetylglucosaminidases

1.2.2.5. *Kích thích khả năng kháng bệnh của cây trồng*

Xạ khuẩn có khả năng kích thích khả năng kháng bệnh của cây trồng thông qua việc: (1) sản xuất quá mức các enzyme liên quan đến tăng cường cấu trúc thành tế bào, tránh sự xâm nhập của nấm gây bệnh, sự xâm nhiễm của nấm vào cây trồng và oxy hóa hợp chất phenolic thành quinones gây độc đối với nấm gây bệnh [66]; (2) sản sinh quá mức các protein (PR) liên quan đến bệnh học như enzyme hydrolytic chitinase và β -1,3-glucanase phá vỡ cấu trúc thành tế bào của nấm gây bệnh cây

trồng [201]; (3) sản sinh các phytoalexins gây độc đối với nấm gây bệnh cây trồng, ức chế sự kéo dài và sự phát triển của ống mầm, giảm sự phát triển của hệ sợi và ức chế sự hấp thụ glucose [115]; (4) thúc đẩy quá trình lignin hóa từ đó làm cứng thành tế bào thực vật [200]; và (5) thúc đẩy hình thành mô sẹo (sinh học và phi sinh học) trong mô bằng cách tạo ra một rào cản vật lý [220].

Xạ khuẩn có thể kích thích khả năng kháng bệnh của cây chủ trong cả hai trường hợp kích kháng bệnh cảm ứng thông qua tín hiệu JA/ET (Jasmonic acid/etylen) và kích kháng bệnh lưu dẫn SAR (Systemic Acquired Resistance). Việc truyền tín hiệu ISR (Induced Systemic Resistance) thường được coi là phụ thuộc vào axit jasmonic và etylen, nhưng không phụ thuộc vào axit salicylic. Trong đó, SAR kích thích nhanh chóng phản ứng của các mầm bệnh thực vật và xạ khuẩn, kích thích trạng thái ISR đặc biệt gọi là “môi”, để có kích thích khả năng kháng bệnh nhanh và mạnh mẽ hơn. Sự khởi đầu của con đường JA/ET dẫn đến sự đề kháng với vi khuẩn gây bệnh *Erwinia carotovora subsp. carotovora* và cảm ứng SAR con đường dẫn đến sự đề kháng với mầm bệnh nấm *F. oxysporum* [56].



Hình 1.7. Cảm ứng kháng hệ thống (ISR) ở thực vật

1.3. THU NHẬN HỢP CHẤT THỨ CẤP TỪ XẠ KHUẨN

1.3.1. Phân lập hợp chất thứ cấp từ xạ khuẩn

Việc lựa chọn dung môi hữu cơ để thu nhận cặn chiết sau quá trình lên men vi sinh vật nói chung và xạ khuẩn nói riêng có tác động đáng kể đến quá trình phân lập, tách chiết và tinh sạch các hợp chất chuyển hóa thứ cấp. Điều này đặc biệt quan trọng vì các dung môi khác nhau có thể ảnh hưởng đến hiệu quả và năng suất của quá trình chiết xuất. Nguyên tắc chọn dung môi chiết đó là: dung môi không phân cực sẽ hòa tan các hợp chất có tính không phân cực, và dung môi phân cực sẽ hòa tan các hợp chất có tính phân cực.

Bảng 1.1. Tính phân cực của một số dung môi [15]

STT	Dung môi	Chỉ số phân cực theo hằng số điện môi và độ nhớt
1	<i>n</i> -Hexane	0,0
2	Diethyl ether	2,8
3	Dichloromethane	3,1
4	Chloroform	4,1
5	Ethyl acetate	4,4
6	Acetone	5,1
7	Methanol	5,1
8	Nước	9,0

Các hợp chất tan trong nước, đặc biệt là các hợp chất trung tính hoặc lưỡng tính, thường khó tinh sạch hơn do tính tan của chúng trong nước, làm phức tạp quá trình tách chiết [65]. Ethyl acetate là dung môi lý tưởng để chiết xuất các hợp chất chuyển hóa thứ cấp từ môi trường lên men do khả năng hoà tan tốt và dễ bay hơi, giúp dễ dàng loại bỏ dung môi sau khi chiết xuất [58]. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng sử dụng ethyl acetate là dung môi hiệu quả để thu nhận các chất kháng khuẩn, kháng nấm và nhiều hoạt tính sinh học khác từ xạ khuẩn [133]. Franco và cs (1991) cũng khẳng định, phần lớn các kháng sinh kháng nấm được chiết xuất bằng ethyl acetate [75].

Tinh sạch các chất trao đổi từ vi sinh vật là một quá trình phức tạp, đòi hỏi rất nhiều kỹ thuật, do các chất này rất đa dạng về cấu trúc hoá học nên có trọng lượng phân tử rất khác nhau. Phương pháp trao đổi ion rất hiệu quả đối với những chất tan trong nước axit hoặc kiềm và không hiệu quả đối với những chất tan trong dung môi hữu cơ. Sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) là phương pháp cho phép phân tách các hợp chất từ chất phân cực đến không phân cực với độ chính xác cao, giúp nhận diện và tinh sạch các chất mục tiêu một cách hiệu quả. Chiết xuất siêu âm là phương pháp dùng sóng siêu âm giúp phá vỡ cấu trúc tế bào vi sinh vật, giải phóng các hợp chất sinh học, tăng cường hiệu suất chiết xuất. Đây là phương pháp cho hiệu suất cao, thời gian chiết xuất ngắn và tiết kiệm dung môi, giúp giảm chi phí và ít tác động xấu đến môi trường. Phương pháp chiết xuất bằng CO₂ siêu tới hạn an toàn và thân thiện môi trường, giữ nguyên được cấu trúc và hoạt tính của các hợp chất sinh học nhờ nhiệt độ chiết xuất thấp và là phương pháp cho hiệu suất cao, thích hợp với các hợp chất không phân cực, đặc biệt là các hợp chất dễ bay hơi và nhạy cảm với nhiệt. Cuối cùng phương pháp tách chiết sử dụng dung môi hữu cơ là phương pháp phổ biến, có khả năng hòa tan tốt các hợp chất chuyển hóa thứ cấp, giúp tăng hiệu quả chiết xuất. Quá trình chiết xuất với dung môi hữu cơ đơn giản, tiện lợi, không đòi hỏi thiết bị phức tạp, giúp giảm chi phí và dễ dàng áp dụng trong phòng thí nghiệm [173].

1.3.2. Xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất thứ cấp từ xạ khuẩn

Việc xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất thứ cấp giúp khám phá và phát triển các loại thuốc mới có hiệu quả cao hơn và ít tác dụng phụ. Đồng thời, việc hiểu rõ cấu trúc hóa học giúp các nhà khoa học hiểu được cơ chế hoạt động của các hợp chất thứ cấp, tối ưu hóa việc sử dụng các hợp chất này trong điều trị và phát triển các dẫn xuất mới có hiệu quả cao hơn [173].

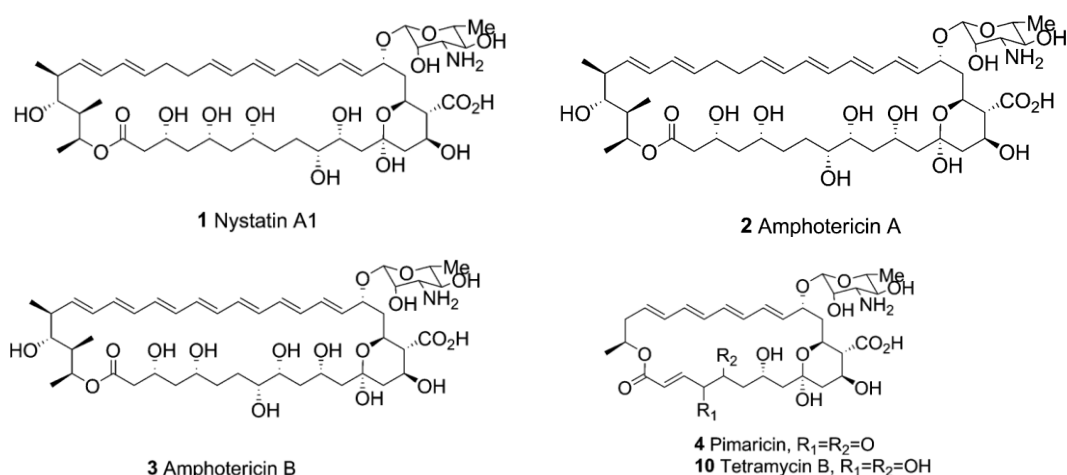
Dựa trên sự kết hợp giữa các phương pháp phổ hiện đại như phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) và phổ khối lượng (ESI-MS) hoặc phổ khối lượng phân giải cao (HR-ESI-MS) để xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất thứ cấp từ dịch lên men xạ khuẩn. Các hợp chất thu nhận sau tinh chế bằng các phương pháp sắc ký sẽ

được đo phổ proton $^1\text{H-NMR}$ để kiểm tra độ tinh sạch. Sau đó, các hợp chất này được tiếp tục đo phổ $^{13}\text{C-NMR}$ và phổ NMR hai chiều gồm HSQC, HMBC và COSY để xác định cấu trúc hóa học. Hợp chất sau khi được xác định cấu trúc sẽ được khẳng định công thức phân tử dựa trên phổ khối MS. Trên cơ sở cấu trúc thu được, tên và tính mới của các hợp chất được xác định bằng cách so sánh với thông tin của các hợp chất đã biết trên các dữ liệu hóa học như SciFinder được sản xuất bởi Chemical Abstracts Service (CAS).

1.3.3. Nhóm các hợp chất kháng nấm phân lập từ xạ khuẩn

1.3.3.1. Nhóm macrolide

Các hợp chất kháng nấm thuộc nhóm macrolide là một họ lớn của polyketide có hoạt tính kháng nấm mạnh được sản xuất chủ yếu bởi các chủng xạ khuẩn (*Streptomyces*). Nhóm macrolides bao gồm các kháng sinh chính như nystatin A1, amphotericin A và B, pimaricin... Kháng sinh polyene có cấu trúc đặc trưng bởi các lactone vòng macrocyclic polyhydroxyl bao gồm 20–40 nguyên tử cacbon với ba đến tám liên kết đôi liên hợp. Cơ chế kháng nấm chính của nhóm polyene liên quan đến sự tương tác trực tiếp của polyene với ergosterol, sterol của màng tế bào nấm để tạo thành các kênh xuyên màng, làm rò rỉ ion, protein và các phân tử quan trọng, dẫn đến mất cân bằng thẩm thấu và gây chết tế bào nấm [192].



Hình 1.8. Cấu trúc của các chất chính nhóm polyene macrolide

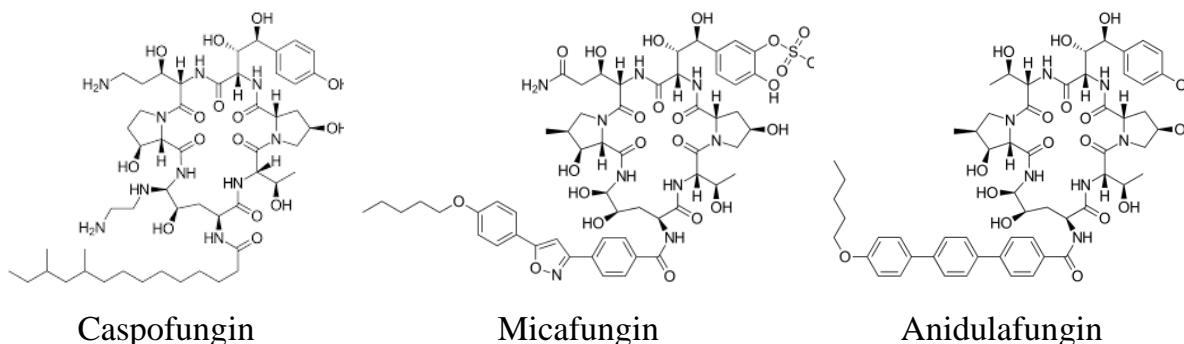
Nystatin được phân lập và xác định khả năng kháng nấm đầu tiên từ chủng *Streptomyces noursei* năm 1958, tiếp đến là từ *S. fungicidicus* ATCC 27432 năm 1960 và *S. albulus* ATCC 12757 năm 1983 và cho đến nay thì chỉ có *Streptomyces noursei* được sử dụng để sản xuất nystatin thương mại [74]. Amphotericin A và B được sản xuất từ chủng xạ khuẩn *Streptomyces nodosus* [19] và hiện nay amphotericin B vẫn là kháng sinh quan trọng nhất để điều trị các bệnh nhiễm trùng nấm toàn thân nghiêm trọng ở người [45]. Pimaricin được sản xuất bởi *Streptomyces natalensis* và được sử dụng rộng rãi trong ngành công nghiệp thực phẩm để ngăn ngừa nhiễm nấm mốc trong pho mát và các loại thực phẩm không vô trùng khác. Công bố của Vartak và cs (2014) cho thấy chất PN00053 là một polyene macrolide được phân lập từ một chủng *Streptomyces* sp. PM0727240 (MTCC5680) hoang dã, một chủng phân lập từ các vùng núi đá của Himachal Pradesh, Ấn Độ. Hợp chất này là một dẫn xuất mới của kháng sinh Roflamycoin [199]. PN00053 thể hiện hoạt tính kháng nấm phổ rộng đối với nấm men và nấm sợi, tuy nhiên, không thể hiện hoạt tính kháng khuẩn [199].

Hai hợp chất phocoenamicin B **39** và phocoenamicin C **40** thuộc nhóm polyketides được phân lập từ dịch chiết acetone của chủng xạ khuẩn *Micromonospora* sp CA-214671 có nguồn gốc từ trầm tích biển ở quần đảo Canary, Tây Ban Nha. Phocoenamicin B **39** và phocoenamicin C **40** thể hiện hoạt tính kháng đối với chủng *Staphylococcus aureus* kháng methicillin (MRSA) với giá trị MIC từ 4 - 64 µg/mL và 16 - 32 µg/mL đối với *M. tuberculosis* H37Rv [160].

1.3.3.2. Nhóm peptide

Echinocandin- là kháng sinh lipopeptidic tự nhiên nhóm peptide- có cấu trúc gồm một peptide vòng và một axit béo. Cấu trúc lipopeptide vòng đặc biệt của echinocandin được lắp ráp bởi một peptide synthetase không phải ribosome (NRPS). Vòng peptide được đóng lại thông qua một cầu nối N-acyl-hemiacetal bất thường giữa dihydroxy-L-ornithine (vị trí axit amin 1) và hydroxy-L-proline (vị trí 6). Nó tương đối ổn định với quá trình thủy phân; tuy nhiên, nhóm này rất quan trọng đối với tính ổn định của echinocandin. Chuỗi axit béo có nguồn gốc từ quá

trình chuyển hóa chính hoặc, trong trường hợp chuỗi phân nhánh, nó được tổng hợp sinh học bởi polyketide synthase (PKS).



Hình 1.9. Cấu trúc của các chất chính nhóm echinocandin

Echinocandin là một nhóm thuốc chống nấm ức chế quá trình tổng hợp β -glucan trong thành tế bào nấm thông qua ức chế không cạnh tranh của enzyme 1,3- β glucan synthase [148]. β -glucan là các polyme carbohydrate liên kết chéo với các thành phần khác của thành tế bào nấm, tương đương với peptidoglycan của vi khuẩn. Caspofungin, micafungin và anidulafungin là các dẫn xuất echinocandin bán tổng hợp có ứng dụng lâm sàng hạn chế do độ hòa tan, phổ kháng nấm và đặc tính dược động học của chúng. Do đó, echinocandin là hợp chất chống nấm mạnh và thường được sử dụng trong điều trị nhiễm nấm *Candida* và *Aspergillus* [25], nhưng chưa thấy có công bố về khả năng kháng nấm *Fusarium*.

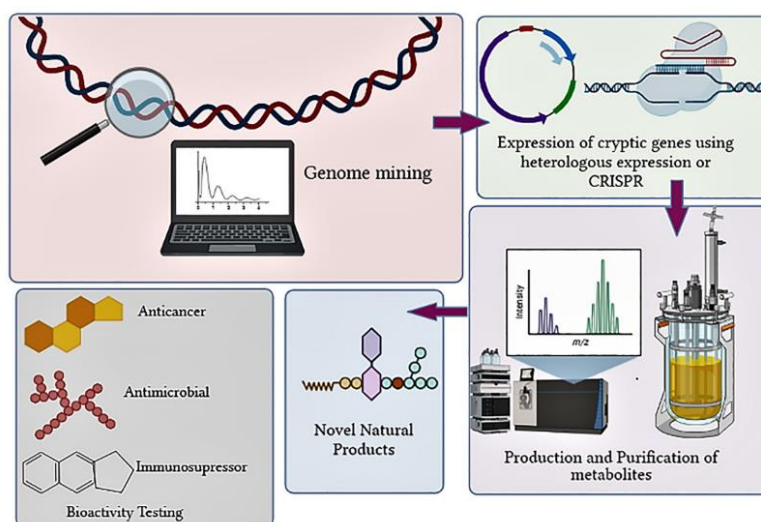
1.4. THÔNG TIN DI TRUYỀN HỆ GEN XẠ KHUẨN LIÊN QUAN ĐẾN HOẠT TÍNH KHÁNG NẤM

1.4.1. Phương pháp khai thác hệ gen xạ khuẩn

Bộ dữ liệu hệ gen toàn cầu bùng nổ với bộ gen của các sinh vật khác nhau được giải trình tự với số lượng lớn. Hiện nay, trên các website đã lưu giữ hơn 0,2 triệu bộ gen vi khuẩn khác nhau. Trình tự hệ gen của các thành viên trong chi xạ khuẩn *Streptomyces* được đặc biệt chú ý do chúng có khả năng sinh tổng hợp các chất chuyển hóa thứ cấp có hoạt tính sinh học. *Streptomyces coelicolor* là xạ khuẩn đầu tiên được giải trình tự hoàn toàn nhằm khám phá các sản phẩm tự nhiên của nó, tiếp theo là *Streptomyces avermitilis*- một chủng xạ khuẩn được ứng dụng nhiều trong

công nghiệp [101]. Trong khi bộ gen của vi khuẩn được giải trình tự chủ yếu dùng cho các mục đích phân loại thì bộ gen của *Streptomyces* chủ yếu được giải trình tự vì tiềm năng sinh tổng hợp các hoạt chất thứ cấp có hoạt tính sinh học.

Với phương pháp truyền thống để khám phá các sản phẩm tự nhiên có hoạt tính sinh học mới có nguồn gốc từ vi sinh vật đòi hỏi tốn nhiều thời gian, công sức và gặp rất nhiều khó khăn và có tỷ lệ tái phát hiện các hợp chất chuyển hóa cao. Hiện nay nhiều bộ gen hoàn chỉnh của vi sinh vật có thể truy cập công khai trên các website nên chúng đã được sử dụng để khai thác như một công cụ mới có hiệu quả cao để khám phá các chất chuyển hóa tự nhiên mới. Sự xuất hiện của các công cụ trong khai thác bộ gen và tin sinh học đã cải thiện đáng kể hiệu quả của việc phát hiện các loài mới và các sản phẩm tự nhiên có hoạt tính sinh học từ vi sinh vật đặc biệt là từ xạ khuẩn đã đẩy nhanh việc phát hiện ra các loại kháng sinh mới [215]. Khai thác bộ gen liên quan đến việc xác định các cụm gen sinh tổng hợp các chất chuyển hóa trong bộ gen của các sinh vật đã được giải trình tự, phân tích trình tự của các enzyme được mã hóa bởi các cụm gen này. Đồng thời xác định các sản phẩm của các cụm gen bằng thực nghiệm sẽ mang lại cơ hội tìm được các sản phẩm mới trong tự nhiên.



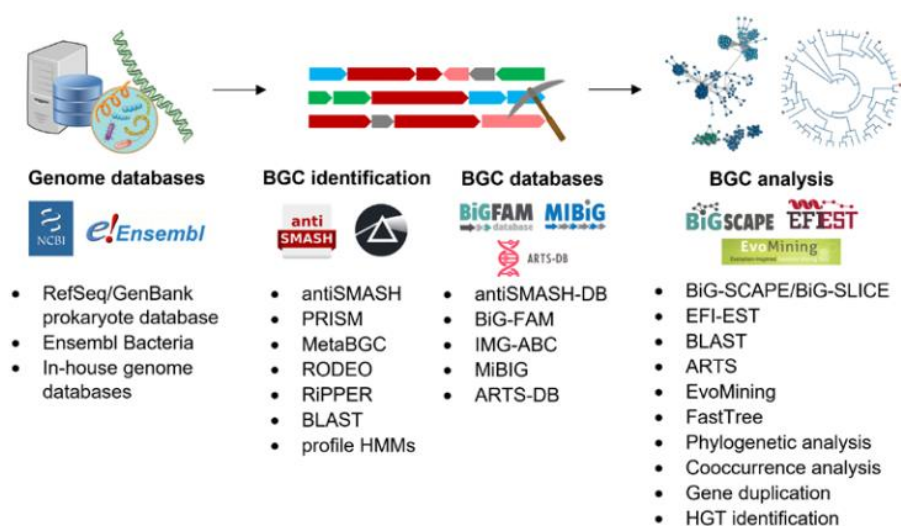
Hình 1.10. Tổng quan về phương pháp khai thác các sản phẩm tự nhiên từ xạ khuẩn [184]

Tin sinh học với các công cụ đã so sánh hàng ngàn gen và toàn bộ bộ gen ở mức độ phân tử. Trong nhiều năm qua, các chương trình và thuật toán trên máy tính đã được thiết kế để phát hiện các cụm gen sinh tổng hợp hợp chất thứ cấp (BGCs) từ trình tự các nucleotit. Những công cụ này đã góp phần cải thiện chất lượng và tốc độ phân tích bộ gen. Các công cụ tin sinh học thường sử dụng các đoạn gen được chọn lọc để xác định gen hoặc miền một cách chính xác trong một nhóm các chuỗi đã căn chỉnh nhằm phát hiện các con đường sinh tổng hợp (pathway) đã biết. Một số cụm gen sinh tổng hợp hợp chất thứ cấp (BGCs) được xác định nhanh chóng như các con đường sinh tổng hợp PKS (polyketide synthase) và NRPS (nonribosomal peptide synthetase). Nhiều con đường sinh tổng hợp và dự đoán đã được biết đến với độ tin cậy cao như phần mềm Antibiotics and Secondary Metabolite Analysis Shell (antiSMASH) [39]. Các enzyme mã hóa trong hệ thống này cùng một họ, ví dụ như oxidoreductases, methyltransferases, CoA-ligases, và cytochrome P-450. Chúng cũng mã hóa các operon tương tự với họ của các bộ điều chỉnh phiên mã đã biết. Tin sinh học giúp hiểu rõ vai trò của các sản phẩm tự nhiên trong sinh thái vi sinh vật và mối quan hệ giữa vi sinh vật và vật chủ. Các thách thức hiện nay có thể được giải quyết với sự hỗ trợ của tin sinh học [139].

1.4.2. Các công cụ và phần mềm tin sinh học trong khai thác hệ gen xạ khuẩn

Trong 10 năm gần đây, việc tìm kiếm, thu thập các chủng xạ khuẩn từ các môi trường sống khác nhau không ngừng tăng lên dẫn đến việc dữ liệu di truyền tăng lên nhanh chóng. Ban đầu, việc khai thác bộ gen được thực hiện bằng cách phát hiện và khai thác các enzyme của các con đường sinh tổng hợp các chất chuyển hóa thứ cấp. Những enzyme này bao gồm polyketide synthase (PKS), tổng hợp peptide không ribosome (NRP). Phân tích các cơ sở dữ liệu khổng lồ về bộ gen của xạ khuẩn đòi hỏi các công cụ tin sinh học đặc biệt. Sau này, nhiều công cụ tin sinh học như antiSMASH và PRISM đã được phát triển có thể xác định một phần hoặc toàn bộ bộ gen mã hóa BCG. Những công cụ này so sánh hiệu quả dữ liệu do người dùng gửi bộ gen với cơ sở dữ liệu BCG có sẵn và cung cấp một dự đoán cấu trúc của các chất chuyển hóa thứ cấp [176]. Trình tự của bộ gen của xạ khuẩn được tìm

kiểm bằng phân tích tin sinh học sẽ mở ra cánh cửa cho các nhà khoa học khám phá các con đường sinh tổng hợp và phát hiện các sản phẩm tự nhiên có hoạt tính sinh học mới. Cách tiếp cận này sẽ góp phần khám phá nhiều hơn về thuốc kháng sinh có nguồn gốc tự nhiên và do đó thúc đẩy ngành công nghiệp dược phẩm phát triển.



Hình 1.11 Các công cụ và phần mềm tin sinh học trong khai thác hệ gen[132]

Streptomyces là một nguồn tài nguyên đa dạng và hữu ích nhằm khai thác các hợp chất thứ cấp có hoạt tính sinh học và nhiều trong số đó có các ứng dụng lâm sàng quan trọng. Khai thác bộ gen đã trở thành một phương pháp hiệu quả để khám phá tiềm năng công nghệ sinh học của *Streptomyces*, nơi công thức hóa học và cấu trúc của các phân tử có thể được xác định và thậm chí dự đoán bằng cụm gen BGC. *Streptomyces* có nhiễm sắc thể tuyến tính, không giống như các vi khuẩn khác, kích thước bộ gen của chúng thuộc loại cao nhất trong giới vi khuẩn, dao động từ 6,2 Mb đối với *Streptomyces cattleya* NRRL 8057 đến 12,7 Mb đối với *Streptomyces rapamycinicus* NRRL 5491 [31]. Xạ khuẩn đóng vai trò quan trọng trong việc tái chế vật liệu hữu cơ và tham gia cộng sinh với thực vật, nấm, côn trùng và động vật [198]. Những tương tác này góp phần tạo ra các hợp chất bảo vệ vật chủ chống lại mầm bệnh hoặc các enzyme phân hủy các polyme như lignocellulose. Mặc dù tiềm năng sản xuất chất chuyển hóa thứ cấp của xạ khuẩn đã được biết đến từ lâu, nhưng các nghiên cứu về hệ gen với các phương pháp tiếp cận mới đã tiết lộ rằng trên thực

tế tiềm năng này của xạ khuẩn đã bị đánh giá thấp vì trên thực tế một chủng *Streptomyces* đơn lẻ có thể sở hữu trung bình từ 30 đến 50 cụm gen sinh tổng hợp (BGC) chiếm 8–10% bộ gen của nó. Hầu hết chúng đều không biểu hiện trong điều kiện nuôi cấy trong phòng thí nghiệm tiêu chuẩn nhưng có thể được đánh thức bằng nhiều phương pháp tiếp cận khác nhau [175]. Xem xét toàn bộ bộ gen được giải trình tự cho đến nay có rất nhiều hợp chất thứ cấp được tìm thấy. Thực tế là chúng chứa số lượng lớn nhất các BGC, chẳng hạn như polyketide synthases (PKS) và synthetase của peptit không phải ribosome (NRPS), hoặc thậm chí cả sự kết hợp giữa các con lai PKS-NRPS [184].

Một số công cụ và phần mềm tin sinh học:

➤ ***National Center for Biotechnology Information (NCBI)***

NCBI là website cung cấp một lượng lớn tài nguyên trực tuyến về thông tin và dữ liệu sinh học, bao gồm cơ sở dữ liệu trình tự nucleic acid (GenBank) và cơ sở dữ liệu PubMed gồm các trích dẫn và tóm tắt được xuất bản trên các tạp chí khoa học sự sống. Các tài nguyên bao gồm PubMed, PMC, Bookshelf, Genome, BioProject, dbSNP, dbVar, cơ sở dữ liệu BLAST, igBLAST, iCn3D và PubChem,.... Tất cả các tài nguyên này có thể được truy cập tại trang web NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

➤ **Genmark**

Genmark (truy cập tại website <http://exon.gatech.edu/GenMark/>) là một trang web tìm kiếm gen và dự đoán vị trí của gen trong hệ gen, trình tự nucleotide của sinh vật nhân sơ, sinh vật nhân thực và virus. GenMark bao gồm hai chương trình chính được gọi là GenMark và GenMark.hmm. Chương trình GenMark được sử dụng để dự đoán các vùng mã hóa và không mã hóa protein, có thể được sử dụng để phân tích toàn bộ bộ gen cũng như phân tích một gen cụ thể và những vùng xung quanh nó. Chương trình GenMark.hmm được sử dụng để tìm các điểm chuyển tiếp (ranh giới) giữa các vùng mã hoá protein và không mã hoá protein và có thể mang hiệu quả cao hơn với các trình tự ở bộ gen lớn hơn [40].

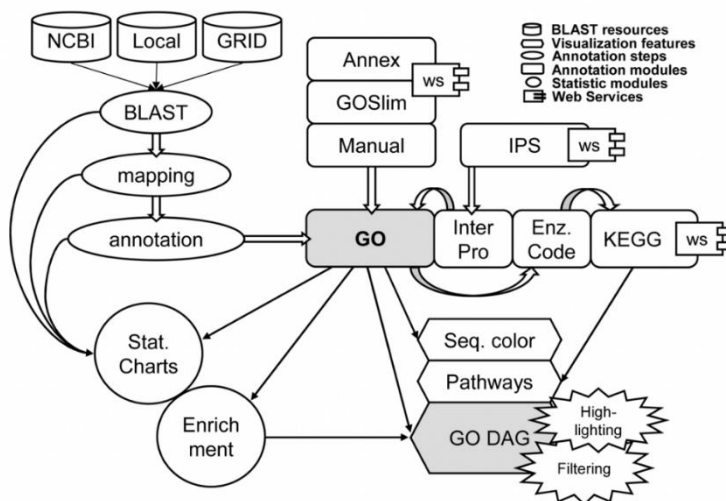
➤ **Blast2GO**

Blast2GO (B2G) (truy cập tại website: <https://www.blast2go.com/>) là một công cụ tin sinh học để chú thích chuỗi DNA hoặc protein dựa trên Gen Ontology (GO) và khai thác dữ liệu dựa trên chức năng [88].

Công cụ này bao gồm nhiều chức năng để trực quan hóa, quản lý và phân tích thống kê các kết quả chú thích, bao gồm cả phân tích làm giàu bộ gen. B2G cung cấp InterPro, mã enzyme, con đường sinh tổng hợp trong KEGG, mô hình hóa dựa trên GO (direct acyclic graphs - DAGs) và GOSlim [55].

Các thuật ngữ InterPro được lấy từ InterProScan tại EBI và được chuyển đổi, hợp nhất thành GO. Chú thích GO có thể được điều chỉnh từ Annex, trang web GOSlim và chỉnh sửa thủ công. Các chú thích bản đồ như mã enzyme và con đường KEGG được truy xuất thông qua lập bản đồ từ GO. Các công cụ trực quan bao gồm mã màu trình tự, con đường KEGG và biểu đồ GO với các chọn lọc và đánh dấu thuật ngữ GO. Các công cụ khai thác dữ liệu chú thích bổ sung bao gồm biểu đồ thống kê và chức năng phân tích làm giàu bộ gen [83].

7



Hình 1.12. Sơ đồ biểu diễn ứng dụng Blast2GO

➤ **Antibiotics & Secondary Metabolite Analysis Shell (AntiSMASH)**

AntiSMASH (antibiotics & Secondary Metabolite Analysis SHell) là công cụ được sử dụng rộng rãi nhất để xác định và phân tích các cụm gen sinh tổng hợp BGC ở vi khuẩn cổ, vi khuẩn và nấm. AntiSMASH lần đầu tiên được Medema và

cs công bố vào năm 2011 với những tính năng xác định polyketides, nonribosomal peptides, terpenes, aminoglycosides, aminocoumarins, indolocarbazoles, lantibiotics, bacteriocins, nucleosides, beta-lactams, butyrolactones và nhiều loại chất khác trong trình tự nucleotide của vi khuẩn và nấm [138]. AntiSMASH 2.0 được Blin và cs tiếp tục công bố năm 2013 được thiết kế lại và cải tiến với nhiều tính năng hơn khiến antiSMASH 2.0 trở thành nguồn tài nguyên toàn diện nhất để xác định và phân tích thứ cấp mới con đường sinh tổng hợp chất chuyển hóa ở vi sinh vật. Tiếp theo đó, các phiên bản antiSMASH 3.0 được công bố bởi Weber và cs năm 2015, các phiên bản antiSMASH 4.0, 5.0, 6.0 và 7.0 được Blin và cs liên tục công bố vào năm 2017, 2019, 2021 và 2023.

Kể từ khi công bố lần đầu vào năm 2011, antiSMASH đã trở thành công cụ được sử dụng rộng rãi nhất để khai thác bộ gen cho các chất chuyển hóa thứ cấp, chất chuyển hóa chuyên biệt và được coi như tiêu chuẩn vàng. AntiSMASH sử dụng cách tiếp cận dựa trên quy tắc phát hiện các vùng gen chứa các cụm gen sinh tổng hợp bằng cách sử dụng thông tin về các enzyme để phân loại các vùng được phát hiện thành 88 con đường sinh tổng hợp khác nhau. Bên cạnh việc phân tích cụ thể đối với nhiều con đường sinh tổng hợp khác nhau đã được biết, antiSMASH còn so sánh các vùng BGCs được phát hiện với cơ sở dữ liệu MIBiG (Minimum Information about a Biosynthetic Gen cluster). MIBiG chứa thông tin về các cụm gen sinh tổng hợp đã biết, giúp xác định các cụm gen mới có tương đồng với các cụm gen đã được nghiên cứu trước đây. Điều này giúp xác định xem các cụm gen mới có tương đồng với các cụm gen đã được dự đoán trước đó hay không. Cuối cùng, antiSMASH tổng hợp tất cả các thông tin và đưa ra báo cáo chi tiết về các vùng BGCs được phát hiện, bao gồm thông tin về con đường sinh tổng hợp, các enzyme liên quan và kết quả so sánh với cơ sở dữ liệu.

Khai thác bộ gen để dự đoán cụm gen mã hoá, sinh tổng hợp các sản phẩm tự nhiên bằng công cụ antiSMASH tạo nền tảng và trở thành một phương pháp quan trọng để khám phá sản phẩm tự nhiên mới từ vi sinh vật. Điều này góp một phần không nhỏ đối trong việc phát triển các loại thuốc mới như thuốc kháng sinh, thuốc

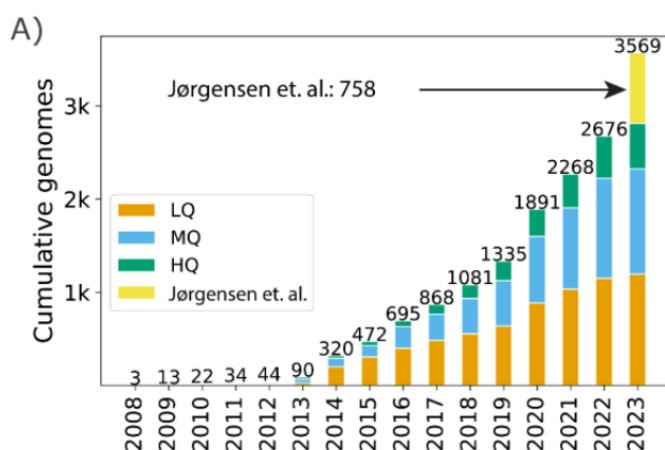
chống ung thư, thuốc có tác dụng làm giảm cholesterol, thuốc bảo vệ thực vật hoặc các chất bảo quản thực vật có nguồn gốc từ vi khuẩn, nấm tạo ra. Khai thác bộ gen tiếp tục là một kỹ thuật vô giá để đánh giá tiềm năng sinh tổng hợp của vi sinh vật trong tương lai.

1.4.3. Đặc điểm hệ gen xạ khuẩn thuộc chi *Streptomyces*

Những tiến bộ trong công nghệ gen trong những năm qua đã có tác động lớn đến lĩnh vực phát hiện, khám phá các sản phẩm tự nhiên NP. Một số nghiên cứu đã khẳng định mỗi chủng vi sinh vật có tiềm năng tạo ra nhiều hợp chất nếu sử dụng các điều kiện lên men tối ưu và kích hoạt được các nhóm gen sinh tổng hợp (BGCs) đang trong tình trạng im lặng [174]. Trong số các hợp chất tự nhiên đã biết, phần lớn các cơ chế sinh tổng hợp cũng như sự liên kết giữa hợp chất với nhóm gen sinh tổng hợp đều chưa được làm rõ. Vì vậy, việc hiểu rõ về nền tảng di truyền của quá trình tổng hợp các chất chuyển hóa thứ cấp sẽ tạo cơ sở cho các nhà khoa học tiếp tục phát hiện ra các hoạt chất sinh học mới [153].

Bộ gen xạ khuẩn đầu tiên được giải trình tự đầy đủ là của *Mycobacterium tuberculosis* [54], và bộ gen đầu tiên của xạ khuẩn có liên quan đến các sản phẩm tự nhiên là của chủng xạ khuẩn *Streptomyces coelicolor* [38], tiếp theo là *Streptomyces avermitilis* có ý nghĩa quan trọng ứng dụng trong công nghiệp [101]. Tất cả đều sử dụng kỹ thuật giải trình tự Sanger. Đồng thời, nghiên cứu của Bentley và cs cũng cho thấy sự có mặt của hơn 20 cụm gen sinh tổng hợp các hợp chất thứ cấp (smBGC) mà không được biết đến trong các nghiên cứu ở điều kiện phòng thí nghiệm. Những cụm gen này được gọi là “im lặng” và đại diện cho hơn 75% các sản phẩm tự nhiên NP tiềm năng được mã hóa bởi các gen này. Tiếp theo là các công bố trình tự hệ gen năm 2003 của *Streptomyces avermitilis* [101] và năm 2015 của *Saccharopolyspora erythraea* NRRL23338 [155] đã đưa ra cái nhìn sâu sắc hơn về tiềm năng sinh tổng hợp các hợp chất thứ cấp chưa được khai thác ngay cả những chủng xạ khuẩn được nghiên cứu kỹ lưỡng nhất trong phòng thí nghiệm. Trong những năm tiếp theo, việc giải trình tự hệ gen đã được tiến hành nhanh chóng hơn với chi phí giảm đáng kể do áp dụng các kỹ thuật được cải tiến và giải trình tự

bộ gen đã trở thành một kỹ thuật thông thường trong phòng thí nghiệm. Số lượng hệ gen xạ khuẩn *Streptomyces* được giải mã tăng theo các năm, hứa hẹn tạo ra cơ sở dữ liệu lớn để nghiên cứu xạ khuẩn.



Hình 1.13. Số lượng hệ gen xạ khuẩn được công bố trên NCBI RefSeq đến 6/2023 [144]

HQ: High-quality, MQ: medium-quality và LQ: low-quality

Năm 2013, nghiên cứu của Doroghazi và cs cho thấy mỗi bộ gen xạ khuẩn *Streptomyces* sở hữu 25–70 smBGC, nhiều hơn bất kỳ chi xạ khuẩn nào khác, nhưng chỉ một phần nhỏ trong số đó được tạo ra khi nuôi cấy trong phòng thí nghiệm [63]. Những công bố của Belknap (2020) dựa trên các cụm gen trung tâm, các cụm gen sinh tổng hợp các hợp chất thứ cấp (smBGC) được phân thành 5 nhóm chính: tổng hợp peptide không ribosome (NRPS), tổng hợp polyketide dạng 1 (type 3 polyketide synthase-T1PKS), lai của tổng hợp peptide không ribosome và tổng hợp polyketide (NRPS-PKS), terpen và peptide biến tính (RiPP) và siderophore chiếm tới 50% tổng số smBGC được dự đoán. Và ở mức độ thấp hơn là butyrolactone, polyketide dạng 2 (type 2 polyketide synthase, T2PKS) bacteriocin và polyketide dạng 3 (type 3 polyketide synthase, T3PKS). Các loại polyketide (PKS) và peptide synthetase không ribosome (NRPS) thường bao gồm các gen cực dài (> 5 kb) mã hóa các enzyme đa mô-đun với cấu trúc miền có tính lặp lại. Do đó, việc chú thích gen chính xác phải dựa trên trình tự bộ gen chất lượng cao để xác định chính xác các smBGC.

Xạ khuẩn *Streptomyces* có cấu trúc hệ gen mở và các smBGC dễ bị tác động từ điều kiện ngoại cảnh- đây là nguyên nhân tạo nên sự khác biệt của xạ khuẩn *Streptomyces* và các sản phẩm thứ cấp tạo ra so với các chi xạ khuẩn khác. Belknap và cs nghiên cứu và công bố một số chủng xạ khuẩn có số lượng smBGC cao nhất như *S. rhizosphaericus* NRRL B-24304 (n = 83 BGC), *Streptomyces* sp. NRRL B-1347 (n = 82 BGC), *Streptomyces* sp. PRh5 (n = 82 BGC), *S. milbemycinicus* NRRL 5739 (n = 81 BGC) và *Streptomyces* sp. NBS 14/10 (n = 79 BGC). Và một số chủng xạ khuẩn có số lượng smBGC thấp nhất là *S. gilvigriseus* MUSC26 (n = 8 BGCs), *S. thermoautotrophicus* H1 (n = 9 BGCs) và *S. thermoautotrophicus* UBT1 (n = 11 BGCs) [36]. Nghiên cứu của Qi và cs (2021) cho thấy, toàn bộ bộ gen của chủng xạ khuẩn SCA2-4T có chứa 51 cụm gen sinh tổng hợp giả định. Đặc biệt có 10 cụm gen tham gia vào quá trình sinh tổng hợp các chất kháng khuẩn. Ngoài ra, chủng này cũng thể hiện hoạt tính kháng nấm cao, chống lại các tác nhân gây bệnh nấm chuỗi như *Foc* 1, *C. fallax* và *C. lunata*. Đồng thời, dịch chiết chủng xạ khuẩn SCA2-4T có tác dụng phá hủy nghiêm trọng cấu trúc tế bào nấm *Foc* TR4, ức chế sự phát triển hệ sợi và sự nảy mầm của bào tử nấm [171].

Hiện nay, tại Việt Nam việc tìm kiếm các chủng xạ khuẩn bản địa có khả năng sinh tổng hợp các hợp chất thứ cấp đặc biệt là các chủng xạ khuẩn có tiềm năng ứng dụng trong nông nghiệp nói chung và kháng nấm gây bệnh thực vật nói riêng đang rất được quan tâm. Do vậy, việc phân lập, định danh và phân tích toàn bộ hệ gen của các chủng xạ khuẩn có nguồn gốc tại Việt Nam có ý nghĩa rất lớn, góp phần quan trọng vào việc phát triển các giải pháp sinh học bền vững và thân thiện với môi trường. Thông qua việc phát hiện và khai thác các đặc tính sinh học độc đáo của các chủng xạ khuẩn bản địa không chỉ giúp tăng năng suất cây trồng và kiểm soát bệnh dịch một cách tự nhiên mà còn góp phần cải thiện chất lượng đất trồng, giảm thiểu sự phụ thuộc vào hóa chất nông nghiệp. Từ đó, xây dựng một nền nông nghiệp an toàn, bền vững, và thích ứng hiệu quả với những thách thức của biến đổi khí hậu.

Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. VẬT LIỆU

2.1.1. Đối tượng nghiên cứu

- Bộ sưu tập 45 chủng xạ khuẩn được phân lập từ các vùng đất trồng chuối tại Việt Nam; các chủng nấm gây bệnh trên thực vật *Colletotrichum gloeosporioides* (VCM-1122), *Corynespora asiicola* (VCM-1163), *Fusarium solani* (VCM-1147), *Sclerotium rolfsii* (VCM-1098), *Diaporthe* sp (VCM-1056) đã được mã hóa thông tin ở cấp độ phân tử, khả năng gây bệnh, được cung cấp bởi Khoa Công nghệ Sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

- 160 mẫu chuối bị bệnh được thu thập từ các bộ phận: thân giả, củ, rễ, lá, quả của các cây chuối bị bệnh tại các tỉnh: Hà Nội, Vĩnh Phúc, Thái Bình, Hải Dương, Hưng Yên, Hải Phòng và Hà Tĩnh.

- Thời gian thu mẫu: Từ 01/2021-12/2022

- Giống chuối Cavendish sáu tuần tuổi, nuôi cấy mô, có chiều cao từ 7-10cm, có từ 3-5 lá thật. Chuối được tách bầu trồng vào chậu nhựa khoảng 1 tuần trước khi tiến hành thí nghiệm tái lây nhiễm.

- Loại đất được dùng để trồng chuối: đất sạch VINATAP.

2.1.2. Hóa chất và trang thiết bị

2.1.2.1. Hóa chất

Hóa chất được cung cấp và sử dụng tại Bộ môn Vi sinh vật học, Khoa Công nghệ Sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt nam (Phụ lục 1).

Các môi trường nuôi cấy vi sinh vật sử dụng trong nghiên cứu được liệt kê tại Phụ lục 2.

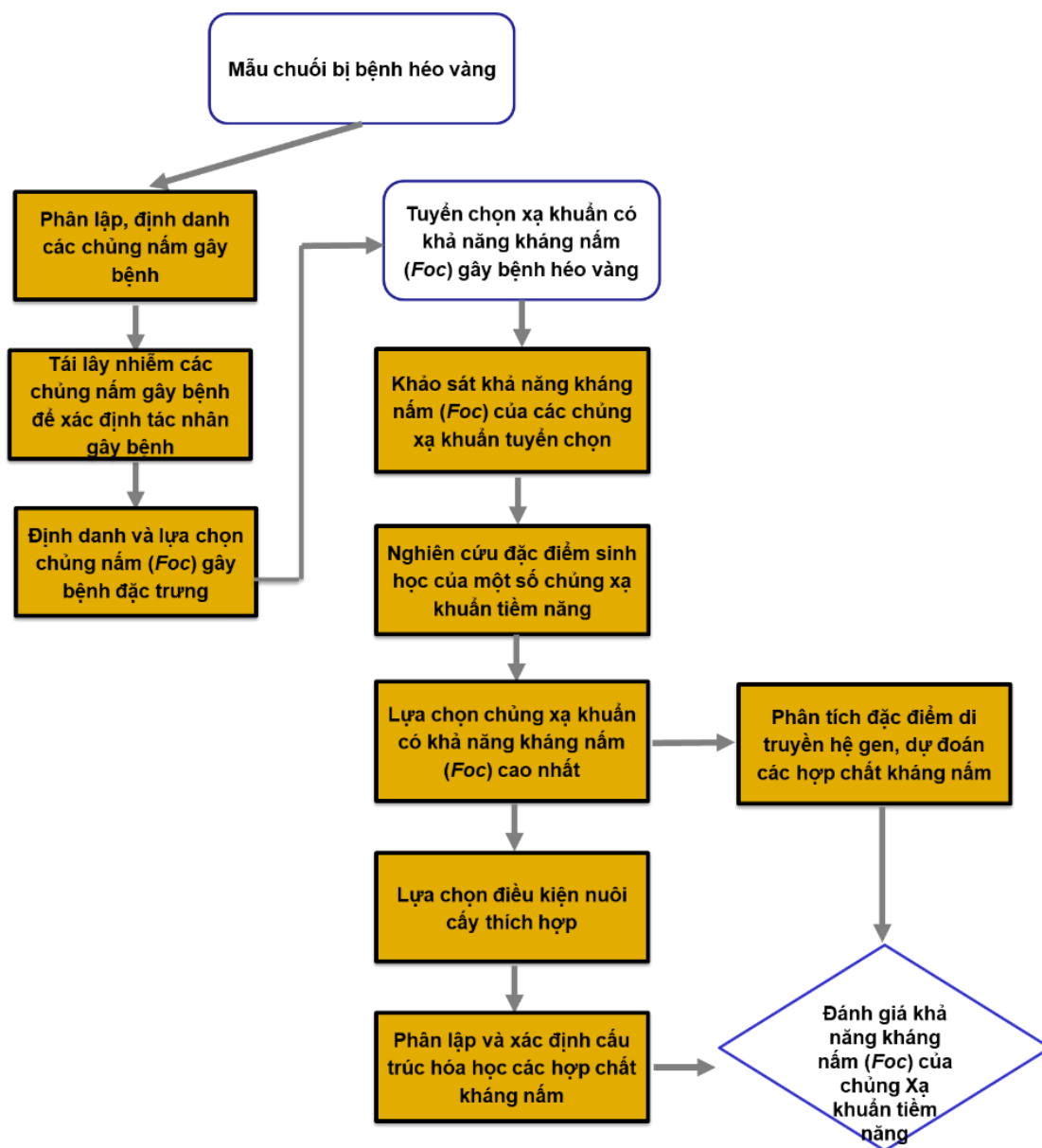
Các cặp môi được thiết kế hoặc tham khảo từ các công trình khác, được gửi đi tổng hợp bởi công ty IDT (Singapore) hoặc bởi Công ty Sinh hóa Phù Sa (Việt Nam). Các môi được pha bằng nước khử ion vô trùng đến nồng độ sử dụng là 10 pmol. Danh sách môi liệt kê tại Phụ lục 3.

2.1.2.2. *Trang thiết bị chính*

Nghiên cứu sử dụng các thiết bị chính trong luận án như: thiết bị giải trình tự 250 PE Miseq tại phòng thí nghiệm Chunlab, Inc (Seoul, Hàn Quốc), máy PCR (Eppendorf, Đức), bộ điện di (GES Wealtec, USA), máy cô mẫu SpeedVac (Thermo Fisher Scientific, Mỹ), tủ bảo quản mẫu (Kirsch, Germany), kính hiển vi điện tử quét SEM (Olympus CX33, Nhật Bản), tủ cấy vi sinh (Labconco, Mỹ), máy lắc ổn nhiệt (LabTech, Hàn Quốc), máy đo mật độ quang (HACH, Mỹ), máy đo pH (Schott, Đức), hệ thống sắc ký điều chế HPLC-DAD (Agilent Technologies, Mỹ), thiết bị đo phổ cộng hưởng từ hạt nhân (Bruker AM500 FT-NMR Spectrometer, Đức), thiết bị đo phổ khối lượng phân giải thường (Agilent 1100 series LC/MSD Trap SL, Mỹ), thiết bị đo phổ khối lượng phân giải cao (Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS, Mỹ), bể rung siêu âm (Daihan Scientific, Hàn Quốc), hệ thống cô quay chân không (Buchi R300, Thụy sỹ), hệ thống hứng mẫu tự động (EYELA fraction collector DC-1200, Nhật Bản), đèn tử ngoại 254 nm, Bản mỏng tráng sẵn silica gel DC-Alufolien 60 F₂₅₄ và RP-18 F₂₅₄ (Merck, Mỹ).

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Sơ đồ nghiên cứu



Hình 2.1. Sơ đồ nghiên cứu

2.2.2. Phương pháp lấy mẫu

Mẫu chuối bị bệnh được thu thập bằng cách dùng dao, kéo đã được khử trùng cắt một phần bộ phận có mang triệu chứng nghi ngờ bỏ vào túi ni lông sạch riêng rẽ. Các mẫu được đánh số thứ tự, ghi lại thông tin về triệu chứng, địa điểm và thời gian lấy mẫu.

2.2.3. Phương pháp phân lập, tuyển chọn, xác định đặc điểm sinh học của vi sinh vật

2.2.3.1. Phương pháp phân lập, tuyển chọn nấm bệnh

Nấm bệnh được phân lập từ phần bó mạch trong thân giả màu nâu trên môi trường PDA. Các mẫu được rửa sạch bằng nước cất vô trùng, cắt thành các đoạn nhỏ có kích thước 1×1 cm tính từ mép vết bệnh, khử trùng bề mặt bằng etanol 70% trong 20 giây, sau đó rửa sạch ba lần bằng nước cất vô trùng và đặt vào giữa các đĩa petri có chứa môi trường PDA đã bổ sung Streptomycin 0,16 mg/ml, ủ ở 30°C trong 1-3 ngày. Khuẩn lạc của các loại nấm khác nhau được quan sát thấy trên đĩa môi trường phân lập nhưng chỉ những khuẩn lạc tạo sắc tố màu hồng được chọn là đặc điểm điển hình của nấm *Fusarium oxysporum*. Các đặc điểm khuẩn lạc (hình dáng, sắc tố, microconidia, macroconidia, chlamydospores) được quan sát trên môi trường PDA nuôi ở 25°C trong 7-14 ngày. Màu sắc khuẩn lạc và hình thái các chủng nấm sau đó được so sánh với đặc điểm của *Fusarium* spp. được mô tả bởi Durán [64] và Leslie và Summerell [121]. Chỉ các chủng phân lập được xác định là *F. oxysporum* mới được chọn để mô tả thêm đặc tính. Các chủng nấm *Foc* giả định phân lập được bảo quản trong môi trường thạch nghiêng PDA ở 4°C và 30% glycerol ở -20°C.

2.2.3.2. Phương pháp tuyển chọn xạ khuẩn có khả năng kháng nấm gây bệnh héo vàng

Các chủng xạ khuẩn được nuôi trên môi trường ISP4 ở 30°C, sau 72 giờ đục những thỏi thạch có đường kính $d=9$ mm đặt lên trên các đĩa đã được cấy trải 50 μ l dịch bào tử (10^6 bào tử/ml) các chủng nấm *Foc* TR4. Các đĩa petri sau khi đặt thỏi thạch được nuôi ở 25°C trong thời gian 5-7 ngày và đo đường kính vòng kháng nấm được hình thành. Lựa chọn các chủng xạ khuẩn có khả năng hình thành hoạt tính đối kháng nấm *Foc* TR4 cao nhất.

2.2.3.3. Phương pháp xác định đặc điểm hình thái xạ khuẩn.

- Đặc điểm hình thái khuẩn lạc: Các chủng xạ khuẩn tuyển chọn được nuôi cấy trên 6 môi trường ISP khác nhau: ISP1; ISP2; ISP3; ISP4; ISP5; ISP6; và

Gause, sau 7-14 ngày ở 30 °C [180]. Tiến hành đánh giá các đặc điểm hình thái khuẩn lạc trên các đĩa thí nghiệm.

- *Màu sắc khuẩn ty khí sinh, khuẩn ty cơ chất, sự hình thành sắc tố tan*: được xác định bằng cách so sánh với biểu đồ màu ISCC-NBS [106]

- *Sự hình thành sắc tố melanin*: được xác định trên môi trường ISP6 ở 30°C trong ít nhất 21 ngày, nếu chủng sinh ra melanin thì màu của môi trường sẽ chuyển từ vàng nhạt sang nâu, đen (theo chương trình phân loại xạ khuẩn quốc tế (ISP)) [92].

- *Khả năng sử dụng nguồn đường*: được đánh giá trên môi trường ISP9 có bổ sung các loại đường (L-arabinose, Sucrose, D-xylose, I-inositol, D-manitol) với nồng độ 1% theo khối lượng, đối chứng âm (môi trường ISP9 không có nguồn cacbon), đối chứng dương (đường D-Glucose 1%). Sau 10-16 ngày nuôi cấy ở 30°C, đánh giá sự phát triển của các chủng xạ khuẩn tuyển chọn.

- *Đặc điểm chuỗi bào tử, bào tử* : Các chủng xạ khuẩn tuyển chọn được cấy trên môi trường Gause I sau đó găm các phiến kính (lamen) vào thạch với góc nghiêng 45° so với bề mặt thạch đã được cấy xạ khuẩn. Sau 3 ngày nuôi cấy ở 30°C, rút các phiến kính có khuẩn ty khí sinh của xạ khuẩn và quan sát hình thái chuỗi sinh bào tử dưới kính hiển vi quang học. Hình thái và bề mặt bào tử xạ khuẩn được quan sát dưới kính hiển vi điện tử quét (SEM).

2.2.3.4. Phương pháp nghiên cứu đặc điểm sinh học của xạ khuẩn

- *Xác định khả năng sinh enzyme ngoại bào bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch* [2]

Các chủng xạ khuẩn được nuôi trên môi trường môi trường ISP2 với các điều kiện: nuôi lắc 180 vòng/phút ở 30°C, thời gian 7 ngày. Tiến hành thu dịch lên men, ly tâm 10.000 vòng/phút ở 4°C. Hút 100µl dịch li tâm nhỏ vào giếng trên đĩa thạch chứa cơ chất Chitin, CMC, xylan, tinh bột, casein và pectin, giữ ở 4°C trong 1 giờ. Sau đó, chuyển sang tủ nuôi cấy ở 30°C trong khoảng 18-24 tiếng. Khả năng sinh tổng hợp enzyme tương ứng: chitinase, cellulase, xylanase, amylase, protease và

pectinase của các chủng xạ khuẩn nghiên cứu được xác định dựa theo đường kính vòng phân giải cơ chất.

Hoạt tính enzyme ngoại bào được xác định bằng công thức:

$$HT = D-d$$

Trong đó: D - đường kính vòng phân giải (mm)

d - đường kính lỗ thạch (mm)

- *Xác định khả năng sinh chất kích thích sinh trưởng IAA [80]*

Hàm lượng IAA sinh ra được xác định bằng phương pháp so màu sử dụng thuốc thử Salkowski (300 ml H₂SO₄ 98%, 15 ml FeCl₃ 0,5M) [80]. Các chủng xạ khuẩn được nuôi trong môi trường ISP2 có bổ sung 0.2 % tryptophan, nuôi lắc 200 vòng/phút ở 30°C trong 5-7 ngày, dịch xạ khuẩn được ly tâm và thu được dịch trong. 1ml dịch trong được bổ sung thêm 2ml thuốc thử Salkowski, lắc đều, để trong bóng tối trong 20 phút ở nhiệt độ phòng. Dung dịch được so màu ở bước sóng 530nm. Đường chuẩn được dựng với các mẫu có nồng độ IAA chuẩn khác nhau, có dạng: $y = 0,018x + 0,061$ ($R^2 = 0,996$)

- *Xác định khả năng sinh siderophore [129]*

Đặt khối thạch (đường kính 5 mm) có chứa khuẩn lạc của chủng xạ khuẩn nghiên cứu lên trên môi trường thạch CAS (Chrome Azurol Sulphonate). Sau 14 ngày nuôi cấy ở 30°C xác định khả năng sinh siderophore bằng kích thước vòng sáng quanh khuẩn lạc và sự chuyển màu môi trường từ màu xanh lam sang màu cam do phức hợp CAS-Fe³⁺ bị phá vỡ.

Khả năng sinh siderophore được xác định bằng công thức:

$$ĐK = D-d$$

Trong đó, D: đường kính vòng sáng quanh khuẩn lạc (mm)

d: đường khuẩn lạc xạ khuẩn (mm)

- *Phương pháp định lượng chitinase và β -1-3 glucanase [168]*

Cây khối thạch đã được cấy chủng xạ khuẩn thí nghiệm (đường kính 5mm) vào 100 mL môi trường Gause I lỏng với các điều kiện: tốc độ lắc 200 vòng/phút, ở 30°C trong 7 ngày. Dịch nuôi cấy chủng xạ khuẩn VNUA116 được ly tâm ở 2000

vòng/phút trong 20 phút. Hoạt tính của chitinase và β -1,3-glucanase được xác định bằng bộ kit Chitinase Activity Assay Kit (Sigma- Mỹ) và bộ kit β -1,3-glucanase ELISA của vi sinh vật (Sigma- Mỹ). Hàm lượng enzyme chitinase tạo thành chính là lượng chitin chuyển hóa 1 μ g N-acetylglucosamine trên mỗi ml dịch nuôi cấy/phút ở 37°C. Hàm lượng β -1,3-glucanase tạo thành chính là lượng enzyme chuyển hóa 1 μ mol cơ chất thành sản phẩm trên mỗi ml dịch nuôi cấy/phút ở 37°C. Tất cả các thí nghiệm đều được lặp lại 3 lần.

2.2.4. Phương pháp tái lây nhiễm nấm gây bệnh nhân tạo trong phòng thí nghiệm trên cây chuối

2.2.4.1. Tái lây nhiễm nấm gây bệnh trên cây chuối

Tái lây nhiễm nấm trên cây chuối được tiến hành như mô tả bởi Li và cs (2013) có cải tiến [122]. Sử dụng các cây chuối nuôi cấy in vitro giống Cavendish 6 tuần tuổi để đánh giá tính gây bệnh của các chủng nấm *Foc*. Các cây chuối này có đủ các điều kiện: đồng nhất, khỏe mạnh và đã được trồng thích nghi (1 tháng ngoài vườn ươm) trước khi tiến hành thí nghiệm.

Thân và rễ của các cây chuối thí nghiệm được làm tổn thương nhẹ bằng kim đã khử trùng được ngâm trong hỗn dịch bào tử nấm *Foc* gây bệnh có chứa 5×10^6 bào tử/ml của mỗi chủng trong 2 giờ trước khi trồng vào các chậu. Sau khi ngâm, phần còn lại của dịch bào tử được tưới đều lên các cây trồng trong chậu. Rễ cây đôi chúng được nhúng trong nước cất vô trùng. Toàn bộ cây thí nghiệm, cây đối chứng sau khi lây nhiễm được trồng trong chậu nhựa và được tưới nước, chăm sóc thường xuyên. Mỗi thí nghiệm sử dụng 30 cây chuối trồng trong 30 chậu nhựa (mỗi cây trong một chậu chứa 0,5 kg đất đã tiệt trùng) và lặp lại 3 lần độc lập.

Các triệu chứng bệnh được ghi nhận sau 1,2 và 3 tháng thí nghiệm lây nhiễm bằng cách quan sát hiện tượng lá vàng theo các thang bệnh. Các mẫu nấm sau đó được tái phân lập từ các cây bị nhiễm; các mẫu nấm này sẽ được so sánh với các mẫu nấm gốc sử dụng trước khi gây nhiễm để chứng minh các định luật của Koch.

$$\text{Tỷ lệ cây nhiễm bệnh (\%)} = \frac{\text{Số cây bị bệnh}}{\text{Số cây thí nghiệm}} \times 100\%$$

Mức độ gây bệnh theo Moore và cs 1993 [147] như sau:

Mức độ gây bệnh	Triệu chứng của cây
1	Không có triệu chứng
2	Vàng ban đầu chủ yếu ở lá dưới
3	Vàng tất cả các lá dưới với một số lá non bị đổi màu
4	Tất cả các lá đều vàng đậm
5	Cây chết

2.2.4.2. Tái lây nhiễm nấm gây bệnh trên lá chuối

Thí nghiệm tái lây nhiễm nhân tạo trên lá chuối được thực hiện theo quy trình của Udompongsuk và Soyong (2016) [197]. Bề mặt của lá chuối khỏe mạnh được tiệt trùng bằng ethanol 70% trong 15 giây, sau đó cắt thành các mảnh có kích thước 5×5 cm và đặt mặt lá hướng lên trên trong các đĩa Petri vô trùng. Các đĩa này chứa giấy lọc được làm ẩm bằng nước cất để duy trì độ ẩm cao. Rạch 1 vết thương ở giữa mảnh lá khỏe mạnh để dễ dàng nhiễm nấm lên mẫu lá chuối. Đặt các khối thạch có chứa sợi nấm của mỗi chủng (đường kính 5 mm) từ các đĩa nuôi cấy nấm *Foc* sau 7 ngày vào các vết thương trên các mảnh lá. Mẫu đối chứng chỉ làm tổn thương lá mà không được cấy nấm bệnh. Các đĩa Petri được ủ ở nhiệt độ phòng trong 5 ngày, với mỗi thí nghiệm được lặp lại ba lần.

2.2.5. Phương pháp định danh vi sinh vật

2.2.5.1. Định danh nấm gây bệnh

- Phương pháp tách DNA từ hệ sợi nấm

Sử dụng que cấy vô trùng lấy sợi nấm của chủng *Foc* được thu từ các khuẩn lạc riêng rẽ sau 7 ngày nuôi cấy ở 25 °C cho vào các ống Eppendorf 2ml. Sau đó, thêm 1ml dung dịch đệm CTAB và ủ ở 65°C trong 1 giờ, lắc 10 phút/ lần. Thêm dung dịch phenol-chloroform-isoamyl (PCI) với tỷ lệ 1:1, trộn đều, sau đó ly tâm 13.700 vòng/phút ở 4°C trong 10 phút để thu dịch. Chuyển phần dịch nổi vào các ống Eppendorf 2ml đã tiệt trùng và bổ sung dung dịch Chloroform: Isoamylalcohol (tỷ lệ 1:1), trộn đều bằng vortex, ly tâm ở 13.700 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C. Phần dịch nổi tiếp tục được chuyển vào ống Eppendorf 1.5ml mới, bổ sung ethanol 100%

với tỷ lệ 2:1. Sau khi đảo nhẹ, hỗn hợp tiếp tục được ly tâm 10.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C để thu được phần tủa DNA. Phần tủa DNA được rửa bằng 500µl dung dịch ethanol lạnh 70% và huyền phù trong 50µl dung dịch đệm TE. Nồng độ mẫu DNA được xác định bằng máy quang phổ nanodrop và điện di gel. Dung dịch DNA sau đó được lưu trữ ở -20°C.

- *Phương pháp PCR và giải trình tự gen*

Các đoạn DNA được PCR từ DNA tổng số thực hiện trên máy chu kỳ nhiệt ASTEC Gen Atlas (Nhật Bản) với tổng thể tích 30 µl. Thành phần phản ứng PCR khuếch đại các đoạn gen phục vụ cho việc giải trình tự:

2xPCR Master Mix	: 15 µl
Mồi xuôi (10 pmol/µl)	: 1,5 µl
Mồi ngược (10 pmol/µl)	: 1,5 µl
Khuôn DNA (50 ng/µl)	: 4,5 µl
Nước khử ion vô trùng	: 7,5 µl
Tổng thể tích	: 30 µl

Sử dụng các mồi ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')/ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') theo Kumar và cs, 2013 để xác định các chủng nấm *Fusarium* [113].

Chu trình nhiệt như sau: 94°C (5 phút); 30 chu kỳ của 94°C (30 giây), 53°C (40 giây), 72°C (1 phút); 72°C (7 phút). Các sản phẩm PCR được phân đoạn và quan sát bằng điện di gel agarose 1% (w/v) và được giải trình tự bởi công ty 1st BASE (Singapore). Các chuỗi được căn chỉnh và kiểm tra bằng công cụ BLAST của Trung tâm Quốc gia (NCBI) trên trang web NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Sự tương đồng của các chuỗi gen mã hóa vùng ITS của các chủng nấm được so sánh bằng công cụ tìm kiếm (BLAST) từ (NCBI; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Phần mềm Mega 11 phiên bản 11.0.13 được sử dụng để xây dựng cây phát sinh loài, phương pháp Maximum Likelihood Tree được chọn để thiết lập tập hợp các

bootstrap có độ tin cậy với 1.000 lần lặp lại và các thiết lập khác được giữ ở mặc định.

Bảng 2.1. Các cặp mồi đặc trưng được sử dụng trong nghiên cứu

Tên mồi	Trình tự (5'→3')	Kích thước SP (bp)	Đặc trưng	TLTK
ITS1/ITS4	TCCGTAGGTGAACCTGCGG/ TCCTCCGCTTATTGATATGC	550	<i>Fusarium</i>	Kumar và cs (2013) [113]
Foc-1/Foc-2	CAGGGGATGTATGAGGAGGCT/ GTGACAGCGTCGTCTAGTTCC	242	<i>Foc</i>	Lin và cs (2009) [128]
FocTR-F/FocTR-R	CACGTTTAAGGTGCCATGAGAG/ CGCACGCCAGGACTGCCTCGTGA	463	TR4	Dita và cs (2010) [61]

Các chủng *Fusarium* được xác nhận là *Foc* TR4 bằng cách sử dụng các mồi đặc trưng (Bảng 2.1) *Foc*-1, *Foc*TR4-F và *Foc*TR4-R theo Dita và cs, 2010 [61]. Các điều kiện khuếch đại PCR được thực hiện theo mô tả của Li và cs năm 2011 [123]. Các sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarose 1,5%.

2.2.5.2. Định danh xạ khuẩn

- Phương pháp tách DNA của xạ khuẩn

Chủng xạ khuẩn nghiên cứu được nuôi trong môi trường Gause-I lỏng với các điều kiện nhiệt độ 30°C, tốc độ lắc 200 vòng/phút trong 7 ngày. Ly tâm dịch lên men và rửa 2 lần bằng nước vô trùng sau đó thu tủa. DNA hệ gen được tách chiết theo quy trình được mô tả bởi Masoomi-Aladizgeh và cs năm 2016 có cải tiến. Bổ sung 20 µl lysozyme, ủ ở nhiệt độ phòng trong vòng 5 phút. Bổ sung 600 µl đệm chiết GX và tiến hành các bước tách DNA tương tự như ở nấm.

- Phương pháp PCR và giải trình tự gen xạ khuẩn

Các đoạn DNA được PCR từ DNA tổng số sử dụng enzyme Phusion® high-fidelity DNA polymerase của hãng Thermo Scientific. Thành phần phản ứng PCR khuếch đại các đoạn gen phục vụ cho việc giải trình tự:

5X HF buffer	: 5 μ l
dNTPs (10 mM)	: 1 μ l
Mồi xuôi (10 pmol/ μ l)	: 1 μ l
Mồi ngược (10 pmol/ μ l)	: 1 μ l
Phusion polymerase (2 U/ μ l)	: 1 μ l
Khuôn DNA (50 ng/ μ l)	: 1 μ l
Nước khử ion vô trùng	: 15 μ l
Tổng thể tích	: 25 μl

Sử dụng các mồi 27F (5'-GAGTTTGATCCTGGCTAAG-3') và 1492R (5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGGC-3') [209].

Chu trình nhiệt như sau: 94°C (6 phút); 35 chu kỳ của 94°C (30 giây), 58°C (30 giây), 72°C (40 giây - 1 phút 30 giây); 72°C (10 phút). Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên gel agarose 1% và được giải trình tự bởi Công ty 1st BASE (Singapore). Mức độ tương đồng về trình tự gen mã hóa vùng 16S rRNA của chủng xạ khuẩn tuyển chọn được so sánh với các chủng đã công bố trên Genbank bằng công cụ tra cứu Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Trình tự các chủng loại có liên quan chặt chẽ được lấy từ cơ sở dữ liệu GenBank được căn chỉnh bằng phần mềm BioEdit 7.2.5. Cây phát sinh gen được xây dựng bằng phương pháp khả năng tối đa sử dụng MEGA-X phiên bản 10.1.8 với các phân tích bootstrap dựa trên 1000 lần lặp lại bằng cách lấy mẫu lại.

2.2.6. Phương pháp đánh giá mức độ an toàn của các chủng xạ khuẩn tuyển chọn

Đánh giá theo Hướng dẫn số 2000/54/EC của Cộng đồng Châu Âu về an toàn sinh học bằng cách tra cứu theo danh mục các tác nhân sinh học. Nhóm tác nhân sinh học vi sinh vật được phân làm 4 cấp độ an toàn.

- Cấp độ 1 (Group 1) là các vi sinh vật không có thể gây bất cứ một nguy hiểm nào đối với người và động vật

- Cấp độ 2 (Group 2) là các vi sinh vật có thể gây bệnh đối với người, động vật ở mức độ thấp, không có khả năng lan truyền và có thể phòng, chống và loại trừ dễ dàng trong điều kiện bình thường.

- Cấp độ 3 (Group 3) là các vi sinh vật có nguy cơ gây bệnh nặng đối với người, động vật và có khả năng lan truyền rộng, song vẫn có thể phòng chống và loại trừ được.

- Cấp độ 4 (Group 4) là các vi sinh vật có thể gây bệnh nặng đối với người, động vật, có nguy cơ lớn về mức độ lan truyền rộng và không thể phòng, chống hoặc loại trừ.

2.2.7. Các phương pháp trong giải trình tự hệ gen xạ khuẩn

2.2.7.1 Tạo thư viện và giải trình tự

+ Chuẩn bị thư viện cho giải trình tự với nền tảng DNBSEQ

DNA được kiểm tra để xác định sự nguyên vẹn, nồng độ và độ tinh khiết đạt tiêu chuẩn. Nồng độ DNA được phát hiện bằng fluorometer hoặc Microplate Reader (Qubit Fluorometer, Invitrogen). Tính toàn vẹn và độ tinh khiết của mẫu được phát hiện bằng điện di trên gel agarose 1%, điện áp 150V, thời gian điện di 40 phút. Sau khi điện di để chọn các đoạn DNA có kích thước khoảng 200-400 bp để chuẩn bị giải trình tự. Các đoạn DNA sau đó được adenyl hóa 3' (gắn nu A). Các adapter sau đó được nối vào các đầu của các đoạn DNA đã gắn với nu A ở phía 3'. Trình tự adapter sẽ sử dụng để khuếch đại các đoạn DNA bởi phản ứng PCR. Sản phẩm PCR sau khi được tinh sạch sẽ được biến tính bằng nhiệt và tạo vòng. Tập hợp các DNA sợi đơn khép vòng (ssCir DNA) được kiểm định chất lượng được gọi là thư viện. Thư viện được kiểm tra lần cuối về kích cỡ và độ phân mảnh với Bioanalyzer 2100 trước khi đưa lên SMRT Cell (PacBio). Các thư viện đủ tiêu chuẩn sẽ được giải trình tự bởi nền tảng DNBSEQ (xử lý dữ liệu thô (lọc, cắt bỏ đoạn đọc kém chất lượng)).

2.2.7.2 Chuẩn bị thư viện cho giải trình tự với nền tảng PacBio

Trên nền tảng PacBio, các đoạn DNA trước tiên được xử lý bằng Covaris g-TUBE để đạt kích thước thích hợp (khoảng 10–15 kb), sau đó các đầu đoạn được nối lại để tạo thành cấu trúc hình chuông bằng cách sử dụng Bộ chuẩn bị mẫu

SMRTbell v.1.0 (Pacific Bioscience) để sửa chữa các hỏng hóc từ quá trình phân mảnh và sửa hai đầu 5', 3' trước khi gắn với adapter của PacBio. Sử dụng enzyme Exo III và Exo VII để loại bỏ các sản phẩm không gắn adapter. Thư viện được làm sạch bằng hạt từ Ampure PB (Beckman Coulter) và được kiểm tra độ dài, nồng độ bằng Bioanalyzer 2100. Thư viện được làm sạch và chọn kích thước bằng Blue Pippin (SageScience) với nồng độ gel 0,75% để lọc ra các đoạn DNA thư viện có độ dài từ 20kb trở lên. Thư viện được kiểm tra lần cuối về kích cỡ và độ phân mảnh với Bioanalyzer 2100 trước khi đưa lên SMRT Cell (PacBio). Các trình tự Polymerase được sử dụng để lắp ráp, so sánh bao gồm adapter và các trình tự DNA (Subreads). Các trình tự có độ dài ngắn hơn 1000 bp sẽ bị loại bỏ. Các thư viện đủ tiêu chuẩn sẽ được giải trình tự bởi nền tảng PacBio (xử lý dữ liệu thô (lọc, cắt bỏ đoạn đọc kém chất lượng)).

2.2.7.3 Lắp ráp hệ gen

Các trình tự (read) được xử lý bởi nhiều phần mềm khác nhau và tuân theo 4 bước

Bước 1. Sửa các trình tự subreads: Sử dụng phần mềm (Canu, Falcon) để sửa lỗi giải trình tự trong các Subreads. Canu v1.5 (estn = 24, npruseGrid = 0, corOvlMemory = 4) (<https://github.com/marbl/canu/releases>) [112].

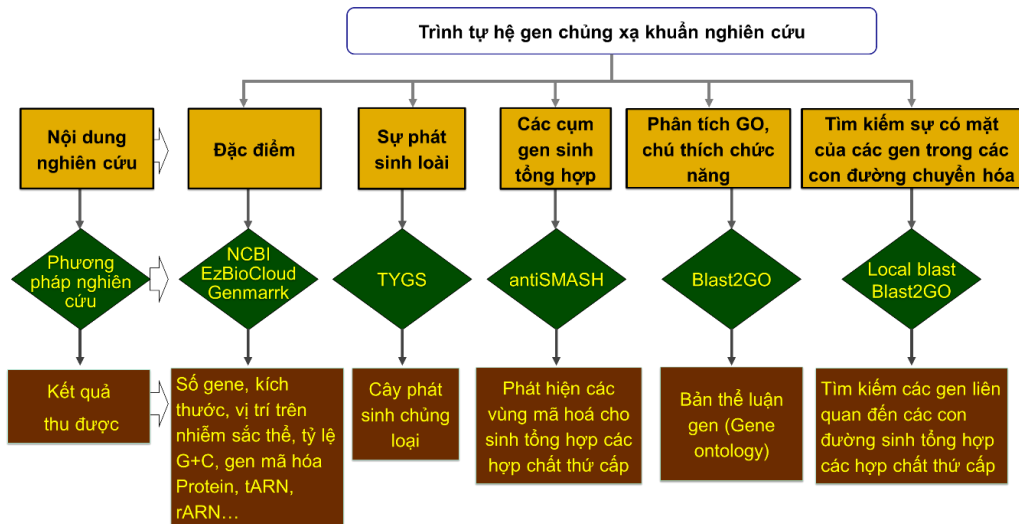
Bước 2. Lắp ráp các đoạn đọc chính xác: Lắp ráp trình tự từ các subreads đã được chỉnh sửa lỗi bằng các phần mềm Canu và Falcon, từ đó chọn kết quả lắp ráp tốt nhất [112].

Bước 3. Sửa lỗi giải trình tự đối với lỗi chỉ ở một nucleotide: Sửa lỗi một nucleotide trong kết quả lắp ráp với phần mềm GATK v1.6-13 (-cluster 2 -window 5 -stand_call_conf 50 -stand_emit_conf 10.0 -dcov 200 MQ0> = 4) (<https://www.broadinstitute.org/gatk/>) [137].

Bước 4. Lắp ráp, hình thành bộ nhiễm sắc thể khép vòng: Sử dụng phần mềm Circlator v1.5.5 để đánh giá hình dạng của trình tự lắp ráp (có dạng vòng hay không) [99].

2.2.8. Phân tích hệ gen của chủng xạ khuẩn tuyển chọn

2.2.8.1 Sơ đồ phân tích hệ gen xạ khuẩn



Hình 2.2. Sơ đồ quy trình phân tích hệ gen xạ khuẩn

2.2.8.2 Các phương pháp phân tích hệ gen xạ khuẩn.

- Dự đoán gen

Các công cụ dự đoán gen thực hiện theo nguyên tắc: (1) Dựa trên một tập hợp các gen được xác định ban đầu trong cơ sở dữ liệu đã được mã hóa để huấn luyện mô hình đặc thù cho từng loài, dự đoán các vùng mã hóa; (2) Cải thiện các dự đoán bằng cách tinh chỉnh tham số qua các vòng lặp thông qua các thuật toán heuristic và (3) Sử dụng BLAST hoặc các cơ sở dữ liệu khác để xác nhận các gen dự đoán bằng cách so sánh với các trình tự đã biết thông qua việc tìm kiếm các trình tự tương đồng.

Sử dụng 02 công cụ dự đoán vị trí của gen trên hệ genome chủng xạ khuẩn với tham số mặc định. Từ đó chọn ra tập gen chung nhất với mức độ tương đồng $\geq 90\%$ làm gen dự đoán cuối cùng là kết quả thu được từ hai phần mềm GenMark và Glimmer.

+) Công cụ dự đoán trực tuyến GenMarkS-2
http://exon.gatech.edu/GenMark/heuristic_gmhmp.cgi.

+) Phần mềm dự đoán gen Glimmer
<http://ccb.jhu.edu/software/glimmer/glimmer302b.tar.gz>.

- *Chú thích bộ gen*

Hệ gen xạ khuẩn VNUA116 được chú thích bằng công cụ Blast2GO. Blast2GO đã được coi là công cụ được sử dụng rộng rãi nhất tích hợp nhiều tính năng khác nhau, bao gồm phân tích làm giàu bộ gen, hiển thị, quản lý và phân tích thống kê dữ liệu chú thích. Ứng dụng này giúp cung cấp InterPro, mã enzyme, các con đường sinh tổng hợp KEGG, mô hình hóa dựa trên GO (direct acyclic graphs - DAGs) và GOSlim [83]

- *Phân tích cụm gen mã hóa*

Hệ gen xạ khuẩn VNUA116 được phân tích các cụm gen sinh tổng hợp bằng công cụ AntiSMASH 7.1.0 (Antibiotics & Secondary Metabolite Analysis Shell) (<https://antismash.secondarymetabolites.org/#!/start>). AntiSMASH là công cụ được sử dụng phổ biến nhất sử dụng dữ liệu đầu vào trên GenBank để xác định và phân tích các cụm gen sinh tổng hợp (smBGC) trong hệ gen của vi khuẩn, xạ khuẩn và nấm, do đó tạo điều kiện khai thác bộ gen nhanh chóng của nhiều loại vi khuẩn, xạ khuẩn và nấm. AntiSMASH kết hợp thuật toán dự đoán cụm gen CLUSEAN (CLUSTER SEQUENCE ANALYZER), chú thích gen (thông qua BLAST), xác định miền protein (thông qua HMMER so với Pfam) và dựa trên các vùng bảo thủ của các enzyme NRPS/PKS, cũng như dự đoán tính đặc hiệu của cơ chất đối với các miền NRPS 'A' (thông qua NRSPREDICTOR). AntiSMASH dùng trình tự protein tham chiếu để phân tích lần lượt các khung đọc mở dựa theo công cụ BLASTp (giá trị e-off-off = $1e-5$). Các trình tự axit amin được giống với thông số mặc định. Các gen đã dự đoán được chú thích với kết quả mô tả chất lượng tốt nhất (với tỷ lệ % chiều dài giống cao nhất và độ tương đồng cao nhất). Tất cả các gen đã chú giải sau đó được phân loại dựa trên các lớp COG của chúng.

- *Tìm kiếm con đường liên quan đến sinh tổng hợp các hợp chất kháng nấm*

Dựa trên cơ sở dữ liệu Kegg pathway về các con đường sinh tổng hợp các hoạt chất kháng nấm như Siderophore trên cơ sở dữ liệu: Biosynthesis of siderophore group nonribosomal peptides-Reference pathway (<https://www.kegg.jp/entry/map01053>). Tiến hành lấy các trình tự mã hoá cho các

enzyme trong pathway được cung cấp bởi cơ sở dữ liệu Kegg pathway, so sánh trình tự các gen có trong hệ genome của chủng VNUA16 với các trình tự mã hóa các enzyme tìm kiếm được.

2.2.9. Nghiên cứu các điều kiện lên men nhằm tăng khả năng kháng nấm *Foc* TR4 của chủng xạ khuẩn tuyển chọn

2.2.9.1 Lựa chọn môi trường lên men thích hợp

Chủng xạ khuẩn tuyển chọn được tiến hành lên men trên 15 môi trường (Gause I, Gause II, ISP1, ISP2, ISP3, ISP4, ISP5, ISP6, Emerson, Casein, A-4, YIM 61, YIM 301, YIM 308 và YIM 310) ở 30°C, tốc độ lắc 200 vòng/phút. Khả năng kháng nấm *Foc* TR4 được đánh giá từ ngày thứ 5 bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch cho đến khi kết thúc thí nghiệm [60]. Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần với mỗi công thức. Chọn môi trường thích hợp cho khả năng kháng nấm cao nhất.

2.2.9.2 Ảnh hưởng của nguồn carbon và nồng độ carbon

Chủng xạ khuẩn tuyển chọn được nuôi cấy trên môi trường đã chọn từ thí nghiệm trước với các nguồn carbon được thay thế là CB1 [(tinh bột tan 24 g/l): D-glucose (1 g/l)], D-glucose, D-mannitol, D-Sorbitol, D-xylose và xellulose, các thành phần khác trong môi trường không thay đổi. Lên men ở 30°C, tốc độ lắc 200 vòng/phút. Khả năng kháng nấm *Foc* TR4 được đánh giá bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch cho đến khi kết thúc thí nghiệm [60]. Mỗi công thức thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Lựa chọn nguồn carbon cho vòng kháng nấm cao nhất.

Tiến hành thay đổi hàm lượng carbon trong môi trường, các thành phần khác không thay đổi. Mỗi công thức thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Lựa chọn hàm lượng carbon cho vòng kháng nấm cao nhất.

2.2.9.3 Ảnh hưởng của nguồn nitơ

Chủng xạ khuẩn tuyển chọn được nuôi cấy trên môi trường có nguồn carbon và hàm lượng carbon đã được lựa chọn từ thí nghiệm trước với các nguồn nitơ được thay thế là N1 [(cao thịt bò (3 g/l): cao nấm men (5 g/l): pepton (3 g/l)], cao nấm men, cao thịt bò, bột đậu tương, pepton và KNO₃ với hàm lượng tương đương với

nguồn nitơ ban đầu trong môi trường cơ sở, các thành phần khác không thay đổi. Lên men ở 30°C, tốc độ lắc 200 vòng/phút. Khả năng kháng nấm *Foc* TR4 được đánh giá bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch cho đến khi kết thúc thí nghiệm [60]. Mỗi công thức thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Lựa chọn nguồn nitơ cho vòng kháng nấm cao nhất.

2.2.9.4 Ảnh hưởng của pH và nhiệt độ

Tiến hành thay đổi pH môi trường từ 5, 6, 7, 8, 9 đến 10 ở 30°C, tốc độ lắc 200 vòng/phút và nhiệt độ nuôi cấy 25, 30 và 35°C, tốc độ lắc 200 vòng/phút. Khả năng kháng nấm *Foc* TR4 được đánh giá bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch cho đến khi kết thúc thí nghiệm [60]. Mỗi công thức thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Lựa chọn được pH và nhiệt độ cho vòng kháng nấm cao nhất.

2.2.10. Phương pháp xác định khả năng đối kháng nấm gây bệnh thực vật của xạ khuẩn.

2.2.10.1 Phương pháp đồng nuôi cấy chấm 1 điểm [60]

Lấy một vòng que cấy chủng xạ khuẩn nghiên cứu cấy chấm điểm hoặc đặt miếng thạch (kích thước 5 mm) chứa xạ khuẩn lên đĩa petri chứa môi trường PDA, cách mép đĩa 20 mm. Sau đó, lấy một vòng que cấy chứa nấm kiểm định hoặc miếng thạch đã được cấy nấm bệnh (đường kính 5mm) cấy ở vị trí đối diện, song song với chủng xạ khuẩn nghiên cứu, cách mép đĩa 20 mm. Đĩa đối chứng, thực hiện cấy một lượng nấm kiểm định tương tự vào giữa trung tâm đĩa petri có chứa môi trường PDA (Dhanasekaran & cs, 2012) [60]. Các đĩa thí nghiệm và đối chứng được nuôi trong tủ ẩm ở nhiệt độ 30°C trong 7 ngày. Đo bán kính tản nấm hình thành. Hiệu lực ức chế (Percent inhibition of radical growth) (PIRG) được xác định theo công thức:

$$\text{PIRG (\%)} = \frac{R1 - R2}{R1} \times 100\%$$

Trong đó: R1 - bán kính tản nấm trên đĩa đối chứng

R2 - bán kính tản nấm ở phần tiếp giáp với xạ khuẩn trên đĩa thí nghiệm.

2.2.10.2 Phương pháp đồng nuôi cấy cấy chắm 4 điểm [60]

Đặt khối thạch đã được cấy nấm bệnh (đường kính 5mm) ở trung tâm đĩa chứa môi trường PDA. Chủng xạ khuẩn tuyển chọn được cấy ở 4 góc đối xứng bao quanh khối thạch chứa nấm bệnh cách tâm đĩa 3 cm. Mẫu đối chứng là đĩa chỉ đặt khối thạch đã cấy nấm, không cấy xạ khuẩn. Các đĩa petri thí nghiệm được nuôi cấy ở 30°C trong 7 ngày. Đo đường kính vùng ức chế sinh trưởng hình thành.

Tỉ lệ phần trăm ức chế sự phát triển của sợi nấm (Growth Inhibition) (GI) theo công thức sau:

$$GI (\%) = \frac{D - D1}{D} \times 100\%$$

Trong đó: D - đường kính của tản nấm trong đĩa đối chứng

D1 - đường kính của tản nấm trong đĩa thí nghiệm

2.2.10.3 Phương pháp khuếch tán đĩa thạch [60]

Chủng xạ khuẩn được nuôi cấy trên môi trường Gause I lỏng với các điều kiện: tốc độ lắc 200 vòng/phút, ở 30°C trong 7 ngày. Cấy nấm bệnh kiểm định trên môi trường PDA, dùng dụng cụ đục đĩa thạch để tạo ra các giếng trên đĩa, dùng pipet nhỏ 100 µl dịch nuôi cấy xạ khuẩn đã ly tâm lắng cặn vào các giếng đã đục trên đĩa thạch đã được cấy trải 100 µl dịch bào tử nấm *Foc* TR4 (10⁶ bào tử/ml). Các đĩa petri sau khi bổ sung dịch xạ khuẩn được nuôi ở 30°C trong thời gian 5-7 ngày và đo vòng kháng nấm hình thành xung quanh giếng thạch [60].

Hoạt tính ức chế nấm được tính theo công thức sau:

$$ĐK = D-d;$$

Trong đó: D - đường kính vòng kháng nấm (mm)

d - đường kính lỗ thạch (mm)

2.2.11. Xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) và nồng độ diệt nấm tối thiểu (MFC) [169].

Cao chiết xạ khuẩn được pha loãng bằng DMSO 10% (v/v) ở các dải nồng độ từ 1; 6,25; 12,5; 25, 50, 100, 200, 400 và 600 µg/mL. Huyền phù nấm kiểm định được điều chỉnh về mật độ tương đương 10⁵ CFU/mL (xác định lại mật độ bằng cách pha loãng huyền phù và trải đĩa đếm khuẩn lạc sống). Sử dụng phương pháp

đĩa 96 giếng, mỗi giếng thí nghiệm gồm: 80 µl môi trường PDB, 100 µl dịch huyền phù nấm và 20 µl dịch cao chiết xạ khuẩn đã pha loãng. Đối chứng dương sử dụng kháng sinh Cycloheximide và Nystatin. Đối chứng âm sử dụng DMSO 10%. Các giếng sẽ được ủ ở điều kiện 28 °C trong 4 ngày. Nồng độ ức chế tối thiểu MIC là nồng độ thấp nhất trong dãy thí nghiệm ức chế sự phát triển của nấm.

Từ thí nghiệm trên đĩa 96 giếng có nồng độ ức chế tối thiểu MIC được xác định, tiến hành nhỏ 10 µl dịch thử nghiệm lên đĩa có chứa môi trường PDA. Sau 48h nuôi cấy ở 28 °C xác định sự sống sót của nấm. Nồng độ MFC được xác định tại nồng độ mà không có khuẩn lạc nấm nào xuất hiện trên đĩa thí nghiệm. Đây chính là nồng độ diệt nấm tối thiểu MFC trong dãy nồng độ của cao chiết xạ khuẩn có thể tiêu diệt hoàn toàn nấm trong giếng hoặc trên 99.9%. Mỗi thí nghiệm được tiến hành 3 lần.

2.2.12. Ảnh hưởng của cao chiết xạ khuẩn lên sinh trưởng hệ sợi.

- Sự phát triển và hình thái hệ sợi nấm tiến hành theo mô tả của Yun và cs (2021) [221] có cải tiến như sau: Đặt một que thủy tinh đã gấp lại lên một tờ giấy lọc thấm nước để dưới đáy một đĩa Petri. Cắt một mẫu agar có diện tích khoảng 1 cm² đặt lên một lam kính đã tiệt trùng rồi đặt lam kính này lên trên que thủy tinh. Cấy nấm vào bốn cạnh của miếng agar rồi đặt lam lên trên, ủ 28°C trong 2 ngày trong bóng tối. Quan sát hình thái nấm trên lam kính và lamem bằng kính hiển vi. Tiếp đó, nhỏ 30 µl cao chiết chủng xạ khuẩn lên trên lam kính và mẫu thạch (vị trí sợi nấm đang phát triển). Sau 2 ngày tách miếng thạch ra khỏi lamem và lam kính, đặt lamem lên một lam kính mới và ngược lại tạo thành 2 mẫu để quan sát. Mẫu đối chứng được thực hiện tương tự và thay dịch nuôi xạ bằng nước cất vô trùng. Các mẫu sợi nấm được quan sát bằng kính hiển vi quang học (Axio Scope A1, Carl ZEISS, Đức). Phương pháp này có thể quan sát được cấu trúc nguyên vẹn của hệ sợi nấm khi đang phát triển.

- Tác động ức chế của dịch chiết xạ khuẩn lên sự phát triển hệ sợi nấm gây bệnh héo *Fusarium* được tiến hành bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch trên môi trường PDA theo Dhanasekaran và cs 2012 [60] có cải tiến. Trong đó, mỗi đĩa

có 4 giếng thạch được đặt ở 4 góc đối xứng đĩa, nhỏ 50 µl dịch chiết của xạ khuẩn vào mỗi giếng thạch, đặt khối thạch chứa nấm bệnh cách tâm đĩa 3 cm. Mẫu đối chứng là đĩa chỉ đặt khối thạch đã cấy nấm, không nhỏ dịch chiết xạ khuẩn. Các đĩa petri thí nghiệm được nuôi cấy ở 30°C trong 7 ngày. Đo đường kính vùng ức chế sinh trưởng hình thành.

Tỉ lệ phần trăm ức chế sự phát triển của sợi nấm (GI) theo công thức sau:

$$GI (\%) = \frac{D - D1}{D} \times 100\%$$

Trong đó: D - đường kính của tản nấm trong đĩa đối chứng

D1 - đường kính của tản nấm trong đĩa thí nghiệm

2.2.13. Ảnh hưởng của cao chiết xạ khuẩn lên khả năng hình thành bào tử.

Ảnh hưởng của cao chiết chủng xạ khuẩn VNUA116 lên quá trình nảy mầm của bào tử nấm gây bệnh héo vàng tiến hành theo mô tả của Wei và cs 2020 có cải tiến [208]. Bào tử nấm được thu bằng cách thêm 5 ml nước vô trùng vào bề mặt các mẫu đã được nuôi cấy 7 ngày trên PDA và nhẹ nhàng cạo bằng que gạt. Hỗn hợp được lọc qua 2 lớp vải và điều chỉnh đến nồng độ 10^4 bào tử/ml với nước cất vô trùng. Sau đó, 1 ml dung dịch bào tử nấm được ly tâm và loại bỏ nước. Lấy 1 ml dịch chiết chủng xạ khuẩn VNUA116 ở các nồng độ khác nhau thêm vào ống chứa bào tử nấm theo tỷ lệ 1:1. Nhỏ 10 µl hỗn hợp (cao chiết: bào tử nấm) lên các lam kính và giữ trong điều kiện ẩm và nhiệt độ phòng trong 9 giờ để quan sát hình thái và sự nảy mầm bào tử, và trong 24h để theo dõi ảnh hưởng của nồng độ chất chiết. Mẫu đối chứng, bào tử nấm *Foc* TR4 được trộn với nước vô trùng thay vì cao chiết chủng xạ khuẩn VNUA116. Sự nảy mầm của bào tử nấm được quan sát dưới kính hiển vi (Olympus CX33, Nhật Bản). Sử dụng lamén đặt trên mẫu đã nhỏ tương ứng với 100 bào tử và chỉ những ống mầm có kích thước dài hơn kích thước bào tử của chúng mới được tính là đã nảy mầm. Tỷ lệ nảy mầm được tính toán và so sánh giữa đối chứng và thí nghiệm. Thí nghiệm được tiến hành ba lần lặp lại.

Tỉ lệ phần trăm ức chế sự nảy mầm của bào tử nấm (Percentage of Spore Germination Inhibition- PSGI) được tính theo công thức:

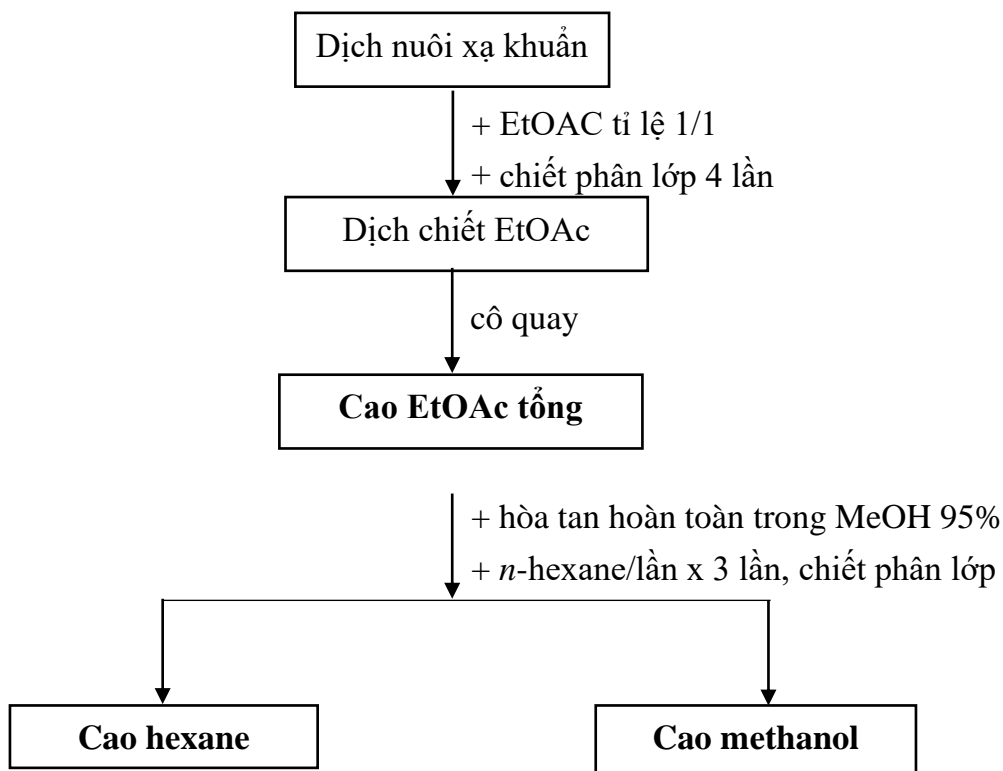
$$\text{PSGI}(\%) = \frac{S_c - S_t}{S_c} \times 100\%$$

Trong đó: S_c : số lượng trung bình bào tử nảy mầm trong mẫu đối chứng

S_t : số lượng trung bình bào tử nảy mầm trong mẫu thí nghiệm.

2.2.14. Phương pháp phân tách và xác định các hoạt chất thứ cấp

Sơ đồ tạo cao chiết tổng dịch lên men xạ khuẩn



Phương pháp phân tách và tinh sạch các hợp chất thứ cấp

Bước 1: Dịch lên men xạ khuẩn được chiết phân lớp với ethyl acetate với tỉ lệ 1/1, lặp lại quy trình chiết 3 lần, thu dịch ethyl acetate, cô quay loại dung môi thu được cao chiết tổng ethyl acetate dạng sệt.

Bước 2: Hòa tan cao chiết tổng ethyl acetate trong methanol 95% sau đó chiết phân lớp với n-hexane/lần, lặp lại quy trình chiết 3 lần. Tách riêng phần dịch chiết n-hexane và methanol 95%, cất quay loại dung môi thu được cao hexane và cao methanol.

Bước 3: Cao methanol được tẩm với hạt Diaion HP-20 được phân tách qua cột Diaion HP-20 với Diaion đã làm khô hoàn toàn và rửa giải bằng các dung môi:

100% nước, 50% methanol, 80% methanol và 100% aceton thu được các phân đoạn ký hiệu phân đoạn 1, phân đoạn 2, phân đoạn 3...

Các phương pháp sắc ký được sử dụng để phân lập và thu nhận các hợp chất thứ cấp:

- *Sắc ký lớp mỏng (TLC)- dùng để khảo sát*

Sắc ký lớp mỏng (TLC) và sắc ký lớp mỏng điều chế được thực hiện trên bản mỏng tráng sẵn DC-Alufolien 60 F₂₅₄ và RP₁₈ F₂₅₄ (Merck-Đức). Các vết chất được phát hiện bằng đèn tử ngoại ở hai bước sóng 254 và 366 nm, hoặc dùng thuốc thử là dung dịch H₂SO₄ 10% phun đều lên bản mỏng rồi sấy ở nhiệt độ cao cho đến khi hiện màu.

- *Sắc ký cột (CC)*

Sắc ký cột được tiến hành với chất hấp phụ pha thường (Silicagel 240,430 mesh, Merck) hoặc pha đảo (ODS-60-14/63, YMC-RP18, Fujisilica-Nhật Bản). Chất hấp phụ được nhồi lên cột thủy tinh. Trong sắc ký cột, tỷ lệ giữa quãng đường đi của chất cần tách so với quãng đường đi được của dung môi được gọi là R_f, mỗi một chất sẽ có một giá trị R_f khác nhau. Chính nhờ sự khác nhau đó mà người ta tách được các chất riêng biệt ra khỏi hỗn hợp.

- *Sắc ký HPLC điều chế*

Sắc ký cột điều chế HPLC với điều kiện sắc ký: cột sắc ký điều chế YMC-Pack ODS-A 250x20mm, 5mm, 8nm, YMC-column 2 ODS-A 250x20mm, 5mm, 12nm; chương trình hệ dung môi methanol – nước (0,1% TFA) gradient từ 10-100% methanol trong 180 phút, tốc độ dòng 3-4 mL/min. Thu được kết quả là thời gian lưu của peak sắc ký của chất.

Phương pháp xác định cấu trúc các hợp chất thứ cấp

Xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất sạch từ dịch nuôi cấy xạ khuẩn dựa trên sự phối hợp các dữ kiện thu được từ các phương pháp phổ như: Phổ cộng hưởng từ hạt nhân: phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều (¹H-NMR, ¹³C-NMR và DEPT) và hai chiều (HSQC, HMBC, COSY và NOESY) và phổ khối lượng (MS).

Các hợp chất thu được sau quá trình tinh chế bằng các phương pháp sắc ký sẽ được kiểm tra độ tinh sạch bằng cách đo phổ proton $^1\text{H-NMR}$. Tiếp theo, các hợp chất này sẽ được phân tích bằng phổ $^{13}\text{C-NMR}$ và các phổ NMR hai chiều như HSQC, HMBC và COSY để xác định cấu trúc hóa học. Sau khi cấu trúc được xác định, công thức phân tử của hợp chất sẽ được xác nhận thông qua phổ khối MS. Dựa trên cấu trúc đã xác định, tên và tính chất mới của các hợp chất sẽ được xác định bằng cách so sánh với dữ liệu của các hợp chất đã biết từ các nguồn tài liệu hóa học như SciFinder, được cung cấp bởi Chemical Abstracts Service (CAS). Quá trình phân tách, xác định cấu trúc của các hợp chất thứ cấp được thực hiện tại Trung tâm nghiên cứu và Phát triển công nghệ cao- Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.2.15. Phương pháp xử lý số liệu

- Số liệu được thu thập, xử lý sơ bộ trên phần mềm Excel phiên bản 365.
- Vẽ biểu đồ, thống kê bằng phần mềm GraphPad Prism 9 với độ tin cậy $P < 0,05$. Sự khác biệt giữa các công thức được xác định bằng cách sử dụng phân tích phương sai một chiều (ANOVA). Số liệu thu được từ các thí nghiệm một nhân tố, sau ba lần lặp lại ngẫu nhiên được biểu thị bằng giá trị trung bình \pm độ lệch chuẩn (SD).

Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập, tuyển chọn nấm *Foc* TR4 gây bệnh héo vàng trên cây chuối tại Việt Nam

3.1.1. Phân lập, tuyển chọn nấm *Foc*.

Các mẫu chuối bị bệnh được thu thập đều có những triệu chứng bệnh điển hình theo mô tả của Pegg và cs, 2019 [159] như: các lá già bị héo vàng toàn bộ, gãy gục và rũ xuống xung quanh thân giả. Các lá phía dưới của cây có màu vàng nhạt ở quanh mép lá và ở gân chính của lá. Một số lá có hiện tượng đốm trên lá, gây ra vàng và khô lá. Mẫu thân giả, xuất hiện các vết bệnh màu nâu và màu đen làm cho thân giả có màu vàng, nứt dọc thân giả được quan sát thấy ở gần gốc cây, cách mặt đất 10cm, hoặc các thân giả có hiện tượng bị thối nhũn và có mùi. Mẫu rễ bị đứt và có các vết bệnh màu đen. Mẫu thân củ xuất hiện màu đỏ nâu ở mạch dẫn của thân củ.



(A)

(B)

(C)

Hình 3.1. Các vị trí lấy mẫu trên cây chuối bị bệnh héo vàng

(A) Cây chuối bị bệnh héo vàng; (B) Thân giả bị bệnh; (C) Thân rễ bị bệnh.

Từ 160 mẫu chuối bị bệnh thu thập từ các giống chuối tiêu (AAA) và chuối tây (ABB) tại 7 tỉnh, đã tiến hành phân lập được 50 chủng nấm có đặc điểm hình thái tương tự loài *Fusarium oxysporum* theo mô tả của Thangavelu và cs năm 2019 [194]. Trong đó, từ các mẫu chuối bị bệnh thu tại Vĩnh Phúc đã phân lập được 9

chủng nấm gây bệnh, tại Hà Nội phân lập được 9 chủng, tại Hưng Yên phân lập được 13 chủng, tại Hải Dương phân lập được 1 chủng, tại Thái Bình phân lập được 11 chủng, tại Hải Phòng phân lập được 2 chủng và tại Hà Tĩnh phân lập được 5 chủng. Kết quả số lượng các chủng nấm bệnh phân lập được thể hiện tại Bảng 3.1.

Bảng 3.1. Số lượng các chủng nấm *Foc* phân lập được tại một số tỉnh của Việt Nam

Địa điểm lấy mẫu	Loại mẫu	Số lượng mẫu	Biểu hiện bệnh	Số chủng nấm phân lập được	Ký hiệu chủng
Vĩnh Phúc	Thân giả	5	Mặt cắt ngang của thân giả có các mô mạch dẫn bị hoại tử	10	VP1, VP1(1), VP1(2), VP1(3), VP1(5), VP8(2), VP2(6), VP3(1), VP3(2)
	Rễ	1	Lớp ngoài của rễ chuyển sang màu đen		
Hà Nội	Lá	3	Màu vàng	9	ML01, ML02, ML02.2, ML04.1, ML04.2, ML04.3, ML05, ML06, ML08
	Thân giả	3	Mặt cắt ngang của thân giả có các mô mạch dẫn bị hoại tử		
	Thân rễ	2	Mặt cắt ngang của thân rễ có mô bị thối và có mùi hôi		
	Rễ	1	Lớp ngoài của rễ chuyển sang màu đen		
Hưng Yên	Lá	8	Màu vàng	13	VG2C, MS1T1, MS1T2, BM1C, AT5.2, AT6, PC8, PC9, VG1C, VG1T1, BM2C, YM3, YM6
	Thân giả	25	Mặt cắt ngang của thân giả có các mạch dẫn chuyển sang màu nâu.		
	Thân rễ	17	Mặt cắt ngang của thân rễ có các mạch dẫn chuyển sang màu nâu		
Hải Dương	Lá	10	Màu vàng có đốm đen	1	NF01
Thái Bình	Lá	14	Màu vàng	11	QG1(R), G4(T), QH2(R), G4(R), QG5(T), QG5(R),
	Thân giả	14	Mặt cắt ngang của thân giả có các mạch dẫn chuyển sang màu nâu đỏ.		

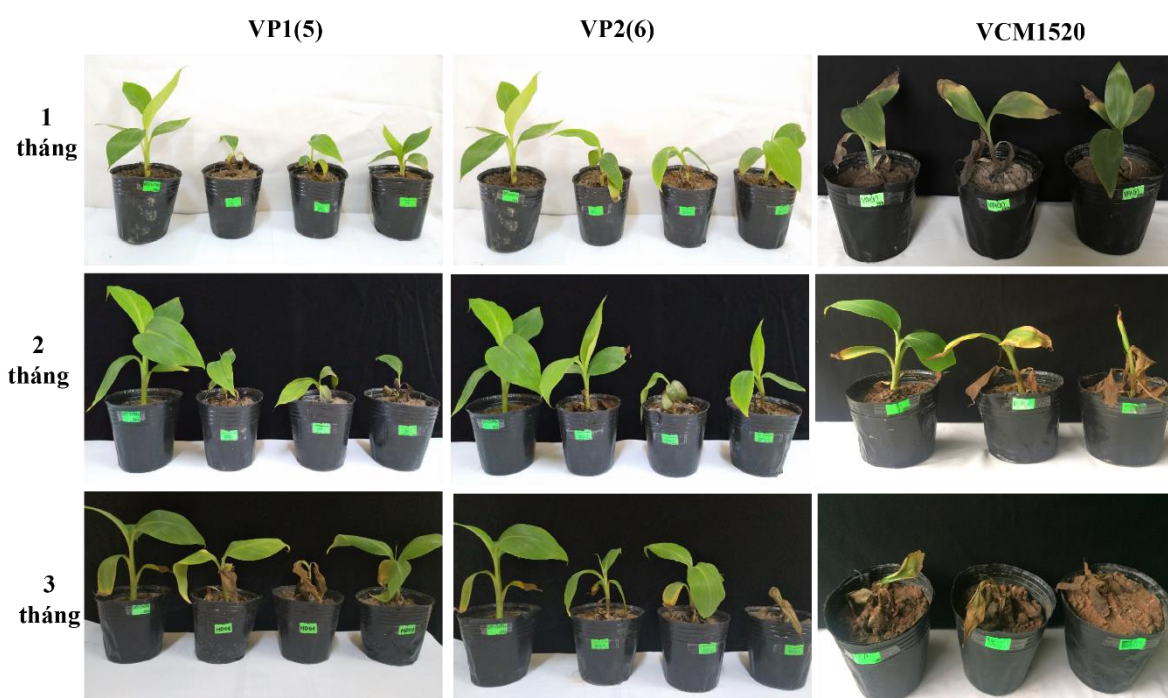
	Thân rễ	4	Mặt cắt ngang của thân rễ có các mạch dẫn chuyển sang màu nâu hoặc nâu sẫm, có mùi hôi.		QG1(RL2), HH1(T), H1(R), HH1(T), HH5(T)
Hải Phòng	Lá	11	Màu vàng	2	BV03, BV06
	Thân giả	11	Mặt cắt ngang của thân giả có các mạch dẫn chuyển sang màu nâu sẫm.		
	Thân rễ	11	Mặt cắt ngang của thân rễ có các mạch dẫn chuyển sang màu nâu hoặc nâu sẫm, có mùi hôi.		
Hà Tĩnh	Lá	7	Lá bị héo vàng	5	HT39, HT10, L05n, R05, VCM1520
	Thân giả	11	Thân giả nứt, thối nhũn, màu nâu đỏ		
	Thân rễ	3	Mạch dẫn thân củ có màu nâu đỏ		
Tổng số		160		50	

3.1.2. Tái lây nhiễm các chủng nấm gây bệnh trong phòng thí nghiệm

Để khẳng định các chủng nấm phân lập được là nhóm nấm gây bệnh héo vàng, tiến hành lây nhiễm các chủng nấm gây bệnh trên chuỗi tiêu hồng nuôi cấy mô (cao 7–10 cm với 3–5 lá thật) trong điều kiện phòng thí nghiệm theo quy tắc Kock.

Kết quả cho thấy: Sau 30 ngày đầu của thí nghiệm, các cây của mỗi thí nghiệm (3 cây/1 chủng nấm bệnh) của 50 chủng nấm phân lập được đều có biểu hiện các triệu chứng điển hình của bệnh héo vàng nhưng ở các mức độ khác nhau như: lá bị vàng chóp lá, có các vết bệnh màu nâu trên thân giả. Quan sát những ngày tiếp theo, lá tiếp tục bị vàng từ ngọn tới cuống lá, héo rũ xuống rồi khô lại. Khoảng thời gian đầu từ lúc bắt đầu tái lây nhiễm tới ngày thứ 30, cây vẫn tăng chiều cao, ra

lá mới... tuy nhiên, mức độ sinh trưởng chậm hơn rất nhiều so với cây đối chứng. Triệu chứng bệnh ngày càng rõ rệt và nặng hơn, cây không còn ra lá mới hoặc nếu có ra lá mới thì lá non cũng sẽ bị vàng và héo. Điều này có thể khẳng định rằng: nấm gây bệnh xâm nhiễm vào bộ rễ thông qua hệ thống mạch xylem để hình thành vết bệnh sau đó mầm bệnh sẽ xâm nhiễm đến các tế bào bên ngoài, do đó, sẽ cản trở quá trình hút nước của cây và ảnh hưởng đến quá trình trao đổi chất dinh dưỡng dẫn đến cây bị còi cọc, héo và lá bị vàng [26]. Một số công bố cũng cho thấy, nấm gây bệnh có thể xâm nhập trực tiếp vào rễ hoặc thông qua các vết tổn thương trên rễ, các vị trí xâm nhập thường là đầu rễ cái hoặc vùng kéo dài giữa các tế bào trong củ chuối để phát triển bệnh [131]. Mẫu tái lây nhiễm chủng VCM 1520 và TG1t biểu hiện triệu chứng sớm nhất (sau 15 ngày tái lây nhiễm). Các chủng HT39, TG1t, VP1(2) xuất hiện cây chết sau 60 ngày tái lây nhiễm. Mẫu VCM 1520, VP2(6) xuất hiện vết bệnh màu nâu đỏ ở thân củ và thân giả, cây chết sau 50 và 60 ngày tái lây nhiễm tương ứng với từng chủng. Các cây đối chứng phát triển bình thường, không xuất hiện các triệu chứng bệnh. Sau 90 ngày tái lây nhiễm, nhóm 34 chủng nấm phân lập được (VP1(1), VP1(3), ML01, ML04.3, ML06, ML08, BV03, MS1T2, VG1T1, VP1(5), VP8(2), ML02, ML02.2, ML04.1, ML04.2, ML05, NF01, BV06, QG1(R), VP1(2), VP2(6), VP3(1), VP3(2), HH1(R), HH5(T), QG4(T), QH2(R), QG5(T), QG4(R), QG5(R), HT10, L05n, VCM1520, VP2(6) có tất cả các lá đều có biểu hiện điển hình của bệnh héo vàng như: bề mặt lá bị vàng không đều, phần giữa vết thương chuyển sang màu nâu đen và lan rộng, kèm theo những đốm nhỏ màu nâu đen xung quanh, xuất hiện một số cây chết. Ngược lại, nhóm 16 chủng nấm còn lại (VP1, VG2C, MS1T1, BM1C, AT5., AT6, PC8, PC9, VG1C, BM2C, YM3, YM6, QG1(RL2), HH1(T), HH5(R), R05 không có biểu hiện héo rũ triệu chứng, lá vẫn xanh và cây con phát triển bình thường.



Hình 3.2. Tái lây nhiễm các chủng nấm điển hình gây bệnh héo vàng trên cây chuối

Căn cứ vào mức độ biểu hiện bệnh trong thí nghiệm tái lây nhiễm, các chủng nấm gây bệnh được chia thành 5 nhóm như Bảng 3.2.

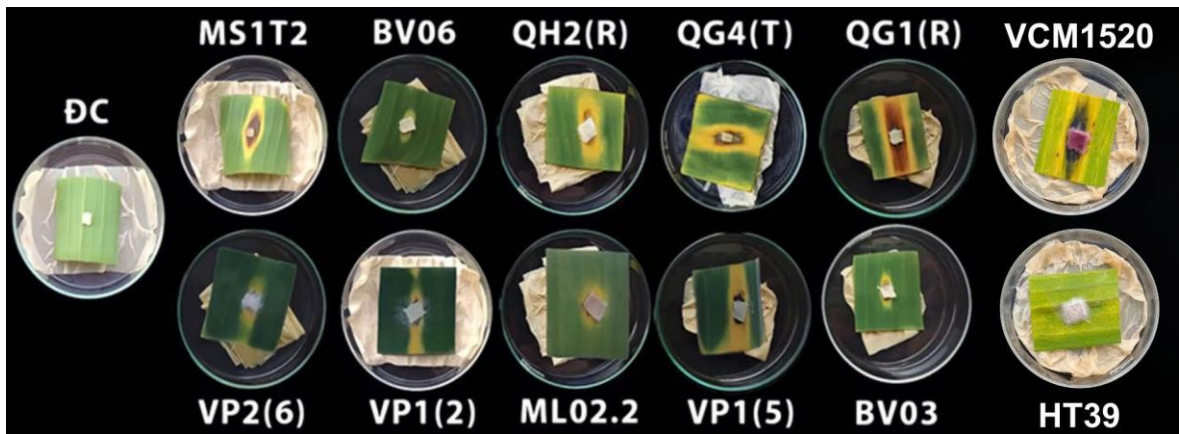
Bảng 3.2. Mức độ biểu hiện bệnh của các chủng nấm phân lập sau 90 ngày thí nghiệm

Phân nhóm	Tên chủng	Mức độ biểu hiện	Mô tả
Nhóm 1	VP1, VG2C, MS1T1, BM1C, AT5.2, AT6, PC8, PC9, VG1C, BM2C, YM3, YM6, QG1(RL2), HH1(T), R05	1	- Không biểu hiện triệu chứng gây bệnh
Nhóm 2	VP1(1), VP1(3), ML01, ML04.3, ML06, ML08, VG1T1, QG5(R),	2	- Gây bệnh yếu - Lá vàng chủ yếu phía dưới
Nhóm 3	VP8(2), ML02, ML04.1, ML04.2, ML05, NF01, HT10, L05n	3	- Có gây bệnh - Tất cả các lá vàng phía dưới và 1 số lá non bị đổi màu.

Nhóm 4	VP3(1), VP3(2), HH1(R), HH5(T), QG5(T), QG4(R), TG1t	4	- Gây bệnh mạnh - Tất cả các cây nhiễm bệnh biểu hiện triệu chứng lá vàng đậm.
Nhóm 5	QG4(T), QH2(R), VCM1520, HT39, VP1(2), VP2(6), VP1(5), ML02.2, QG1(R), BV06, BV03, MS1T2	5	- Gây bệnh nghiêm trọng. - Các cây chết: + Sau 50 ngày lây nhiễm: VCM 1520 + Sau 60 ngày lây nhiễm: VP2(6), VP1(2), HT39. + Sau 90 ngày lây nhiễm: QH2(R), QG4(R), VP1(5), ML02.2, QG1(R), BV06, BV03.

Kết quả Bảng 3.2 cho thấy rằng các chủng nấm gây bệnh phân lập từ các tỉnh khác nhau thể hiện mức độ gây bệnh khác nhau. Các chủng QG4(T), QH2(R), VCM1520, HT39, VP1(2), VP2(6), VP1(5), ML02.2, QG1(R), BV06, BV03, MS1T2 có khả năng nhiễm và biểu hiện bệnh héo vàng ở mức độ nghiêm trọng nhất và là các chủng đại diện cho 7 tỉnh đã được lấy mẫu. Kết quả tái lây nhiễm tương tự như các công bố của Zheng và cs năm 2018; Andrew Chen và cs năm 2019 cho thấy rằng các mẫu chuỗi tái lây nhiễm bởi dịch nuôi cấy các chủng nấm gây bệnh có các biểu hiện triệu chứng bệnh rất giống với triệu chứng bệnh do nấm *Foc* TR4 gây ra [225],[48].

Dựa trên mức độ biểu hiện bệnh, tính đại diện của từng chủng tương ứng với từng vị trí lấy mẫu chuỗi bị bệnh, lựa chọn các chủng QG4(T), QH2(R), VCM1520, HT39, VP1(2), VP2(6), VP1(5), ML02.2, QG1(R), BV06, BV03, MS1T2 để đánh giá thêm khả năng gây bệnh trên lá chuối.



Hình 3.3. Tái lây nhiễm các chủng nấm điển hình gây bệnh héo vàng trên lá chuối

Kết quả Hình 3.3 cho thấy sau 5 ngày tái lây nhiễm 12 chủng nấm lựa chọn, tất cả lá ở các thí nghiệm đều xuất hiện các triệu chứng điển hình như: (1) vết bệnh vàng không đều, (2) tâm vết bệnh có màu nâu đen và có xu hướng lan rộng, (3) xung quanh xuất hiện các đốm nhỏ màu nâu đen. Mẫu lá đối chứng không có biểu hiện bệnh, lá vẫn xanh. Kết quả này cũng tương tự với một số nghiên cứu đã được công bố ở Thái Lan [197], Indonesia [90], Đài Loan và Malaysia [161] đã tìm thấy và mô tả loài nấm gây bệnh này là *Foc* gây bệnh héo vàng trên cây chuối. Các mẫu cây, lá nhiễm bệnh sau khi tái lây nhiễm được tái phân lập để thu nhận các tác nhân gây bệnh từ các bộ phận bị bệnh mới, xác định thông qua hình thái thu được nguồn nấm *Fusarium oxysporum* ban đầu với tỷ lệ đạt 100%.

3.1.3. Định danh các chủng nấm gây bệnh héo vàng trên cây chuối.

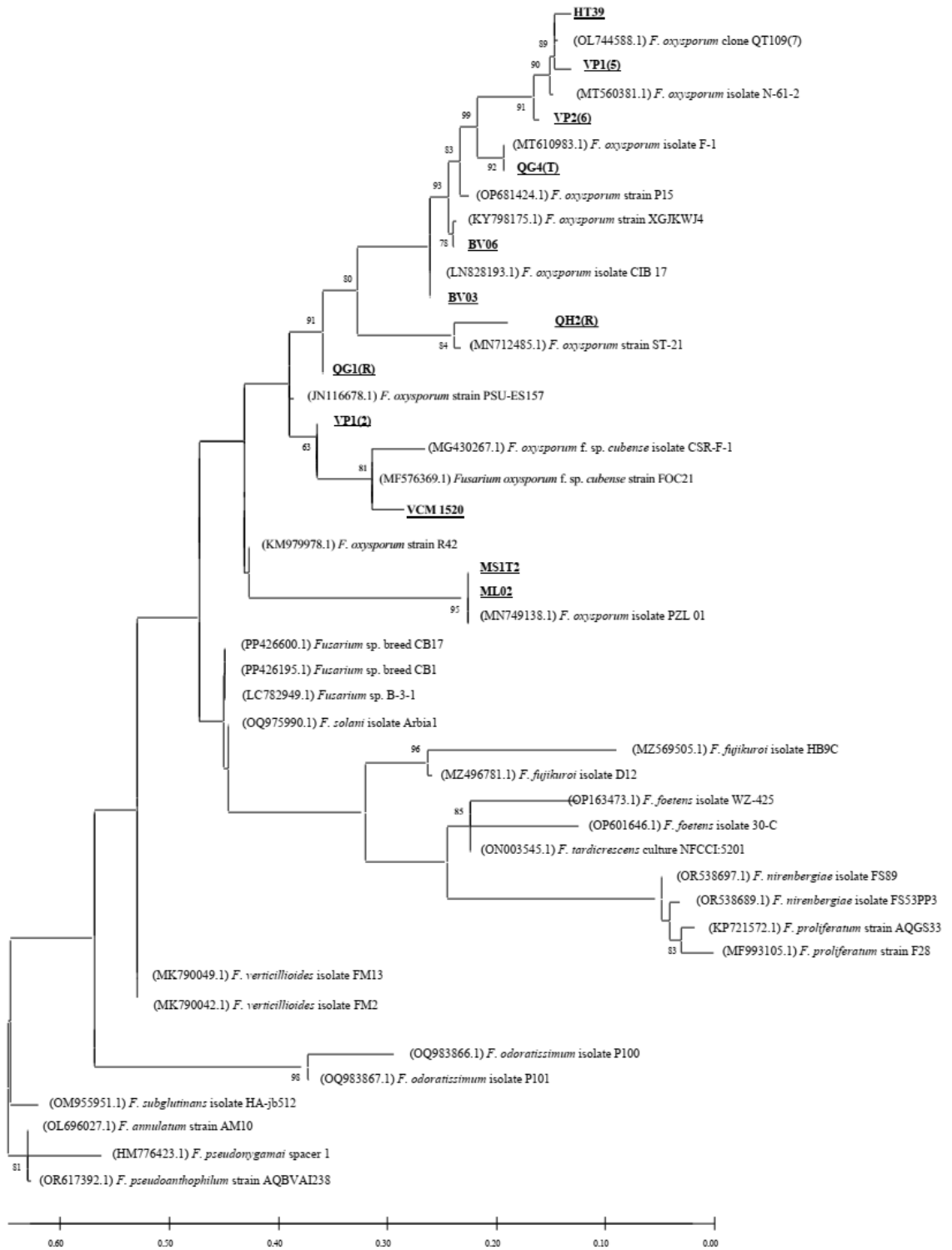
Vì một số chủng nấm phân lập được từ cùng một tỉnh giống hệt nhau nên chúng tôi đã chọn 12 chủng đại diện của các tỉnh khác nhau, bao gồm QG4(T), QH2(R), VCM1520, HT39, VP1(2), VP2(6), VP1(5), ML02.2, QG1(R), BV06, BV03, MS1T2 để tiến hành định danh và xây dựng cây phát sinh loài.

Tiến hành định danh 12 chủng nấm gây bệnh lựa chọn dựa trên các đặc điểm hình thái (hệ sợi, bào tử và cấu trúc sinh bào tử) và trình tự gen vùng ITS của rDNA. Trình tự DNA của vùng sao chép nội bộ ITS của rDNA ở các loài nấm vừa có trình tự bảo thủ vừa có các trình tự thay đổi nên vùng ITS đã được nghiên cứu cho mục đích phân loại nhiều loài nấm. Ngoài ra, so với các gen 18S rRNA và 28S

rRNA của rDNA, vùng ITS (gồm ITS1; 5,8S rRNA; ITS2) ở nấm có mức độ biến đổi cao hơn giữa các loài gần gũi [57].

Các đoạn 18S rDNA của 12 chủng nấm gây bệnh đã được khuếch đại phản ứng PCR với các đoạn mồi ITS1/ITS4; 12 chủng nấm này đều biểu hiện một băng trong khoảng 500–550bp, tương ứng với băng mục tiêu.

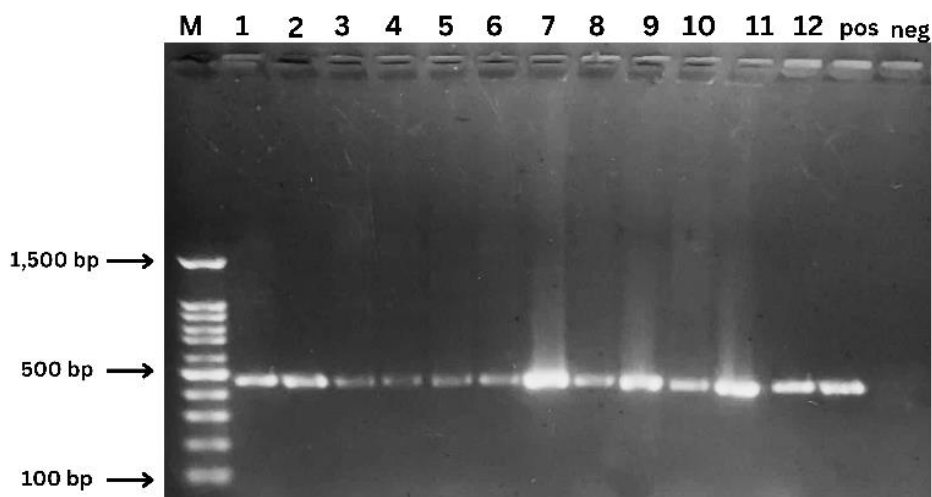
Sản phẩm PCR được sử dụng để giải trình tự và so sánh với Genbank bằng BLAST để phân tích nucleotide. Cây phát sinh chủng loại của những chủng phân lập này đã được xây dựng. Kết quả Hình 3.4 cho thấy 12 chủng này có quan hệ gần gũi và trong cùng một nhánh với các chủng *F. oxysporum*. Kết quả khuếch đại vùng ITS với cặp mồi đa năng cho nấm là ITS1/ITS4 chỉ ra 1 băng DNA duy nhất, có kích thước khoảng hơn 500 bp. Sản phẩm PCR vùng ITS được tinh sạch bằng kit tinh sạch của hãng Promega và được giải trình tự bởi Công ty 1st BASE (Singapore). Trình tự ITS được phân tích, so sánh với dữ liệu trong ngân hàng gen GenBank và phân tích mối quan hệ loài với phần mềm Mega 11 phiên bản 11.0.13. Cây phát sinh chủng loại được xây dựng dựa trên phương pháp Maximum Likelihood Tree để thiết lập tập hợp các bootstrap có độ tin cậy với 1.000 lần lặp lại và các thiết lập khác được giữ ở mặc định.



Hình 3.4. Cây phát sinh chủng loại của các chủng nấm gây bệnh héo vàng đại diện.

Cặp mồi *Foc-1/Foc-2* được sử dụng để phát hiện nhanh chóng và chính xác các chủng nấm *Foc* (bao gồm cả nấm *Foc* TR4) thông qua việc khuếch đại một đoạn gen đặc trưng [61]. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này, điều đáng chú ý đã xảy ra khi sử dụng cặp mồi *Foc-1/Foc-2*, cả 12 chủng nấm được lựa chọn để định danh đều không tạo ra băng khuếch đại nhìn thấy được. Sự không đồng nhất này có thể là một giới hạn mới được phát hiện của cặp mồi *Foc-1/Foc-2*.

Để xác định chính xác hơn các chủng nấm được tiến hành chạy phản ứng PCR sử dụng các mồi đặc trưng *FocTR4-F/FocTR4-R*. Đây là phương pháp đáng tin cậy và cụ thể để phát hiện *Foc* TR4 đã được Tổ chức quốc tế về sức khỏe Nông nghiệp Khu vực (OIRSA) và Tổ chức Nông Lương Liên Hợp Quốc (FAO) khuyến khích sử dụng. Kết quả cho thấy, cả 12 chủng nấm được lựa chọn có vùng ITS được khuếch đại với cặp mồi đặc hiệu *FocTR4-F/FocTR4-R* chỉ ra 1 băng DNA duy nhất, có kích thước xấp xỉ 460 bp. Kết quả phân tích cho thấy rằng 12 chủng nấm tuyển chọn đều là *Foc* TR4.



Hình 3.5. Hình ảnh PCR nhân gen bằng cặp mồi *Foc* TR4-F/*Foc* TR4-R

1-BV03, 2-VP1(5), 3-QG1(R), 4-VP2(6), 5-MI02.2, 6-QH2(R), 7-VP1(2), 8-QG4(T), 9-MS1T2, 10-BV06, 11- HT39 và 12-VCM1520, pos: Foc TR4 đối chứng dương, neg: Foc race 1 đối chứng âm.

**Bảng 3.3. Định danh các chủng nấm phân lập bằng các cặp môi đặc trưng
*Foc TR4-F/Foc TR4-R***

TT	Tên chủng	Vị trí lấy mẫu	Cặp môi <i>Foc-1/Foc-2</i>	Cặp môi <i>FocTR4-F / FocTR4-R</i>	Race
1	VP1(2)	Vĩnh Phúc	–	+	TR4
2	VP1(5)	Vĩnh Phúc	–	+	TR4
3	VP2(6)	Vĩnh Phúc	–	+	TR4
4	ML02.2	Hà Nội	–	+	TR4
5	MS1T2	Hung Yên	–	+	TR4
6	BV03	Hải Phòng	–	+	TR4
7	BV06	Hải Phòng	–	+	TR4
8	QG1(R)	Thái Bình	–	+	TR4
9	QG4(T)	Thái Bình	–	+	TR4
10	QH2(R)	Thái Bình	–	+	TR4
11	VCM1520	Hà Tĩnh	-	+	TR4
12	HT39	Hà Tĩnh	-	+	TR4

Các kết quả của một số nghiên cứu trước đây về sự xuất hiện của chủng *Foc TR4* tại một số vùng trồng chuối ở đồng bằng sông Hồng như tỉnh Nam Định [119], Vĩnh Phúc [52], [119], Hải Phòng [52], Hưng Yên, Hà Nội [9], Lào Cai, Yên Bái, Phú Thọ, Lai Châu [225]. Kết quả này cũng cho thấy nấm *Foc TR4* đã lần đầu tiên được công bố xuất hiện tại Thái Bình. Điều này có thể khẳng định chủng nấm *Foc TR4* đã lây lan nhanh chóng ra hầu hết các vùng trồng chuối ở vùng đồng bằng sông Hồng của Việt Nam.

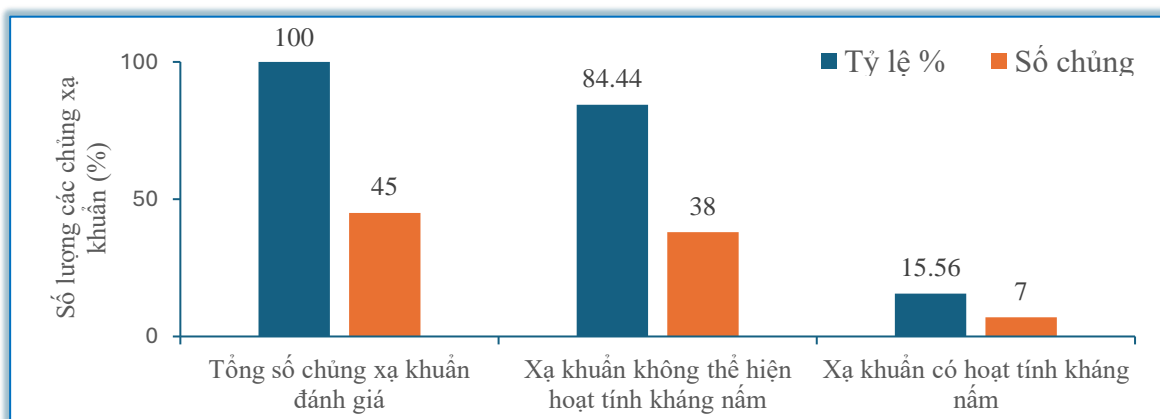
Chủng nấm VCM1520 đã được xác định là *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4 (*Foc TR4*), có các đặc điểm sinh học đặc trưng như: khả năng gây bệnh héo vàng trên cả thân, lá chỉ sau 15 ngày với độc lực mạnh, gây chết cây con sau 50 ngày lây nhiễm, khả năng sinh trưởng mạnh trên nhiều loại môi trường, dải nhiệt độ và pH sinh trưởng rộng (phụ lục 4) chúng tôi đã lựa chọn chủng nấm VCM1520 làm chủng kiểm định để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo.

3.2. Sàng lọc và tuyển chọn chủng xạ khuẩn có khả năng đối kháng nấm gây bệnh héo vàng trên cây chuối

3.2.1. Tuyển chọn xạ khuẩn có khả năng đối kháng nấm gây bệnh héo vàng trên chuối.

Để tuyển chọn được chủng xạ khuẩn có khả năng kháng nấm *Foc* TR4, nghiên cứu đã sử dụng chủng nấm *Foc* TR4 kí hiệu là VCM1520 làm chủng kiểm định. Bộ sưu tập 45 chủng xạ khuẩn được phân lập từ các vùng đất trồng chuối đang được lưu giữ, bảo quản tại Bộ môn Công nghệ vi Sinh, Khoa Công nghệ Sinh học-Học viện Nông nghiệp Việt Nam đã được sử dụng để tuyển chọn được chủng xạ khuẩn có hoạt tính đối kháng nấm *Foc* TR4 VCM1520 mạnh nhất.

Trong nghiên cứu này, 45 chủng xạ khuẩn được phân lập từ các mẫu đất lấy từ các vùng trồng chuối bị nhiễm bệnh héo vàng được tiến hành đánh giá khả năng đối kháng với nấm *Foc* TR4 VCM1520. Dựa trên kết quả sàng lọc hoạt tính đối kháng nấm *Foc* TR4 VCM1520, hầu hết các chủng xạ khuẩn trong bộ sưu tập không thể hiện hoạt tính kháng nấm (84,44%) và 15,56% các chủng thể hiện hoạt tính đối kháng nấm *Foc* TR4 (Hình 3.6).

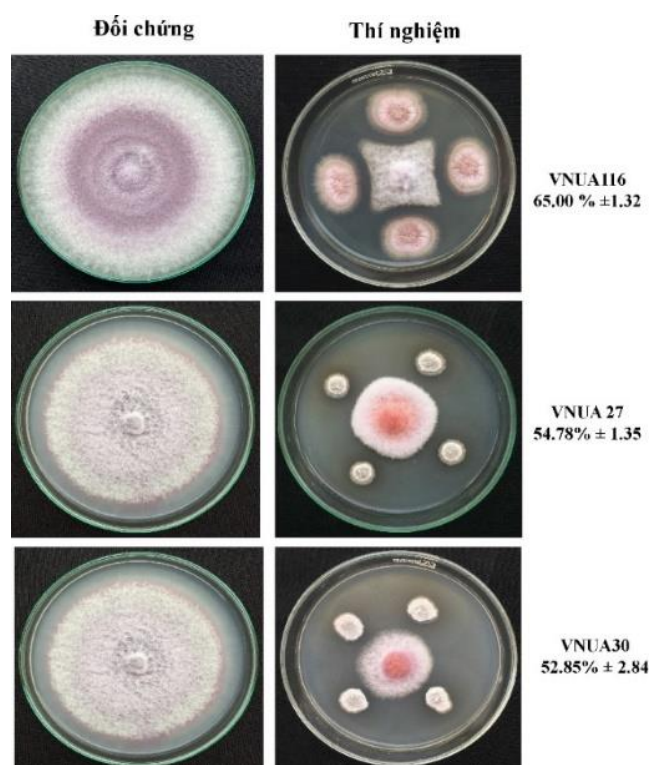


Hình 3.6. Đánh giá hoạt tính kháng nấm của bộ sưu tập xạ khuẩn

Xạ khuẩn *Streptomyces* đã được công nhận là có khả năng đối kháng chống lại nhiều nấm gây bệnh cây trồng trong đó có nấm *Fusarium*. Rất nhiều công bố đã chứng minh xạ khuẩn có hoạt tính kháng *Foc* TR4. Li và cs năm 2012 đã công bố xạ khuẩn *Streptomyces bikiniensis* HD-087 có khả năng ức chế *Fusarium oxysporum* đạt 69,2% và tăng cường sức đề kháng của cây dưa leo [125], Qi và cs

năm 2019 cũng công bố chủng *Streptomyces* sp. SCA3-4, được phân lập từ đất vùng rễ của cây xương rồng *Opuntia stricta* có khả năng kháng nấm phổ rộng trong đó có *Fusarium oxysporum* [169].

Dựa trên kết quả đánh giá khả năng đối kháng nấm *Foc* TR4, 3 chủng xạ khuẩn VNUA116, VNUA27 và VNUA30 thể hiện khả năng kháng nấm cao nhất lần lượt đạt 65%, 54,78% và 52,85% (Hình 3.7). Kết quả này vượt trội hơn hẳn so với công bố trước đây của Cao và cs năm 2005 chứng minh rằng chủng xạ khuẩn *Streptomyces griseorubiginosus* có khả năng kháng nấm *Foc* đạt 37,05% và tương đương với công bố của Qi và cs năm 2021 đã chứng minh chủng xạ khuẩn SCA 2-4 có hoạt tính kháng *Foc* đạt 53,17%{Cao, 2005 #386}, {Qi, 2021 #229}. Vì vậy, 3 chủng xạ khuẩn VNUA116, VNUA27 và VNUA30 có khả năng kháng nấm *Foc* TR4 VCM1520 cao nhất trong 7 chủng có hoạt tính kháng nấm trong 45 chủng của bộ sưu tập được lựa chọn để tiến hành các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 3.7. Khả năng kháng nấm *Foc* TR4 VCM1520 của 03 chủng xạ khuẩn tuyển chọn

3.2.2. Nghiên cứu đặc điểm sinh học của các chủng xạ khuẩn.

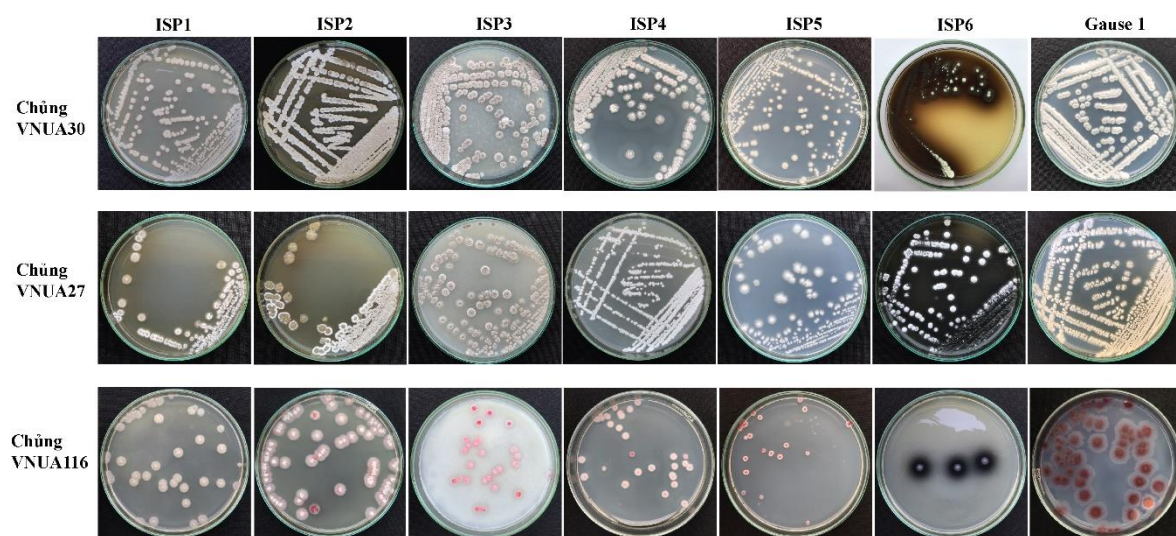
Đặc điểm sinh học của xạ khuẩn chính là các yếu tố liên quan đến hình thái, cấu trúc, chức năng, sinh lý và sinh hóa của chúng. Nghiên cứu các đặc điểm sinh học giúp hiểu rõ hơn về cách xạ khuẩn tồn tại, phát triển và tương tác với môi trường xung quanh. Từ đó, có thể lựa chọn được các chủng xạ khuẩn thích hợp với các mục đích nghiên cứu như: (1) bảo vệ cây trồng khỏi các tác nhân gây bệnh (vi khuẩn, nấm, vi rút...); (2) khả năng sinh các hoạt chất sinh học (enzyme ngoại bào, khả năng cố định đạm, phân giải phosphat, tạo chất kích thích sinh trưởng thực vật nhằm nâng cao năng suất cây trồng và cải thiện chất lượng đất; (3) khả năng thích nghi với môi trường sống đa dạng giúp xạ khuẩn có thể tồn tại và phát triển trong các điều kiện khác nhau....

3.2.2.1. Đặc điểm hình thái các chủng xạ khuẩn tuyển chọn

Việc phân loại chi *Streptomyces* là rất phức tạp và thách thức hơn so với các chi trong nhóm xạ khuẩn do số lượng loài được mô tả trong chi *Streptomyces* khá lớn [114]. Các kỹ thuật sử dụng để phân loại *Streptomyces* đã được cải thiện theo thời gian từ các phân loại hình thái cổ điển như hình thái chuỗi bào tử, màu sắc của chất nền và sợi nấm khí sinh đến các phân tích phân loại số bao gồm đặc tính kiểu hình dựa trên các bộ tiêu chuẩn và hiện nay áp dụng các phân tích phân tử và phát sinh gen [114]. Yếu tố đầu tiên để phân loại xạ khuẩn theo khóa phân loại ISP (1974) và khóa phân loại Bergey [92] chính là màu sắc của khuẩn lạc xạ khuẩn khi nuôi trên môi trường ISP1 đến ISP6. Sử dụng biểu đồ màu ISCC-NBS của Kelly [106] để so sánh khuẩn ty khí sinh và khuẩn ty cơ chất của các chủng xạ khuẩn trong nghiên cứu này. Đồng thời, khả năng sinh sắc tố tan và sự hình thành melanin của các chủng xạ khuẩn tuyển chọn cũng là một trong những tiêu chuẩn cơ bản để phân biệt các chủng xạ khuẩn.

Các chủng xạ khuẩn tuyển chọn được cấy ria trên môi trường Gause I, môi trường từ ISP1 đến ISP6 để đánh giá đặc điểm về hình thái khuẩn lạc. Kết quả nghiên cứu cho thấy rằng, trên các môi trường nuôi cấy khác nhau thì hình thái

khuẩn lạc của các chủng xạ khuẩn cũng thể hiện khác nhau. Kết quả được trình bày Hình 3.8 và Bảng 3.4.

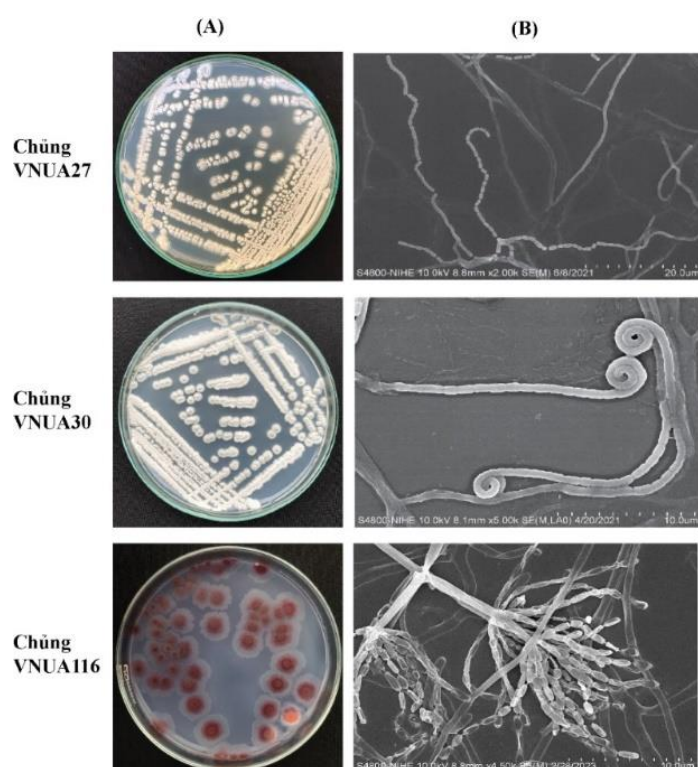


Hình 3.8. Hình thái khuẩn lạc của các chủng xạ khuẩn trên các môi trường nuôi cấy.

Bảng 3.4. Đặc điểm nuôi cấy của chủng xạ khuẩn nghiên cứu trên môi trường Gause I và ISP

Môi trường	VNUA27				VNUA30				VNUA116			
	KTCC	KTKS	Sắc tố tan	Sắc tố melanin	KTCC	KTKS	Sắc tố tan	Sắc tố melanin	KTCC	KTKS	Sắc tố tan	Sắc tố melanin
Gause	Trắng	Trắng	Nâu nhạt	-	Trắng	Trắng	-					
ISP1	Vàng nâu	Trắng	Nâu	-	Trắng	Trắng	Vàng nâu	-	Hồng nhạt	Trắng	-	-
ISP2	Vàng nâu	Trắng xám	Nâu	-	Vàng nâu	Trắng	Nâu	-	Hồng	Trắng	-	-
ISP3	Trắng xám	xám	Nâu nhạt	-	Trắng	Xám	Nâu nhạt	-	Hồng đậm	Hồng phấn	-	-
ISP4	Trắng	Trắng	Nâu nhạt	-	Trắng	Trắng xám	Trắng	-	Hồng	Trắng hồng	-	-
ISP5	Trắng	Trắng	-	-	Trắng	Trắng	-	-	Hồng đậm	Hồng		-
ISP6	Đen	Đen	-	Hình thành sắc tố melanin	Đen	Đen	-	Hình thành sắc tố melanin	Đen	Đen	Đen	Hình thành sắc tố melanin

Kết quả quan sát dưới kính hiển vi quang học cho thấy, chủng xạ khuẩn VNUA30 bắt đầu hình thành chuỗi sinh bào tử sau 30 giờ nuôi cấy. Các bào tử được hình thành sắp xếp thành các chuỗi dài với đầu chuỗi xoắn cuộn. Sau 36 giờ các bào tử trên chuỗi này bắt đầu tách rời khỏi chuỗi và phát tán. Chủng xạ khuẩn VNUA30 khi được quan sát dưới kính hiển vi điện tử quét (SEM) ở độ phóng đại 5000 lần cho thấy rõ, hình dạng chuỗi sinh bào tử của chủng này rất đặc trưng với dạng xoắn móc câu (Hình 3.9). Chủng xạ khuẩn VNUA27 bắt đầu hình thành cuống sinh bào tử sau 36 giờ nuôi cấy. Các bào tử được sắp xếp thành chuỗi dài, dạng xoắn và sau 48 giờ bắt đầu đứt rời khỏi chuỗi, phát tán. Quan sát dưới kính hiển vi điện tử quét (SEM) ở độ phóng đại 2.000 lần cho thấy rõ, hình thái chuỗi sinh bào tử của chủng xạ khuẩn VNUA27 rất đặc trưng với dạng xoắn màu trắng, mỗi chuỗi hình thành 20 - 35 bào tử (Hình 3.9). Trong khi đó, chủng xạ khuẩn VNUA116 bắt đầu hình thành chuỗi sinh bào tử sau 30 giờ nuôi cấy. Các bào tử được hình thành sắp xếp thành các chuỗi dài với đầu chuỗi xoắn cuộn. Sau 36 giờ các bào tử trên chuỗi này bắt đầu tách rời khỏi chuỗi và phát tán. Chủng xạ khuẩn VNUA116 khi được quan sát dưới kính hiển vi điện tử quét (SEM) ở độ phóng đại 5000 lần cho thấy rõ, hình dạng chuỗi sinh bào tử của chủng này có cấu trúc đặc biệt với các bào tử được sắp xếp thành hai nhánh không có cấu trúc hình xoắn ốc (Hình 3.8). Hình thái này cho thấy chủng xạ khuẩn VNUA116 có các đặc trưng khác biệt với hình thái bào tử điển hình của *Streptomyces* [124]. Các bào tử được sắp xếp trên hai nhánh xuất phát từ một điểm có thể giúp tối ưu hóa việc phát tán bào tử trong môi trường, đồng thời chuỗi sinh bào tử không có cấu trúc xoắn ốc giúp dễ dàng phân biệt chủng xạ khuẩn VNUA116 với nhiều loài xạ khuẩn khác. Có thể cấu trúc dạng sợi và bào tử đặc biệt của chủng xạ khuẩn VNUA116 cho phép chúng cạnh tranh hiệu quả hơn chống lại các sinh vật khác được tìm thấy trong vùng rễ.



Hình 3.9. Đặc điểm hình thái của các chủng xạ khuẩn nghiên cứu

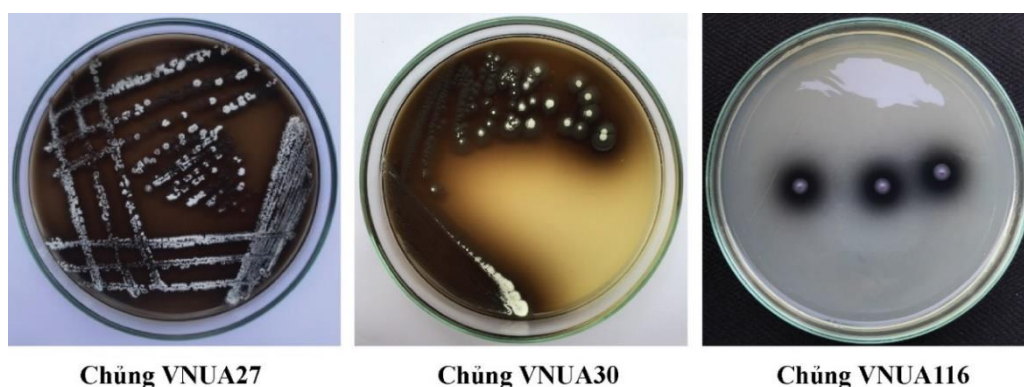
(A) Hình thái khuẩn lạc trên môi trường Gause I; (B) Hình thái cuống sinh bào tử, chuỗi bào tử

3.2.2.2. Khả năng sinh sắc tố melanin của các chủng xạ khuẩn tuyển chọn

Melanin từ xạ khuẩn được nghiên cứu thể hiện nhiều hoạt tính sinh học như hoạt động chống oxy hoá, đặc tính kháng khuẩn, kháng nấm [185]. Nhiều công bố của các tác giả về công dụng của melanin như: (1) được sử dụng làm chất hấp phụ các hạt nhân phóng xạ và các ion kim loại nặng [29], (2) thể hiện hoạt tính sinh học mạnh mẽ trong việc loại bỏ các gốc tự do và bảo vệ chống lại bức xạ, (3) cải thiện tỷ lệ sống sót dưới các áp lực môi trường nghiêm trọng (nhiệt độ khắc nghiệt, hạn hán, chiếu xạ và kim loại phơi nhiễm, và có thể thay thế cho chất tổng hợp sắc tố. Vì vậy, khả năng tổng hợp và hình thành sắc tố melanin của xạ khuẩn được xem là một trong những tiêu chí chuẩn để xác định phân loại xạ khuẩn đến cấp độ chi, từ đó chọn lọc những chủng xạ khuẩn có tiềm năng ứng dụng cao trong nông nghiệp và công nghiệp sinh học [59].

Ba chủng xạ khuẩn tuyển chọn được nuôi cấy trên môi trường ISP6, sau 7 ngày ở 30°C để kiểm tra khả năng hình thành sắc tố melanin. Kết quả nghiên cứu

cho thấy: trên tất cả các đĩa thí nghiệm môi trường chuyển từ màu vàng nhạt sang màu nâu đen, chứng tỏ cả 3 chủng này đều có khả năng sinh sắc tố melanin (Hình 3.10). Chủng xạ khuẩn VNUA30 và VNUA27 có môi trường nuôi cấy chuyển từ vàng sang nâu, trong khi đó môi trường nuôi cấy chủng xạ khuẩn VNUA116 chuyển sang màu đen chứng tỏ chủng xạ khuẩn VNUA116 thể hiện khả năng sinh melanin mạnh nhất.



Hình 3.10. Khả năng sinh sắc tố melanin của 3 chủng xạ khuẩn nghiên cứu

3.2.2.3. Đặc điểm sinh lý, sinh hóa của các chủng xạ khuẩn tuyển chọn

Kết quả nghiên cứu đánh giá đặc điểm sinh lý, sinh hóa của 3 chủng xạ khuẩn tuyển chọn được tổng hợp trong Bảng 3.5.

Bảng 3.5. Đặc điểm sinh lý, sinh hóa của các chủng xạ khuẩn tuyển chọn

Đặc điểm sinh lý, sinh hóa	Chủng		
	VNUA27	VNUA30	VNUA116
Đặc điểm sinh lý			
Khoảng nhiệt độ chịu đựng (°C)	20-40 (tối ưu 25-37)	20-40 (tối ưu 25-37)	20-40 (tối ưu 25-37)
Khoảng pH chịu đựng	4-12 (tối ưu 6-11)	4-12 (tối ưu 6-9)	4-10 (tối ưu 6-10)
Nồng độ NaCl chịu đựng (%)	0-4 (tối ưu 1-2)	0-5 (tối ưu 1-3)	0-5 (tối ưu 1-3)

Đặc điểm sinh hóa			
Khả năng sinh Chitinase	+	+	+
Khả năng sinh Cellulase	+	+	+
Khả năng sinh Xylanase	+	+	+
Khả năng sinh Protease	+	+	+
Khả năng sinh Pectinase	+	+	+
Khả năng sinh Amylase	+	+	+
Các đặc điểm khác			
Khả năng sinh indole	-	-	-
Khả năng sinh IAA	+	+	+
Khả năng sinh siderophore	+	+	+
Đồng hóa citrate	+	+	+
Khử nitrat	-	+	-
Khả năng hóa lỏng gelatin	+	-	+
Khả năng phân giải ure	+	+	-
Khả năng phân giải phosphate khó tan	+	-	-
Khả năng phân giải kali khó tan	-	-	-
Phản ứng MR	-	-	-
Phản ứng VP	-	-	-

Ghi chú: (+) có hoạt tính, (-) không có hoạt tính

Kết quả đánh giá sơ bộ về đặc điểm sinh lý, sinh hóa của 3 chủng xạ khuẩn tuyển chọn cho thấy: cả 3 chủng đều có thể sinh trưởng trong dải nhiệt độ rộng (từ 20-40°C), khoảng pH tối ưu cho sinh trưởng của chủng VNUA27 tương đối rộng (6-11), tiếp đến là chủng xạ khuẩn VNUA116 (6-10) và hẹp nhất là chủng xạ khuẩn VNUA30 (6-9), các chủng xạ khuẩn cũng có khả năng chịu được nồng độ muối trong khoảng 1-2% đối với chủng xạ khuẩn VNUA27 và 1-3% đối với chủng xạ khuẩn VNUA30 và VNUA116. Cả 3 chủng đều có khả năng sinh các enzyme ngoại bào (chitinase, cellulase, xylanase, protease, pectinase và amylase), sinh IAA, siderophore và khả năng đồng hóa citrate, 3 chủng xạ khuẩn này không có khả năng sinh indole, không sinh acetoin, có khả năng phân giải kali khó tan, chỉ có chủng

VNUA27 có khả năng phân giải phosphate khó tan. Các đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hóa của 3 chủng xạ khuẩn tuyển chọn phù hợp các đặc điểm của chi *Streptomyces*.

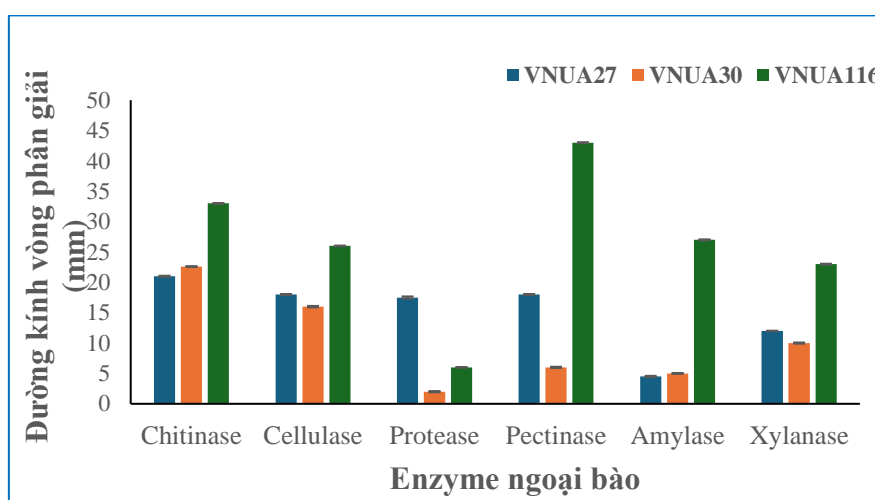
3.2.3. Đánh giá hoạt tính sinh học của các chủng xạ khuẩn nghiên cứu

Ba chủng xạ khuẩn (VNUA27, VNUA30 và VNUA116) có khả năng đối kháng mạnh với nấm *Foc* TR4 VCM1520 gây bệnh héo vàng trên cây chuối được tiến hành nghiên cứu xác định một số hoạt tính sinh học như: khả năng sinh enzyme ngoại bào, khả năng sinh siderophore, khả năng sinh chất kích thích sinh trưởng (IAA). Mục đích nhằm tuyển chọn được chủng xạ khuẩn vừa có hoạt tính kháng nấm *Foc* TR4 gây bệnh cao vừa có các hoạt tính sinh học vừa cao nhất, từ đó tuyển chọn được chủng xạ khuẩn tiềm năng ứng dụng sản xuất chế phẩm vi sinh góp phần trừ bệnh và thúc đẩy sinh trưởng cho cây chuối.

3.2.3.1. Đánh giá khả năng sinh tổng hợp enzyme ngoại bào

Theo Mishra và cộng tác viên (2020), chitinase, cellulase, protease, pectinase, amylase và xylanase là các enzyme quan trọng của các vi sinh vật sử dụng làm tác nhân kiểm soát sinh học bệnh, dịch hại cây trồng [142]. Kết quả đánh giá khả năng sinh tổng hợp các enzyme ngoại bào: chitinase, cellulase, protease, pectinase, amylase và xylanase của các chủng xạ khuẩn tuyển chọn được tổng hợp trong Hình 3.10 cho thấy cả 3 chủng xạ khuẩn tuyển chọn đều thể hiện khả năng tổng hợp enzyme này nhưng ở các mức độ khác nhau. Trong đó, chủng xạ khuẩn VNUA116 thể hiện khả năng sinh tổng hợp các enzyme ngoại bào vượt trội hơn hẳn 2 chủng xạ khuẩn VNUA27 và VNUA30 với đường kính vòng phân giải pectinase, chitinase, cellulase, amylase và xylanase lần lượt là 43; 33; 26; 27 và 23mm, chỉ có hoạt tính phân giải protease thể hiện thấp hơn 2 chủng xạ khuẩn VNUA27 và VNUA30 với đường kính vòng phân giải chỉ đạt 6mm. Nayak và cs năm 2020 đã công bố, sử dụng xạ khuẩn kiểm soát các bệnh do nấm gây ra thông qua cơ chế tiết ra các enzyme ngoại bào như chitinase- có khả năng thủy phân chitin nằm trong thành tế bào nấm [150]. Đồng chitinase còn có tác dụng kháng nấm như chitinase F (ChiF) từ *S. coelicolor* A3(2), chitinase 30 (Chi30) từ *S. olivaceoviridis* ATCC 11238,

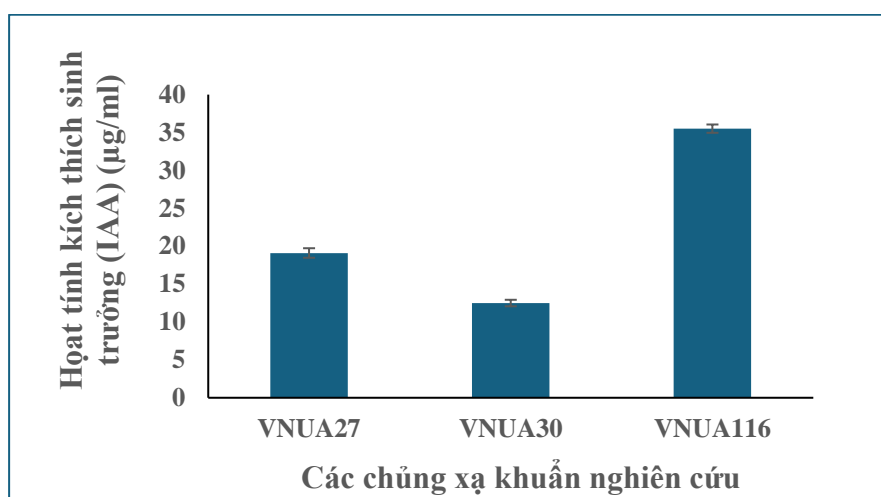
chitinase 35 (Chi35) từ *S. thermoviolaceus* OPC-520, chitinase IS (ChiIS) từ *Streptomyces* sp. MG3 và chitinase A (ChiA) từ *S. cyaneus* SP-27 [216]. Các enzyme khác như glucanase, cellulase và protease có khả năng phân giải các thành phần chính của thành tế bào nấm bệnh, làm nấm bị tổn thương và không thể phát triển bình thường. Do đó, cả 3 chủng xạ khuẩn này đều có tiềm năng trong việc ứng dụng để kiểm soát các bệnh do nấm ở thực vật gây ra, tuy nhiên chủng xạ khuẩn VNUA116 thể hiện khả năng sinh các enzyme ngoại bào mạnh hơn cả.



Hình 3.11. Khả năng sinh enzyme ngoại bào của 3 chủng xạ khuẩn nghiên cứu

3.2.3.2. Đánh giá khả năng sinh chất kích thích sinh trưởng IAA

IAA là chất thúc đẩy tăng trưởng thực vật thuộc nhóm auxin, hoạt động thông qua các con đường trao đổi chất khác nhau, có liên quan đến sự kéo dài rễ, phân chia tế bào và tăng sinh của lông rễ [203]. Xạ khuẩn có khả năng sinh IAA giúp làm tăng diện tích bề mặt và chiều dài rễ; nhờ đó mà cây trồng có thể tiếp cận nhiều hơn với dinh dưỡng trong đất, tăng khả năng hấp thụ dinh dưỡng, giúp cây phát triển tốt hơn, từ đó tăng năng suất cho cây trồng [181].



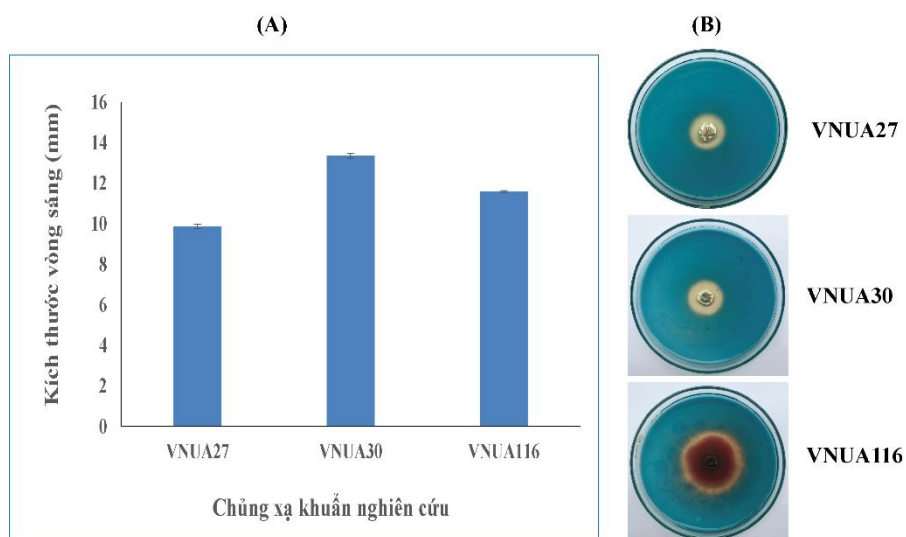
Hình 3.12. Khả năng sinh IAA của 3 chủng xạ khuẩn nghiên cứu

Từ kết quả đánh giá khả năng sinh IAA trên cho thấy trong 3 chủng xạ khuẩn nghiên cứu đều có khả năng sinh IAA khi bổ sung Tryptophan với nồng độ 0,2%; lượng IAA của các chủng dao động trong khoảng 12,5 đến 35,5 µg/ml. Trong đó chủng xạ khuẩn VNUA116 sinh IAA với hàm lượng cao nhất đạt 35,5 µg/ml sau 7 ngày nuôi cấy. Nhiều nghiên cứu cho thấy rằng một lượng nhỏ IAA là cần thiết cho sự phát triển của rễ sơ cấp và vi sinh vật có khả năng tiết ra lượng hợp chất indole cao hơn 13,5 µg/ mL được đánh giá là có hoạt tính kích thích sinh trưởng [203]. Công bố của Rihab và cs năm 2020 cho thấy trong 9/14 chủng xạ khuẩn tuyển chọn từ đất nhiễm mặn có khả năng sinh IAA và chủng H14 có hoạt tính sinh IAA cao nhất (21,4 µg/mL), chủng K12 có hoạt tính sinh IAA thấp nhất (7,44 µg/ mL), 7 chủng còn lại có hoạt tính sinh IAA trong khoảng từ 12,25 -14,75 µg/mL. So sánh với các kết quả đã công bố, hai chủng xạ khuẩn VNUA27 và VNUA116 cho thấy có khả năng tổng hợp chất kích thích sinh trưởng IAA cao hơn. Trong đó, chủng xạ khuẩn VNUA116 được đánh giá là có tiềm năng tốt nhất cho việc ứng dụng xạ khuẩn với mục đích kích thích sinh trưởng thực vật.

3.2.3.3. Đánh giá khả năng sinh siderophore

Siderophores là các hợp chất có khả năng liên kết với sắt (Fe^{3+}) với ái lực cao, giúp vi sinh vật thu nhận sắt trong môi trường có nồng độ sắt thấp. Do đó, hỗ trợ vi sinh vật có thể tồn tại và phát triển trong môi trường cạnh tranh sắt khác nghiệt. Các nghiên cứu đã phát hiện *Streptomyces* có thể sản xuất nhiều loại

siderophore khác nhau, bao gồm catechol, hydroxamate, carboxylate và loại hỗn hợp. Trong đó, hydroxamate đóng vai trò quan trọng trong việc cố định các kim loại trong đất [91].



Hình 3.13. Khả năng sinh siderophore của 3 chủng xạ khuẩn nghiên cứu

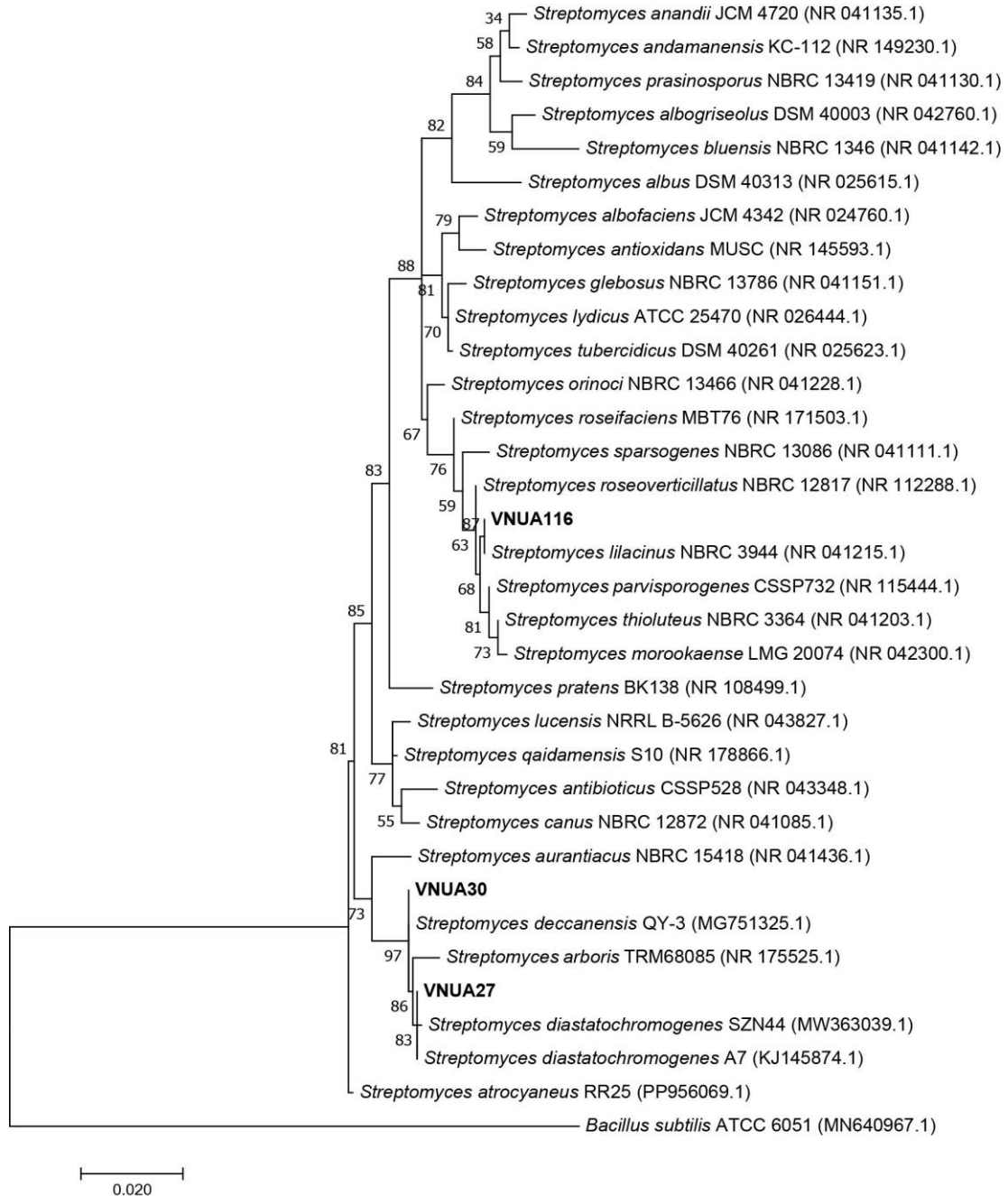
Kết quả nghiên cứu trên cho thấy, cả 3 chủng xạ khuẩn VNUA27, VNUA30 và VNUA116 đều có khả năng sinh siderophore trên môi trường thạch CAS thông qua màu sắc vòng phân giải rõ ràng xung quanh các khuẩn lạc. Theo kết quả Hình 3.12 (B) cho thấy, chủng xạ khuẩn VNUA116 có màu sắc vòng phân giải màu cam chính là siderophore dạng hydroxamates, chủng VNUA27 và VNUA30 có màu sắc vòng phân giải màu vàng là siderophore dạng catechol. Cả 3 chủng này đều có khả năng sinh siderophore, trong đó chủng VNUA30 thể hiện khả năng sinh siderophore mạnh nhất (13,3 mm) tiếp đến là chủng xạ khuẩn VNUA116 (11,6 mm) và thấp nhất là chủng VNUA27 (9,88 mm). So sánh với công bố của Fatmawati và cs năm 2019 chủng xạ khuẩn ASR 41 thể hiện khả năng sinh siderophore cao nhất (26 mm) trong 23 chủng xạ khuẩn tuyển chọn có khả năng sinh siderophore trên môi trường CAS và cao hơn kết quả nghiên cứu của chúng tôi [73]. Nguyễn Thị Vàng và cs (2013) đã phân lập được 5 chủng *Bacillus* trên đất trồng lúa có khả năng đối kháng mạnh với vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* và có khả năng tiết siderophore dạng hydroxamates. Gopalakrishnan và cs (2011) cũng đã ghi nhận 5 chủng xạ khuẩn có khả năng sản xuất siderophore dạng hydroxamates đồng thời cả 5 chủng

này đều có khả năng đối kháng mạnh với *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* [82]. Như vậy, so sánh với các kết quả đã công bố thấy rằng chủng xạ khuẩn VNUA116 có khả năng tiết siderophore dạng hydroxamates, cùng với khả năng kháng nấm *Foc* TR4 mạnh nên có thể dự đoán rằng chủng xạ khuẩn VNUA116 không chỉ tồn tại được trong điều kiện thiếu sắt mà còn có vai trò quan trọng trong kháng nấm gây bệnh, bảo vệ cây trồng khỏi các bệnh do nấm gây ra.

3.2.4. Định danh các chủng xạ khuẩn.

Các chủng xạ khuẩn được nuôi lắc trong môi trường Gause-I ở 30°C trong 48 giờ để tăng sinh khối phục vụ tách chiết DNA. DNA tổng số thu được từ mỗi chủng xạ khuẩn được sử dụng cho phản ứng PCR khuếch đại trình tự 16S rRNA bằng cặp mồi 27F/1492R. 16S rRNA ở xạ khuẩn có mức độ biến đổi cao giữa các loài gần gũi. Do đó, trình tự 16S rRNA được sử dụng phổ biến trong nghiên cứu phân loại xạ khuẩn. Kiểm tra kết quả PCR cho thấy một băng duy nhất kích thước 1500 bp. Mẫu DNA tinh sạch được giải trình tự bởi công ty 1st BASE (Singapore). Kết quả so sánh trình tự 16S rRNA với dữ liệu trong GenBank và xây dựng cây phát sinh chủng loại sử dụng phần mềm MEGA6 cho thấy, chủng xạ khuẩn VNUA27 nằm cùng nhánh với chủng *Streptomyces diastatochromogenes* SZN44 (MW363039.1) với giá trị bootstrap khá cao 87%, đồng thời trình tự nucleotide trên BLAST cho thấy mức độ tương đồng của trình tự 16S rRNA của chủng xạ khuẩn VNUA27 và chủng *S. diastatochromogenes* SZN44 là 99,13%. Chủng xạ khuẩn VNUA30 nằm cùng nhánh với chủng *Streptomyces decanensis* QY-3 (MG751325.1) với giá trị bootstrap rất cao 97%, trình tự nucleotide trên BLAST cho thấy mức độ tương đồng của trình tự 16S rRNA của chủng VNUA30 và chủng *Streptomyces decanensis* là 99,8%. Chủng xạ khuẩn VNUA116 nằm cùng nhánh với chủng *Streptomyces lilacinus* NBRC 3944 (NR 041215.1) với giá trị bootstrap khá cao 87%, trình tự nucleotide trên BLAST cho thấy mức độ tương đồng của trình tự 16S rRNA của chủng xạ khuẩn VNUA116 và chủng *Streptomyces lilacinus* NBRC 3944 là 99,0%. Như vậy, 3 chủng xạ khuẩn tuyển chọn được định danh lần lượt là: *Streptomyces*

diastatochromogenes VNUA27, *Streptomyces decanensis* VNUA30 và *Streptomyces lilacinus* VNUA116 (Hình 3.14).



Hình 3.14. Cây phát sinh chủng loại 3 chủng xạ khuẩn tuyển chọn

3.2.5. Đánh giá mức độ an toàn của các chủng xạ khuẩn tuyển chọn

Độ an toàn sinh học của các chủng VSV sử dụng trong đời sống có ý nghĩa đặc biệt quan trọng. Các chủng vi sinh vật nghiên cứu khi đưa ra ngoài môi trường

tự nhiên phải đảm bảo đầy đủ các yếu tố như: không gây bệnh cho thực vật và động vật, ổn định hoạt tính đối kháng trong thời gian dài...Trước tiên các chủng vi sinh vật tuyển chọn được so sánh, đánh giá an toàn thông qua danh mục đánh giá mức độ an toàn của các chủng vi sinh vật.

Các chủng xạ khuẩn tuyển chọn được so sánh, đánh giá an toàn thông qua danh mục đánh giá mức độ an toàn theo hướng dẫn số 2000/54/EC của Cộng đồng Châu Âu về an toàn sinh học của các chủng vi sinh vật. Kết quả thể hiện tại Bảng 3.6.

Bảng 3.6. Mức độ an toàn sinh học của các chủng xạ khuẩn tuyển chọn

Ký hiệu chủng	Loài gần nhất	Nhóm rủi ro
VNUA27	<i>Streptomyces diastatochromogenes</i>	1
VNUA30	<i>Streptomyces decanensis</i>	1
VNUA116	<i>Streptomyces lilacinus</i>	1

Kết quả đánh giá cho thấy cả 3 chủng xạ khuẩn tuyển chọn đều thuộc nhóm có mức độ rủi ro thấp, không có nguy cơ gây bất cứ một nguy hiểm nào đối với người và động vật. Vì vậy đều có thể sử dụng các chủng này để ứng dụng trong sản xuất chế phẩm, phân bón vi sinh.

Trong 3 chủng xạ khuẩn nghiên cứu, chủng *Streptomyces lilacinus* VNUA116 có hoạt tính đối kháng *Foc* TR4 VCM1520 mạnh nhất (65%), khả năng sinh các enzyme ngoại bào cao nhất (trong đó có chitinase – một trong những enzyme phân hủy thành tế bào nấm bệnh), khả năng sinh chất kích thích sinh trưởng thực vật (IAA) ở mức độ cao, vượt trội so với 2 chủng còn lại (35,5 µg/ml), khả năng sinh siderophore dạng hydroxamates và một số hoạt tính sinh học tiềm năng khác. Chủng xạ khuẩn VNUA116 là chủng có mức độ an toàn sinh học cao (cấp độ 1) đáp ứng được yêu cầu khi ứng dụng sản xuất chế phẩm, phân bón vi sinh góp phần phòng trừ bệnh héo Vàng và thúc đẩy sinh trưởng cho cây chuối. Đồng thời, chủng xạ khuẩn VNUA116 với các đặc điểm sinh học độc đáo và tiềm năng phát hiện các đặc tính mới, có thể đại diện cho một chủng xạ khuẩn mới, cần được

nghiên cứu sâu hơn. Vì vậy, chủng xạ khuẩn *Streptomyces lilacinus* VNUA116 được lựa chọn để nghiên cứu: (1) tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy nhằm tăng hoạt tính kháng nấm *Foc* TR4, (2) tìm kiếm cơ chế phân tử hệ gen chủng xạ khuẩn VNUA116 liên quan đến cơ chế kháng nấm *Foc* TR4, (3) xác định khả năng kháng nấm gây bệnh phổ rộng trên thực vật, (4) phát hiện, thu nhận và đánh giá các hoạt chất kháng nấm trong điều kiện PTN.... để hiểu rõ hơn về chủng này và tiềm năng ứng dụng trong sản xuất chế phẩm, phân bón vi sinh phục vụ nông nghiệp hữu cơ.

3.2.6. Lựa chọn các điều kiện lên men thích hợp nhằm tăng khả năng kháng nấm *Foc* TR4 VCM1520 của chủng xạ khuẩn VNUA116

Để lựa chọn các điều kiện lên men thích hợp nhất đối với chủng xạ khuẩn VNUA116 nhằm tăng cường khả năng kháng nấm *Foc* TR4 VCM1520, thí nghiệm được tiến hành với các yếu tố ảnh hưởng chính như: nguồn carbon, nguồn nitơ, pH môi trường, nhiệt độ và thời gian nuôi cấy. Việc lựa chọn được các điều kiện lên men thích hợp không chỉ tăng khả năng đối kháng với tác nhân gây bệnh mà còn giúp nâng cao hiệu quả sinh trưởng của chủng xạ khuẩn VNUA116, từ đó tạo tiền đề trong ứng dụng chủng xạ khuẩn VNUA116 vào thực tiễn nhằm kiểm soát bệnh héo vàng trên cây chuối.

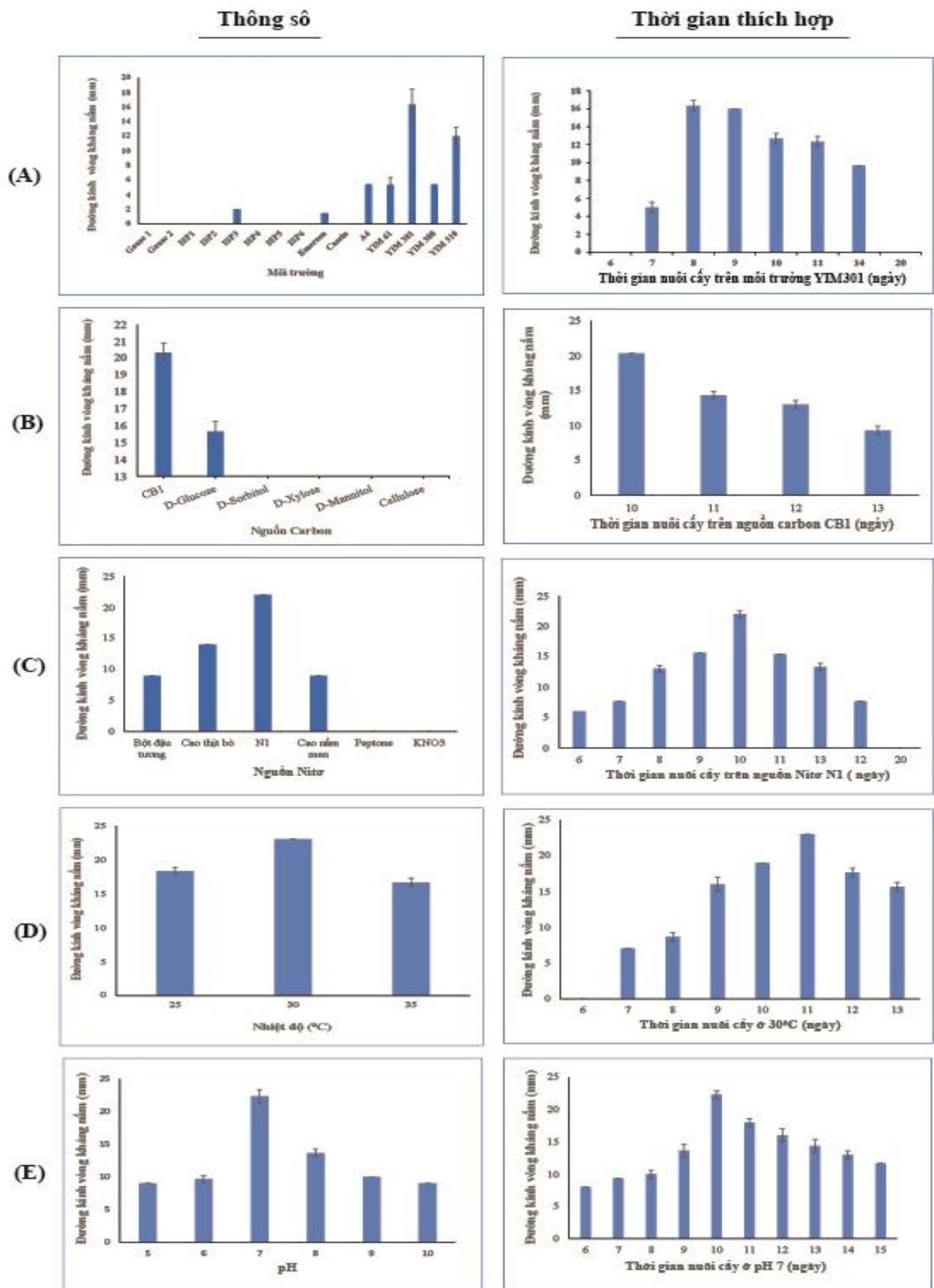
Với 15 loại môi trường lên men được khảo sát, chủng xạ khuẩn VNUA116 phát triển và thể hiện hoạt tính kháng nấm *Foc* TR4 VCM1520 ở các mức độ khác nhau. Sau 8 ngày lên men có 7 loại môi trường có thể hiện khả năng kháng nấm *Foc* TR4 VCM1520 ở các mức độ khác nhau, đó là môi trường ISP-3, A-4, Emerson, YIM 61, YIM 301, YIM 308 và YIM 310. Trong đó môi trường YIM 301 thể hiện khả năng kháng nấm vượt trội. Đây cũng là môi trường hình thành khả năng kháng nấm sớm nhất và mạnh nhất trong 15 môi trường được khảo sát (Hình 3.15 A).

Kết quả (Hình 3.15 B) cho thấy nguồn carbon CB1 và D-glucose là thích hợp với chủng xạ khuẩn VNUA116 trong việc hình thành hoạt tính kháng nấm. Và nguồn carbon hỗn hợp là CB1 (tinh bột tan 40 g/l + D-glucose 1 g/l) là thích hợp nhất tạo hoạt tính kháng nấm tối đa với đường kính vòng kháng nấm đạt trên 22,5 mm ở thời gian sớm nhất (10-11 ngày). Đồng thời, một số nghiên cứu cũng chỉ ra

rằng nồng độ glucose làm giảm khả năng tổng hợp các chất kháng sinh do ức chế các enzyme tham gia vào quá trình này và có thể liên quan đến ảnh hưởng của sinh trưởng lên sinh tổng hợp kháng sinh [172]. Các nghiên cứu khác cũng công bố: tinh bột tan là nguồn carbon để xạ khuẩn sử dụng sản sinh nhiều loại kháng sinh như *Streptomyces fradiae* sản sinh ra tylocin [41], *Streptomyces kanamyceticus* sản sinh ra Kanamycin [167], *Streptomyces rimosus* sản sinh ra hoạt chất kháng nấm [219] và *Streptomyces noursei* sản sinh ra nystatin [69]

Nguồn nitơ đóng vai trò cung cấp cơ chất để xạ khuẩn tổng hợp nên các hợp chất chứa nito cần thiết cho sự sinh trưởng và phát triển của chúng. Mỗi loài xạ khuẩn khác nhau sẽ phù hợp với tỉ lệ C/N trong môi trường sống nhất định. Do đó nguồn nito bổ sung vào môi trường cần phải cân đối với nguồn carbon mà xạ khuẩn đang sử dụng. Trong nghiên cứu này, nguồn nitơ hỗn hợp N1 (cao thịt, cao nấm men, pepton) với tỷ lệ 3:5:3 g/l là nguồn nitơ tốt nhất cho sinh tổng hợp hoạt chất kháng nấm *Foc* TR4 VCM1520 của chủng xạ khuẩn VNUA116. Với bột đậu tương và cao nấm men mặc dù chủng xạ khuẩn VNUA116 có sự gia tăng về sinh khối nhưng khả năng hình thành hoạt tính kháng nấm *Foc* TR4 VCM1520 là không nhiều. Đối với môi trường sử dụng pepton và KNO_3 thì chủng xạ khuẩn VNUA116 không hình thành hoạt tính kháng nấm (Hình 3.15 C). Điều này có thể thấy rằng, khi nguồn nitơ là các chất riêng lẻ là không thích hợp cho sinh chất kháng nấm đối với chủng xạ khuẩn VNUA116. Kết quả này cũng phù hợp với công bố của M. Young và cs (1985) khi sử dụng nguồn nitơ riêng lẻ hoặc nitơ vô cơ làm giảm khả năng sinh tổng hợp hoạt chất kháng nấm [218].

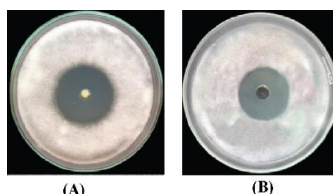
Ngoài ra nghiên cứu cũng cho thấy, khả năng hình thành hoạt tính kháng nấm thích hợp nhất của chủng xạ khuẩn VNUA116 ở nhiệt độ nuôi là 30°C, môi trường có pH 7 và thời gian 10 ngày (Hình 3.15 D, E).



Hình 3.15. Ảnh hưởng của một số điều kiện trong quá trình lên men chủng xạ khuẩn VNUA116

(A) Khả năng kháng nấm *Foc TR4 VCM1520* của dịch lên men chủng xạ khuẩn VNUA116 trên các loại môi trường khác nhau; (B) Khả năng kháng nấm *Foc TR4 VCM1520* của dịch lên men chủng xạ khuẩn VNUA116 trên các nguồn carbon khác nhau; (C) Khả năng kháng nấm *Foc TR4 VCM1520* của dịch lên men chủng xạ khuẩn VNUA116 trên các nguồn nitơ khác nhau; (D) Khả năng kháng nấm *Foc TR4 VCM1520* của dịch lên men chủng xạ khuẩn VNUA116 trên các nhiệt độ nuôi cấy khác nhau; (E) Khả năng kháng nấm *Foc TR4 VCM1520* của dịch lên men chủng xạ khuẩn VNUA116 trên các pH môi trường nuôi cấy khác nhau.

Tiến hành lên men chủng xạ khuẩn VNUA116 với các điều kiện thích hợp nhất được lựa chọn cho mục đích tăng hoạt tính kháng nấm gồm: Môi trường khoáng YIM30, nguồn carbon (tinh bột tan 40 g/l + D-glucose 1 g/l), nguồn nitơ (cao thịt 3g/l + cao nấm men 5g/l + pepton 3g/l), môi trường có pH 7, thời gian lên men 10 ngày ở 30°C thì chủng xạ khuẩn VNUA116 đã thể hiện khả năng sinh chất kháng nấm với đường kính vòng kháng nấm đạt cực đại $30,67 \pm 0,58$ mm tương đương với hiệu lực kháng nấm đạt 93,20% (tăng 1,43 lần so với ban đầu) sau 11 ngày lên men. Kết quả này tương đương với đối chứng dương khi sử dụng Ridomil gold 68WG với nồng độ 3 g/l khi thử nghiệm trong phòng thí nghiệm theo công bố của L.T. Tuong và cs (2019) [11]. Khả năng kháng nấm ban đầu của chủng xạ khuẩn VNUA116 khi chưa lựa chọn các điều kiện nuôi cấy thích hợp chỉ đạt 65%. Điều này cho thấy việc lựa chọn được các yếu tố về thành phần dinh dưỡng môi trường, điều kiện nuôi cấy (pH, nhiệt độ) thích hợp vừa tăng cường hiệu quả sản xuất các hợp chất kháng nấm vừa có thể đẩy nhanh thời gian lên men, giảm thiểu chi phí. Nghiên cứu của Hu và cs (2024) cũng cho thấy chủng *Streptomyces rectiviolaceus* WM-37 khi tối ưu hóa các yếu tố lên men đã tăng cường sản xuất các chất chuyển hóa thứ cấp có hoạt tính kháng nấm [95].



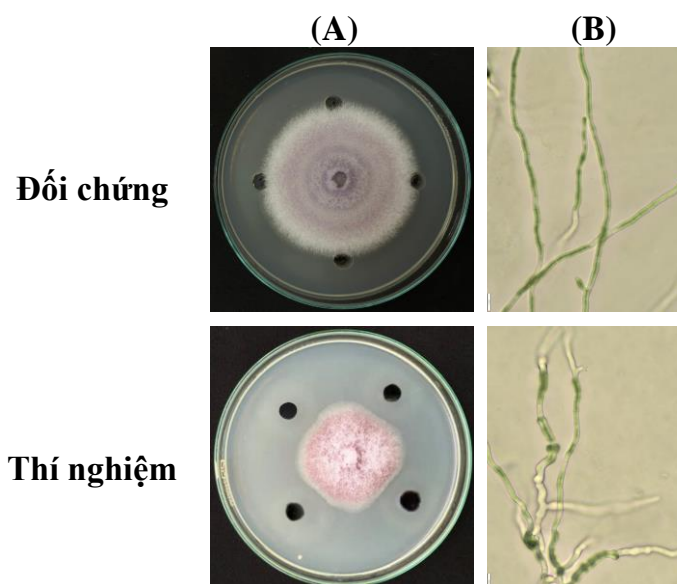
Hình 3.16. Khả năng ức chế nấm *Foc TR4 VCM1520* của chủng xạ khuẩn VNUA116

(A). Đối chứng dương (thuốc Ridomil gold 68WG); (B) Vòng kháng nấm *Foc TR4* của dịch lên men chủng VNUA116.

3.2.7. Đánh giá hoạt tính kháng nấm *Foc TR4 VCM1520* của chủng xạ khuẩn *VNUA116*

3.2.7.1. Đánh giá tác động của cao chiết chủng xạ khuẩn *VNUA116* đến sinh trưởng và hình thái hệ sợi

Cao chiết xạ khuẩn nồng độ 30 $\mu\text{g/ml}$ được nhỏ lên lam kính chứa sợi nấm *Foc TR4 VCM1520* đang phát triển. Sau 2 ngày nuôi ở 28°C, hình thái sợi nấm được quan sát dưới kính hiển vi quang học có độ phóng đại 400X. Kết quả được thể hiện ở Hình 3.17.



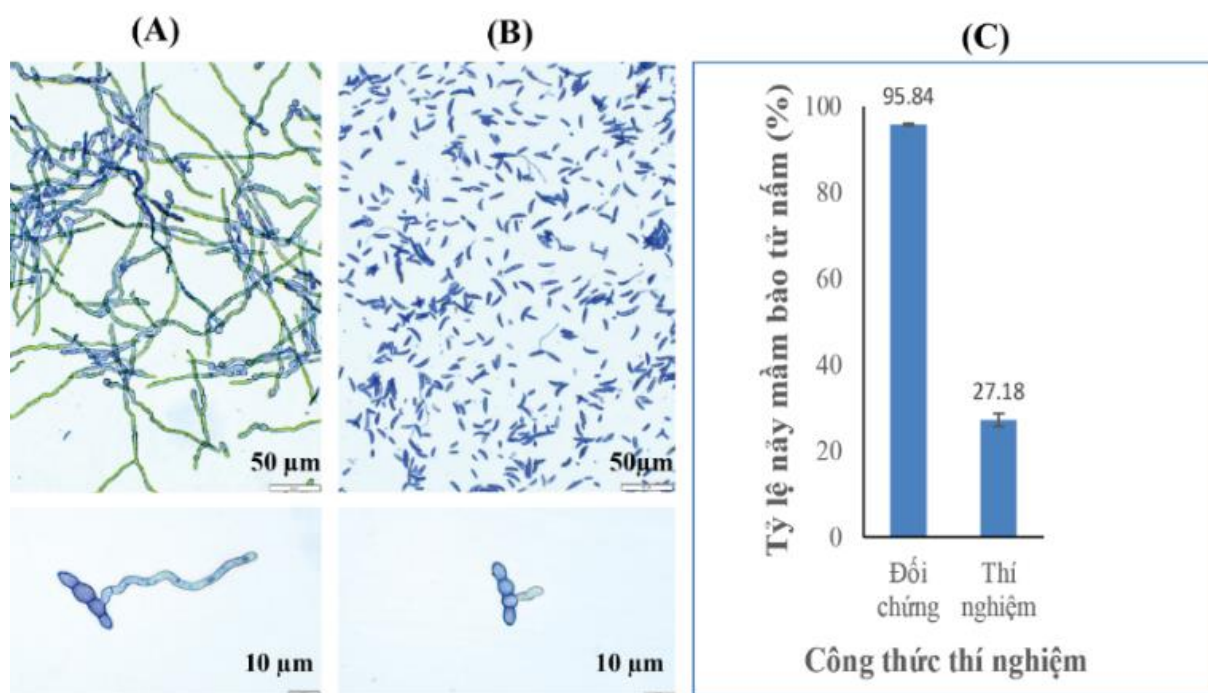
Hình 3.17. Tác động của cao chiết xạ khuẩn đến sự phát triển của nấm *Foc TR4 VCM1520*

(A) Tác động của cao chiết lên sinh trưởng sợi nấm; (B) Tác động của cao chiết lên hình thái sợi nấm.

Kết quả cho thấy, ở mẫu đối chứng nấm *Foc TR4 VCM1520* có hệ sợi mọc đều, hình thái và cấu trúc sợi nấm mọc bình thường, thẳng, đều. Trong khi ở công thức thí nghiệm khi xử lý bằng dịch chiết xạ khuẩn, hình thái sợi nấm có nhiều bất thường, bị biến dạng, bề mặt sợi nấm xù xì, nhiều đoạn sợi nấm bị gãy gập, hình thành các vách ngăn trong hệ sợi nấm.

3.2.7.2. Đánh giá tác động của cao chiết xạ khuẩn đến khả năng nảy mầm của bào tử nấm

Kết quả quan sát hình thái và sự nảy mầm bào tử nấm (Hình 3.18) cho thấy: ở công thức thí nghiệm khi xử lý dịch bào tử với cao chiết xạ khuẩn các bào tử nấm gần như không nảy mầm hoặc ống mầm rất ngắn. Trong khi ở công thức đối chứng, một số bào tử nảy mầm bình thường với ống mầm dài vượt quá chiều dài bào tử, một số bào tử khác được quan sát thấy đang bắt đầu nảy mầm. Điều này chứng tỏ, dịch chiết xạ khuẩn có ảnh hưởng rõ rệt đến khả năng nảy mầm bào tử nấm, ức chế sự nảy mầm của bào tử. Tiến hành đánh giá khả năng ức chế của dịch chiết xạ khuẩn lên sự nảy mầm bào tử nấm *Foc* Tr4 VCM1520 cho thấy dịch chiết xạ khuẩn có khả năng ức chế mạnh (72,82%) sự nảy mầm của bào tử *Foc* TR4 VCM1520 và ảnh hưởng đến khả năng kéo dài ống mầm (Hình 3.48 C) tương đương với khả năng nảy mầm bào tử nấm chỉ đạt 27,18%.



Hình 3.18. Tác động của cao chiết xạ khuẩn VNUA116 đến khả năng nảy mầm bào tử nấm *Foc* TR4 VCM1520

(A) Hình thái bào tử của mẫu đối chứng; (B) Hình thái bào tử của mẫu thí nghiệm;
(C) Tỷ lệ nảy mầm của bào tử nấm *Foc* TR4 VCM1520

Gần đây, nhiều nghiên cứu đã phát hiện ra tiềm năng của một số loài *Streptomyces* trong việc kiểm soát nấm *Foc* gây bệnh trên cây chuối. Qi và cs

(2019) đã báo cáo rằng *Streptomyces huiliensis* sp. nov ức chế sự phát triển của nấm *Foc* TR4 bằng các cơ chế: vừa làm hỏng cấu trúc tế bào của nấm vừa ức chế sự phát triển sợi nấm và sự nảy mầm bào tử nấm [169]. Tương tự, *Streptomyces* sp. WHL7 có cơ chế kháng nấm *Foc* TR4 thông qua việc ức chế sự nảy mầm của bào tử, ngăn chặn sự phát triển của sợi nấm và thay đổi cấu trúc tế bào nấm [206]. So sánh với kết quả công bố của Yun và cs (2021) chất chiết chủng xạ khuẩn 5–10 có tỷ lệ nảy mầm bào tử nấm *Foc* TR4 sau 6h ở mẫu thí nghiệm đạt 27,35% thì chất chiết chủng xạ khuẩn VNUA116 có hoạt lực tương đương với tỷ lệ này mầm bào tử đạt 27,18%. Có thể thấy rằng chủng xạ khuẩn VNUA116 có thể tạo ra các hợp chất thứ cấp có khả năng kháng nấm và giải phóng vào môi trường để ức chế sự hình thành bào tử nấm *Foc* TR4 VCM1520.

Như vậy, có thể thấy rằng cao chiết xạ khuẩn VNUA116 có tác động hạn chế khả năng lây nhiễm của nấm *Foc* TR4 VCM1520 bằng cách làm biến dạng hệ sợi, ức chế sự nảy mầm của bào tử, từ đó làm giảm mức độ gây hại của nấm bệnh.

3.2.7.3. Xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) và nồng độ diệt nấm tối thiểu (MFC)

Để khẳng định khả năng ức chế của cao chiết chủng xạ khuẩn VNUA116 thì việc xác định được nồng độ tối thiểu (MIC) và nồng độ diệt nấm tối thiểu (MFC) lên sinh trưởng nấm *Foc* Tr4 VCM1520 là yêu cầu hàng đầu. Kết quả nghiên cứu này đã xác định được giá trị MIC và MFC của cao chiết đối với nấm *Foc* Tr4 VCM1520 thể hiện tại Bảng 3.7.

Bảng 3.7. Nồng độ ức chế của cao chiết lên sinh trưởng nấm *Foc* TR4 VCM1520.

TT	Thí nghiệm	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	MFC ($\mu\text{g/ml}$)
1.	Cao chiết xạ khuẩn VNUA116	> 6,25	> 30
2.	Nystatin	> 6,25	> 25
3.	Cycloheximide	> 0,052	> 50




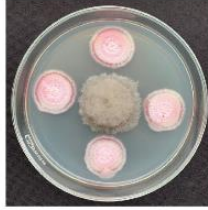
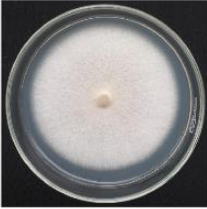






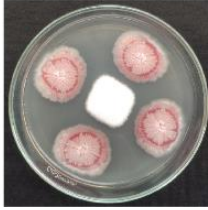
Từ kết quả Bảng 3.7 cho thấy, cao chiết xạ khuẩn VNUA116 có nồng độ MIC (> 6,25 $\mu\text{g/ml}$) tương đương với kháng sinh Nystatin (> 6,25 $\mu\text{g/ml}$) nhưng thấp hơn Cycloheximide (> 0,052 $\mu\text{g/ml}$). Khả năng diệt nấm tối thiểu MFC của cao

chiết xạ khuẩn VNUA116 thấp hơn kháng sinh Nystatin ($> 25 \mu\text{g/ml}$) nhưng cao hơn Cycloheximide ($> 50 \mu\text{g/ml}$). So sánh kết quả công bố của Wei và cs 2020 cũng cho thấy, chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. YYS-7 có khả năng ức chế nấm *Foc* TR4 với giá trị MIC $> 6,25 \mu\text{g/ml}$ và MFC $> 25 \mu\text{g/ml}$, đồng thời chủng YYS-7 cũng thể hiện khả năng kháng nấm *Foc* Tr4 khi thí nghiệm trên chậu vại [208].

3.2.7.4. Đánh giá khả năng kháng nấm phổ rộng của chủng xạ khuẩn VNUA116

Khả năng kháng nấm gây bệnh thực vật phổ rộng rất có ý nghĩa và đóng vai trò quan trọng trong bảo vệ cây trồng, giúp giảm thiểu thiệt hại do các loại nấm bệnh nguy hiểm gây ra. Chủng xạ khuẩn VNUA116 được tiến hành đánh giá hoạt tính đối kháng với các loài nấm gây bệnh phổ biến khác nhau trên thực vật như *C. gloeosporioides*, *C. cassicola*, *F. solani*, *S. rolfsii*, *Diaporthe* sp., và *F. oxysporum*.

Kết quả Hình 3.19 cho thấy rằng chủng xạ khuẩn VNUA116 có khả năng ức chế sự phát triển của tất cả 6 loài nấm gây bệnh khác nhau được thử nghiệm. Tỷ lệ ức chế sự phát triển hệ sợi nấm của các loài nấm gây bệnh được thử nghiệm dao động từ 59,46% đến 98,9%. Trong đó, chủng xạ khuẩn VNUA116 thể hiện tỷ lệ ức chế cao nhất đối với sự phát triển hệ sợi nấm của *Diaporthe* sp (98,9%) - gây bệnh thối thân (thối nõn) chuối. Đồng thời, chủng xạ khuẩn VNUA116 thể hiện khả năng ức chế nấm *F. oxysporum* đạt 71.11%. Những kết quả này cho thấy rằng chủng xạ khuẩn VNUA116 có hoạt tính ức chế phổ rộng đối với các loài nấm gây bệnh khác nhau.

	Đôi chứng	Thí nghiệm	Tỷ lệ đối kháng (%)
<i>C. gloeosporioides</i>			71.25 ± 0.86
<i>C. cassiicola</i>			61.11 ± 0.39
<i>F. solani</i>			59.46 ± 1.89
<i>S. rolfsii</i>			67.50 ± 0.89
<i>Diaporthe sp.</i>			98.96 ± 0.72
<i>F. oxysporum</i>			71.11 ± 4.00

Hình 3.19. Khả năng ức chế một số nấm gây bệnh thực vật của chủng xạ khuẩn VNUA116

Kết quả công bố của Wei và cs (2020) cho thấy chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. YYS-7 thể hiện khả năng kháng nấm gây bệnh phổ rộng trong đó tỷ lệ ức chế cao nhất đối với *C. fallax* ($76,07 \pm 1,97$) và thấp nhất đối với *C. musae* ($51,07 \pm$

1,57), đồng thời chủng *Streptomyces* sp. YYS-7 thể hiện khả năng kháng *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* ($59,25 \pm 1,77$) [208]. Hay công bố của Qi và cs (2019) cũng cho thấy chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. SCA3-4 được phân lập từ vùng rễ cây xương rồng Nopal cũng thể hiện khả năng ức chế 13 loại nấm gây bệnh thực vật với đường kính vòng kháng nấm cao nhất đối với *C. fragariae* ($84,67 \pm 0,58$) và thấp nhất đối với *F. graminearum* ($36,67 \pm 5,77$), chủng *Streptomyces* sp. SCA3-4 cũng thể hiện khả năng kháng nấm *Foc* TR1 nhưng chỉ đạt ($39,67 \pm 0,58$) [169]. So sánh khả năng kháng nấm phổ rộng và tỷ lệ ức chế đối với các chủng nấm gây bệnh thực vật thì chủng xạ khuẩn VNUA116 thể hiện hoạt tính kháng nấm đối với từng chủng nấm gây bệnh được thử nghiệm đều mạnh hơn các chủng xạ khuẩn đã công bố.

Kết hợp với kết quả đánh giá khả năng kháng nấm *Foc* TR4 VCM1520 của chủng xạ khuẩn VNUA116 chỉ ra rõ ràng rằng *Streptomyces lilacinus* VNUA116 có thể được coi như một chủng xạ khuẩn tiềm năng để ngăn ngừa hoặc ức chế các loại nấm gây bệnh khác nhau trên thực vật, đặc biệt là các tác nhân gây bệnh héo *Fusarium* (do *Foc* TR4).

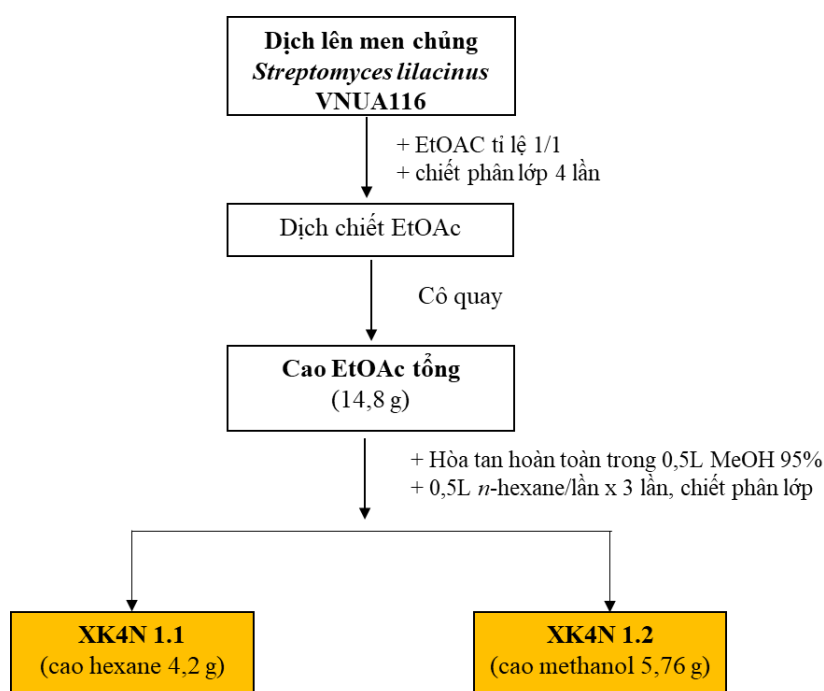
Từ các kết quả của nghiên cứu có thể khẳng định rằng chủng xạ khuẩn VNUA116 có rất nhiều tiềm năng ứng dụng trong sản xuất chế phẩm phòng và điều trị bệnh héo vàng trên cây chuối do nấm *Foc* Tr4 gây ra.

3.3. Phân lập và xác định cấu trúc hóa học các hợp chất từ chủng xạ khuẩn

***Streptomyces lilacinus* VNUA116**

3.3.1. Xử lý mẫu, tạo cặn chiết

Sau khi lựa chọn được các điều kiện lên men chủng *Streptomyces lilacinus* VNUA116 nhằm mục đích thu nhận hoạt chất kháng nấm *Foc* TR4 cao nhất. Quy trình phân lập cặn chiết của chủng xạ khuẩn VNUA116 trình bày tại Hình 3.20. Ký hiệu mẫu là **XK4**



Hình 3.20. Sơ đồ tạo cao chiết tổng chủng xạ khuẩn VNUA116

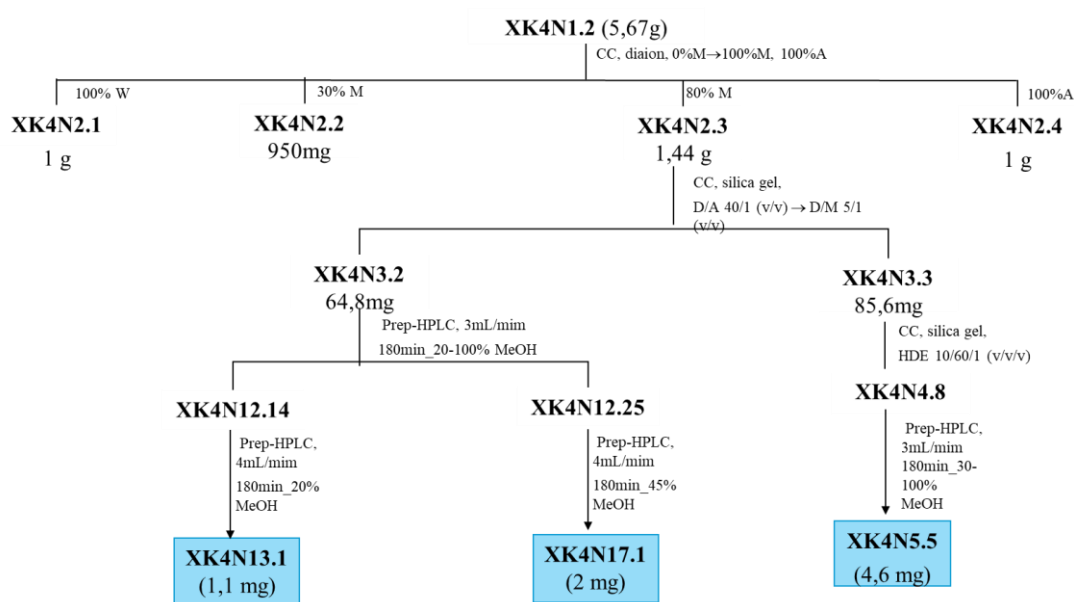
Dịch lên men được chiết phân lớp với ethyl acetate với tỉ lệ 1/1, lặp lại quy trình chiết 4 lần, thu dịch ethyl acetate, cô quay loại dung môi thu được cao chiết tổng ethyl acetate 14,8 g. Cao chiết dạng sệt, màu nâu, có mùi đặc trưng của dịch lên men xạ khuẩn (như mùi mốc hoặc mùi đất ẩm).

Hòa tan cao chiết tổng ethyl acetate (14 g) trong 0,5L methanol 95% sau đó chiết phân lớp với 0,5L *n*-hexane/lần, lặp lại quy trình chiết 3 lần. Tách riêng phần dịch chiết *n*-hexane và methanol 95%, cất quay loại dung môi thu được cao hexane **XK4N 1.1** (4,2 g) và cao methanol **XK4N 1.2** (5,76 g).

3.3.2. Phân lập các chất từ các cặn chiết

Sử dụng các hệ dung môi khác nhau để khảo sát trên sắc ký lớp mỏng (TLC) để phân tách cặn chiết EtOAc. Hệ dung môi dichloromethane/acetone và hệ dichloromethane/methanol cho kết quả tốt nhất. Vì vậy, lựa chọn 2 hệ dung môi này làm dung môi rửa giải cho sắc ký cột. Hệ dichloromethane/acetone (gradient, 40/1, v/v) và hệ dichloromethane/methanol (gradient, 5/1, v/v) được tiến hành kế tiếp nhau.

Sự kết hợp giữa sắc ký cột và sắc ký HPLC điều chế trong phân lập và tinh chế hoạt chất từ dịch lên men xạ khuẩn mang lại hiệu quả cao nhờ khả năng tách chất tốt và tăng cường độ tinh khiết của các hợp chất thu được. HPLC điều chế cho phép xác định chính xác và thu được các phân đoạn có hoạt tính sinh học cao, trong khi sắc ký cột giúp xử lý lượng mẫu lớn hơn và loại bỏ tạp chất hiệu quả hơn. Sự kết hợp này tối ưu hóa quá trình phân lập, đảm bảo thu được các hợp chất với độ tinh khiết cao nhất, đây là một trong những yếu tố quan trọng trong nghiên cứu và phát triển sản phẩm từ vi sinh vật [21].



Hình 3.21. Sơ đồ phân lập chất trong mẫu xạ khuẩn VNUA116

Kết quả phân lập các chất từ cặn chiết tổng chủng xạ khuẩn VNUA116 (Hình 3.21) như sau:

Phân đoạn **XK4N1.2** được rửa giải với hệ dung môi lần lượt là 100% nước, 30% methanol, 80% methanol và 100% acetone thu được các cao phân đoạn tương ứng như sau: **XK4N 2.1** (1 g), **XK4N 2.2** (0,95g), **XK4N 2.3** (1,44 g), **XK4N 2.4** (1 g). Trong quá trình sử dụng bản mỏng TLC để đánh giá triển vọng về thành phần hoá học của các cao chiết, chúng tôi nhận thấy cao chiết phân đoạn 80%M là cao chiết khả quan nhất nên phân đoạn này được lựa chọn để tiếp tục nghiên cứu phân lập hợp chất.

Tiến hành phân lập trên cột sắc ký silica gel, rửa giải với hệ dung môi dichloromethane/acetone từ 40/1 (v/v) đến dichloromethane/methanol 5/1 (v/v) phân đoạn **XK4N2.3** (1,44 g) thu được 16 phân đoạn từ XK4N3.1®XK4N 3.16. Các phân đoạn thu được tiếp tục tiến hành phân lập chất kết hợp giữa phương pháp chấm bản mỏng TLC với sắc ký cột để lựa chọn các phân đoạn có triển vọng dự đoán là các hợp chất thứ cấp có hoạt tính kháng nấm. Các phân đoạn **XK4N3.2** (64,8mg) và **XK4N3.3** (85,6mg) được lựa chọn và xử lý bằng phương pháp sắc ký cột điều chế HPLC với điều kiện sắc ký: cột sắc ký điều chế YMC-Pack ODS-A 250x20mm, 5mm, 8nm, YMC-column 2 ODS-A 250x20mm, 5mm, 12nm; chương trình hệ dung môi methanol – nước (0,1% TFA) gradient từ 10-100% methanol trong 180 phút, tốc độ dòng 3-4 mL/min (các điều kiện với mỗi phân đoạn như sơ đồ Hình 3.8). Kết quả thu được 3 hợp chất như sau:

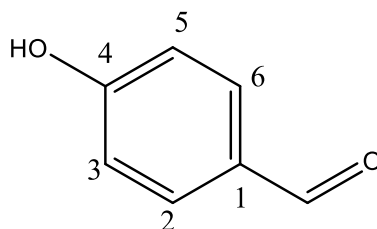
Bảng 3.8. Các hợp chất phân lập được trong dịch lên men chủng xạ khuẩn VNUA116

TT	Tên chất	Trọng lượng chất (mg)	Nhận dạng chất
1.	XK4N13.1	1,1	Chất rắn vô định hình
2.	XK4N17.1	2	Chất rắn vô định hình
3.	XK4N5.5	4,6	Chất rắn vô định hình màu nâu

Các chất này sẽ được tiến hành xác định cấu trúc hóa học bằng các phương pháp phổ kết hợp

3.3.3. Thông số vật lý và dữ liệu phổ của các hợp chất phân lập được từ chủng *Streptomyces lilacinus* VNUA116

3.3.3.1. Hợp chất XK4N13.1: *p*-hydroxybenzadehyde

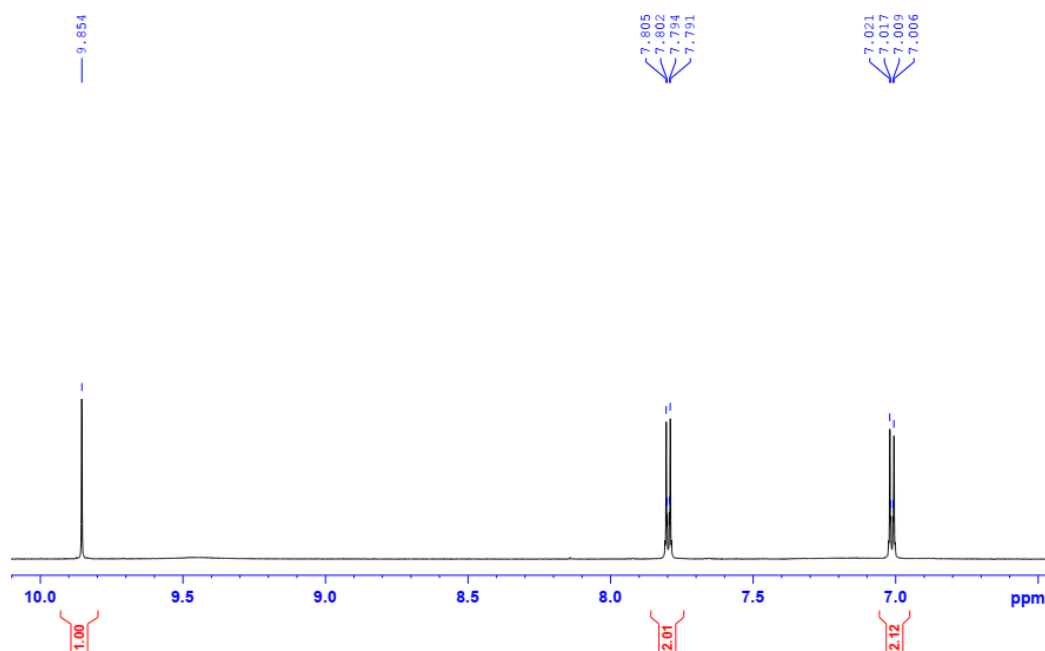


Hình 3.22. Cấu trúc hợp chất XK4N13.1

Hợp chất XK4N13.1 thu được dưới dạng chất rắn vô định hình màu nâu. Có công thức phân tử $C_7H_6O_2$ ($M = 122$).

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, Acetone- d_6): δ 9,85 (1H, s, CHO), 7,81 (2H, d, $J=8,4\text{Hz}$, H-2, H-6), 7,02 (2H, d, $J=9,0\text{ Hz}$, H-3, H-5).

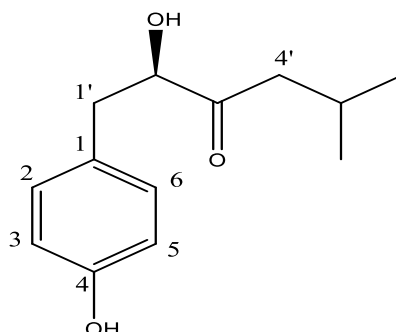
Dữ liệu phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất XK4N 13.1 cho thấy sự xuất hiện của tín hiệu proton trong vùng trường thấp tại 9,85 (1H, s), cho phép dự đoán sự xuất hiện của nhóm -CHO. Xuất hiện 4 tín hiệu proton vòng thơm trong khoảng 7,00 – 8,00 ppm gợi ý về 1 hợp chất benzadehyde 1 nhóm thế tại vị trí para.



Hình 3.23. Dữ liệu phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất XK4N13.1

Kết hợp các dữ liệu phổ NMR và so sánh với tài liệu tham khảo cho phép xác định hợp chất XK4N13.1 là **p-hydroxybenzadehyde** [49].

3.3.3.2. Hợp chất XK4N17.1: **4-Hydroxysattabacin**



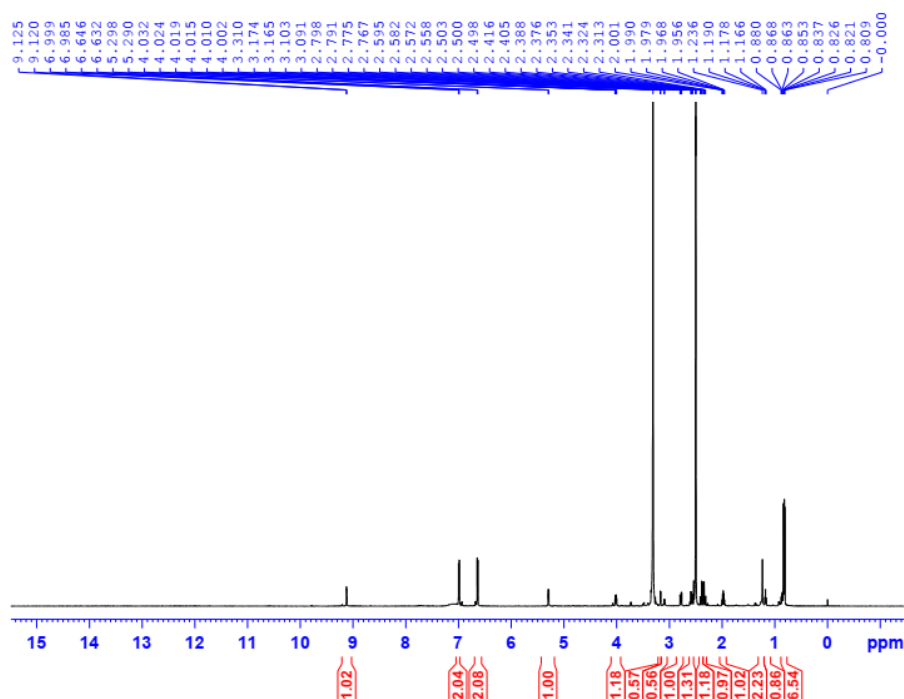
Hình 3.24. Cấu trúc hợp chất XK4N17.1

Hợp chất XK4N17.1 thu được dưới dạng chất rắn vô định hình màu vàng nâu. Có công thức phân tử $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_3$ ($M = 222$)

¹H-NMR (600 MHz, Acetone-*d*₆): δ 6,99 (2H, d, J=8,4 Hz, H-3, H-5), 6,65 (2H, d, J=8,4 Hz, H-2, H-6), 4,03 (m, 1H, H-2'), 2,80 (1H, dd, J = 7,8;4,2 Hz, H-1'a), 2,60 (1H, dd, J = 13,8;7,8 Hz, H-1'b), 2,39 (1H, d, J=7,2 Hz, H-4'a), 2,37 (1H, d, J=7,2 Hz, H-4'b), 2,00 (1H, m, H-5'), 0,88 (6H, m, H-6', H-7').

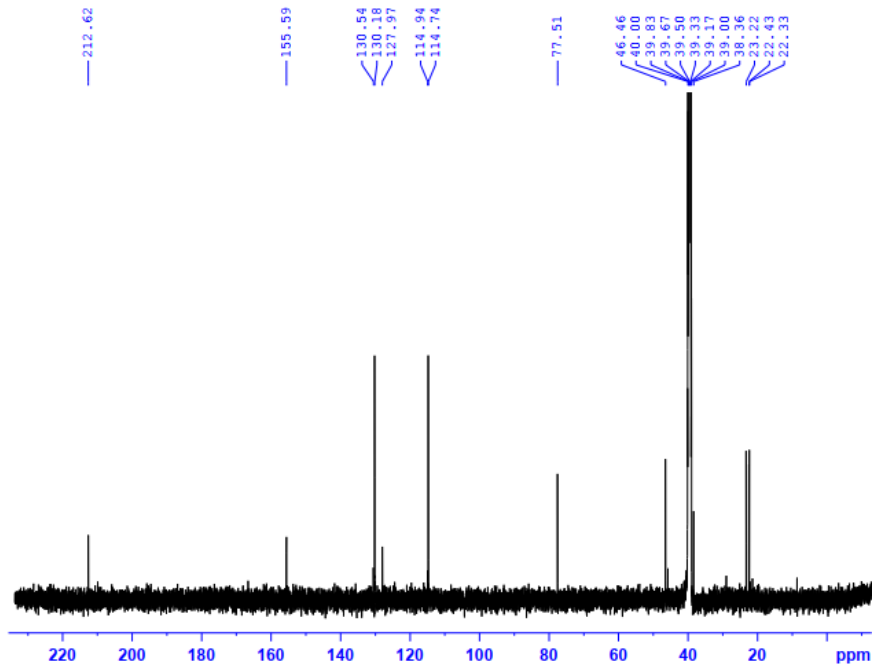
¹³C-NMR (150 MHz, Acetone-*d*₆): δ 212,6 (C-3',C=O), 155,6 (C-4), 130,5 (C-2, C-6), 128,0 (C-1), 114,9 (C-3, C-5), 77,5 (C-2', C-OH), 46,5 (C-4'), 38,6 (C-1'), 23,2 (C-5'), 22,4 (C-6'), 22,3 (C-7').

Phổ ¹H-NMR cho thấy sự xuất hiện proton đối xứng trong khoảng 6,5 – 7,0 ppm gợi ý một vòng benzen 2 vị trí thế ở vị trí 1-, 4-. Ngoài ra, dữ liệu phổ ¹H-NMR xuất hiện 2 proton methine trong đó có 1 proton xuất hiện trong vùng trường thấp tại δ 4,03 (m, 1H, H-2') gợi ý liên kết với nguyên tử O, 1 proton methine còn lại tại δ 2,00 (1H, m, H-5'), 2 tín hiệu proton methylene trong khoảng 2,3 – 3,8 ppm, tín hiệu methyl tại 0,88 (6H, m, H-6', H-7'). (Phụ lục 10.1: Phổ dẫn ¹H-NMR của hợp chất XK4N17.1)



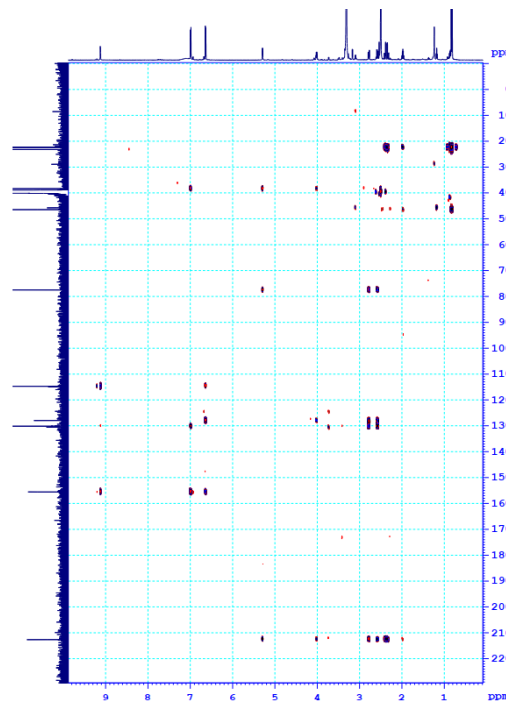
Hình 3.25. Dữ liệu phổ ¹H-NMR của hợp chất XK4N17.1

Dữ liệu phổ ¹³C-NMR cho thấy cộng hưởng cho hai methylene, một carbonyl bão hòa, hai methyl và hai methine (một trong số đó có oxy). Phổ HSQC của hợp chất phù hợp với phổ ¹H-NMR và ¹³C-NMR. (Phụ lục 10.2: Phổ dẫn ¹³C-NMR của hợp chất XK4N17.1)



Hình 3.26. Dữ liệu phổ ^{13}C -NMR của hợp chất XK4N17.1

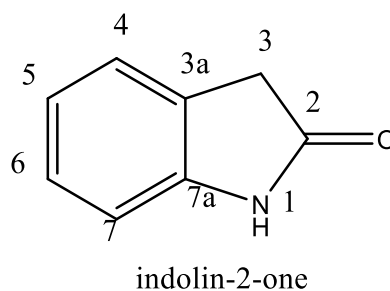
Phổ HMBC cho thấy sự tương tác của proton H-1' với carbon C-1 và C=O, proton H-2' với carbon C-1 và C=O, proton H-4' với carbon C=O cho phép gắn nhóm =O vào vị trí C-3', các tương tác proton H-4' với C=O, C-5', C-6' và C-7' cho phép xác định chuỗi liên kết từ C=O tới C-7'.



Hình 3.27. Dữ liệu phổ HMBC của hợp chất XK4N17.1

Từ các dữ liệu phổ 1D, 2D – NMR kết hợp với tài liệu tham khảo có thể kết luận hợp chất XK4N 17.1 là hợp chất **4-Hydroxysattabacin** [117], [111]

3.3.3.3. Hợp chất XK4N5.5: *Oxindole*



Hình 3.28. Cấu trúc hợp chất XK4N5.5

Hợp chất XK4N5.5 thu được dưới dạng chất rắn vô định hình màu nâu. Có công thức phân tử C_8H_7NO ($M=133$).

1H -NMR (600 MHz, Acetone- d_6): δ 9,28 (1H, s, NH), 7,21 (1H, d, $J = 7,2$ Hz, H-7), 7,17 (1H, td, $J = 7,8; 1,2$ Hz, H-6), 6,94 (1H, td, $J = 7,8; 1,2$ Hz, H-5), 6,88 (1H, d, $J = 7,2$ Hz, H-4), 3,43 (2H, s, H-3).

^{13}C -NMR (150 MHz, Acetone- d_6): δ 206,1 (C-2), 142,6 (C-7a) 128,4 (C-4), 125,3 (C-3a), 124,5 (C-6) (122,2 C-5), 109,9 (C-7), 30,5 (C-3).

Dữ liệu phổ 1H -NMR của hợp chất XK4N 5.5 cho thấy sự xuất hiện của 7 tín hiệu proton trong đó xuất hiện tín hiệu trong vùng trường thấp tại δ 9,28 (1H, s) gợi ý sự xuất hiện của proton gắn với N, xuất hiện 4 tín hiệu proton thơm trong khoảng 6,5 – 7,5 ppm, 1 tín hiệu proton methylenene tại 3,43 (2H, s). Phụ lục 11.1: Phổ dẫn 1H -NMR của hợp chất XK4N5.5)

Từ các dữ liệu phổ kết hợp với tài liệu tham khảo, kết luận được hợp chất XK4N 5.5 là Oxindole [224].

Bảng 3.9. Tính chất các hợp chất phân lập được

TT	Phân đoạn	Tên chất	Công thức hóa học	Hoạt tính sinh học	TLTK
1.	XK4N13.1	p-hydroxybenzadehyde	C ₇ H ₆ O ₂	Kháng khuẩn, kháng nấm, chống ôxy hóa	[34],[211]
2.	XK4N17.1	4-hydroxysattabacin	C ₁₃ H ₁₈ O ₃	Kháng khuẩn, kháng nấm, kháng virus	[162]
3.	XK4N5.5	oxindole	C ₈ H ₇ NO	Kháng khuẩn, kháng nấm, chống ôxy hóa	[104], [109]

Oxindole là nhóm chất dị vòng dẫn xuất của indole đã được Khetmalis và cs chứng minh có liên quan đến các hoạt tính sinh học rất phong phú như: kháng khuẩn, kháng nấm và chống ô xy hóa cả trong điều kiện *in vivo* và *in vitro*. Trong đó, hợp chất aminomethyl-3- cyclohexylthiosemicarbazone-2-indolinone có khả năng kháng nấm, kháng khuẩn và kháng vi-rút, trong khi hợp chất mới 1,3-dihydro-3-hydroxy-3- [2-hydroxyimino-2-(thay thế phenyl) ethyl]-2H-indol-2-one cũng chứng minh khả năng kháng khuẩn và có nhiều tiềm năng kháng nấm [109]. Oxindole cũng đã được công bố tách chiết từ nhiều vi sinh vật như *Streptomyces* sp., *Pseudomonas* sp. và từ xạ khuẩn biển và đều thể hiện hoạt tính kháng ung thư, kháng khuẩn và kháng nấm [186].

4-hydroxysattabacin thuộc nhóm chất peptide đã được Pinzon và cs cũng công bố thể hiện hoạt tính đối kháng nấm *F. oxysporum* f. sp. *dianthi*, *Colletotrichum gloeosporoides* C26 được phân lập từ vi khuẩn *B. cereus* RKHC-09 [162].

Điều này cho thấy chủng xạ khuẩn VNUA116 có tiềm năng ứng dụng trong sản xuất chế phẩm vi sinh kháng nấm khi đã tách chiết, phân lập được 3 chất p-hydroxybenzadehyde, 4-hydroxysattabacin và oxindole là những chất đã có nhiều công bố về các đặc tính sinh học như kháng khuẩn, chống oxy hóa và đặc biệt là hoạt tính kháng nấm *Foc*.

3.4. Phân tích đặc tính di truyền hệ gen chủng xạ khuẩn VNUA116.

3.4.1. Giải trình tự hệ gen chủng xạ khuẩn VNUA116.

Trong nghiên cứu này 2 nền tảng được sử dụng để giải trình tự hệ gen gồm nền tảng PacBio - là một phương pháp giải trình tự đoạn dài- kết hợp với nền tảng DNBSEQ- giải trình tự đoạn ngắn. Việc kết hợp hai nền tảng giải trình tự sẽ cùng lúc có được hai ưu điểm quan trọng và bù trừ lẫn nhau đó là dễ lắp ráp (đối với giải trình tự đoạn dài như PacBio) và chính xác (đối với giải trình tự đoạn ngắn DNBSEQ). Chính vì vậy, việc kết hợp hai nền tảng sẽ là cơ sở cho công tác lắp ráp, hình thành được một hệ gen hoàn chỉnh, ít lỗi cho phép khám phá hệ gen của chủng xạ khuẩn VNUA116 được toàn diện hơn về cấu trúc gen và khả năng sinh hóa của xạ khuẩn. Sự kết hợp này không chỉ tối ưu hóa việc phát hiện các gen và các vùng lặp lại khó xác định mà còn đẩy mạnh khả năng khám phá các sản phẩm thứ cấp có giá trị từ xạ khuẩn.

Bảng 3.10. Thông số hệ gen chủng xạ khuẩn VNUA116 theo nền tảng DNBSEQ

Kích thước chèn vào (bp)	Chiều dài đoạn đọc (bp)	Kích thước dữ liệu thô (Mb)	Tổng các trình tự (read)	Dữ liệu sạch sau khi lọc (Mb)
350	(150:150)	1.314	8.764.210	1.311 (157X)

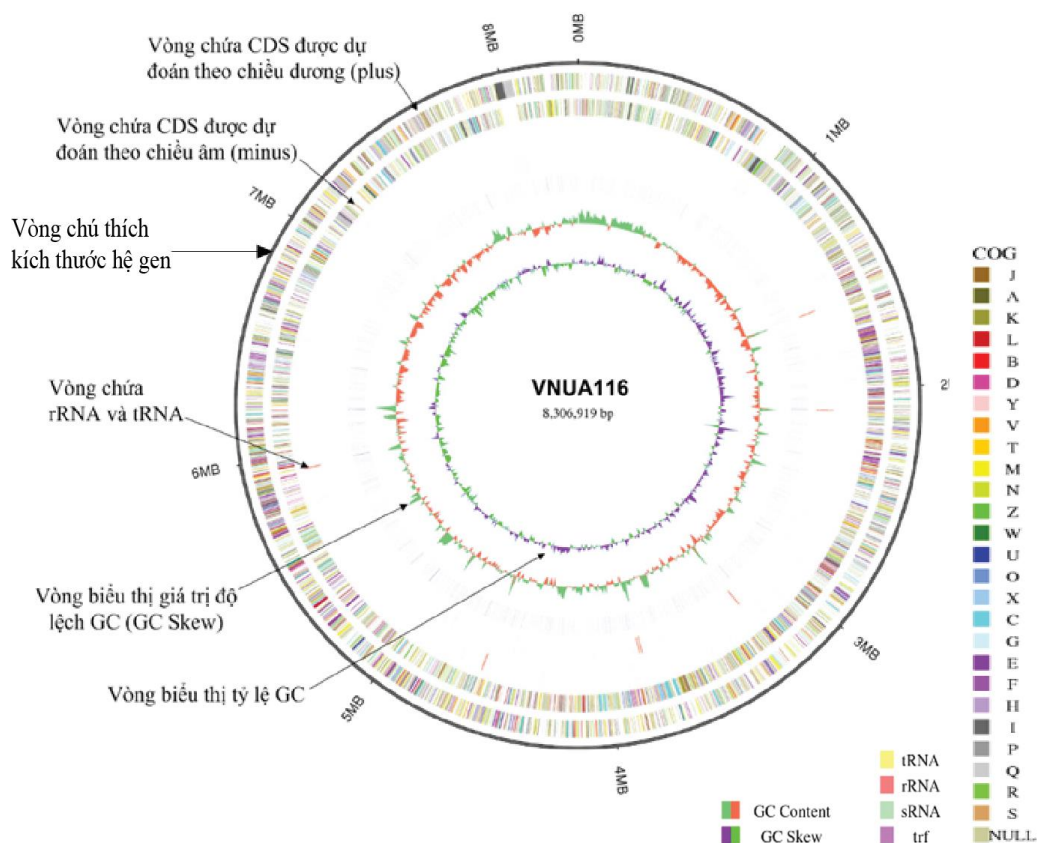
Kết quả Bảng 3.10 cho thấy chủng xạ khuẩn VNUA116 có số trình tự (read) đạt 8.764.210, kích thước trình tự giải được là 1.311 Mb, với số lần che phủ đạt khá cao 157X. Với số lần che phủ đạt được này, khả năng lắp ráp để hình thành bộ genome hoàn chỉnh và ít bị lỗi của chủng xạ khuẩn VNUA116 là hoàn toàn có cơ sở.

Trên nền tảng PacBio, do các subreads có kích thước nhỏ hơn 1000 bp đã bị lọc và loại bỏ nên trình tự nhỏ nhất của subread là 1000 bp. Kết quả trên Bảng 3.11 cho thấy số trình tự (Subreads) của chủng xạ khuẩn VNUA116 là 421.729, số lượng base đạt 3.644.571.672, chiều dài lớn nhất của một subread là 167.462 bp, chiều dài trung bình của Subreads (bp) đạt 8.641. Kết quả trên chứng tỏ các đoạn trình tự giải được có kích thước rất lớn, chất lượng tốt. Đây là điều kiện tiên quyết, thuận lợi cho công tác lắp ráp để hình thành một bộ genome hoàn chỉnh.

Bảng 3.11. Thông số hệ gen chủng xạ khuẩn VNUA116 theo nền tảng PacBio

Số lượng ZWM	Số lượng Subreads	Tổng số bazo trong các Subreads (bp)	Chiều dài trung bình của Subreads (bp)	Giá trị N50 của Subreads (bp)	Giá trị N90 của Subreads (bp)	Chiều dài lớn nhất của Subreads (bp)	Chiều dài nhỏ nhất của Subreads (bp)
59.911	421.729	3.644.571.672	8.641	9.332	6.120	167.462	1.000

Dựa vào dữ liệu từ hai nền tảng giải trình tự, tiến hành lắp ráp hệ gen chủng xạ khuẩn VNUA116. Trình tự sau khi lắp ráp và chỉnh sửa lỗi được phân tích bằng phần mềm Circos. Kết quả cho thấy đã lắp ráp thành công bộ genome của chủng xạ khuẩn VNUA116 hình thành được một bản đồ khép vòng (Hình 3.31).



Hình 3.31. Bản đồ hệ gen chủng xạ khuẩn VNUA116

Từ ngoài vào: Vòng 1 chú thích kích thước hệ gen; vòng 2 và 3 chứa CDS được dự đoán theo chiều dương (plus) và chiều âm (minus). Vòng 4 là các rRNA và tRNA; vòng 5 biểu thị giá trị G+; vòng 6 biểu thị giá trị độ lệch GC (GC skew)

Kết quả lắp ghép *de novo* và chú giải hệ gen cho thấy hệ gen của chủng xạ khuẩn VNUA116 dạng khép vòng, kích thước là 8,306,919 bp, hàm lượng GC đạt 72,49%. Tổng số có 144 RNA trong đó có 21 rRNA, 71 tRNA và 52 sRNA. Trong đó, tổng số trình tự gen mã hóa protein (CDS) là 7.172. Kết quả đánh giá độ hoàn thiện của hệ gen bởi công cụ CheckM cho thấy hệ gen có độ hoàn thiện đạt 99.62% (Accession ASM3052024v1) [158]. Các kết quả đã công bố về trình tự hoàn chỉnh và dự đoán bộ gen của các chủng *Streptomyces*, tỷ lệ % GC dao động từ 66 – 74% [87], [170]. Như vậy, tỷ lệ GC của chủng xạ khuẩn VNUA116 là 72.49% là đặc trưng với *Streptomyces* và phù hợp với các công bố trước đó. Toàn bộ trình tự hệ gen và dữ liệu liên quan của chủng xạ khuẩn VNUA116 đã được lưu trữ tại GenBank (số đăng ký CP130487) và Sequence Read Archive (SRR25317685 và SRR25317686).

3.4.2. Phân tích đặc điểm di truyền hệ gen chủng xạ khuẩn VNUA116.

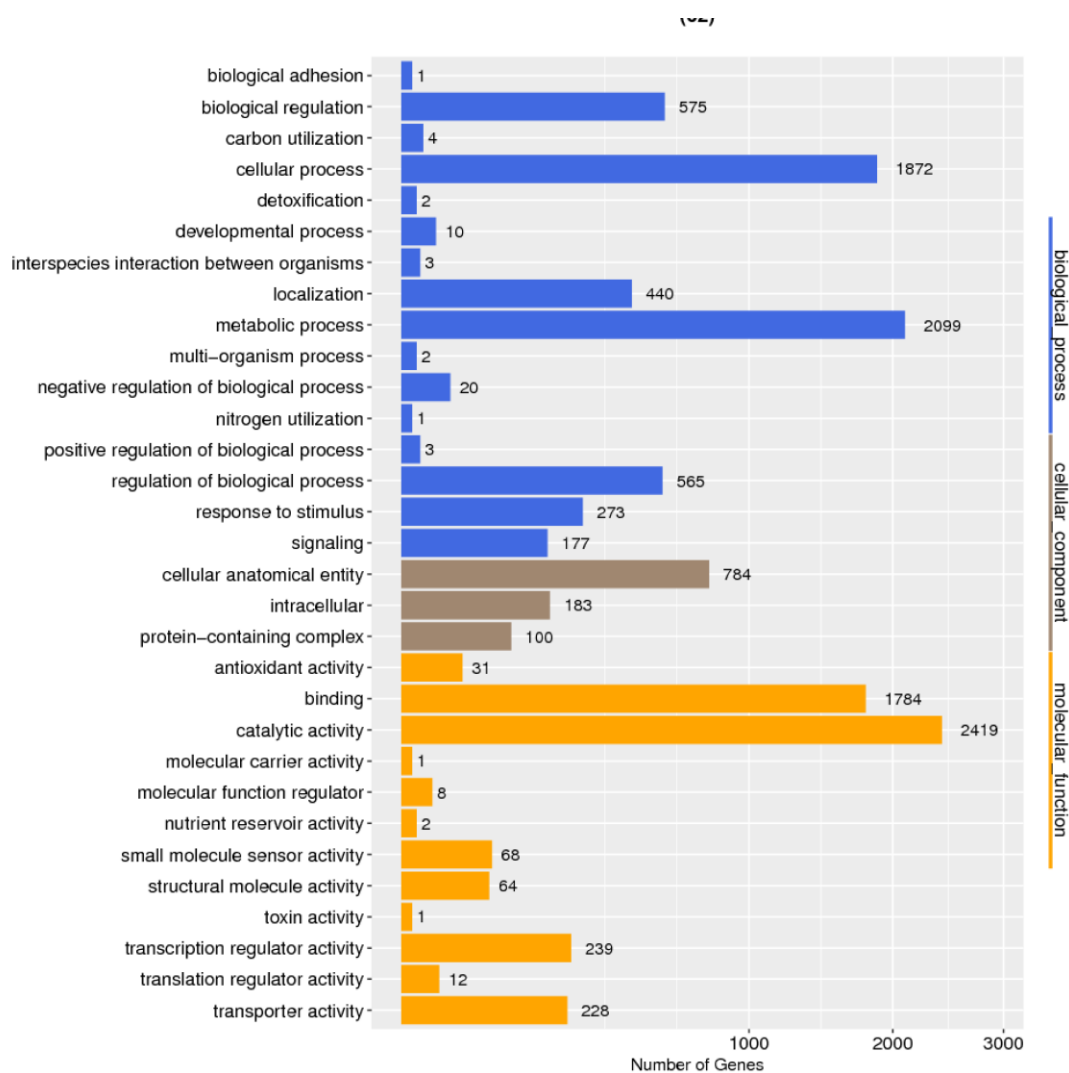
Sử dụng công cụ GenMark để dự đoán gen của chủng xạ khuẩn VNUA116. Kết quả Bảng 3.12 thu được là 7.172 gen. Các ứng dụng RNAmmer, tRNAscan-SE và Rfam được sử dụng để dự đoán và cho kết quả hệ gen VNUA116 có 21 rRNA, 71 tRNA và 52 sRNA.

Bảng 3.12. Đặc điểm hệ gen chủng xạ khuẩn VNUA116

Đặc điểm	VNUA116
Kích thước genome (bp)	8.306.919
Số lượng contig	1
Cấu trúc nhiễm sắc thể	Khép vòng
Số lượng gen	7.172
Hàm lượng G+C (%)	72,49
Số lượng gen mã hóa protein (CDS)	7.172
Số lượng rRNA	21
Số lượng tRNA	71
Số lượng sRNA	52

3.4.2.1. Phân nhóm các gen chức năng trong hệ gen chủng xạ khuẩn VNUA116.

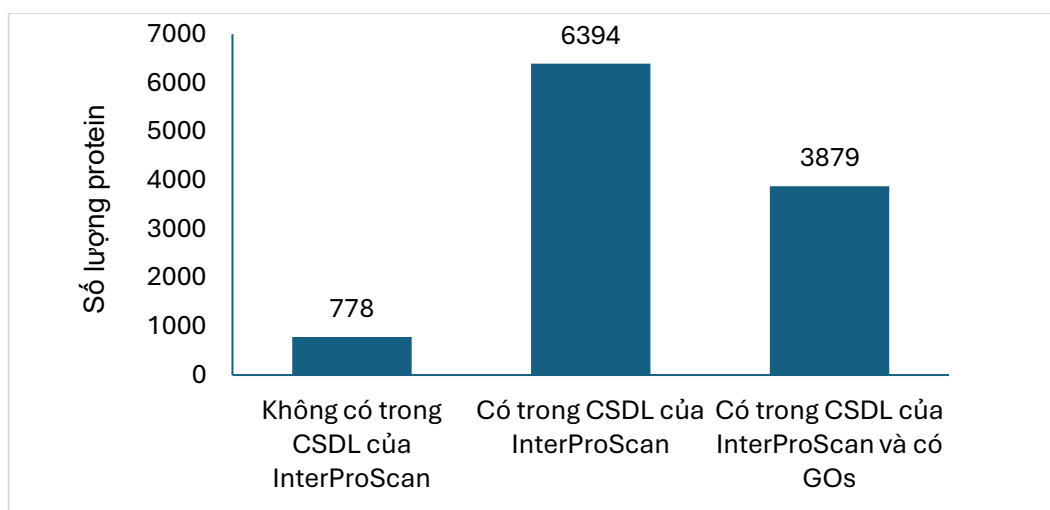
Số liệu thống kê Hình 3.32 cho thấy kết quả phân tích bản thể luận (Gene Ontology - GO) của chủng xạ khuẩn VNUA116 được phân thành ba nhóm chính dựa trên chức năng bao gồm: (1) 1.067 gen mã hóa liên quan đến thành phần tế bào, vị trí trong tế bào (cellular component – CC); (2) 4.857 gen liên quan đến chức năng phân tử (molecular function – MF); và (3) 6.047 gen liên quan đến chu trình sinh học (biological process- BP).



Hình 3.32. Phân loại các nhóm gen chức năng của hệ gen chủng xạ khuẩn VNUA116 trên kết quả chú thích GO

Các gen mã hoá protein chức năng là chỉ tiêu đầu tiên để đánh giá đặc điểm di truyền hệ gen xạ khuẩn. Chủng xạ khuẩn VNUA116 có số lượng gen mã hóa protein (CDS) là 7.172 gen. Sử dụng phần mềm Blast2GO cho phép chú thích chức

năng và phân tích trình tự gen hoặc protein, chúng tôi đã tiến hành so sánh trình tự gen của chủng xạ khuẩn VNUA116 với CSDL và xác định được mức độ tương đồng. Kết quả thống kê Hình 3.18 cho thấy, trong 7.172 gen trong hệ genome của chủng xạ khuẩn VNUA116, có 6394 gen đã được định danh dựa trên CSDL InterProScan. Trong số gen được định danh đó, có 3879 protein đã có chú thích về bản thể luận gen (GO). Như vậy, vẫn còn 778 gen trong hệ gen của chủng xạ khuẩn VNUA116 chưa được định danh. Đây là những cơ sở dữ liệu tiềm năng cần khai thác trong khám phá các con đường trao đổi chất, các cơ chế sản xuất kháng sinh mới của chủng xạ khuẩn VNUA116.

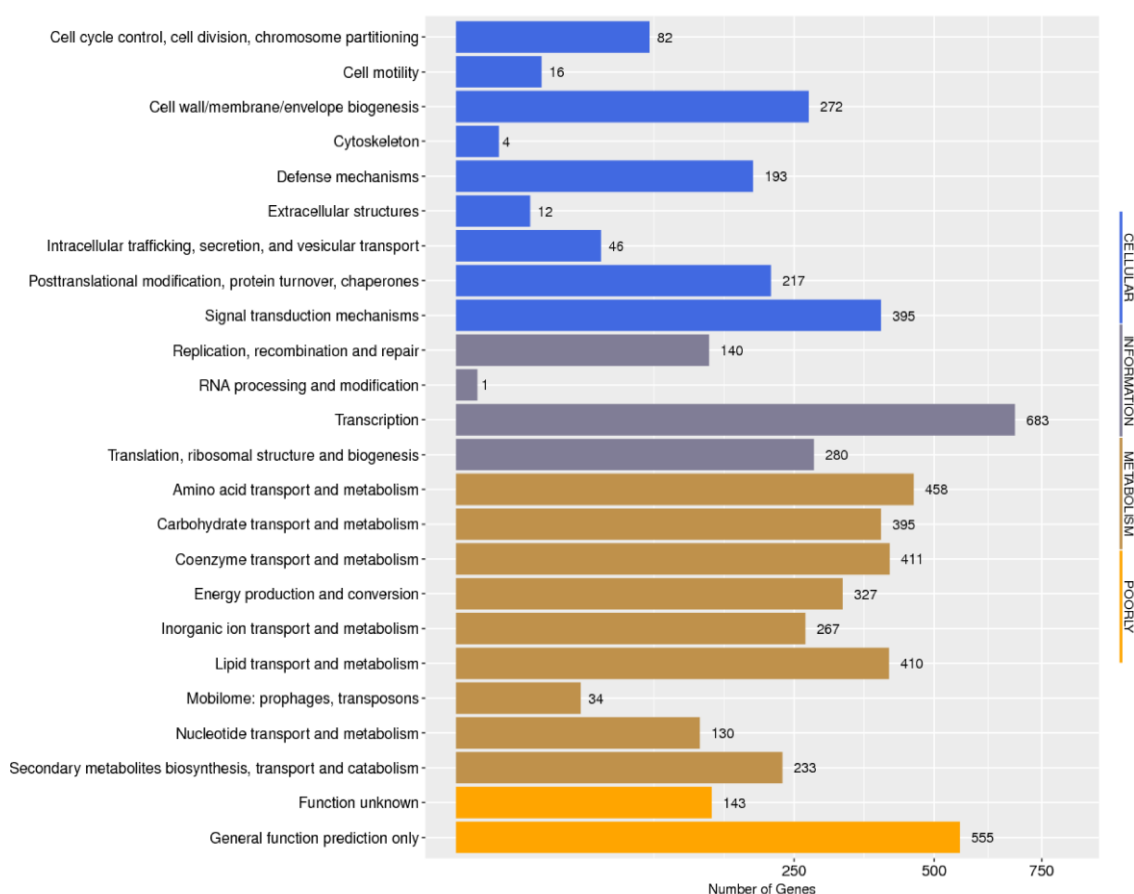


Hình 3.33. Số lượng protein được định danh của chủng xạ khuẩn VNUA116 so sánh với cơ sở dữ liệu của InterProScan

Cơ sở dữ liệu các cụm gen tương đồng (Cluster of orthologous groups - COG) [191] của các protein chủng xạ khuẩn VNUA116 đã được sử dụng để xác định đặc trưng các gen mã hóa protein (CDSs). Tổng cộng có 7.172 gen đã được so sánh với cơ sở dữ liệu COG và được chia thành 4 nhóm chức năng chính: (1) cellular – chức năng tế bào- chức năng liên quan đến phân chia tế bào, vận chuyển chất, và tổ chức tế bào; (2) Information- thông tin và xử lý thông tin- chức năng liên quan đến quá trình sao chép DNA, sửa chữa DNA, dịch mã, và các quá trình liên quan đến RNA và protein; (3) Metabolism- trao đổi chất- chức năng liên quan đến quá trình trao đổi chất như chuyển hóa carbon, nitơ, axit amin, và nucleotide; và (4)

Poorly- chức năng chưa xác định- các protein chưa có chức năng xác định rõ ràng nhưng được xác định thuộc một nhóm nhờ tính tương đồng về cấu trúc hoặc trình tự.

Chi tiết về phân loại chức năng COG của chủng xạ khuẩn VNUA116 được phân vào 24 danh mục. Trong đó, 5 loại chức năng có số lượng gen mã hóa lớn nhất là “phiên mã” (683 gen), tiếp theo là “vận chuyển axit amin và trao đổi chất” (458 gen), “vận chuyển coenzyme và trao đổi chất” (411 gen), “vận chuyển lipid và trao đổi chất” (410 gen) và hai nhóm “cơ chế truyền tín hiệu” và “vận chuyển và chuyển hóa carbohydrate” đều có 395 gen (Hình 3.34).



Hình 3.34. Phân loại các nhóm gen chức năng của hệ gen chủng xạ khuẩn VNUA116 trên cơ sở dữ liệu COG

Cơ sở dữ liệu Cluster of Orthologous Groups (COG) của các protein là một nguồn tài nguyên quan trọng trong nghiên cứu sinh học phân tử và tin sinh học. COG giúp xác định chức năng và vai trò của các protein dựa trên sự bảo tồn tiến

hóa. Việc phân tích các nhóm COG cung cấp cái nhìn sâu sắc về các quá trình sinh học và chức năng của các gen, hỗ trợ việc nghiên cứu gen, protein và quá trình tiến hóa [191].

3.4.2.2. Phân nhóm enzyme trong hệ gen chủng xạ khuẩn VNUA116.

Enzyme đóng một vai trò quan trọng trong hoạt động trao đổi chất, sinh trưởng của xạ khuẩn. Vì vậy, việc phân tích hệ enzyme hoạt động sử dụng công cụ CAZy (Carbohydrate-Active enZYmes) để chú thích và phân loại các enzyme tham gia vào chuyển hóa carbohydrate. CAZy tập trung vào các enzyme như glycosyltransferase, glycoside hydrolase, polysaccharide lyase, carbohydrate esterase và các carbohydrate-binding module.

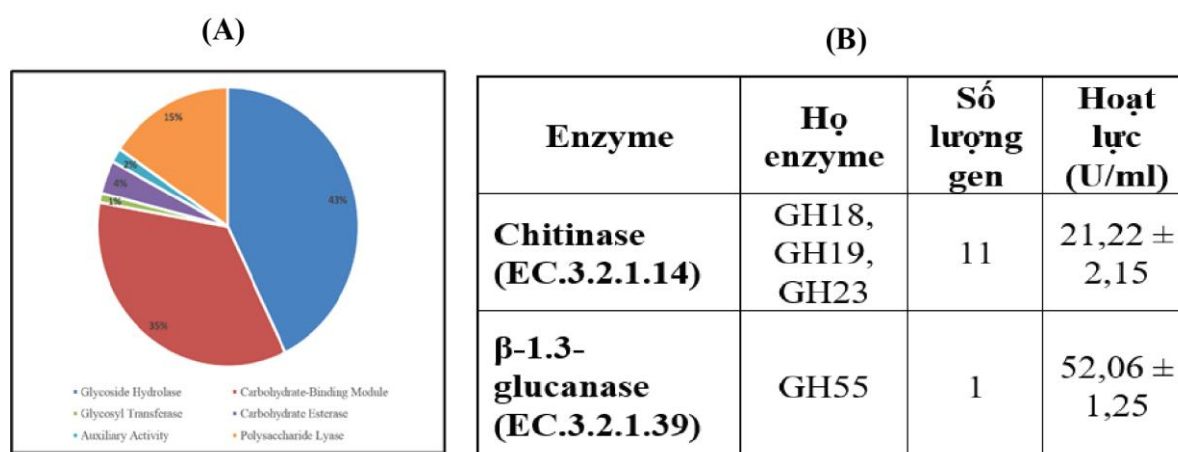
Bảng 3.13. Số lượng các nhóm gen CAZyme của chủng xạ khuẩn VNUA116 (theo CAZy database)

Chức năng các CAZyme	Số lượng gen	Họ CAZyme
Glycoside Hydrolase	77	GH18 (4), GH19 (1), GH92 (1), GH13 (4), GH1 (1), GH101 (1), GH109 (1), GH113 (1), GH114 (2), GH13 (5), GH135 (1), GH15 (2), GH171 (1), GH176 (1), GH178 (9), GH20 (3), GH23 (2), GH25 (2), GH3 (2), GH31 (1), GH33 (1), GH38 (1), GH39 (2), GH4 (2), GH47 (1), GH5 (2), GH55 (1), GH6 (1), GH63 (1), GH65 (2), GH77 (1), GH84 (1), GH85 (1), GH89 (2), GH92 (2), GHnc (10)
Carbohydrate-Binding Module	63	CBM12(1), CBM13(12), CBM2 (2), CBM32 (2), CBM35 (1), CBM48 (4), CBM5 (1), BM50 (1), BM32 (2), BM50 (1)
Glycosyl Transferase	2	GT1 (5), GT11 (4), GT2 (20), GT20 (1), GT28 (2), GT35 (1), GT39 (1), GT4 (15), GT51 (6), GT81 (1), GT83 (2), GT87 (2), GTnc (4)
Carbohydrate Esterase	7	CE14 (2), CE4 (3), CE9 (1), Cenc
Auxiliary Activity	3	AA10 (3)
Polysaccharide Lyase	28	PL8 (1), PLnc (1)

Kết quả Bảng 3.13 cho thấy, số lượng CAZyme được dự đoán của chủng xạ khuẩn VNUA116 là 180 enzyme. Nhóm có số lượng enzyme dự đoán nhiều nhất là GH (Glycoside Hydrolase) (77 enzyme), tiếp theo là nhóm GT (Glycosyl Transferase) (63 enzyme), CBM (Carbohydrate-Binding Module) (28 enzyme). Các nhóm có số lượng enzyme dự đoán thấp hơn gồm có CE (Carbohydrate Esterase) (7 enzyme), AA (Auxiliary Activities) (3 enzyme), PL (Polysaccharide Lyase) (2 enzyme). Các CAZymes được tìm thấy trong tất cả các sinh vật sống và chiếm khoảng 1-3% số lượng gen [96]. Quá trình sinh tổng hợp disaccharides, oligosaccharides và polysaccharides liên quan đến hoạt động của hàng trăm glycosyltransferases (GTs) khác nhau (EC 2.4.x.y). Các enzyme này xúc tác quá trình chuyển các gốc đường từ các phân tử chất cho đã được kích hoạt sang các phân tử chất nhận cụ thể, từ đó hình thành các liên kết glycosid. Các enzyme GH, CBM và GT chịu trách nhiệm tổng hợp (trong thực vật) và phân hủy (trong vi sinh vật) các hợp chất carbohydrate của thành tế bào. Các enzyme disaccharides, oligosaccharides và polysaccharides không chỉ đóng vai trò như nguồn dự trữ năng lượng và cấu trúc mà còn tham gia vào các quá trình nhận dạng tế bào cả bên trong và bên ngoài [96]. Điều này cho thấy sự quan trọng của chúng trong nhiều chức năng sinh học và ứng dụng công nghiệp. Vì vậy, việc chú thích các enzyme trong hệ gen xạ khuẩn giúp các nhà khoa học hiểu rõ hơn về chức năng và cơ chế của các enzyme, đồng thời hỗ trợ nghiên cứu về sinh hóa, cung cấp thông tin về chức năng và cơ chế hoạt động của các enzyme.

Thành tế bào nấm chủ yếu được cấu tạo từ polysaccharide, chiếm 80-90% trọng lượng khô của chúng. CAZymes là các enzyme quan trọng nhất trong việc phân hủy polysaccharide. Các gen chức năng mã hóa CAZymes tham gia vào quá trình phân hủy thành tế bào nấm. Phân tích CAZymes cho thấy rằng bộ gen của chủng xạ khuẩn VNUA116 chứa 180 CAZymes, chiếm 2,51% tổng số gen (Hình 3.35 A). Trong hầu hết các bộ gen của vi khuẩn, CAZymes thường chiếm ít hơn 2% tổng số gen [134]. Bộ gen của chủng xạ khuẩn VNUA116 có tỷ lệ CAZymes cao, cho thấy tiềm năng mạnh mẽ của nó trong việc phân hủy thành tế bào nấm. Cụ thể, nhóm GH của CAZymes trong bộ gen của chủng xạ khuẩn VNUA116 chứa 11 gen

chitinase và 01 gen β -1,3-glucanase (Hình 3.35 B). Đồng thời, kết quả định lượng khả năng sinh các enzyme chitinase và β -1,3-glucanase của chủng xạ khuẩn VNUA116 lần lượt là $21,22 \pm 2,15$ và $52,06 \pm 1,25$ U/ml tương đương với chủng SCA4-21T thể hiện hoạt tính chitinase và β -1,3-glucanase ở mức cao lần lượt là 22,42 và 50,44 U/ml [168].



Hình 3.35. Phân tích các CAZyme của chủng xạ khuẩn VNUA116

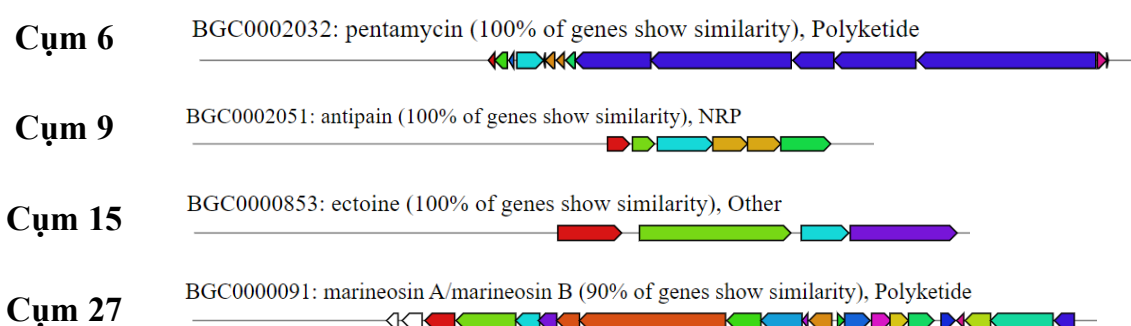
(A) Số lượng các CAZyme; (B) Số lượng các enzyme có khả năng phân hủy thành tế bào nấm

Cơ chế kháng nấm của chủng xạ khuẩn VNUA116 được dự đoán có thể liên quan đến khả năng sản xuất enzyme thủy phân bao gồm β -1,3-glucanase và chitinase. Các enzyme tác động vào các thành phần cấu trúc chính của thành tế bào nấm như β -glucan, chitin từ đó phá hủy thành tế bào nấm và rò rỉ của tế bào, ức chế sự phát triển của nấm gây bệnh thực vật [93]. Các báo cáo tương tự cũng cho thấy *Streptomyces cavourensis* SY224 ngăn chặn sự lây nhiễm của nấm *Colletotrichum gloeosporioides* nhờ khả năng sinh các enzyme thủy phân [120]. Hoạt tính kháng nấm của *Trichoderma harzianum* QTYC77 chống lại *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* có liên quan đến khả năng sinh chitinase và β -1,3-glucanase [223]. Hay dịch nuôi cấy của *Streptomyces violaceusniger* MTCC 3959 thể hiện nhiều hoạt tính kháng nấm chống lại cả nấm thối trắng và thối nâu thông qua khả năng sinh chitinase và β -1,3-glucanase [149]. Anitha và cs (2009) cũng công bố rằng chitinase từ *Streptomyces griseus* có thể ức chế các tác nhân gây bệnh thực vật trong đất như *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Rhizoctonia solani* và

Fusarium solani [24]. Chitinase và β -1,3-glucanase do *Streptomyces cavourensis* SY224 sản xuất có khả năng đối kháng bệnh thán thư trên cây ớt [120]. Với các kết quả định tính, định lượng xác định khả năng sinh các enzyme như amylase, protease, cellulase... có thể thấy rằng khả năng sinh các enzyme đặc biệt là β -1,3-glucanase và chitinase của chủng *Streptomyces lilacinus* VNUA116 được dự đoán liên quan đến khả năng đối kháng với nấm gây bệnh thực vật, đặc biệt là nấm *Foc* TR4.

3.4.3. Các cụm gen sinh tổng hợp hợp chất thứ cấp của chủng xạ khuẩn VNUA116.

Bằng công cụ AntiSMASH, tiến hành phân tích các cụm gen sinh tổng hợp hợp chất thứ cấp (smBGC) của hệ gen chủng VNUA116. Kết quả cho thấy có 44 cụm gen (BGC) mã hoá sinh tổng hợp nhiều nhóm hợp chất thứ cấp, peptide như: Non-ribosomal Peptide Synthetase Gen Clusters (NRPS), Polyketide synthase, terpene, kháng khuẩn, melanin, hợp chất kháng nấm, siderophore, geosmin, carotenoid, osmolyte và terpenes... trong đó mã hóa cho nhiều hợp chất có tính kháng, kháng sinh như: mitomycin, qinichelins, griseobactin, telomycin (Phụ lục 12).



Hình 3.36. Các cụm gen sinh tổng hợp có tỷ lệ tương đồng với các cụm gen đã biết trên 90%

Hình 3.36 cho thấy, cụm gen 6 của chủng xạ khuẩn VNUA116 tương đồng ở mức 100% với cụm gen mã hoá cho PKS-T1 của *Streptomyces* sp. S816 (NCBI GenBank: QQVZ01000001.1). Đây là cụm gen mã hoá cho các gen tham gia vào quá trình sản xuất pentamycin, là một chất thuộc nhóm polyene có tính kháng

khuẩn, kháng nấm đã được Zhou và cs công bố năm 2019 [226]. Cụm gen 9 tương đồng ở mức 100% với cụm gen mã hoá cho NRPS của *Streptomyces* sp. (NCBI GenBank: MT149901.1), chịu trách nhiệm sản xuất antipain- chất ức chế các enzyme protease serine và cysteine. Cụm gen 15 tương đồng ở mức 100% với cụm gen mã hoá cho polyketide từ *Streptomyces* sp., tham gia vào quá trình sinh tổng hợp các hợp chất sinh học như ectoine. Cụm gen 27 tương đồng ở mức 90% với cụm gen mã hoá cho marineosin A/ marineosin B của chủng *Streptomyces* sp. CNQ-617 (NCBI GenBank: KF711829.1). Các cụm gen có độ tương đồng > 80% bao gồm ectoine, geosmin, desferrioxamine E, sapB, xantholipin. Điều này phù hợp với các nghiên cứu trước đây chứng minh cụm gen xantholipi, ectoine, geosmin và sapB có độ bảo thủ cao trong chi *Streptomyces* [207]. Bên cạnh các gen mã hóa cho các chất chuyển hóa có mức độ tương đồng cao (> 90%) thì còn lại rất nhiều cụm gen mã hóa cho các hợp thứ cấp có mức độ tương đồng dưới 20% như dudomycin A (8%), hexacosalactone A (13%), hedamycin (9%), legonindolizidine A6 (12%), sarasinocide (18%), kendomycin B (9%), actonamycin (3%). Điều này cho thấy, bộ gen chủng xạ khuẩn VNUA116 có tiềm năng trong khai thác các chất chuyển hóa thứ cấp mới. Những kết quả này gợi ý rằng chủng xạ khuẩn VNUA116 có khả năng tạo ra các hợp chất mới và được dự đoán là rất đa dạng. Vì vậy, chủng xạ khuẩn VNUA116 mang 44 cụm gen (BGC) mã hoá sinh tổng hợp nhiều chất kháng sinh, khả năng sinh siderophore và các enzyme (chitinase, β -1,3-glucanase)... cũng có thể góp phần giải thích được vì sao chủng này có khả năng kháng nấm *Foc* TR4.

3.4.4. Tìm kiếm con đường liên quan đến sinh tổng hợp hoạt chất kháng nấm của chủng xạ khuẩn VNUA116.

3.4.4.1. Con đường sinh tổng hợp hoạt chất kháng nấm của chủng xạ khuẩn VNUA116.

Xạ khuẩn. *Streptomyces* đầu tiên được giải trình tự toàn bộ bộ gen – với các hợp chất hoạt tính sinh học quan trọng được tạo ra từ chất chuyển hóa thứ cấp – chính là *Streptomyces coelicolor*. Việc khai thác hệ gen của chủng *S. coelicolor* A3(2) đã chỉ ra rằng ngoài 5 hợp chất đã biết, chủng *S. coelicolor* A3(2) có thể tạo ra khoảng 20 hợp

chất khác nhau [38]. Công bố của Bentley và cs cũng cho thấy nhóm xạ khuẩn này vẫn là nguồn phát hiện của các chất chuyển hóa mới có hoạt tính sinh học. Nghiên cứu khác nhau của Becerril và cs năm 2018 cho thấy sự tồn tại của các gen ở trạng thái im lặng trong những điều kiện nhất định chính là những khoảng trống còn thiếu trong việc tìm kiếm các sản phẩm tự nhiên mới [33].

Một số cụm gen được dự đoán liên quan đến sinh tổng hợp hoạt chất kháng nấm của chủng xạ khuẩn VNUA116 bao gồm 7 cụm gen: cụm gen 3 (Sarasinocide), 6 (pentamycin), 14 (peucechelin), 29 (Guanipiperazine A guanipiperazine B), 34 (griseobactin), 35 (Toxoflavin/fervenulin) 41 (niphimycins C-E). Các hợp chất này thuộc nhiều nhóm chất hóa học khác nhau: triterpene glycoside, polyene macrolide, peptide, alkaloid piperazine, alkaloid dị vòng... điều này cho thấy khả năng sinh tổng hợp hoạt chất kháng nấm của chủng xạ khuẩn VNUA116 rất phong phú.

Trong 7 chất kháng nấm được dự đoán này, tiến hành phân tích mô phỏng các cụm gen mã hóa 2 hợp chất là 6 (pentamycin) và cụm 41 (niphimycins C-E) đã được nhiều nhà khoa học công bố có khả năng kháng nấm làm cơ sở khoa học cho các giả thuyết cho phép giải thích được khả năng kháng nấm của chủng xạ khuẩn VNUA116 ở cấp độ gen.

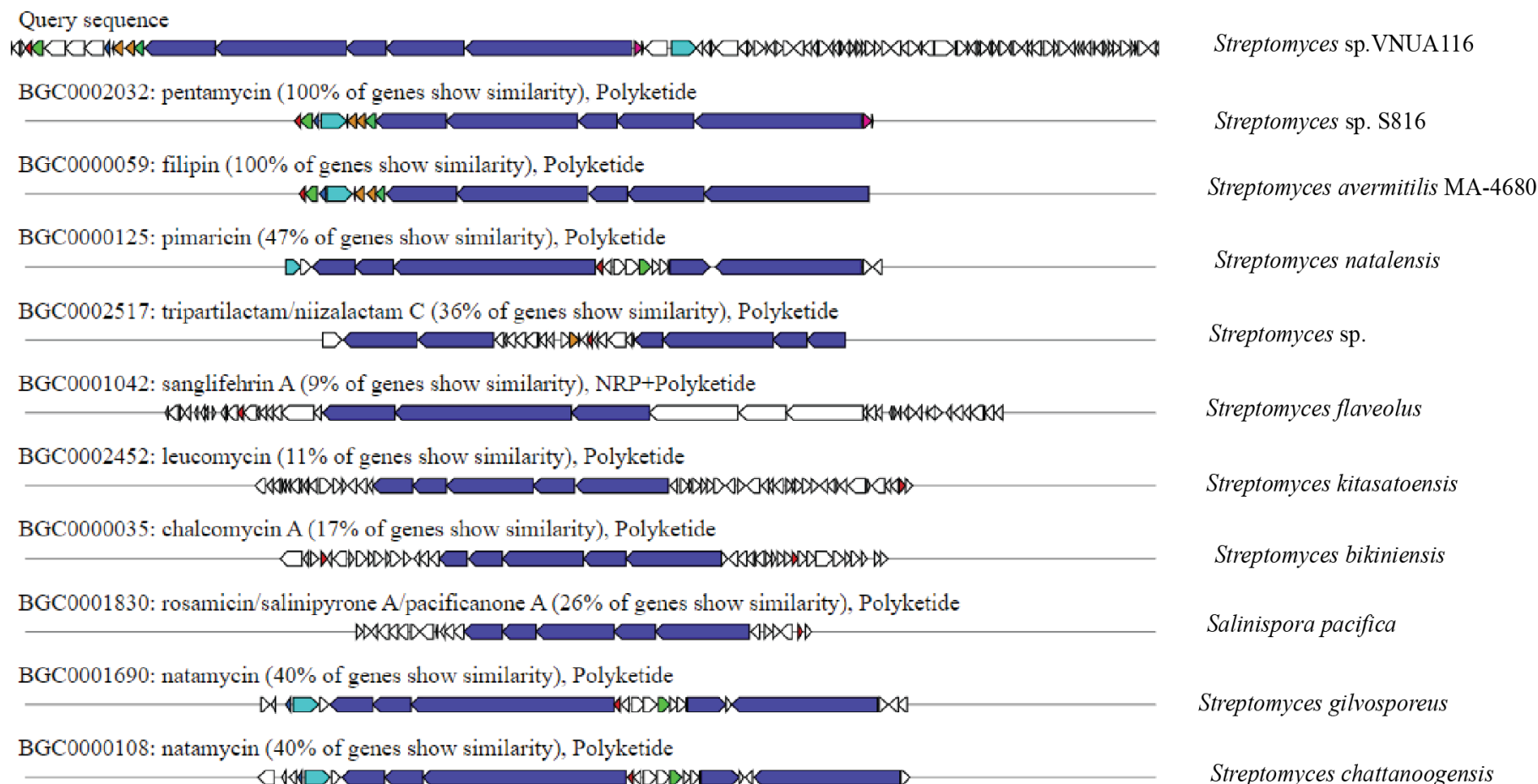
Bảng 3.14. Các cụm gen sinh tổng hợp chất kháng nấm được dự đoán trong hệ gen chủng xạ khuẩn VNUA116

Cụm gen	Kích thước (bp)	Loại cụm gen	Cụm gen tham chiếu	Hoạt tính/Chức năng	Độ tương đồng (%)	Chủng tham chiếu
Cụm 3	22,172	Terpene	Sarasinocide	Chống ung thư, kháng khuẩn, kháng nấm, chống viêm	18	uncultured bacterium ID: 77133
Cụm 6	163,825	T1PKS, transAT-PKS-like, T3PKS	Pentamycin	Kháng nấm	100	<i>Streptomyces</i> sp. S816 ID: 2283197

Cụm 14	48,664	Terpene, NI-siderophore	Peucechelin	Vận chuyển sắt, kháng khuẩn, kháng nấm	25	<i>Streptomyces peucetius</i> sub. sp. <i>caesius</i> ATCC 27952 ID: 316280
Cụm 29	43,126	NRPS-like, terpene	Guanipiperazine A Guanipiperazine B	Chống ung thư, kháng khuẩn, kháng nấm	80	<i>Streptomyces chrestomyceticus</i> ID: 68185
Cụm 34	47,590	T1PKS	Griseobactin	Vận chuyển sắt, kháng khuẩn, kháng nấm	8	<i>Streptomyces albus</i> sub sp. <i>chlorinus</i> ID: 337066
Cụm 35	53,133	T1PKS, betalactone, terpene	Toxoflavin/ferve nulin	Kháng khuẩn, kháng nấm, gây độc tế bào	67	<i>Streptomyces hirosimensis</i> ID: 66424
Cụm 41	48,037	T1PKS, NRPS-like	Niphimycin C-E	Kháng nấm	22	<i>Streptomyces</i> sp. <i>IMB7-145</i> ID: 2070498

Con đường sinh tổng hợp pentamycin cụm gen 6

Trong cụm gen 6 với chiều dài ADN là 163,825 cặp base được dự đoán mã hoá cho các gen trong con đường sản xuất pentamycin - chất kháng sinh thuộc nhóm polyene macrolide có mức độ tương đồng 100% với cụm gen tham chiếu sinh pentamycin từ *Streptomyces* sp. S816. Bên cạnh đó, cụm gen 6 cũng thể hiện độ tương đồng tới 100% với cụm gen sinh chất kháng nấm filipin của *Streptomyces avermitilis* MA-4680, 47% với cụm gen sinh chất kháng nấm pimaricin của *Streptomyces avermitilis* MA-4680 và các chất kháng nấm khác được so sánh với các mức độ tương đồng khác nhau (Hình 3.37).

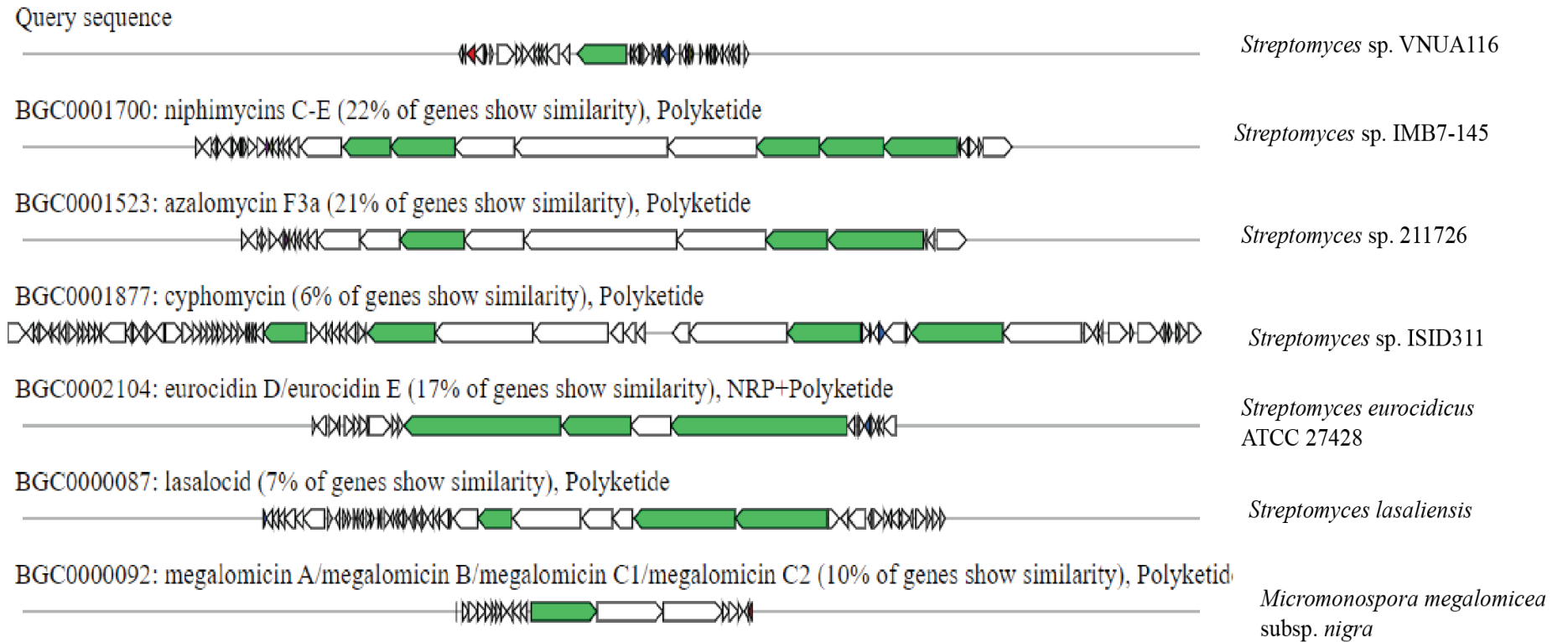


Hình 3.37. Dữ liệu so sánh cụm gen 6 trên MIBiG

Pentamycin là một loại kháng sinh polyene- là một phân nhóm của macrolide- có hoạt tính kháng nấm mạnh. Cơ chế của pentamycin là tác động lên các sterol của màng tế bào, làm thay đổi tính chất màng tế bào, gây mất ổn định màng, khiến các thành phần nội bào như ion và các phân tử nhỏ thoát ra ngoài, dẫn đến sự phá vỡ chức năng tế bào và cuối cùng gây chết tế bào nấm. Cho đến nay, hơn 200 loại kháng sinh polyene macrolide đã được phân lập và xác định đặc điểm như rapamycin, pentamycin, nystatin, filipin và amphotericin B và hầu hết trong số đó được sản xuất bởi chi *Streptomyces* [166]. Điều này càng khẳng định rằng, chủng xạ khuẩn VNUA116 có khả năng kháng nấm khi cụm gen 6 có độ tương đồng 100% với cụm gen mã hóa pentamycin đã được công bố của chủng *Streptomyces* sp. S816.

Con đường sinh tổng hợp Niphimycins C-E cum gen 41

Cụm gen 41 có kích thước 48,037 cặp base được dự đoán là cụm gen sản xuất niphimycins C-E- là kháng sinh thuộc nhóm guanidyl-polyol macrolide có mức độ tương đồng 22% với cụm gen tham chiếu sinh niphimycins C-E của chủng *Streptomyces* sp. IMB7-145. Cụm gen 41 cũng thể hiện mức độ tương đồng với cụm gen sinh chất kháng nấm azalomycin F3a (21%), cyphomycin (6%), eurocidin D/eurocidin E (17%), lasalocid (7%) và megalomicin A/megalomicin B/megalomicin C1/megalomicin C2 (10%) (Hình 3.38).



Hình 3.38. Dữ liệu so sánh cụm gen 41 trên MIBiG

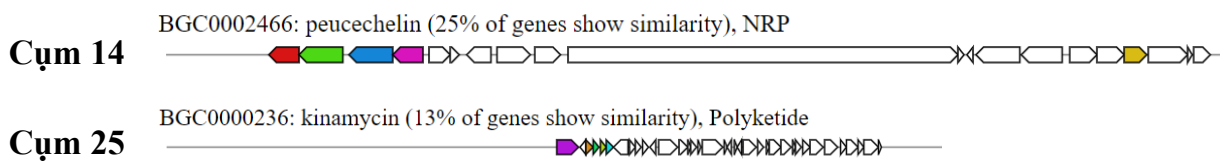
Niphimycins C-E thể hiện khả năng kháng nấm mạnh, đặc biệt chống lại các loại nấm gây bệnh trên thực vật. Cơ chế hoạt động của các hợp chất niphimycins bằng cách can thiệp vào màng tế bào nấm, có thể bằng cách liên kết với các sterol như ergosterol trong màng tế bào nấm, làm rối loạn cấu trúc màng và gây chết tế bào nấm.

Chen và cs (2022) đã công bố niphimycin C thể hiện hoạt tính kháng nấm mạnh đối với *Foc* TR4 với giá trị 1,20 µg/mL đối với EC50 và ức chế sự phát triển sợi nấm và sự nảy mầm bào tử của *Foc* TR4. Đồng thời, niphimycin C gây ra sự mất chức năng của ty thể từ đó gây rối loạn chuyển hóa của tế bào nấm *Foc* TR4 [50]. Kim và cs (2013) công bố Niphimycin thể hiện hoạt tính kháng nấm phổ rộng chống lại *Alternaria mali*, *Aspergillus oryzae*, *Colletotrichum coccodes*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Cercospora canescens*, *Cylindrocarpon destructans*, *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* và *Rhizoctonia solani* ở nồng độ từ 8 đến 64 µg/ml thông qua cơ chế phá vỡ màng tế bào các loại nấm [110].

Con đường sinh tổng hợp siderophore

Siderophores là nhóm các hợp chất do vi sinh vật tổng hợp, có ái lực lớn với sắt và do vậy nó có khả năng thu hút sắt trong môi trường. Chúng đóng vai trò quan trọng trong việc thu nhận và vận chuyển sắt, một yếu tố thiết yếu cho sự phát triển của nhiều loài sinh vật bao gồm cả nấm. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng một số siderophores có hoạt tính kháng nấm mạnh mẽ, không chỉ nhờ việc làm cạn kiệt nguồn sắt mà còn có khả năng trực tiếp ảnh hưởng đến cấu trúc và chức năng của thành tế bào nấm [107]

Phân tích hệ gen của chủng xạ khuẩn VNUA116 cho thấy có 2 con đường sinh tổng hợp siderophore bao gồm: (1) Con đường sinh tổng hợp carboxylate siderophore và (2) Con đường sinh tổng hợp hydroxamate siderophore.



Hình 3.39. Các cụm gen sinh tổng hợp NI-siderophore của hệ gen chủng VNUA116

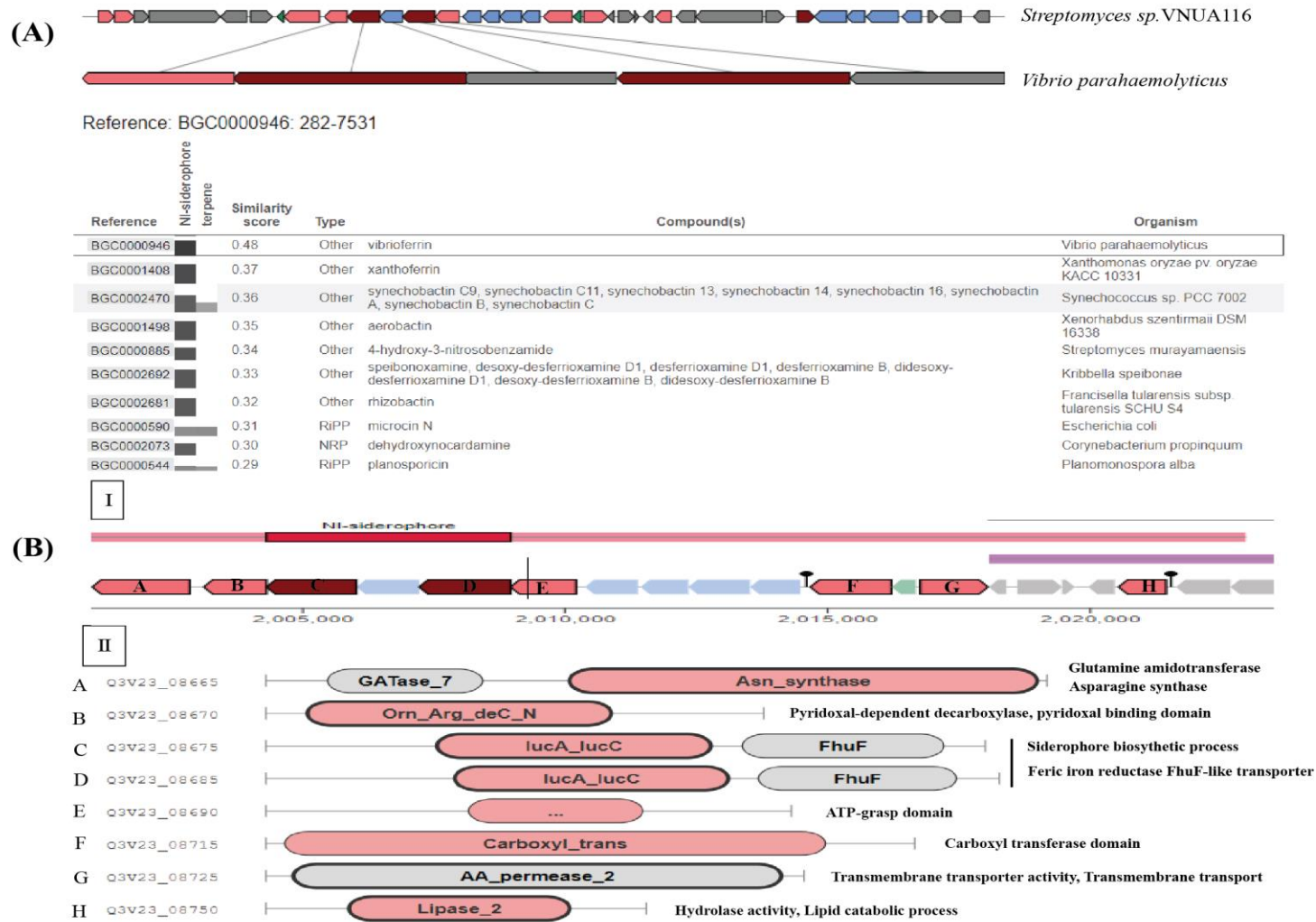
Con đường sinh tổng hợp carboxylate siderophore

Carboxylate siderophore có vai trò quan trọng trong việc thu thập sắt từ môi trường cho hoạt động sống của các vi sinh vật, đặc biệt là những sinh vật sống trong đất hoặc những nơi có nồng độ sắt thấp. Các nhóm carboxylate tạo ra liên kết mạnh mẽ với sắt và cho phép vi sinh vật cạnh tranh hiệu quả trong việc hấp thụ sắt từ môi trường [213].

Con đường sinh tổng hợp siderophore đầu tiên của chủng xạ khuẩn VNUA116 dự đoán được tìm thấy trong cụm gen 14 với chiều dài ADN là 260,763 cặp base. Con đường sinh tổng hợp carboxylate siderophore được dự đoán có liên quan mật thiết tới quá trình sản xuất vibrioferrin- là siderophore được tạo ra từ các chủng vi khuẩn biển *Vibrio parahaemolyticus* - khi so sánh trong cơ sở dữ liệu MIBiG. Bằng cách so sánh các cụm gen đã biết (ClusterBlast) cho thấy có sự tương đồng của con đường sinh tổng hợp carboxylate siderophore của chủng xạ khuẩn VNUA116 với các chủng *Streptomyces eurocidicus* CECT 3259 (100%), *Streptomyces* sp. NRRL B-1677 B1677 XRG (97%), *Streptomyces rectiverticillatus* B15-08 (91%), *Streptomyces hirosimensis* JCM 4586 (78%)... (phụ lục 13.1).

Toàn bộ con đường sinh tổng hợp carboxylate siderophore của chủng xạ khuẩn VNUA116 bao gồm các gen mã hóa cho các enzyme: (1) Glycosyl transferase (Q3V23_08630) được dự đoán tham gia vào quá trình sinh tổng hợp siderophore, đặc biệt trong các con đường cần sự hình thành hoặc chuyển hóa các hợp chất chứa nitrogen, thông qua việc chuyển nhóm amino từ glutamine để sản xuất các tiền chất cần thiết cho việc tổng hợp siderophore không có vai trò trực tiếp trong quá trình sinh tổng hợp siderophore nhưng được dự đoán có thể có liên quan gián tiếp đến việc cung cấp tiền chất và quản lý nguồn nitơ cho tế bào; (2)

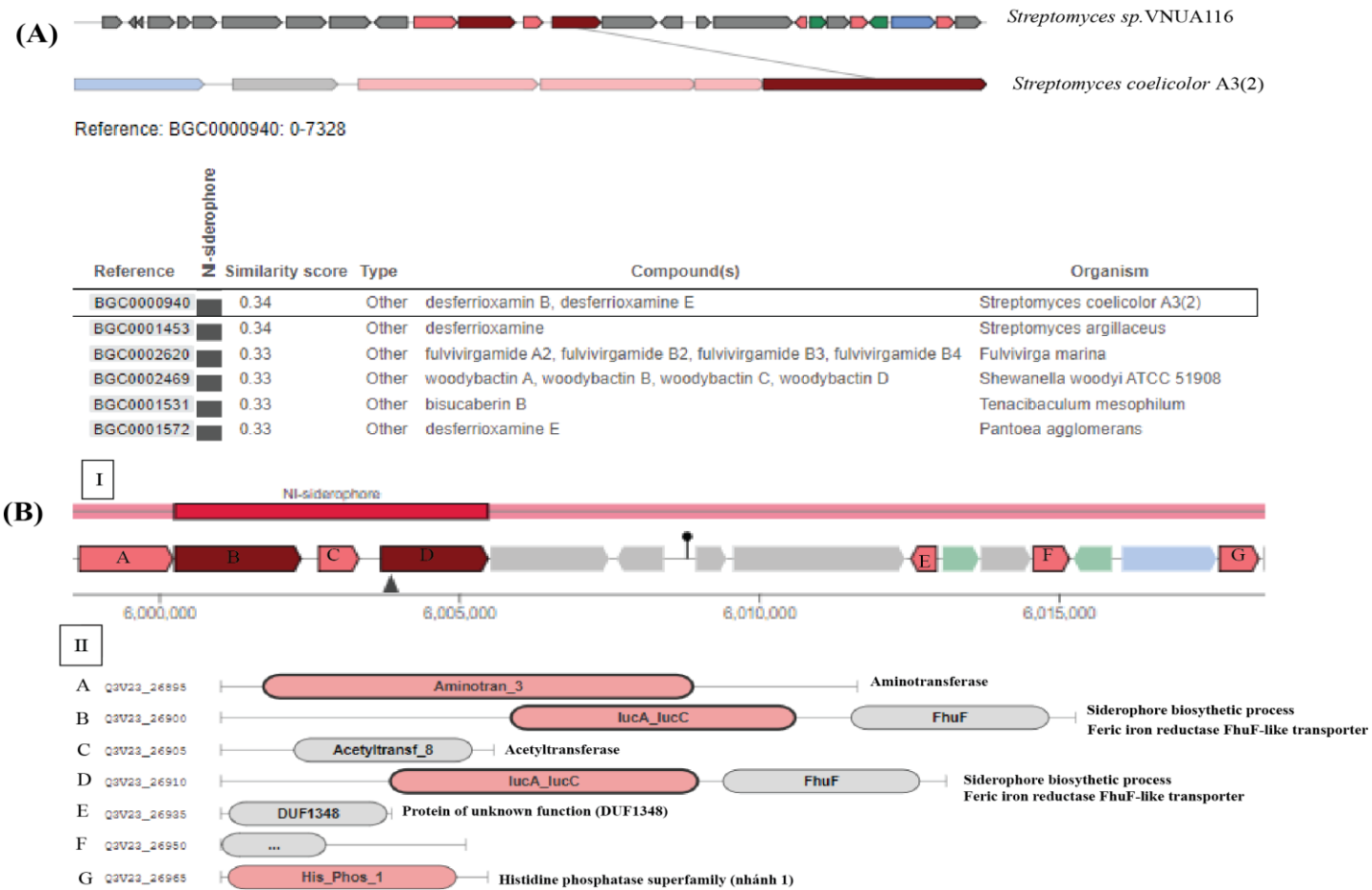
Pyridoxal-dependent decarboxylase và pyridoxal binding domain (Q3V23_08670) được dự đoán có vai trò gián tiếp trong sinh tổng hợp siderophore bằng cách tạo ra các hợp chất chứa nitrogen, thông qua phản ứng khử carboxyl (decarboxylation) liên quan đến các hợp chất chứa nhóm amino của các axit amin từ đó cung cấp các tiền chất cần thiết cho quá trình sinh tổng hợp siderophore; (3) hai họ protein sinh tổng hợp siderophore IucA/IucC (Q3V23_08675, Q3V23_08685) và chất vận chuyển FhuF (Q3V23_08675, Q3V23_08685) có khả năng khử Fe^{3+} thành Fe^{2+} trong các phức hợp siderophore-ferric hydroxamate trong điều kiện môi trường thiếu sắt để sắt trở nên sẵn có cho các quá trình sinh học của vi sinh vật; (4) ATP-grasp domain (Q3V23_08690) một miền protein có vai trò quan trọng trong quá trình sinh tổng hợp siderophore, thông qua việc sử dụng ATP để thúc đẩy các phản ứng hình thành liên kết trong quá trình tạo ra các hợp chất siderophore; (5) Amino acid permease (Q3V23_08725) được dự đoán vai trò vận chuyển các amino acid là các tiền chất quan trọng để tổng hợp các siderophore có thành phần từ các peptide hoặc nhóm chức chứa nitrogen; (6) Hydrolase, activity lipid catabolic process (Q3V23_08750) được dự đoán gián tiếp tham gia vào quá trình sinh tổng hợp siderophore thông qua việc cung cấp năng lượng dưới dạng ATP và các nguyên liệu quan trọng cho quá trình trao đổi chất trong tế bào. (Hình 3.40B)



Hình 3.40. Thông tin các gen mã hóa carboxylate siderophore của chủng xạ khuẩn VNUA116 trên AntiSMASH.
 (A) So sánh giữa cụm gen carboxylate siderophore (các gen màu đỏ thẫm và cam). (B) Cụm gen carboxylate siderophore được xác định dựa trên Pfam. (I) Cụm gen mã hóa carboxylate siderophore trên đoạn mã contig_1.14 từ trình tự toàn bộ bộ gen; (II) các gen mã hóa cho các enzyme tham gia vào quá trình sinh tổng hợp carboxylate siderophore.

Con đường sinh tổng hợp hydroxamate siderophore

Con đường sinh tổng hợp hydroxamate siderophore được tìm thấy trong cụm gen 25 với chiều dài DNA là 33,223 cặp base. Con đường này chứa 6 gen được dự đoán sẽ tổng hợp siderophore có liên quan chặt chẽ đến desferrioxamine B/E (là thành phần chính tạo nên các hydroxamate siderophore và thường được tạo ra bởi các chủng xạ khuẩn *Streptomyces* [205]. Các gen này đã được tìm thấy trong chủng *Streptomyces coelicolor* A3(2), *Streptomyces argillaceus* và *Pantoea agglomerans* (Hình 3.41A). Bằng cách so sánh các cụm gen đã biết (KnownClusterBlast) trong cơ sở dữ liệu MIBiG cho thấy có sự tương đồng của con đường sinh tổng hợp hydroxamate siderophore với chủng *Streptomyces hirosimensis* JCM 4586, *Streptomyces rectiverticillatus* B15-08 ở mức độ 100%, chủng *Streptomyces lateritius* JCM 4389 (92%), *Streptomyces roseolus* JCM 4411 (91%) (phụ lục 13.2). Toàn bộ con đường sinh tổng hợp hydroxamate siderophore của chủng xạ khuẩn VNUA116 bao gồm các gen: (1) một enzyme aminotransferase class-III (Q3V23_26895) có khả năng xúc tác cho phản ứng chuyển nhóm amin trong quá trình tổng hợp amino axit, các tiền chất cần thiết cho việc tổng hợp siderophore; (2) hai họ protein sinh tổng hợp siderophore IucA/IucC (Q3V23_26900, Q3V23_26910) và chất vận chuyển FhuF (Q3V23_26900, Q3V23_26910) có khả năng khử Fe³⁺ thành Fe²⁺ trong các phức hợp siderophore-ferric hydroxamate trong điều kiện môi trường thiếu sắt để sắt trở nên sẵn có cho các quá trình sinh học của vi sinh vật; (3) một acetyltransferase (Q3V23_26905) có vai trò quan trọng trong việc chuyển nhóm acetyl từ phân tử acetyl-CoA đến các phân tử đích hoặc có thể thêm nhóm acetyl vào các protein, từ đó điều chỉnh hoạt động của chúng; (4) DUF1348 -một protein chưa được biết (Q3V23_26935); (5) miền chức năng chưa được xác định (Q3V23_26950) và (6) một protein thuộc họ histidine phosphatase (Q3V23_26965) liên quan đến việc xúc tác các phản ứng thủy phân nhóm phosphate từ các phân tử phosphohistidine hoặc các hợp chất phosphorylated khác. Tuy nhiên, His_Phos_1 không trực tiếp tham gia vào quá trình sinh tổng hợp siderophore [182] (Hình 3.41 B).

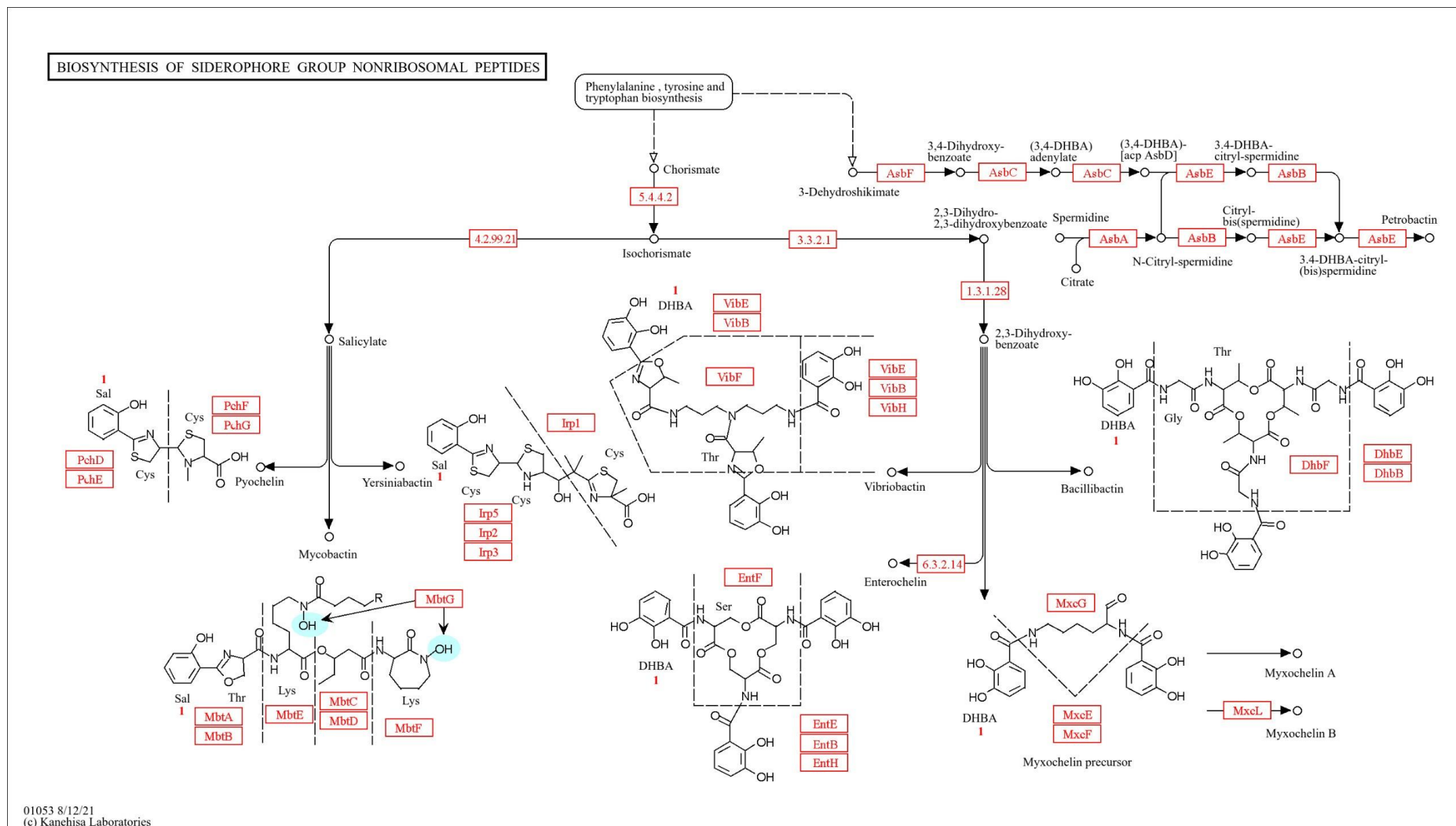


Hình 3.41. Thông tin các cụm gen mã hóa hydroxamate siderophore của chủng xạ khuẩn VNUA116 trên AntiSMASH

(A) So sánh giữa cụm gen hydroxamate siderophore (các gen màu đỏ thẫm và cam). (B) Cụm gen hydroxamate siderophore được xác định dựa trên Pfam. (I) Cụm gen mã hóa hydroxamate siderophore trên đoạn mã contig_1.25 từ trình tự toàn bộ bộ gen; (II) các gen mã hóa cho các enzyme tham gia vào quá trình sinh tổng hợp hydroxamate siderophore

Đồng thời, tiến hành tìm kiếm các trình tự tương đồng của các enzyme mã hóa trên Hình 3.42 cho thấy: đã tìm được 100% các trình tự tương đồng của các enzyme cần thiết trong các pathway sinh tổng hợp siderophore trong hệ gen chủng xạ khuẩn VNUA116. Như vậy, hệ gen chủng xạ khuẩn VNUA116 có đầy đủ các gen để tổng hợp được Mycobactin, Enterochelin, petrobactin, MyxochelinA/B (Hình 3.42).

Với các kết quả tìm kiếm, khai thác hệ gen của chủng xạ khuẩn VNUA116 cho thấy rằng: với các đoạn gen mã hóa cho việc sinh tổng hợp siderophore loại carboxylate và hydroxamate, chứng tỏ khả năng thu nhận sắt từ môi trường khan hiếm sắt của chủng này là rất mạnh mẽ. Việc sở hữu đầy đủ các enzyme cần thiết trong các pathway sinh tổng hợp siderophore, như non-ribosomal peptide synthetases (NRPSs) và các enzyme liên quan đến biến đổi nhóm chức nitrogen, giúp chủng này có thể tổng hợp đồng thời cả hai loại siderophore. Điều này cho thấy chủng xạ khuẩn VNUA116 có thể cạnh tranh hiệu quả với các vi sinh vật khác trong việc hấp thụ sắt, một yếu tố quan trọng cho sự sinh trưởng và phát triển. Theo dự đoán, chủng xạ khuẩn VNUA116 có thể sản xuất siderophore và thích nghi tốt hơn trong các môi trường khan hiếm vi lượng sắt. Bên cạnh đó, việc xác định được hàm lượng siderophore tạo thành trong dịch nuôi cấy chủng xạ khuẩn VNUA116 cho thấy rằng khả năng sinh siderophore không chỉ được dự đoán thông qua các dữ liệu hệ gen mà còn biểu hiện thành kiểu hình. Kết quả này một lần nữa khẳng định chủng xạ khuẩn VNUA116 có tiềm năng ứng dụng trong kiểm soát vi sinh vật gây bệnh và tăng cường khả năng hấp thụ dinh dưỡng của cây trồng.



Hình 3.42. Con đường sinh tổng hợp siderophore của chủng xạ khuẩn VNUA116

Hoạt tính kháng nấm của chủng *Streptomyces* sp. SCA3-4^T có liên quan chặt chẽ đến khả năng sinh siderophore và chiết xuất của nó (terpenoid, este, axit, macrolide) gây ra quá trình tự hủy của tế bào *Foc* TR4 [170]. Khan và cs 2021 đã công bố các siderophore có khả năng cạnh tranh với sắt dạng (Fe^{3+}) qua các thụ thể của các chủng xạ khuẩn sản sinh siderophore. Từ đó, góp phần quan trọng trong việc tăng cường khả năng chống chịu của cây trồng và giảm thiểu nguy cơ mắc bệnh của thực vật. Đồng thời, công bố cũng cho thấy chủng *Brevibacillus brevis* GZDF3 có hoạt tính kháng mạnh đối với nấm *Candida albicans* thông qua việc sản xuất siderophore [107]. Tuy nhiên, một công bố khác của Cao và cs 2005 cũng chứng minh xạ khuẩn *Streptomyces* S96 không thể hiện hoạt tính đối kháng với *Foc* TR4 khi được bổ sung dư sắt ferric [46].

Việc tìm các pathway trong trình tự hệ gen của chủng xạ khuẩn VNUA116 cho thấy chủng này có khả năng đối kháng với nấm gây bệnh thực vật và có ý nghĩa đặc biệt quan trọng trong nông nghiệp và bảo vệ thực vật. Khai thác hệ gen và phân tích các hợp chất chuyển hóa cho thấy chủng xạ khuẩn VNUA116 có tiềm năng lớn trong việc sản xuất các hợp chất thứ cấp. Ngoài việc sản xuất các terpene, siderophore, các enzyme chitinase, β - 1,3 glycanase với cấu trúc đã biết, nhiều cụm gen sinh tổng hợp (BGCs) khác trong hệ gen chủng xạ khuẩn VNUA116 có độ tương đồng thấp (< 20% hoặc không xác định), có thể mã hoá các nhóm gen sinh tổng hợp hợp chất mới chưa được khai thác. Kết quả này cho thấy tiềm năng của chủng xạ khuẩn VNUA116 trong việc sinh tổng hợp các hợp chất chuyển hóa mới.

Bằng cách xác định và hiểu rõ các pathway liên quan đến việc sản xuất các chất kháng nấm, cùng với những kết quả thực nghiệm trong phòng thí nghiệm như khả năng kháng nấm gây bệnh thực vật phổ rộng, kháng khuẩn, sinh siderophore, sinh enzyme β - 1,3 glycanase... của chủng xạ khuẩn VNUA116 sẽ là căn cứ khoa học để chứng minh tiềm năng ứng dụng của chủng xạ khuẩn VNUA116 trong kiểm soát bệnh héo vàng trên cây chuối do nấm *Foc* TR4 gây ra.

KẾT LUẬN

1. Phân lập, lựa chọn được chủng nấm *Foc* TR4 VCM1520 với những đặc điểm gây bệnh héo vàng làm chủng kiểm định trong nghiên cứu.
2. Đã tuyển chọn, xác định đặc điểm sinh học và định danh 3 chủng xạ khuẩn thuộc loài *Streptomyces diastatochromogenes* VNUA27, *Streptomyces decanensis* VNUA30 và *Streptomyces lilacinus* VNUA116. Lựa chọn chủng *Streptomyces lilacinus* VNUA116 có hoạt tính đối kháng *Foc* TR4 VCM1520 mạnh nhất (65%), khả năng sinh các enzyme ngoại bào cao nhất, khả năng sinh chất kích thích sinh trưởng thực vật (IAA) (35,5 µg/ml), khả năng sinh siderophore dạng hydroxamates và một số hoạt tính sinh học tiềm năng khác.
3. Đã phân tách, tinh sạch và xác định cấu trúc 3 chất có tiềm năng kháng nấm là p-hydroxybenzadehyde, 4-hydroxysattabacin và oxindole từ dịch lên men xạ khuẩn *Streptomyces lilacinus* VNUA116.
4. Đã giải trình tự, lắp ráp và dự đoán thành công hệ gen chủng *Streptomyces lilacinus* VNUA116:

- Hệ gen chủng xạ khuẩn *Streptomyces lilacinus* VNUA116 có kích thước genome 8.306.919 bp, số lượng gen 7.172 gen, cấu trúc nhiễm sắc thể dạng khép vòng, tỷ lệ G+C đạt 72,49 %, tổng số RNA đạt 144 (trong đó có 21 rRNA, 71 tRNA và 52 sRNA), số lượng gen mã hóa protein (CDS) là 7.172 gen.

- Số lượng CAZymes được dự đoán của chủng xạ khuẩn *Streptomyces lilacinus* VNUA116 là 180 enzyme. Trong đó, nhóm GH (Glycoside Hydrolase) (77 enzyme), nhóm GT (Glycosyl Transferase) (63 enzyme), nhóm CBM (Carbohydrate-Binding Module) (28 enzyme), nhóm CE (Carbohydrate Esterase) (7 enzyme), nhóm AA (Auxiliary Activities) (3 enzyme) và nhóm PL (Polysaccharide Lyase) (2 enzyme).

- Các cụm gen sinh tổng hợp hợp chất thứ cấp (smBGC): 44 cụm gen mã hóa cho nhiều hợp chất có tính kháng nấm, kháng khuẩn, chống ung thư,

kháng kháng sinh như: pentamycin, mitomycin, qinichelins, griseobactin, telomycin... với mức độ tương đồng khác nhau.

- Tìm kiếm, xác định, dự đoán thành công các pathway liên quan đến hoạt tính đối kháng nấm *Foc* TR4 VCM1520 như: khả năng sinh chất kháng nấm, sinh siderophore, sinh enzyme β - 1,3 glycanase, chitinase... của chủng xạ khuẩn *Streptomyces lilacinus* VNUA116.

KIẾN NGHỊ

1. Nghiên cứu thêm về các hợp chất kháng nấm *Foc* TR4 tiềm năng từ chủng xạ khuẩn *Streptomyces lilacinus* VNUA116, đồng thời định hướng nghiên cứu làm rõ cơ chế di truyền và sinh hóa liên quan đến các đường tổng hợp ba hoạt chất đã được xác định.
2. Nghiên cứu tối ưu hóa các điều kiện lên men quy mô công nghiệp nhằm ứng dụng sản xuất chế phẩm vi sinh và phân bón hữu cơ vi sinh trong phòng trừ bệnh héo vàng trên cây chuối.
3. Thử nghiệm chế phẩm vi sinh kháng nấm *Foc* Tr4 trên mô hình trồng tại một số vùng trồng chuối chuyên canh miền Bắc Việt Nam (Hưng Yên, Phú Thọ...).

DANH MỤC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC CỦA TÁC GIẢ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. **Nguyễn Thị Thanh Mai**, Nguyễn Thanh Hải, Nguyễn Thị Thu, Trần Thị Đào, Nguyễn Xuân Cảnh (2022). Đặc điểm sinh học của chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. VNUA30 có khả năng đối kháng với một số nấm gây bệnh trên cây trồng. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, 20(7), tr. 954-964
2. Đinh Trường Sơn, **Nguyễn Thị Thanh Mai**, Nguyễn Thị Thu, Nguyễn Thanh Hải, Trần Thị Đào, Ngô Thị Vân Anh, Nguyễn Xuân Cảnh (2022). Nghiên cứu đặc tính đối kháng với nấm *Fusarium oxysporum* gây bệnh trên chuối của chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. VNUA27. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, 20(8), tr. 1042-1053
3. **Mai Thi Thanh Nguyen**, Son Truong Dinh and Canh Xuan Nguyen (2023). Complete genome sequence of *Streptomyces* strain VNUA116 a potential biocontrol against phytopathogenic *Fusarium* wilt fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense*. *Microbiology Resource Announcements*, 2023 Nov 7: e0070623, doi: 10.1128/MRA.00706-23
4. **Nguyễn Thị Thanh Mai**, Nguyễn Thị Thu, Trần Văn Tuấn, Phạm Hồng Hiền, Nguyễn Xuân Cảnh (2023). Khảo sát một số đặc điểm sinh học của chủng xạ khuẩn *Streptomyces diastatochromogenes* VNUA27 sử dụng trong kiểm soát nấm bệnh hại cây chuối. *Tạp chí Khoa học Công nghệ Việt Nam (Bản B)*, 65(5): 59-63
5. **Nguyễn Thị Thanh Mai**, Nguyễn Thị Thu, Bùi Xuân Tứ, Trần Văn Tuấn, Phạm Hồng Hiền, Nguyễn Xuân Cảnh, (2024). Xác định điều kiện lên men thích hợp cho chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. VNUA116 nhằm tăng khả năng kháng nấm *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* gây bệnh héo rũ trên cây chuối. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam* 66(6): 22-29.
6. Tam thi thanh Dang^{a#}, **Mai thi thanh Nguyen^{b#}**, thu thi Nguyen^a, hien hong Pham^c, Van-tuan tran^d, Dao thi tran^a and Canh Xuan Nguyen^a (2024). Characterisation of *Streptomyces* sp. VNUA116 with strong antifungal activity

- against *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense tropical race 4 . Archives of Phytopathology and Plant Protection, DOI: 10.1080/03235408.2024.2356710
7. Hien Hong Pham, Dao Thi Tran, Thu Thi Nguyen, **Mai Thi Thanh Nguyen**, Dung Thi Pham, Hoan Van Duong & Canh Xuan Nguyen (2024): Molecular identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*) causing *Fusarium* wilt disease of Tieu hong banana cultivar in the Red River Delta of Vietnam, Archives of Phytopathology and Plant Protection, DOI: 10.1080/03235408.2024.2366547.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

I. Tài liệu tiếng Việt

1. Vũ Thị Phương Bình, Trương Thị Nhàn Lê Hữu Chí và Trần Ngọc Khánh (2021), "Một số kết quả nghiên cứu bệnh héo vàng hại cây chuối tây (bệnh panama) tại huyện Phong Thổ tỉnh Lai Châu", *Bảo vệ thực vật*. 2.
2. Nguyễn Lâm Dũng, Nguyễn Đăng Đức, Đặng Hồng Nguyên, Phạm Văn Ty, Nguyễn Vĩnh Phước và Nguyễn Phùng Tiên (1976), "Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học ", *NXB Khoa học kỹ thuật*. Tập 2
3. Bùi Thị Việt Hà (2006), "Nghiên cứu xạ khuẩn sinh chất kháng sinh chống nấm gây bệnh thực vật ở Việt Nam", *Luận án tiến sỹ sinh học, ĐHKHTN HN*.
4. Đỗ Thu Hà (2015), "Nghiên cứu tuyển chọn các chủng nấm Trichoderma có khả năng đối kháng mạnh với nấm bệnh *Fusarium* gây bệnh héo vàng chuối tại huyện Đại Lộc, tỉnh Quảng Nam", *Khoa học và Công nghệ*. 3(88), tr. 104.
5. Nguyễn Văn Hiếu, Nguyễn Phương Huệ, Vũ Thị Hạnh Nguyên, Phan Thị Hồng Thảo, Phạm Thanh Huyền và Phí Quyết Tiến (2013), "Nghiên cứu chủng xạ khuẩn HLD 3.16 có hoạt tính kháng khuẩn phân lập từ vùng ven bờ biển Việt Nam", *Vietnam Journal of Science Technology*. 51(1), tr. 29.
6. Đinh Anh Hòa, Nguyễn Thị Ánh Nguyệt, Trần Thùy Trang, Trần Thị Phấn và Hà Thị Loan (2021), "Phân lập và tuyển chọn các chủng xạ khuẩn tại tỉnh Lâm Đồng có hoạt tính kháng *Pythium vexans* gây bệnh thối rữa trên rau ăn lá họ thập tự", *Tạp chí Khoa học*. 16(1), tr. 79.
7. Võ Duy Hoàng, Hà Huỳnh Hồng Vũ, Nguyễn Thị Pha Ly và Nguyễn Thị Ngọc Lành (2024), "Đánh giá khả năng đối kháng của một số chủng xạ khuẩn đối với nấm *Fusarium minilyforme* trong điều kiện nhà lưới", *Tạp chí Khoa học Đại học Đồng Tháp*, 13(2), p. 41.
8. Hoàng Thị Hồng và Nguyễn Ngọc Phương (2013), "Phân lập và tuyển chọn chủng xạ khuẩn từ rừng ngập mặn Cần Giờ kháng nấm *Fusarium sp*", *Tạp chí Khoa học*(51), tr. 59.

9. Trần Ngọc Hùng, Đỗ Thị Vĩnh Hằng và Nguyễn Đức Huy (2020), "Bệnh héo vàng (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*) hại chuối tiêu tại Việt Nam", *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*. 18(5), tr. 315.
10. Lê Thị Hiền, Đinh Văn Lợi, Vũ Thị Vân, Nguyễn Văn Giang (2014), "Phân lập và tuyển chọn các chủng xạ khuẩn (*Streptomyces* spp.) đối kháng nấm bệnh cây", *Khoa học và Phát triển*, 12.
11. Lê Thị Tường, Đặng Phan Kỳ Duyên, Đặng Thị Kim Uyên, Nguyễn Văn Hòa, Trần Thị Oanh Yên (2019), "Xác định tác nhân và hiệu quả một số loại thuốc trừ bệnh đối với tác nhân gây bệnh thối rễ panama trên cây chuối ở điều kiện phòng thí nghiệm", *Tạp chí Khoa học Công nghệ nông nghiệp Việt Nam*, 10 (107), p. 118
12. Lê Thị Loan (2024), "Đặc điểm sinh học, di truyền và phòng chống sinh học nấm *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) gây bệnh héo vàng chuối ở miền Bắc Việt Nam.", *Luận án tiến sĩ*, Học viện Nông nghiệp Việt Nam.
13. Nguyễn Thị Thanh Mai, Nguyễn Thị Thu, Trần Văn Tuấn, Phạm Hồng Hiên và Nguyễn Xuân Cảnh (2023), "Khảo sát một số đặc điểm sinh học của chủng xạ khuẩn *Streptomyces diastatochromogenes* VNUA27 sử dụng trong kiểm soát nấm bệnh hại cây chuối", *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*. 65(5), tr. 59.
14. Nguyễn Hoàng Nhật Tân, Hà Thị Trúc Mai, Lương Thị Thùy Dương, Nguyễn Vũ Phong (2023), "Đặc điểm sinh học và khả năng ức chế của chủng xạ khuẩn *Streptomyces rochei* BT02 đối với vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* gây bệnh héo xanh", *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam* 65(7), p. 67
15. Chu Bá Phúc, Nguyễn Văn Khiên (2000), "Nghiên cứu khả năng thích ứng và sự phân bố của *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* ở miền Bắc Việt Nam", *Nông nghiệp công nghiệp thực phẩm* (9), tr. 416.
16. Nguyễn Kim Phi Phụng (2007), *Phương pháp cô lập hợp chất hữu cơ*, chủ biên, Đại học Quốc gia Hà Nội.

17. Vũ Thị Quyên, Vũ Thị Thu Huyền và Nguyễn Mai Anh (2021), "Phân lập, sàng lọc và định danh một số chủng xạ khuẩn có khả năng kháng vi sinh vật kiểm định và gây độc tế bào từ các mẫu trầm tích vùng biển vùng áng tại Hà Tĩnh", *Tạp chí công nghệ sinh học*, tr. 557.
18. Tăng Thị Chính, Lý Kim Bảng (2005), "Đặc điểm phân loại của ba chủng xạ khuẩn có khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh héo xanh ở cây cà chua và cây dưa hấu", *Tạp chí Sinh học*, 27(1), p. 39.

II. Tài liệu tiếng Anh

19. Abu-Salah, KM (1996), "Amphotericin B: an update", *British journal of biomedical science*, 53(2), p. 122.
20. Aguayo, Jaime, Cerf-Wendling, I, Folscher, Alexander Bart, Fourier-Jeandel, Céline, Ioos, Renaud, Mathews, MC, Mostert, Diane, Renault, Camille, Wilson, Veronique, and Viljoen, Altus (2021), "First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4 (TR4) causing banana wilt in the Island of Mayotte", *Plant Disease*, 105(1), p. 219.
21. Akash, Muhammad Sajid Hamid and Rehman, Kanwal (2020), "Column Chromatography", *Essentials of Pharmaceutical Analysis*, Springer Nature Singapore, p. 167.
22. Alblooshi, Aisha A, Purayil, Gouthaman P, Saeed, Esam Eldin, Ramadan, Gaber A, Tariq, Saeed, Altaee, Amna S, El-Tarabily, Khaled A, and AbuQamar, Synan F (2021), "Biocontrol potential of endophytic actinobacteria against *Fusarium solani*, the causal agent of sudden decline syndrome on date palm in the UAE", *Journal of Fungi*, 8(1), p. 8.
23. Allure, Nandini, Madhusudhan, DN, and Agsar, Dayanand (2015), "Detection of keratinolytic Actinobacteria and evaluation of bioprocess for production of alkaline keratinase", *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4, p. 907.

24. Anitha, A and Rebeeth, MJAJPS (2009),"In vitro antifungal activity of *Streptomyces griseus* against phytopathogenic fungi of tomato field", *Academic Journal of Plant Sciences*, 2(2), p. 119.
25. Antinori, Spinello, Milazzo, Laura, Sollima, Salvatore, Galli, Massimo, and Corbellino, Mario (2016),"Candidemia and invasive candidiasis in adults: A narrative review", *European journal of internal medicine*, 34, p. 21.
26. Ara, A, Akram, A, Ajmal, M, Akhund, S, Nayyar, BG, Seerat, W, and Chaudhry, SM (2017),"Histopathological studies of sesame (*Sesamum indicum*) seedlings infected with *Fusarium oxysporum*", *Plant Pathology Quarantine*, 7(1), p. 82.
27. Awla, Hayman Kakakhan, Kadir, Jugah, Othman, Radziah, Rashid, Tavga Sulaiman, Hamid, Sathyapriya, and Wong, Mui-Yun (2017),"Plant growth-promoting abilities and biocontrol efficacy of *Streptomyces* sp. UPMRS4 against *Pyricularia oryzae*", *Biological Control*, 112, p. 55.
28. Baakza, Arefa, Vala, AK, Dave, BP, and Dube, HC (2004),"A comparative study of siderophore production by fungi from marine and terrestrial habitats", *Journal of Experimental Marine Biology Ecology*, 311(1), p. 1.
29. Babitskaya, VG, Shcherba, VV, and Lkonnikova, NV (2000),"Melanin complex of the fungus *Inonotus obliquus*", *Applied Biochemistry Microbiology*, 36, p. 377.
30. Baltz, Richard H (2010),"Genomics and the ancient origins of the daptomycin biosynthetic gene cluster", *The Journal of antibiotics*, 63(8), p. 506.
31. Baranasic, Damir, Gacesa, Ranko, Starcevic, Antonio, Zucko, Jurica, Blažič, Marko, Horvat, Marinka, Gjuračić, Krešimir, Fujs, Štefan, Hranueli, Daslav, and Kosec, Gregor (2013),"Draft genome sequence of *Streptomyces rapamycinicus* strain NRRL 5491, the producer of the immunosuppressant rapamycin", *Genome announcements*, 1(4), p. 10.

32. Batra, Priyanka, Barkodia, Monika, Ahlawat, Umang, Sansanwal, Rekha, Sharma, Tanisha, and Wati, Leela (2018), "Endophytes: An environmental friendly bacteria for plant growth promotion", *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7, p. 1899.
33. Becerril, Adriana, Álvarez, Susana, Braña, Alfredo F, Rico, Sergio, Díaz, Margarita, Santamaría, Ramón I, Salas, José A, and Méndez, Carmen (2018), "Uncovering production of specialized metabolites by *Streptomyces argillaceus*: Activation of cryptic biosynthesis gene clusters using nutritional and genetic approaches", *PLoS One*, 13(5), p. e0198145.
34. Belghit, Mohamed Yazid, Moussi, Abdelhamid, and Barkat, Djamel (2017), "In vitro antifungal activity of some schiffbases derived from ortho-hydroxybenzaldehyde against *Fusarium*", *Journal of Engineering Science Technology*, 12(6), pp. 1709-1722.
35. Belgrove, Altus, Steinberg, Christian, and Viljoen, A (2011), "Evaluation of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* and *Pseudomonas fluorescens* for Panama disease control", *Plant Disease*, 95(8), pp. 951-959.
36. Belknap, Kaitlyn C, Park, Cooper J, Barth, Brian M, and Andam, Cheryl P (2020), "Genome mining of biosynthetic and chemotherapeutic gene clusters in *Streptomyces* bacteria", *Scientific Reports*, 10(1), p. 2003.
37. Bentley, SBKG, Pegg, Kenneth G, Moore, NY, Davis, RD, and Buddenhagen, IW (1998), "Genetic variation among vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* analyzed by DNA fingerprinting", *Phytopathology*, 88(12), p. 1283.
38. Bentley, Stephen D, Chater, Keith F, Cerdeño-Tárraga, A-M, Challis, Greg L, Thomson, NR, James, Keith D, Harris, David E, Quail, Michael A, Kieser, H, and Harper, David (2002), "Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3 (2)", *Nature*, 417(6885), p. 141.

39. Blin, Kai, Shaw, Simon, Steinke, Katharina, Villebro, Rasmus, Ziemert, Nadine, Lee, Sang Yup, Medema, Marnix H, and Weber, Tilmann (2019),"antiSMASH 5.0: updates to the secondary metabolite genome mining pipeline", *Nucleic acids research*, 47(W1), p. 81.
40. Borodovsky, Mark, Mills, Ryan, Besemer, John, and Lomsadze, Alex (2003),"Prokaryotic gene prediction using GeneMark and GeneMark. hmm", *Current protocols in bioinformatics*, 1(1), pp. 4.5. 1-4.5. 16.
41. Brahim-Horn, Marie-Christiane, Luo, Shu-Huy, Wang, Shu-Lian, Gau, Shwu-Wen, and Mou, Duen-Gang (1992),"Synthesis of hydrolytic enzymes during production of tylosin by *Streptomyces fradiae*", *Journal of industrial microbiology*, 10, p. 25.
42. Brühlmann, Fredi, Kim, Kwi Suk, Zimmerman, Wolfgang, and Fiechter, Armin (1994),"Pectinolytic enzymes from actinomycetes for the degumming of ramie bast fibers", *Applied Environmental History*, 60(6), p. 2107.
43. Butler, Mark S, Hansford, Karl A, Blaskovich, Mark AT, Halai, Reena, and Cooper, Matthew A (2014),"Glycopeptide antibiotics: back to the future", *The Journal of antibiotics*, 67(9), p. 631.
44. Cabrera, Rosina, García-López, Héctor, Aguirre-von-Wobeser, Eneas, Orozco-Avitia, Jesús Antonio, and Gutiérrez-Saldaña, Aldo Hiram (2020),"Amycolatopsis BX17: An actinobacterial strain isolated from soil of a traditional milpa agroecosystem with potential biocontrol against *Fusarium graminearum*", *Biological control*, 147, p. 104285.
45. Caffrey, Patrick, Lynch, Susan, Flood, Elizabeth, Finnan, Shirley, and Oliynyk, Markiyana (2001),"Amphotericin biosynthesis in *Streptomyces nodosus*: deductions from analysis of polyketide synthase and late genes", *Chemistry biology*, 8(7), p. 713.
46. Cao, Lixiang, Qiu, Zhiqi, You, Jianlan, Tan, Hongming, and Zhou, Shining (2005),"Isolation and characterization of endophytic streptomycete

- antagonists of *Fusarium* wilt pathogen from surface-sterilized banana roots", *FEMS microbiology letters*, 247(2), p. 147.
47. Cao, Miaomiao, Cheng, Qifeng, Cai, Bingyu, Chen, Yufeng, Wei, Yongzan, Qi, Dengfeng, Li, Yuqi, Yan, Liu, Li, Xiaojuan, and Long, Weiqiang (2022),"Antifungal mechanism of metabolites from newly isolated *Streptomyces* sp. Y1-14 against banana fusarium wilt disease using metabolomics", *Journal of Fungi*, 8(12), p. 1291.
 48. Chen, Andrew, Sun, Jiaman, Matthews, Andrea, Armas-Egas, Liz, Chen, Ning, Hamill, Sharon, Mintoff, Sharl, Tran-Nguyen, Lucy TT, Batley, Jaqueline, and Aitken, Elizabeth AB (2019),"Assessing variations in host resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4 in *Musa* species, with a focus on the subtropical race 4", *Frontiers in Microbiology*, 10, p. 1062.
 49. Chen, Chung-Yi, Chang, Fang-Rong, and Wu, Yang-Chang (1998),"Cherimonaine, a novel dimeric amide from the stems of *Annona cherimola*", *Tetrahedron Letters*, 39(5-6), p. 407.
 50. Chen, Yufeng, Wei, Yongzan, Cai, Bingyu, Zhou, Dengbo, Qi, Dengfeng, Zhang, Miaoyi, Zhao, Yankun, Li, Kai, Wedge, David E, and Pan, Zhiqiang (2022),"Discovery of Niphimycin C from *Streptomyces yongxingensis* sp. nov. as a promising agrochemical fungicide for controlling banana fusarium wilt by destroying the mitochondrial structure and function", *Journal of Agricultural Technology Food Chemistry*, 70(40), p. 12784.
 51. Chittarath, Khonesavane, Mostert, Diane, Crew, Kathleen S, Viljoen, Altus, Kong, Gary, Molina, AB, and Thomas, John E (2018),"First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4 (VCG 01213/16) associated with Cavendish bananas in Laos", *Plant disease*, 102(2), p. 449.
 52. Chittarath, Khonesavanh, Nguyen, Chung Huy, Bailey, Wendy C, Zheng, Si-Jun, Mostert, Diane, Viljoen, Altus, Tazuba, Anthony Fredrick, Ocimati, Walter, Kearsley, Elizabeth, and Chi, Tran Yen (2022),"Geographical

- distribution and genetic diversity of the banana Fusarium wilt fungus in Laos and Vietnam", *Journal of Fungi*, 8(1), p. 46.
53. Chung, Wen-Chuan, Wu, Rey-Shung, Hsu, Chia-Ping, Huang, Hung-Chang, and Huang, Jenn-Wen (2011),"Application of antagonistic rhizobacteria for control of Fusarium seedling blight and basal rot of lily", *Australasian Plant Pathology*, 40, p. 269.
 54. Cole, S Tea, Brosch, R, Parkhill, J, Garnier, T, Churcher, C, Harris, D, Gordon, SV, Eiglmeier, K, Gas, S, and Barry Iii, CE (1998),"Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence", *Nature*, 396(6707), p. 190.
 55. Conesa, Ana and Götzt, Stefan (2008),"Blast2GO: a comprehensive suite for functional analysis in plant genomics", *International journal of plant genomics*, 2008(1), p. 619.
 56. Conn, VM, Walker, AR, and Franco, CMM (2008),"Endophytic actinobacteria induce defense pathways in *Arabidopsis thaliana*", *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(2), p. 208.
 57. Curran, J, Driver, F, Ballard, JWO, and Milner, RJ (1994),"Phylogeny of *Metarhizium*: analysis of ribosomal DNA sequence data", *Mycological Research*, 98(5), p. 547.
 58. Dar, Muzammil Sharief and Ahmad, Iqbal (2024),"Screening and evaluation of antibacterial active strains of Actinomycetes isolated from Northern Indian soil for biofilm inhibition against selected ESKAPE pathogens", *Journal of Umm Al-Qura University for Applied Sciences*, p. 1.
 59. Dastager, SG, Li, Wen-Jun, Dayanand, A, Tang, Shu-Kun, Tian, Xin-Peng, Zhi, Xiao-yang, Xu, Li-Hua, and Jiang, Cheng-Lin (2006),"Seperation, identification and analysis of pigment (melanin) production in *Streptomyces*", *African journal of biotechnology*, 5(11), p. 1131.
 60. Dhanasekaran, D, Panneerselvam, A, and Thajuddin, N (2012), *Applications of actinobacterial fungicides in agriculture and medicine*, Croatia, 298.

61. Dita, Miguel A, Waalwijk, Cees, Buddenhagen, IW, Souza Jr, MT, and Kema, GHJ (2010),"A molecular diagnostic for tropical race 4 of the banana fusarium wilt pathogen", *Plant pathology*, 59(2), p. 348.
62. Dita, Miguel, Barquero, Marcia, Heck, Daniel, Mizubuti, Eduardo SG, and Staver, Charles P (2018),"Fusarium wilt of banana: current knowledge on epidemiology and research needs toward sustainable disease management", *Frontiers in plant science*, 9, p. 1468.
63. Doroghazi, James R and Metcalf, William W (2013),"Comparative genomics of actinomycetes with a focus on natural product biosynthetic genes", *BMC genomics*, 14, p. 1.
64. Durán, Nelson, Justo, Giselle Z, Ferreira, Carmen V, Melo, Patrícia S, Cordi, Livia, and Martins, Dorival (2007),"Violacein: properties and biological activities", *Biotechnology applied biochemistry*, 48(3), p. 127.
65. Durham, David G. (2005), "Isolation by Ion-Exchange Methods", *Natural Products Isolation*, Humana Press, Totowa, NJ, p. 159.
66. Ebrahimi-Zarandi, Marzieh, Bonjar, Gholam Hosein Shahidi, Riseh, Roohallah Saberi, El-Shetehy, Mohamed, Saadoun, Ismail, and Barka, Essaid Ait (2021),"Exploring two *Streptomyces* species to control *Rhizoctonia solani* in tomato", *Agronomy*, 11(7), p. 1384.
67. El-Mehalawy, A. A., Hassanein, N. M., Khater, H. M., El-Din, E. K., & Youssef, Y. A (2004),"Influence of maize root colonization by the rhizosphere actinomycetes and yeast fungi on plant growth and on the biological control of late wilt disease", *International Journal of Agriculture and Biology*, 6(4), p. 599.
68. El-Shatoury, Sahar A, Ameen, Fuad, Moussa, Heba, Wahid, Omar Abdul, Dewedar, Ahmed, and AlNadhari, Saleh (2020),"Biocontrol of chocolate spot disease (*Botrytis cinerea*) in faba bean using endophytic actinomycetes *Streptomyces*: a field study to compare application techniques", *PeerJ*, 8, p. e8582.

69. Elattal, NA, Hamdy, AA, Ali, AE, and Amin, MA %J (2011),"Nystatin production by a local *Streptomyces* sp. Isolated from Egyptian soil", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 1(6), p. 128.
70. Ezziyyani, M, Requena, ME, Egea-Gilabert, C, and Candela, ME (2007),"Biological control of Phytophthora root rot of pepper using *Trichoderma harzianum* and *Streptomyces rochei* in combination", *Journal of Phytopathology*, 155(6), p. 342.
71. Fadhilah, Qonita Gina, Santoso, Iman, Maryanto, Andi Eko, Abdullah, Sarini, and Yasman, Yasman (2021),"Evaluation of the antifungal activity of marine actinomycetes isolates against the phytopathogenic fungi *Colletotrichum siamense* KA: A preliminary study for new antifungal compound discovery", *Pharmacia*, 68(4), p. 837.
72. Farda, Beatrice, Djebaili, Rihab, Vaccarelli, Ilaria, Del Gallo, Maddalena, and Pellegrini, Marika (2022),"Actinomycetes from caves: an overview of their diversity, biotechnological properties, and insights for their use in soil environments", *Microorganisms*, 10(2), p. 453.
73. Fatmawati, UMI, Meryandini, Anja, Nawangsih, Abdjad Asih, and Wahyudi, Aris Tri (2019),"Screening and characterization of actinomycetes isolated from soybean rhizosphere for promoting plant growth", *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 20(10), p. 2970.
74. Fjærvik, Espen and Zotchev, Sergey B (2005),"Biosynthesis of the polyene macrolide antibiotic nystatin in *Streptomyces noursei*", *Applied microbiology biotechnology*, 67, p. 436.
75. Franco, Christopher MM and Coutinho, Louis EL (1991),"Detection of novel secondary metabolites", *Critical reviews in biotechnology*, 11(3), p. 193.
76. Fushimi, Susumu Nishikawa, Shigeru Shimazu, Akira (1989),"Studies on new phosphate ester antifungal antibiotics phoslactomycins I. Taxonomy, fermentation, purification and biological activities", *The Journal of Antibiotics*, 42(7), p. 1019.

77. García-Bastidas, F, Ordóñez, N, Konkol, J, Al-Qasim, M, Naser, Z, Abdelwali, M, Salem, N, Waalwijk, C, Ploetz, RC, and Kema, GHJ (2014),"First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4 associated with Panama disease of banana outside Southeast Asia", *Plant Disease*, 98(5), p. 694.
78. Garcia-Bastidas, Fernando (2022),"*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical race 4 (*Foc* TR4)", *CABI Compendium*, p. 17.
79. Gebily, Doha AS, Ghanem, Gamal AM, Ragab, Mona M, Ali, Ayat M, Soliman, Nour El-din K, and Abd El-Moity, Tawfik H (2021),"Characterization and potential antifungal activities of three *Streptomyces* spp. as biocontrol agents against *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary infecting green bean", *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 31, p. 1.
80. Glickmann, Eric and Dessaux, Yves (1995),"A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria", *Applied environmental microbiology*, 61(2), p. 793.
81. Gong, Yuan, Liu, Jia-Qi, Xu, Ming-Jie, Zhang, Chun-Mei, Gao, Jun, Li, Cheng-Guo, Xing, Ke, and Qin, Sheng (2022),"Antifungal volatile organic compounds from *Streptomyces setonii* WY228 control black spot disease of sweet potato", *Applied Environmental Microbiology*, 88(6), pp. e02317-21.
82. Gopalakrishnan, Subramaniam, Pande, Suresh, Sharma, Mamta, Humayun, Pagidi, Kiran, Bandru Keerthi, Sandeep, Dasyam, Vidya, Meesala Sree, Deepthi, Kanala, and Rupela, Om (2011),"Evaluation of actinomycete isolates obtained from herbal vermicompost for the biological control of *Fusarium* wilt of chickpea", *Crop Protection*, 30(8), p. 1070.
83. Götz, Stefan, García-Gómez, Juan Miguel, Terol, Javier, Williams, Tim D, Nagaraj, Shivashankar H, Nueda, María José, Robles, Montserrat, Talón, Manuel, Dopazo, Joaquín, and Conesa, Ana (2008),"High-throughput

- functional annotation and data mining with the Blast2GO suite", *Nucleic acids research*, 36(10), p. 3420.
84. Gullino, M Lodovica, Camponogara, Andrea, Gasparrini, Giuliana, Rizzo, Valeria, Clini, Corrado, and Garibaldi, Angelo (2003),"Replacing methyl bromide for soil disinfestation: the Italian experience and implications for other countries", *Plant Disease*, 87(9), p. 1012.
 85. Haddad, F, Rocha, LS, Soares, ACF, Martins, IPS, Teixeira, LAJ, Staver, Charles, and Dita, M (2016), Management of Fusarium wilt of bananas in Minas Gerais, Brazil, *X International Symposium on Banana: ISHS-ProMusa Symposium on Agroecological Approaches to Promote Innovative Banana 1196*, p. 137.
 86. Hassan, Naglaa, Nakasuji, Satoko, Elsharkawy, Mohsen Mohamed, Naznin, Hushna Ara, Kubota, Masaharu, Ketta, Hammad, and Shimizu, Masafumi (2017),"Biocontrol potential of an endophytic *Streptomyces* sp. strain MBCN152-1 against *Alternaria brassicicola* on cabbage plug seedlings", *Microbes environments*, 32(2), p. 133.
 87. He, Hairong, Huang, Jiarui, Zhao, Zhenzhu, Du, Pengqiang, Li, Jiansong, Xin, Jile, Xu, Huifang, Feng, Weisheng, and Zheng, Xiaoke (2023),"Whole genome analysis of *Streptomyces* sp. RerS4, a *Rehmannia glutinosa* rhizosphere microbe producing a new lipopeptide", *Heliyon*, 9(9), p. e19543.
 88. Hernandez, V, Robles, M, and Talon, M (2006), Blast2GO goes grid: developing a grid-enabled prototype for functional genomics analysis, *Challenges and Opportunities of Healthgrids: Proceedings of Healthgrid*, IOS Press.
 89. Herbert, JA and Marx, D (1990),"Short-term control of Panama disease of bananas in South Africa", *Phytophylactica*, 22(3), p. 339.
 90. Hermanto, C, Sutanto, A, Edison, HS, Daniells, JW, O'Neill, WT, Sinohin, VGO, Molina, AB, and Taylor, P (2009), Incidence and distribution of Fusarium wilt disease of banana in Indonesia, *V International Symposium on*

Banana: ISHS-ProMusa Symposium on Global Perspectives on Asian Challenges 897, p. 313.

91. Hofmann, Marika, Heine, Thomas, Malik, Luise, Hofmann, Sarah, Joffroy, Kristin, Senges, Christoph Helmut Rudi, Bandow, Julia Elisabeth, and Tischler, Dirk (2021), "Screening for microbial metal-chelating siderophores for the removal of metal ions from solutions", *Microorganisms*, 9(1), p. 111.
92. Holt, John G, Krieg, NR, Sneath, PHA, Staley, JT, and Williams, ST (1984), "Bergey's manual of systematic bacteriology", *The Williams Wilkins Co., Baltimore*, 1, p. 1388.
93. Hong, Sin-Hyoung, Song, Yong-Su, Seo, Dong-Jun, Kim, Kil-Yong, and Jung, Woo-Jin (2017), "Antifungal activity and expression patterns of extracellular chitinase and β -1, 3-glucanase in *Wickerhamomyces anomalus* EG2 treated with chitin and glucan", *Microbial pathogenesis*, 110, p. 159.
94. Houfani, Aicha Asma, Větrovský, Tomáš, Baldrian, Petr, and Benallaoua, Said (2017), "Efficient screening of potential cellulases and hemicellulases produced by *Bosea* sp. FBZP-16 using the combination of enzyme assays and genome analysis", *World Journal of Microbiology Biotechnology*, 33, p. 1.
95. Hu, Zhe, Weng, Qiangang, Cai, Zhehui, and Zhang, Huawei (2024), "Optimization of fermentation conditions and medium components for chrysomycin a production by *Streptomyces* sp. 891-B6", *BMC microbiology*, 24(1), p. 120.
96. Huang, Le, Zhang, Han, Wu, Peizhi, Entwistle, Sarah, Li, Xueqiong, Yohe, Tanner, Yi, Haidong, Yang, Zhenglu, and Yin, Yanbin (2018), "dbCAN-seq: a database of carbohydrate-active enzyme (CAZyme) sequence and annotation", *Nucleic Acids Research*, 46(D1), p. 516.
97. Huang, YH, Wang, RC, Li, CH, Zuo, CW, Wei, YR, Zhang, L, and Yi, GJ (2012), "Control of Fusarium wilt in banana with Chinese leek", *European journal of plant pathology*, 134, p. 87.

98. Hung, TN, Hung, NQ, Mostert, D, Viljoen, Altus, Chao, CP, and Molina, AB (2018),"First report of Fusarium wilt on Cavendish bananas, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4 (VCG 01213/16), in Vietnam", *Plant Disease*, 102(2), p. 448.
99. Hunt, Martin, Silva, Nishadi De, Otto, Thomas D, Parkhill, Julian, Keane, Jacqueline A, and Harris, Simon R (2015),"Circlator: automated circularization of genome assemblies using long sequencing reads", *Genome biology*, 16, p. 1.
100. Igarashi, Yasuhiro, Futamata, Katsuyuki, Fujita, Tsuyoshi, Sekine, Akira, Senda, Hisato, Naoki, Hideo, and Furumai, Tamotsu (2003),"Yatakemycin, a novel antifungal antibiotic produced by *Streptomyces* sp. TP-A0356", *The Journal of antibiotics*, 56(2), p. 107.
101. Ikeda, Haruo, Ishikawa, Jun, Hanamoto, Akiharu, Shinose, Mayumi, Kikuchi, Hisashi, Shiba, Tadayoshi, Sakaki, Yoshiyuki, Hattori, Masahira, and Ōmura, Satoshi (2003),"Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*", *Nature biotechnology*, 21(5), p. 526.
102. Jing, Tao, Zhou, Dengbo, Zhang, Miaoyi, Yun, Tianyan, Qi, Dengfeng, Wei, Yongzan, Chen, Yufeng, Zang, Xiaoping, Wang, Wei, and Xie, Jianghui (2020),"Newly isolated *Streptomyces* sp. JBS5-6 as a potential biocontrol agent to control banana Fusarium wilt: genome sequencing and secondary metabolite cluster profiles", *Frontiers in microbiology*, 11, p. 602591.
103. Kamarudheen, Neethu and Rao, B (2018),"An overview of protease inhibitors from Actinobacteria", *Research Journal of Biotechnology*, 13, p. 1.
104. Kandile, Nadia G, Zaky, Howida T, Mohamed, Mansoura I, Ismaeel, Hind M, and Ahmed, Nashwa A (2012),"Synthesis, characterization and in vitro antimicrobial evaluation of new compounds incorporating oxindole nucleus", *Journal of Enzyme Inhibition Medicinal Chemistry*, 27(4), p. 599.

105. Kang, Shin-Ae, Cho, Hyun-Soo, Yoon, Jong Bok, Chung, In Kwon, and Lee, Seung-Taek (2012), "Hsp90 rescues PTK6 from proteasomal degradation in breast cancer cells", *Biochemical Journal*, 447(2), p. 313.
106. Kelly, KL (1964), "Color-name charts illustrated with centroid colors", *Inter-Society Color Council-National Bureau of Standards, Chicago*, p. 313.
107. Khan, Azmi, Singh, Pratika, Kumar, Ravinsh, Das, Sujit, Singh, Rakesh Kumar, Mina, Usha, Agrawal, Ganesh Kumar, Rakwal, Randeep, Sarkar, Abhijit, and Srivastava, Amrita (2021), "Antifungal activity of siderophore isolated from *Escherichia coli* against *Aspergillus nidulans* via iron-mediated oxidative stress", *Frontiers in Microbiology*, 12, p. 729032.
108. Kharel, Madan K, Pahari, Pallab, Shepherd, Micah D, Tibrewal, Nidhi, Nybo, S Eric, Shaaban, Khaled A, and Rohr, Jürgen (2012), "Angucyclines: Biosynthesis, mode-of-action, new natural products, and synthesis", *Natural product reports*, 29(2), p. 264.
109. Khetmalis, Yogesh Mahadu, Shivani, Mithula, Murugesan, Sankaranarayanan, and Sekhar, Kondapalli Venkata Gowri Chandra (2021), "Oxindole and its derivatives: A review on recent progress in biological activities", *Biomedicine Pharmacotherapy*, 141, p. 111842.
110. Kim, Hye Yoon, Kim, Jeong Do, Hong, Jin Sung, Ham, Jong Hyun, and Kim, Beom Seok (2013), "Identification of antifungal niphimycin from *Streptomyces* sp. KP 6107 by screening based on adenylate kinase assay", *Journal of Basic Microbiology*, 53(7), p. 581.
111. Kim, Kyuri, Leutou, Alain S, Jeong, Haein, Kim, Dayoung, Seong, Chi Nam, Nam, Sang-Jip, and Lim, Kyung-Min (2017), "Anti-pigmentary effect of (-)-4-hydroxysattabacin from the marine-derived bacterium *Bacillus* sp", *Marine Drugs*, 15(5), p. 138.
112. Koren, Sergey, Walenz, Brian P, Berlin, Konstantin, Miller, Jason R, Bergman, Nicholas H, and Phillippy, Adam M (2017), "Canu: scalable and

- accurate long-read assembly via adaptive k-mer weighting and repeat separation", *Genome research*, 27(5), p. 722.
113. Kumar, Ashutosh, Patil, Deepak, Rajamohanan, Pattuparambil Ramanpillai, and Ahmad, Absar (2013),"Isolation, purification and characterization of vinblastine and vincristine from endophytic fungus *Fusarium oxysporum* isolated from *Catharanthus roseus*", *PloS one*, 8(9), p. e71805.
 114. Labeda, DP, Goodfellow, M, Brown, R, Ward, AC, Lanoot, B, Vannanneyt, M, Swings, Jean, Kim, S-B, Liu, Z, and Chun, J (2012),"Phylogenetic study of the species within the family *Streptomycetaceae*", *Antonie Van Leeuwenhoek*, 101, p. 73.
 115. Lahlali, Rachid, Ezrari, Said, Radouane, Nabil, Kenfaoui, Jihane, Esmaeel, Qassim, El Hamss, Hajar, Belabess, Zineb, and Barka, Essaid Ait (2022),"Biological control of plant pathogens: A global perspective", *Microorganisms*, 10(3), p. 596.
 116. Lakshmanan, P, Selvaraj, P, and Mohan, S (1987),"Efficacy of different methods for the control of Panama disease", *Tropical Pest Management*, p. 373.
 117. Lampis, Giorgio, Deidda, Delia, Maullu, Carlo, Madeddu, Maria A, Pompei, Raffaello, Delle Monache, Franco, and Satta, Giuseppe (1995),"Sattabacins and sattazolins: new biologically active compounds with antiviral properties extracted from a *Bacillus* sp", *The Journal of Antibiotics*, 48(9), p. 967.
 118. le Roes-Hill, Marilize, Khan, Nuraan, and Burton, Stephanie Gail (2011),"Actinobacterial peroxidases: an unexplored resource for biocatalysis", *Applied biochemistry biotechnology*, 164, p. 681.
 119. Le Thi, Loan, Mertens, Arne, Vu, Dang Toan, Vu, Tuong Dang, Minh, Pham Le Anh, Duc, Huy Nguyen, De Backer, Sander, Swennen, Rony, Vandelook, Filip, and Panis, Bart (2022)," Diversity of *Fusarium* associated banana wilt in northern Viet Nam", *MycKeys*, 87, p. 53.

120. Lee, So Youn, Tindwa, Hamisi, Lee, Yong Seong, Naing, Kyaw Wai, Hong, Seong Hyun, Nam, Yi, and Kim, Kil Yong (2012),"Biocontrol of Anthracnose in Pepper Using Chitinase, β -1, 3 Glucanase, and 2-Furancarboxaldehyde Produced by *Streptomyces cavourensis* SY224", *Journal of microbiology biotechnology*, 22(10), p. 1359.
121. Leslie, John F and Summerell, Brett A (2008), *The Fusarium laboratory manual*, John Wiley & Sons.
122. Li, CY, Mostert, G, Zuo, CW, Beukes, I, Yang, QS, Sheng, O, Kuang, RB, Wei, YR, Hu, CH, and Rose, L (2013),"Diversity and distribution of the banana wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in China", *Fungal Genomic and Biology*, 3(2), p. 111.
123. Li, MH, Yang, B, Leng, Y, Chao, CP, Liu, JM, He, ZF, Jiang, ZD, and Zhong, S (2011),"Molecular characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 1 and 4 isolates from Taiwan and Southern China", *Canadian Journal of Plant Pathology*, 33(2), p. 168.
124. Li, Qinyuan, Chen, Xiu, Jiang, Yi, and Jiang, Chenglin (2016),"Morphological identification of actinobacteria", *Actinobacteria-basics biotechnological applications*, p. 59.
125. Li, Xiao-Fang, Tian, Ye-Han, Peng, Hai-Ying, He, Bang-Ling, and Gao, Ke-Xiang (2020),"Isolation, screening and identification of an antagonistic actinomycetes to control Fusarium wilt of *Momordica charantia*", *The Journal of Applied Ecology*, 31(11), p. 3869.
126. Li, Xiaojuan, Li, Kai, Zhou, Dengbo, Zhang, Miaoyi, Qi, Dengfeng, Jing, Tao, Zang, Xiaoping, Qi, Chunlin, Wang, Wei, and Xie, Jianghui (2021),"Biological control of banana wilt disease caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* using *Streptomyces* sp. H4", *Biological Control*, 155, p. 104524.
127. Li, Xingshen, Bai, Tingting, Li, Yunfeng, Ruan, Xiaolei, and Li, Huaping (2013),"Proteomic analysis of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical

- race 4-inoculated response to *Fusarium* wilts in the banana root cells", *Proteome science*, 11(1), p. 1.
128. Lin, Ying-Hong, Chang, Jing-Yi, Liu, En-Tzu, Chao, Chih-Ping, Huang, Jenn-Wen, and Chang, Pi-Fang Linda (2009), "Development of a molecular marker for specific detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4", *European Journal of plant Pathology*, 123, p. 353.
 129. Louden, Brian C, Haarmann, Daniel, and Lynne, Aaron M (2011), "Use of blue agar CAS assay for siderophore detection", *Journal of microbiology biology education*, 12(1), p. 51.
 130. Lu, Cai Ge, Liu, Wei Cheng, Qiu, Ji Yan, Wang, Hui Min, Liu, Ting, and Liu, De Wen (2008), "Identification of an antifungal metabolite produced by a potential biocontrol actinomyces strain A01", *Brazilian Journal of Microbiology*, 39, p. 701.
 131. Lucas, John A (2020), *Plant pathology and plant pathogens*, John Wiley & Sons.
 132. Malit, Jessie James Limlingan, Leung, Hiu Yu Cherie, and Qian, Pei-Yuan (2022), "Targeted large-scale genome mining and candidate prioritization for natural product discovery", *Marine Drugs*, 20(6), p. 398.
 133. Manivasagan, Panchanathan, Venkatesan, Jayachandran, Sivakumar, Kannan, and Kim, Se-Kwon (2013), "Actinobacterial melanins: current status and perspective for the future", *World Journal of Microbiology Biotechnology*, 29, p. 1737.
 134. Mann, Alexander J, Hahnke, Richard L, Huang, Sixing, Werner, Johannes, Xing, Peng, Barbeyron, Tristan, Huettel, Bruno, Stüber, Kurt, Reinhardt, Richard, and Harder, Jens (2013), "The genome of the alga-associated marine flavobacterium *Formosa agariphila* KMM 3901T reveals a broad potential for degradation of algal polysaccharides", *Applied environmental microbiology*, 79(21), p. 6813.

135. Maryani, N, Lombard, L, Poerba, YS, Subandiyah, S, Crous, PW, and Kema, GHJ (2019),"Phylogeny and genetic diversity of the banana Fusarium wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in the Indonesian centre of origin", *Studies in mycology*, 92(1), p. 155.
136. Masdek, N, Mahmood, M, Molina, A, Hwang, SC, Dimiyati, A, Tangaveli, R, and Omar, I (2003), Global significance of Fusarium wilt: Asia, *2nd International Symposium on Fusarium wilt of banana*, p. 22.
137. McKenna, Aaron, Hanna, Matthew, Banks, Eric, Sivachenko, Andrey, Cibulskis, Kristian, Kernytsky, Andrew, Garimella, Kiran, Altshuler, David, Gabriel, Stacey, and Daly, Mark (2010),"The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data", *Genome research*, 20(9), p. 1297.
138. Medema, Marnix H, Blin, Kai, Cimermancic, Peter, De Jager, Victor, Zakrzewski, Piotr, Fischbach, Michael A, Weber, Tilmann, Takano, Eriko, and Breitling, Rainer (2011),"antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences", *Nucleic acids research*, 39(suppl_2), p. 339.
139. Medema, Marnix H and Fischbach, Michael A (2015),"Computational approaches to natural product discovery", *Nature chemical biology*, 11(9), p. 639.
140. Meena, L Indhu, Rajeswari, E, Ahiladevi, P, Kamalakannan, A, and Kalaiselvi, T (2022),"Antifungal potential of *Streptomyces rameus* GgS 48 against mungbean root rot [*Rhizoctonia bataticola* (Taub.) Butler]", *Journal of Biosciences*, 47(1), p. 10.
141. Mejías Herrera, R, Hernández, Yonis, Magdama, Freddy, Mostert, Diane, Bothma, Sheryl, Paredes Salgado, EM, Terán, Diana, González, Elsa, Angulo, Rodrigo, and Angel, Liadamith (2023),"First report of Fusarium wilt of Cavendish bananas caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4 in Venezuela", *Plant disease*, 107(10), p. 3297.

142. Mishra, Priya, Mishra, Jitendra, Dwivedi, SK, and Arora, Naveen Kumar (2020),"Microbial enzymes in biocontrol of phytopathogens", *Microbial enzymes: roles applications in industries*, pp. 259-285.
143. Mohammed, Aeshah Mhana, AL-Ani, Laith KT, Bekbayeva, Lyazzat, and Salleh, Baharuddin (2011),"Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* by *Pseudomonas fluorescens* and BABA in vitro", *World Applied Sciences Journal*, 15(2), p. 189.
144. Mohite, OS, Jørgensen, TS, Booth, T, Charusanti, P, Phaneuf, PV, Weber, T, and Palsson, BO (2024),"Pangenome mining of the *Streptomyces* genus redefines their biosynthetic potential", *The preprint server for biology*, p. 1.
145. Molina, AB, Fabregar, E, Sinohin, VG, Yi, G, and Viljoen, Altus (2007), Recent occurrence of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* tropical race 4 in Asia, *III International Symposium on Banana: ISHS-ProMusa Symposium on Recent Advances in Banana Crop Protection for Sustainable* 828, p. 109.
146. Moore, NY, Pegg, Kenneth G, Bentley, S, and Smith, LJ (2001), Fusarium wilt of banana: global problems and perspectives, *Banana fusarium wilt management: towards sustainable cultivation: proceedings of the workshop on the banana fusarium wilt disease, Genting Highlands resort, Malaysia*, Alliance Biodiversity & CIAT.
147. Moore, NY, Pegg, KG, Allen, RN, and Irwin, JAG (1993),"Vegetative compatibility and distribution of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* in Australia", *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 33(6), p. 797.
148. Morris, Michele I. and Villmann, Mark (2006),"Echinocandins in the management of invasive fungal infections, part 1", *American Journal of Health-System Pharmacy*, 63(18), p. 1693.
149. Nagpure, Anand, Choudhary, Bharti, and Gupta, Rajinder (2014),"Mycolytic enzymes produced by *Streptomyces violaceusniger* and their role in antagonism towards wood-rotting fungi", *Journal of Basic Microbiology*, 54(5), p. 397.

150. Nayak, SK, Dash, B, Nayak, S, Mohanty, S, and Mishra, BB (2020), "Chitinase producing soil bacteria: prospects and applications", *Frontiers in soil and Environmental Microbiology*, CRC Press, p. 289.
151. Negri, Ana, Marco, Esther, García-Hernández, Verónica, Domingo, Alberto, Llamas-Saiz, Antonio L, Porto-Sandá, Silvia, Riguera, Ricardo, Laine, William, David-Cordonnier, Marie-Hélène, and Bailly, Christian (2007),"Antitumor activity, X-ray crystal structure, and DNA binding properties of thiocoraline A, a natural bisintercalating thiodepsipeptide", *Journal of medicinal chemistry*, 50(14), p. 3322.
152. Nel, B, Steinberg, Christian, Labuschagne, Nico, and Viljoen, Alvaro (2007),"Evaluation of fungicides and sterilants for potential application in the management of Fusarium wilt of banana", *Crop Protection*, 26(4), p. 697.
153. Nielsen, Jens and Keasling, Jay D (2016),"Engineering cellular metabolism", *Cell*, 164(6), p. 1185.
154. O'Neill, Wayne T, Henderson, Juliane, Pattermore, Julie A, O'Dwyer, Cecilia, Perry, Suzy, Beasley, Dean R, Tan, Yu Pei, Smyth, AL, Goosem, CH, and Thomson, KM (2016),"Detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* tropical race 4 strain in northern Queensland", *Australasian Plant Disease Notes*, 11, p. 1.
155. Oliynyk, Markiyan, Samborsky, Markiyan, Lester, John B, Mironenko, Tatiana, Scott, Nataliya, Dickens, Shilo, Haydock, Stephen F, and Leadlay, Peter F (2007),"Complete genome sequence of the erythromycin-producing bacterium *Saccharopolyspora erythraea* NRRL23338", *Nature biotechnology*, 25(4), p. 447.
156. Ordonez, Nadia, Seidl, Michael F, Waalwijk, Cees, Drenth, André, Kilian, Andrzej, Thomma, Bart PHJ, Ploetz, Randy C, and Kema, Gert HJ (2015),"Worse comes to worst: bananas and Panama disease- when plant and pathogen clones meet", *PLoS pathogens*, 11(11), p. e1005197.

157. Panth, Milan, Hassler, Samuel C, and Baysal-Gurel, Fulya (2020),"Methods for management of soilborne diseases in crop production", *Agriculture*, 10(1), p. 16.
158. Parks, Donovan H, Imelfort, Michael, Skennerton, Connor T, Hugenholtz, Philip, and Tyson, Gene W (2015),"CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes", *Genome research*, 25(7), p. 1043.
159. Pegg, Kenneth G, Coates, Lindel M, O'Neill, Wayne T, and Turner, David W (2019),"The epidemiology of Fusarium wilt of banana", *Frontiers in plant science*, 10, p. 1395.
160. Pérez-Bonilla, Mercedes, Oves-Costales, Daniel, Cruz, Mercedes de la, Kokkini, Maria, Martín, Jesús, Vicente, Francisca, Genilloud, Olga, and Reyes, Fernando (2018),"Phocoenamycin B and C, new antibacterial spirotetronates isolated from a marine *Micromonospora* sp", *Marine drugs*, 16(3), p. 95.
161. Pin, OnKim (1995),"Fusarium wilt of Cavendish banana in a commercial farm in Malaysia", *Dirk De Waele, editors.*, p. 211.
162. Pinzón-Espinosa, Angela, Martínez-Matamoros, Diana, Castellanos, Leonardo, Duque, Carmenza, Rodríguez, Jaime, Jiménez, Carlos, and Ramos, Freddy A (2017),"Cereusitin A, a cyclic tetrapeptide from a *Bacillus cereus* strain isolated from the soft coral *Antilloorgia* (syn. *Pseudopterogorgia elisabethae*", *Tetrahedron Letters*, 58(7), p. 634.
163. Ploetz, Randy C (2006),"Fusarium wilt of banana is caused by several pathogens referred to as *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*", *Phytopathology* 96(6), p. 653.
164. Ploetz, Randy C (2000),"Panama disease: a classic and destructive disease of banana", *Plant Health Progress*, 1(1), p. 10.
165. Ploetz, Randy C (2015),"Management of Fusarium wilt of banana: A review with special reference to tropical race 4", *Crop Protection*, 73, p. 7.

166. Polyak, Yu M and Sukharevich, VI (2021),"Detection and regulation of antagonistic properties of the soil actinomycete *Streptomyces* sp. 89", *Biology Bulletin*, 48, p. 626.
167. Pringsulaka, Onanong and Chavanich, Surina (1999),"Optimal Conditions for the Production of Kanamycin by *Streptomyces kanamyceticus* Mutants", *Journal of Scientific Research*, 24, p. 103.
168. Qi, Dengfeng, Liu, Qiao, Zou, Liangping, Zhang, Miaoyi, Li, Kai, Zhao, Yankun, Chen, Yufeng, Feng, Junting, Zhou, Dengbo, and Wei, Yongzan (2024),"Taxonomic identification and antagonistic activity of *Streptomyces luomodiensis* sp. nov. against phytopathogenic fungi", *Frontiers in Microbiology*, 15, p. 1402653.
169. Qi, Dengfeng, Zou, Liangping, Zhou, Dengbo, Chen, Yufeng, Gao, Zhufen, Feng, Renjun, Zhang, Miaoyi, Li, Kan, Xie, Jianghui, and Wang, Wei (2019),"Taxonomy and broad-spectrum antifungal activity of *Streptomyces* sp. SCA3-4 isolated from rhizosphere soil of *Opuntia stricta*", *Frontiers in Microbiology*, 10, p. 1390.
170. Qi, Dengfeng, Zou, Liangping, Zhou, Dengbo, Zhang, Miaoyi, Wei, Yongzan, Li, Kai, Zhao, Yankun, Zhang, Lu, and Xie, Jianghui (2022),"Biocontrol potential and antifungal mechanism of a novel *Streptomyces sichuanensis* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4 in vitro and in vivo", *Applied Microbiology Biotechnology*, 106(4), p. 1633.
171. Qi, Dengfeng, Zou, Liangping, Zhou, Dengbo, Zhang, Miaoyi, Wei, Yongzan, Zhang, Lu, Xie, Jianghui, and Wang, Wei (2021),"Identification and antifungal mechanism of a novel actinobacterium *Streptomyces huiliensis* sp. nov. against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4 of banana", *Frontiers in Microbiology*, 12, p. 722661.

172. Rafieenia, Razieh (2013),"Effect of nutrients and culture conditions on antibiotic synthesis in Streptomyces", *Asian Journal of Pharmaceutical Health Sciences*, 3(3), p. 810.
173. Rawat, Pramod, Singh, Yashaswi, Bisht, Manisha, and Pal, Manoj (2023), "Modern Analytical Techniques for Extraction, Purification, and Structural Characterization of Microbial Bioactive Compounds", *Microbial Bioactive Compounds: Industrial and Agricultural Applications*, Springer Nature Switzerland, Cham, p. 85.
174. Reen, F Jerry, Romano, Stefano, Dobson, Alan DW, and O’Gara, Fergal (2015),"The sound of silence: activating silent biosynthetic gene clusters in marine microorganisms", *Marine drugs*, 13(8), p. 4754.
175. Rutledge, Peter J and Challis, Gregory L (2015),"Discovery of microbial natural products by activation of silent biosynthetic gene clusters", *Nature Reviews Microbiology*, 13(8), p. 509.
176. Salzberg, Steven L (2019),"Next-generation genome annotation: we still struggle to get it right", *Genome biology*, 20(1), p. 92.
177. Schwartz, Robert E, Giacobbe, Robert A, Bland, Judith A, and Monaghan, Richard L (1989),"A new antifungal agent I. Fermentation and isolation", *The Journal of Antibiotics*, 42(2), p. 163.
178. Sekhar, Aparna Chandra and Thomas, Pious (2015),"Isolation and identification of shoot-tip associated endophytic bacteria from banana cv. Grand Naine and testing for antagonistic activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*", *American Journal of Plant Sciences*, 6(7), p. 943.
179. Shimizu, Masafumi, Yazawa, Sachiko, and Ushijima, Yusuke (2009),"A promising strain of endophytic *Streptomyces* sp. for biological control of cucumber anthracnose", *Journal of General Plant Pathology*, 75, p. 27.
180. Shirling, EB and Gottlieb, D (1966),"Methods for characterization of *Streptomyces* species. International Journal of Systematic Bacteriology", p. 313.

181. Silva, Guilherme da Cruz, Kitano, Isabella Takahashi, Ribeiro, Iron Amoreli de Figueiredo, and Lacava, Paulo Teixeira (2022), "The potential use of actinomycetes as microbial inoculants and biopesticides in agriculture", *Frontiers in Soil Science*, 2, p. 833181.
182. Silva, Marielle Garcia, De Curcio, Juliana Santana, Silva-Bailão, Mirelle Garcia, Lima, Raisa Melo, Tomazett, Mariana Vieira, De Souza, Aparecido Ferreira, Cruz-Leite, Vanessa Rafaela Milhomem, Sbaraini, Nicolau, Bailão, Alexandre Melo, and Rodrigues, Fernando (2020), "Molecular characterization of siderophore biosynthesis in *Paracoccidioide brasiliensis*", *International Mycological Association Fungus*, 11, p. 1.
183. Singh, SP and Gaur, R (2016), "Evaluation of antagonistic and plant growth promoting activities of chitinolytic endophytic actinomycetes associated with medicinal plants against *Sclerotium rolfsii* in chickpea", *Journal of applied microbiology*, 121(2), p. 506.
184. Singh, Tanim Arpit, Passari, Ajit Kumar, Jajoo, Anjana, Bhasin, Sheetal, Gupta, Vijai Kumar, Hashem, Abeer, Alqarawi, Abdulaziz A, and Abd_Allah, Elsayed Fathi (2021), "Tapping into actinobacterial genomes for natural product discovery", *Frontiers in Microbiology*, 12, p. 655.
185. Sivaperumal, P, Kamala, K, and Rajaram, R (2015), "Bioactive DOPA melanin isolated and characterised from a marine actinobacterium *Streptomyces* sp. MVCS6 from Versova coast", *Natural Product Research*, 29(22), p. 2117.
186. Smaoui, Slim, Mathieu, Florence, Elleuch, Lobna, Coppel, Yannick, Merlina, Georges, Karray-Rebai, Ines, and Mellouli, Lofti (2012), "Taxonomy, purification and chemical characterization of four bioactive compounds from new *Streptomyces* sp. TN256 strain", *World Journal of Microbiology Biotechnology*, 28, p. 793.
187. Stover, Robert Harry (1962), "Fusarial wilt (Panama Disease) of bananas and other *Musa* species", *Fusarial wilt of bananas other *Musa* species.*, p. 117.

188. Su, HJ, Chuang, TY, and Kong, WS (1977),"Physiological race of fusarial wilt fungus attacking Cavendish banana of Taiwan", *Taiwan Banana Research Institute Special Publication*, 2(21), p. 814.
189. Suwan, Nisakorn, Boonying, Wassamon, and Nalumpang, Sarunya (2012),"Antifungal activity of soil actinomycetes to control chilli anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides*", *Journal of Agricultural Technology*, 2012(8), p. 725.
190. Taechowisan, T, Chuaychot, N, Chanaphat, S, Wanbanjob, A, and Tantiwachwutikul (2009),"Antagonistic effects of *Streptomyces* sp. SRM1 on *Colletotrichum musae*", *Biotechnology*, 8(1), p. 86.
191. Tatusov, Roman L., Galperin, Michael Y., Natale, Darren A., and Koonin, Eugene V. (2000),"The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution", *Nucleic Acids Research*, 28(1), p. 33.
192. Te Welscher, Yvonne Maria, van Leeuwen, Martin Richard, de Kruijff, Ben, Dijksterhuis, Jan, and Breukink, Eefjan (2012),"Polyene antibiotic that inhibits membrane transport proteins", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(28), p. 11156.
193. Thangavelu, R and Jayanthi, A (2009),"RFLP analysis of rDNA-ITS regions of native non-pathogenic *Fusarium oxysporum* isolates and their field evaluation for the suppression of Fusarium wilt disease of banana", *Australasian Plant Pathology*, 38, p. 13.
194. Thangavelu, Raman, Mostert, D, Gopi, M, Devi, P Ganga, Padmanaban, B, Molina, AB, and Viljoen, Altus (2019),"First detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4 (TR4) on Cavendish banana in India", *European Journal of Plant Pathology*, 154, p. 777.
195. Tomita, Koji, Nishio, Maki, Saitoh, Kyoichiro, Yamamoto, Haruaki, Hoshino, Yutaka, Ohkuma, Hiroaki, Konishi, Masataka, Miyaki, Takeo, and Oki, Toshikazu (1990),"Pradimicins A, B and C: new antifungal antibiotics I.

- Taxonomy, production, isolation and physico-chemical properties", *The Journal of Antibiotics*, 43(7), p. 755.
196. Torres-Rodriguez, Juan A, Reyes-Pérez, Juan J, Quiñones-Aguilar, Evangelina E, and Hernandez-Montiel, Luis G (2022),"Actinomycete potential as biocontrol agent of phytopathogenic fungi: Mechanisms, source, and applications", *Plants*, 11(23), p. 3201.
 197. Udompongsuk, Mongkutkarn Soyong, Kasem (2016),"Isolation, identification, and pathogenicity test from *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* causing banana wilt", *International Journal of Agricultural Technology*, 12(7.2), p. 2181.
 198. Van der Meij, Anne, Worsley, Sarah F, Hutchings, Matthew I, and van Wezel, Gilles P (2017),"Chemical ecology of antibiotic production by actinomycetes", *FEMS microbiology reviews*, 41(3), p. 392.
 199. Vartak, A., Mutalik, V., Parab, R.R., Shanbhag, P., Bhave, S., Mishra, P.D., and Mahajan, G.B. (2014),"Isolation of a new broad spectrum antifungal polyene from *Streptomyces* sp. MTCC 5680", *Letters in Applied Microbiology*, 58(6), p. 591.
 200. Vijayabharathi, Rajendran, Gopalakrishnan, Subramaniam, Sathya, Arumugam, Vasanth Kumar, Mandla, Srinivas, Vadlamudi, and Mamta, Sharma (2018),"*Streptomyces* sp. as plant growth-promoters and host-plant resistance inducers against *Botrytis cinerea* in chickpea", *Biocontrol science technology*, 28(12), p. 1140.
 201. Vilasinee, S, Toanuna, C, McGovern, RJ, and Nalumpang, S (2019),"Expression of pathogenesis-related (PR) genes in tomato against Fusarium wilt by challenge inoculation with *Streptomyces* NSP3", *International Journal of Agricultural Technology*, p. 157.
 202. Vindeirinho, João M, Soares, Helena MVM, and Soares, Eduardo V (2021),"Modulation of siderophore production by *Pseudomonas fluorescens*

- through the manipulation of the culture medium composition", *Applied biochemistry Biotechnology*, 193, p. 607.
203. Wahyudi, Aris Tri, Priyanto, Jepri Agung, Afrista, Resti, Kurniati, Deni, Astuti, Rika Indri, and Akhdiya, Alina (2019), "Plant growth promoting activity of actinomycetes isolated from soybean rhizosphere", *OnLine Journal of Biological Sciences*, 19, p. 1.
 204. Waite, BH and Stover, Robert Harry (1960), "Studies on Fusarium wilt of Bananas: VI. Variability and the cultivar concept in *Fusarium oxysporum* f. *cubense*", *Canadian Journal of Botany*, 38(6), p. 985.
 205. Wang, Wenfeng, Qiu, Zhiqi, Tan, Hongming, and Cao, Lixiang (2014), "Siderophore production by actinobacteria", *Biometals*, 27, p. 623.
 206. Wang, Xiaoyi, Yu, Renbo, and Li, Jingyang (2021), "Using genetic engineering techniques to develop banana cultivars with fusarium wilt resistance and ideal plant architecture", *Frontiers in Plant Science*, 11, p. 617528.
 207. Ward, A C and Allenby, N EE (2018), "Genome mining for the search and discovery of bioactive compounds: the *Streptomyces* paradigm", *FEMS Microbiology Letters*, 365(24), p. fny240.
 208. Wei, Yuanyuan, Zhao, Yankun, Zhou, Dengbo, Qi, Dengfeng, Li, Kai, Tang, Wen, Chen, Yufeng, Jing, Tao, Zang, Xiaoping, and Xie, Jianghui (2020), "A newly isolated *Streptomyces* sp. YYS-7 with a broad-spectrum antifungal activity improves the banana plant resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4", *Frontiers in microbiology*, 11, p. 1712.
 209. Weisburg, William G, Barns, Susan M, Pelletier, Dale A, and Lane, David J (1991), "16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study", *Journal of bacteriology*, 173(2), p. 697.
 210. Wu, Qiulan, Dou, Xin, Wang, Qi, Guan, Zhengbing, Cai, Yujie, and Liao, Xiangru (2018), "Isolation of β -1, 3-glucanase-producing microorganisms

- from *Poria cocos* cultivation soil via molecular biology", *Molecules*, 23(7), p. 1555.
211. Xi, Ke-Yong, Xiong, Shi-Jie, Li, Gang, Guo, Chang-Quan, Zhou, Jie, Ma, Jia-Wei, Yin, Jun-Liang, Liu, Yi-Qing, and Zhu, Yong-Xing (2022),"Antifungal Activity of *Ginger Rhizome* Extract against *Fusarium solani*", *Horticulturae*, 8(11), p. 983.
 212. Xia, Xuwei, Liu, Jun, Huang, Li, Zhang, Xiaoyong, Deng, Yunqin, Li, Fengming, Liu, Zhiyuan, and Huang, Riming (2022),"Molecular details of actinomycin D-Treated MRSA revealed via high-dimensional data", *Marine drugs*, 20(2), p. 114.
 213. Xie, Benkang, Wei, Xinpei, Wan, Chu, Zhao, Wei, Song, Renfeng, Xin, Shuquan, and Song, Kai (2024),"Exploring the Biological Pathways of Siderophores and Their Multidisciplinary Applications: A Comprehensive Review", *Molecules*, 29(10), p. 2318.
 214. Yamaguchi, Maki, Yamaki, Hiroshi, Shinoda, Takako, Tago, Yoshitaka, Suzuki, Hideo, Nishimura, Toshio, and Yamaguchi, Hideyo (1990),"The mode of antifungal action of (S) 2-amino-4-oxo-5-hydroxypentanoic acid, RI-331", *The Journal of Antibiotics*, 43(4), p. 411.
 215. Yang, Zhijie, He, Jianqiao, Wei, Xin, Ju, Jianhua, and Ma, Junying (2020),"Exploration and genome mining of natural products from marine *Streptomyces*", *Applied microbiology biotechnology*, 104, p. 67.
 216. Yano, Shigekazu, Kanno, Haruki, Tshako, Haruna, Ogasawara, Sonoka, Suyotha, Wasana, Konno, Hiroyuki, Makabe, Koki, Uechi, Keiko, and Taira, Toki (2021),"Cloning, expression, and characterization of a GH 19-type chitinase with antifungal activity from *Lysobacter* sp. MK9-1", *Journal of bioscience bioengineering*, 131(4), p. 348.
 217. Yoshida, M and Horikoshi, K (1988),"Preparation and use of FR900848 from *Streptoverticillium ferverns*", *European Patent Application*, 286, p. 330.

218. Young, MD, Kempe, Lloyd Lute, and Bader, FG (1985),"Effects of phosphate, glucose, and ammonium on cell growth and lincomycin production by *Streptomyces lincolnensis* in chemically defined media", *Biotechnology bioengineering*, 27(3), p. 327.
219. Yu, Jicheng, Liu, Qiu, Liu, Qiao, Liu, Xiangdong, Sun, Qiang, Yan, Jianfang, Qi, Xiaohui, and Fan, Shengdi (2008),"Effect of liquid culture requirements on antifungal antibiotic production by *Streptomyces rimosus* MY02", *Bioresource Technology*, 99(6), p. 2087.
220. Yu, Yiyang, Gui, Ying, Li, Zijie, Jiang, Chunhao, Guo, Jianhua, and Niu, Dongdong (2022),"Induced systemic resistance for improving plant immunity by beneficial microbes", *Plants*, 11(3), p. 386.
221. Yun, Tianyan, Zhang, Miaoyi, Zhou, Dengbo, Jing, Tao, Zang, Xiaoping, Qi, Dengfeng, Chen, Yufeng, Li, Kai, Zhao, Yankun, and Tang, Wen (2021),"Anti-Foc RT4 activity of a newly isolated *Streptomyces* sp. 5–10 from a medicinal plant (*Curculigo capitulata*)", *Frontiers in Microbiology*, 11, p. 610698.
222. Zhang, Di, Shu, Chenyan, Lian, Xiaoyuan, and Zhang, Zhizhen (2018),"New antibacterial bagremycins F and G from the marine-derived *Streptomyces* sp. ZZ745", *Marine drugs*, 16(9), p. 330.
223. Zhang, Shuxiang, Sun, Feifei, Liu, Lijun, Bao, Liyun, Fang, Wei, Yin, Caiping, and Zhang, Yinglao (2020),"Dragonfly-associated *Trichoderma harzianum* QTYC77 is not only a potential biological control agent of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* but also a source of new antibacterial agents", *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 68(48), p. 14161.
224. Zhao, Guodong, Liang, Lixin, Wang, Eryu, Lou, Shaoyan, Qi, Rui, and Tong, Rongbiao (2021),"Fenton chemistry enables the catalytic oxidative rearrangement of indoles using hydrogen peroxide", *Green Chemistry*, 23(6), p. 2300.

225. Zheng, Si-Jun, García-Bastidas, Fernando A, Li, Xundong, Zeng, Li, Bai, Tingting, Xu, Shengtao, Yin, Kesuo, Li, Hongxiang, Fu, Gang, and Yu, Yanchun (2018),"New geographical insights of the latest expansion of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4 into the greater Mekong subregion", *Frontiers in Plant Science*, 9, p. 457.
226. Zhou, Shanshan, Song, Lijiang, Masschelein, Joleen, Sumang, Felaine AM, Papa, Irene A, Zulaybar, Teofila O, Custodio, Aileen B, Zabala, Daniel, Alcantara, Edwin P, and De Los Santos, Emmanuel LC (2019),"Pentamycin biosynthesis in Philippine *Streptomyces* sp. S816: cytochrome P450-catalyzed installation of the C-14 hydroxyl group", *ACS Chemical Biology*, 14(6), p. 1305.
227. Zou, Niexia, Zhou, Dengbo, Chen, Yinglong, Lin, Ping, Chen, Yufeng, Wang, Wei, Xie, Jianghui, and Wang, Mingyuan (2021),"A novel antifungal actinomycete *Streptomyces* sp. strain H3-2 effectively controls banana fusarium wilt", *Frontiers in Microbiology*, 12, p. 706647.
228. <https://pembroke.graphics/panama-disease-illustrated-lifecycle-infographic/>.
229. <https://www.producereport.com/article/global-banana-exports-down-12-million-metric-tons-2022>.
230. <https://www.promusa.org/Fusarium+oxysporum+f.+sp.+cubense>.

PHỤ LỤC