

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

Nguyễn Thị Thanh Mai

NGHIÊN CỨU ĐẶC TÍNH 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

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

Hà Nội - 2025

Công trình được hoàn thành tại:

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên - Đại học Quốc gia Hà Nội

Người hướng dẫn khoa học: 1. PGS.TS. Nguyễn Xuân Cảnh
2. PGS.TS. Trần Văn Tuấn

Phản biện:

Phản biện:

Phản biện:

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ
hợp tại Trường Đại học Khoa học Tự nhiên - ĐHQGHN
vào hồi....giờ....ngày..... tháng..... năm 20.....

Có thể tìm hiểu luận án tại:

- Thư viện Quốc gia Việt Nam
- Trung tâm Thông tin - Thư viện, Đại học Quốc gia Hà Nội

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.

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 *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 và ảnh hưởng trực tiếp đến năng suất và chất lượng chuối và gây thiệt hại nghiêm trọng đến kinh tế của nông dân.

Xạ khuẩn đã được nghiên cứu và có nhiều ứng dụng quan trọng trong nông nghiệp như: sản xuất các hợp chất kháng khuẩn, kháng nấm và thúc đẩy sự phát triển của cây trồng. Một trong những ứng dụng đáng chú ý nhất trong thời gian gần đây là việc sử dụng xạ khuẩn để kháng *Fusarium oxysporum*, tác nhân gây bệnh héo vàng lá chuối, một căn bệnh nghiêm trọng ảnh hưởng đến sản lượng và chất lượng cây trồng.

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.

Đề tài: “*Nghiên cứu đặc tính sinh học, di truyền của một số chủng xạ khuẩn có hoạt tính đối kháng nấm Fusarium oxyporum* f. sp. *cubense* gây bệnh héo vàng trên cây chuối tại Việt Nam” được thực hiện với mục đích nghiên cứu, tìm kiếm các chủng xạ khuẩn bản địa có khả năng đối kháng với nấm bệnh héo vàng trên cây chuối tại Việt Nam. Đồng thời tìm hiểu 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 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

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* của chủng xạ khuẩn này. 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 Fusarium 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 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 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. Bệnh héo vàng phân bố ở các vùng sản xuất chuối trên toàn cầu, cả vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới. 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.

Triệu chứng bệnh héo vàng bên ngoài có thể quan sát thấy trên lá, thân giả, củ. Chu kỳ bệnh héo vàng bắt đầu khi tác nhân gây bệnh xâm nhập vào vật chủ tiềm năng thông qua phần chóp rễ, nhờ chất dinh dưỡng của cây chủ, bào tử nấm nảy mầm tạo hệ sợi phát triển. 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.

1.2. CÁC HỢP CHẤT THỨ CẤP CÓ HOẠT TÍNH ĐỐI KHÁNG NẤM TỪ 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 sử dụng nhiều cơ chế khác nhau như khả năng tiết kháng sinh, cạnh tranh dinh dưỡng và môi trường sống, sinh spiderophores, tiết các enzyme phân giải, các hợp chất hữu cơ dễ bay hơi (VOC) và một số cơ chế khác để kiểm soát mầm bệnh trên cây trồng.

1.3. THU NHẬN HỢP CHẤT THỨ CẤP TỪ XẠ KHUẨN

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.

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.

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

Giải trình tự và phân tích bộ gen là một trong những phương thức tiếp cận mới dựa trên các kỹ thuật khai thác thông tin bộ gen sử dụng các công cụ, phần mềm tin sinh học để khám phá tiềm năng sinh tổng hợp các sản phẩm tự nhiên, khám phá cấu trúc hóa học của các phân tử mới chưa xác định ở mức độ phân tử. Các công cụ này cho phép thực hiện các phân tích so sánh, suy luận về các mối quan hệ chức năng giữa gen và protein mà còn giúp dự đoán về tính đặc hiệu của chất nền và các tính chất xúc tác của các enzyme sinh tổng hợp. Dựa vào trình tự bộ gen đã biết, phân tích trình tự của các enzyme được mã hóa bởi các cụm gen nhằm 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.

Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. VẬT LIỆU

Bộ sưu tập 45 chủng xạ khuẩn được phân lập từ các vùng đất trồng chuối tại Việt Nam. 160 mẫu chuối bị bệnh héo vàng điển hình. Các chủng nấm gây bệnh trên thực vật *Colletotrichum gloeosporioides* (VCM-1122), *Corynespora casiicola* (VCM-1163), *Fusarium solani* (VCM-1147), *Sclerotium rolfsii* (VCM-1098), *Diaporthe* sp. (VCM-1056)

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Phương pháp lấy mẫu chuối bị bệnh.

2.2.2. Phương pháp phân lập, tuyển chọn, định danh và xác định đặc điểm sinh học và định danh vi sinh vật

2.2.3. Phương pháp tái lây nhiễm nhân tạo trong phòng thí nghiệm trên cây chuối

2.2.4. Các phương pháp trong giải trình tự, phân tích toàn bộ hệ gen xạ khuẩn

2.2.5. Nghiên cứu các điều kiện lên men nhằm tăng khả năng kháng nấm *Foc TR4* của chủng *VNUA116*

2.2.6. Phương pháp phân lập và xác định các hoạt chất thứ cấp

Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

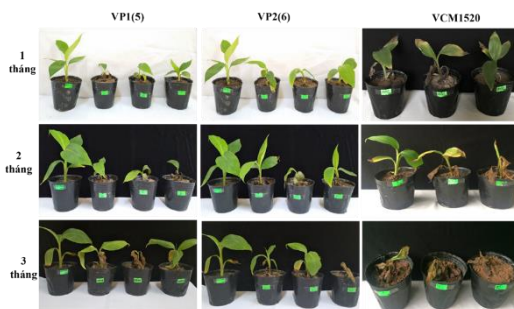
3.1. Phân lập, tuyển chọn nấm *Foc TR4* gây bệnh héo vàng trên cây chuối tại Việt Nam

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

Từ 160 mẫu chuối bị bệnh có các biểu hiện của bệnh héo Panama điển hình được thu thập tại 7 tỉnh, phân lập được 50 chủng nấm có đặc điểm hình thái tương tự loài *Fusarium oxysporum* theo Thangavelu và cộng sự năm 2019 đã mô tả.

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

Kết quả cho thấy: Sau 30, 60 và 90 ngày 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 *Fusarium* ở các mức độ khác nhau.

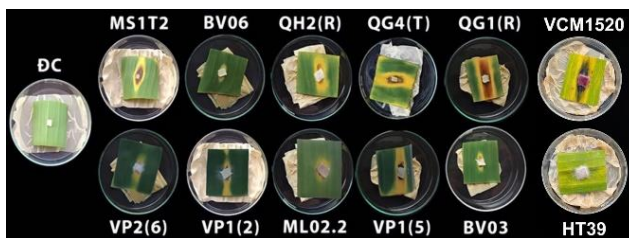


Hình 3.2 Tái lây nhiễm các chủng nấm điển hình gây bệnh héo vàng trên cây chuối

Căn cứ vào mức độ biểu hiện bệnh trong thí nghiệm tái lây nhiễm, các chủng nấm gây bệnh được chia thành 5 nhóm với các mức độ biểu hiện bệnh 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	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), HHH1(T), R05	1	- Không biểu hiện triệu chứng gây bệnh	Nhóm 4	VP3(1), HHI1(R), QG5(T), QG4(R), TG11	4	- Gây bệnh mạnh - Tất cả các cây nhiễm bệnh biểu hiện triệu chứng lá vàng đậm.
	VP1(1), VP1(3), ML01, ML04.3, ML06, ML08, VGI1T, QG5(R),	2	- Gây bệnh yếu - Lá vàng chủ yếu phía dưới		Nhóm 5	QG4(T), QH2(R), VCM1520, HT39, VP1(2), VP2(6), VP1(5), ML02.2, QG1(R), BV06, BV03, MS1T2	5
Nhóm 3	VP8(2), ML02, ML04.1, ML04.2, ML05, NF01, IIT10, L05n	3	- Có gây bệnh - Tất cả các lá vàng phía dưới và 1 số lá non bị đổi màu.				



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

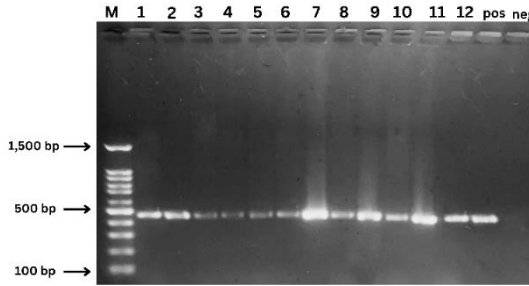
Sau 5 ngày tái lây nhiễm 12 chủng nấm lựa chọn, tất cả lá ở các thí nghiệm đều xuất hiện các triệu chứng điển hình của bệnh héo vàng (Hình 3.3).

3.1.3. Định danh các chủng nấm gây bệnh.

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. Kết quả phân tích cho thấy rằng 12 chủng nấm tuyển chọn đều là *Foc*.

Khuếch đại với cặp mồi đặc hiệu *Foc*TR4-F/*Foc*TR4-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 3.5 Hình ảnh PCR nhân gen băng cặp môi *Foc* TR4-F/*Foc*TR4-R

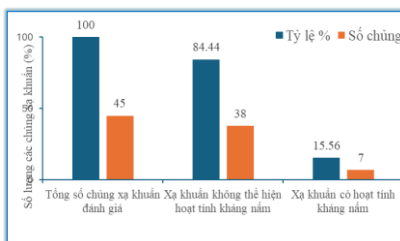
1-BV03, 2-VP1(5), 3-QG1R, 4-VP2(6), 5-M102.2, 6-QH2(r), 7-VP1(2), 8-QG4T, 9-MS1T2, 10-BV06, 11- HT39 và 12-VCM1520 pos: *Foc* TR4 đối chứng dương, neg: *Foc* race 1 đối chứng âm.

Từ 12 chủng nấm được xác định là *Foc* TR4. Lựa chọn chủng nấm *Foc* TR4 VCM1520 có các đặc điểm sinh học điển hình để sử dụng làm chủng kiểm định để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo.

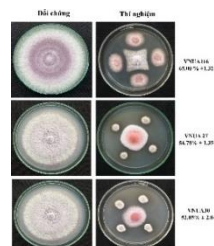
3.2. Sàng lọc và tuyển chọn xạ khuẩn có khả năng đối kháng nấm gây bệnh héo vàng trên cây chuối

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

Bộ sưu tập 45 chủng xạ khuẩn được sàng lọc hoạt tính kháng nấm trong đó 84,44% không thể hiện hoạt tính và 15,56% các chủng thể hiện hoạt tính đối kháng mạnh với nấm *Foc* TR4 VCM1520 (Hình 3.6).



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



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

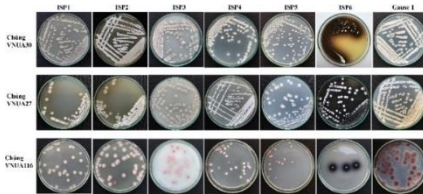
Lựa chọn 3 chủng xạ khuẩn VNUA116, VNUA27 và VNUA30 có khả năng kháng nấm cao nhất lần lượt đạt 65%, 54,78% và 52,85% (Hình 3.7).

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

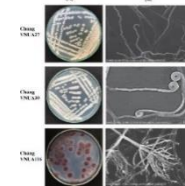
3.2.2.1. Đặc điểm hình thái, khả năng sinh sắc tố của các chủng xạ khuẩn tuyển chọn

+)Đặc điểm hình thái

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 3.9.



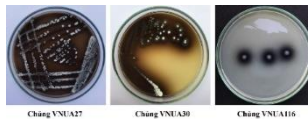
Hình 3.8 Hình thái khuẩn lạc của các chủng xạ khuẩn trên các môi trường nuôi cấy.



Hình 3.9 Đặc điểm hình thái cuống sinh bào tử của các chủng xạ khuẩn nghiên cứu

+)Khả năng sinh 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). Trong đó môi trường nuôi cấy chủng VNUA116 chuyển sang màu đen chứng tỏ chủng VNUA116 thể hiện khả năng sinh melanin mạnh nhất.



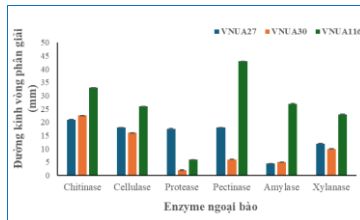
Hình 3.10. Khả năng sinh sắc tố melanin của 3 chủng xạ khuẩn nghiên cứu

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

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, các chủng xạ khuẩn cũng có khả năng chịu được nồng độ muối trong khoảng 1-3% . 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. Ba chủng xạ khuẩn này không có khả năng sinh idole, không sinh acetoin, có khả năng phân giải kali khó tan, chỉ có chủng VNUA27 có khả năng phân giải phosphate khó tan.

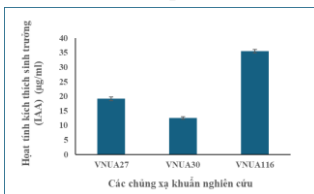
3.2.3. Đánh giá hoạt tính sinh học của các chủng xạ khuẩn nghiên cứu

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

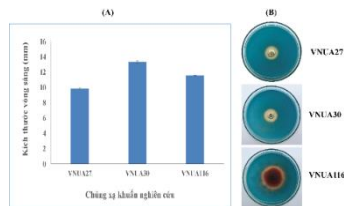


Hình 3.11 Khả năng sinh enzyme ngoại bào của 3 chủng xạ khuẩn nghiên cứu

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



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



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

Đã đánh giá được đặc điểm sinh học của 3 chủng xạ khuẩn tuyển chọn và lựa chọn được chủng xạ khuẩn 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 $\mu\text{g/ml}$), khả năng sinh siderophore dạng hydroxamates và một số hoạt tính sinh học tiềm năng khác

3.2.4. Định danh các chủng xạ khuẩn.

So sánh trình tự 16S rRNA với dữ liệu trong GenBank và xây dựng cây phát sinh chủng loại sử dụng phần mềm MEGA6. Kết quả định danh xác định 3 chủng lần lượt là *Streptomyces diastatochromogenes* VNUA27, *Streptomyces decanensis* VNUA30 và *Streptomyces lilacinus* VNUA116 với mức độ tương đồng lần lượt là 99,13, 99,8 và 99,0%.

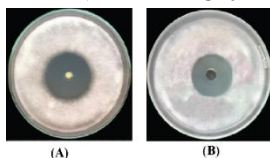
3.2.5. Đánh giá mức độ an toàn của các chủng xạ khuẩn tuyển chọn.

Kết quả 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 cho thấy cả 3 chủng xạ khuẩn tuyển chọn đều thuộc nhóm 1- nhóm có mức độ rủi ro thấp, không có nguy cơ gây bất cứ một nguy hiểm nào đối với người và động vật.

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.

Đã lựa chọn được các điều kiện thích hợp nhất với chủng VNUA116 cho hoạt tính kháng nấm *Foc* TR4 VCM1520 cao nhất: Môi trường khoáng YIM 301, nguồn carbon CB1 (tinh bột tan 40 g/l, D-glucose 1 g/l) và nguồn nitơ N1 (cao thịt bò 3 g/l, cao nấm men 5 g/l, pepton 3 g/l), pH 7, nhiệt độ 30°C với hoạt tính kháng nấm xuất hiện sớm nhất (ngày thứ 7) và đạt tối đa vào ngày thứ 10 và 11.

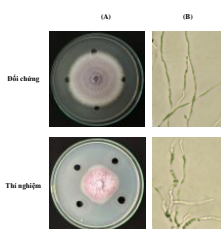
Với các thành phần môi trường và điều kiện lên men thích hợp được lựa chọn, chủng xạ khuẩn VNUA116 đã thể hiện khả năng sinh chất kháng nấm với đường kính vòng kháng nấm đạt cực đại $30,67 \pm 0,58$ mm tương đương với hiệu lực kháng nấm đạt 93,20% (tăng 1,43 lần so với ban đầu) sau 11 ngày lên men



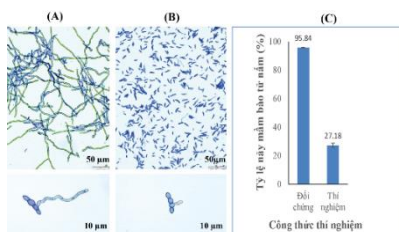
Hình 3.16. Khả năng ức chế nấm *Foc* TR4 của chủng xạ khuẩn VNUA116

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 hình thái hệ sợi và khả năng nảy mầm của bào tử nấm



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



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

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. Đồng thời, cao chiết xạ có khả năng ức chế mạnh (72,82%) sự nảy

màng của bào tử *Foc* TR4 VCM1520 và ảnh hưởng đến khả năng kéo dài ống mầm (Hình 3.18 C) tương đương với khả năng nảy mầm bào tử nấm chỉ đạt 27,18%.

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

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

Cao chiết chủng 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 $\mu\text{g/ml}$).

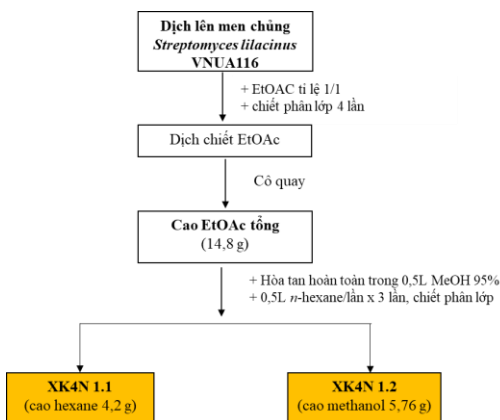
3.2.7.4 *Đánh giá khả năng kháng nấm phổ rộng của chủng xạ khuẩn VNUA116.*

Kết quả cho thấy rằng chủng xạ khuẩn VNUA116 có khả năng ức chế sự phát triển của tất cả 6 loài nấm gây bệnh thực vật khác nhau được thử nghiệm. 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 loại nấm gây bệnh thực vật khác nhau.

3.3. Phân lập và xác định cấu trúc hóa học các hợp chất từ chủng xạ khuẩn *Streptomyces lilacinus* VNUA116.

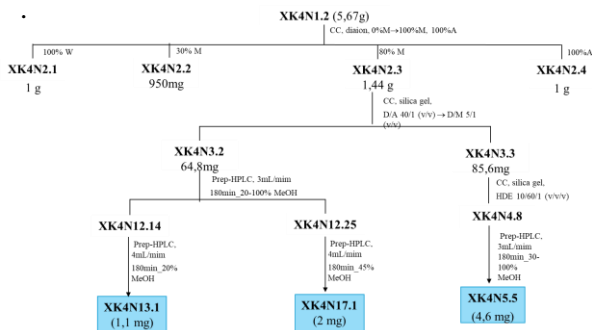
3.3.1. *Xử lý mẫu, tạo cặn chiết.*

Quy trình phân lập cận chiết của chủng xạ khuẩn VNUA116 trình bày tại hình 3.20. Kí hiệu mẫu là **XK4**



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

3.3.2. Phân lập các chất từ các cận chiết.



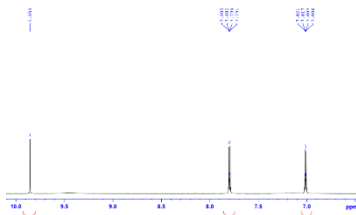
Hình 3.21. Sơ đồ phân lập chất trong mẫu xạ khuẩn VNUA116

Kết quả phân lập các chất từ cận chiết tổng chủng xạ khuẩn VNUA116 như (Hình 3.21). Kết quả thu được 3 hợp chất **XK4N13.1** (1.1 mg), **XK4N17.1** (2mg) và **XK4N5.5** (4,6 mg).

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

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

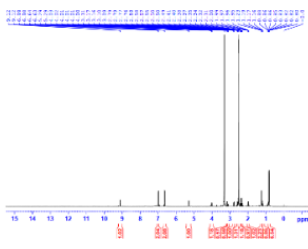


Hình 3.23. Dữ liệu phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất XK4N13.1

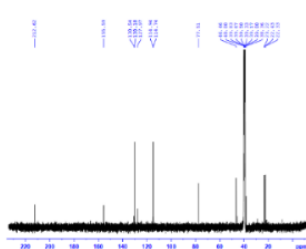
Kết hợp các dữ liệu phổ NMR và so sánh với tài liệu tham khảo cho phép xác định hợp chất XK4N13.1 là *p*-hydroxybenzadehyde [47].

3.3.3.2. Hợp chất XK4N17.1: 4-Hydroxysattabacin

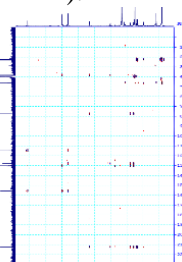
Hợp chất XK4N17.1 thu được dưới dạng chất rắn vô định hình màu vàng nâu. Có công thức phân tử $C_{13}H_{18}O_3$ ($M = 222$).



Hình 3.25: Dữ liệu phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất XK4N17.1



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

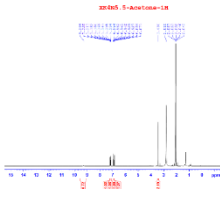


Hình 3.27. Dữ liệu phổ HMBC của hợp chất XK4N17.1

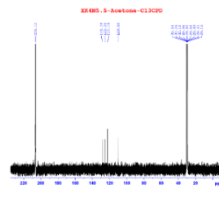
Từ các dữ liệu phổ 1D, 2D – NMR kết hợp với tài liệu tham khảo có thể kết luận hợp chất XK4N 17.1 là hợp chất **4-hydroxysattabacin**.

3.3.3.3. Hợp chất XK4N5.5: Oxindole

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



Hình 3.29. Dữ liệu phổ ^1H -NMR của hợp chất XK4N5.5



Hình 3.30. Dữ liệu phổ ^{13}C -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** [245].

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.

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

Kết quả bảng 3.11 chứng tỏ các đoạn trình tự giải được có kích thước rất lớn, chất lượng tốt, thuận lợi cho công tác lắp ráp để hình thành một bộ genome hoàn chỉnh.

InterProScan và có 3879 protein đã có chú thích về bản thể luận gen (GO) và vẫn còn 778 gen trong hệ gen của chủng 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 xạ khuẩn VNUA116.

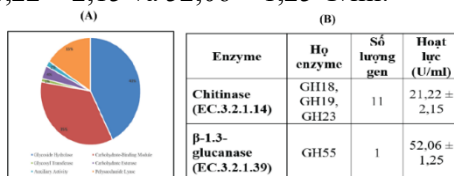
3.4.2.2 Phân nhóm enzyme trong hệ gen chủng xạ khuẩn VNUA116.

Số lượng CAZyme được dự đoán của chủng xạ khuẩn VNUA116 là 180 enzyme được phân vào các nhóm như bảng 3.13.

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)

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. Nhóm GH 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.



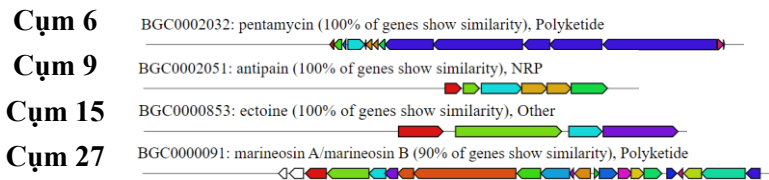
Hình 3.35. Phân tích các CAZyme của chủng VNUA116

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

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 có thể liên quan đến tác dụng đối kháng của chúng hoạt động chống lại nấm gây bệnh thực vật.

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



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

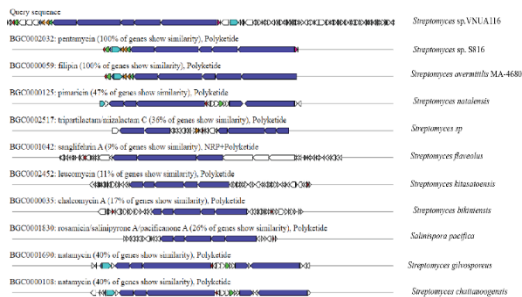
Bên cạnh các gen mã hóa cho các chất chuyển hóa có mức độ tương đồng cao (> 90%) thì còn lại rất nhiều cụm gen mã hóa cho các hợp chất thứ cấp có mức độ tương đồng dưới 20% như dudomycin A (8%), hexacosalactone A (13%), hedamycin (9%), legonindolizidine A6 (12%), sarasinamide (18%), kendomycin B (9%), 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.

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.

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.

Con đường sinh tổng hợp pentamycin cụm gen 6



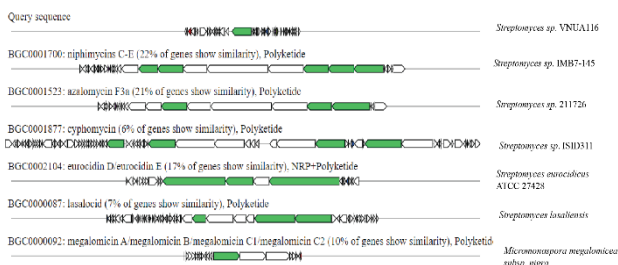
Hình 3.37. Dữ liệu so sánh cụm gen 6 trên MIBiG

Pentamycin là một loại kháng sinh polyene- là một phân nhóm của macrolide- có hoạt tính kháng nấm mạnh. Điều này càng khẳng định rằng, chủng 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 cụm 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

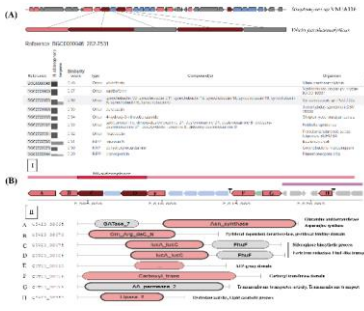
3.4.4.2 Con đường sinh tổng hợp siderophore.

Phân tích hệ gen của chủng 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.

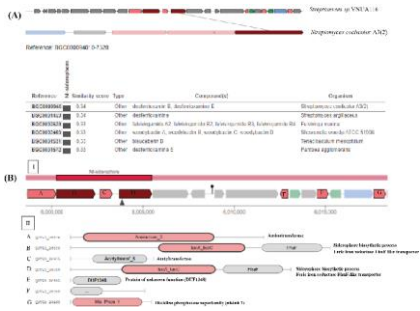
Con đường sinh tổng hợp carboxylate siderophore

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); (2) Pyridoxal-dependent decarboxylase và pyridoxal binding domain (Q3V23_08670); (3) hai họ protein sinh tổng hợp siderophore IucA/IucC (Q3V23_08675, Q3V23_08685) và chất vận chuyển FhuF (Q3V23_08675, Q3V23_08685); (4) ATP-grasp domain (Q3V23_08690) một miền protein có vai trò quan trọng trong quá trình sinh tổng hợp siderophore;

(5) Amino acid permease (Q3V23_08725); (6) Hydrolase, activity lipid catabolic process (Q3V23_08750) (Hình 3.40B)



Hình 3.40. Thông tin các gen mã hóa carboxylate siderophore của chủng VNUA116 trên AntiSMASH
Con đường sinh tổng hợp hydroxamate siderophore



Hình 3.41. Thông tin các cụm gen mã hóa hydroxamate siderophore của chủng VNUA116 trên AntiSMASH
Con đường sinh tổng hợp hydroxamate siderophore

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); (2) hai họ protein sinh tổng hợp siderophore IucA/IucC (Q3V23_26900, Q3V23_26910) và chất vận chuyển FhuF (Q3V23_26900, Q3V23_26910); (3) một acetyltransferase (Q3V23_26905); (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) (Hình 3.41 B).

Việc sở hữu đầy đủ các enzyme cần thiết (Hình 3.28) trong các pathway sinh tổng hợp siderophore giúp chủng này có thể tổng hợp đồng thời cả hai loại siderophore và 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.

KẾT LUẬN, KIẾN NGHỊ

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 $\mu\text{g/ml}$), 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: 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 (Hung Yên, Phú Thọ...)