

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Lê Thị Ánh Tuyết

**NGHIÊN CỨU ĐẶC TÍNH PHÒNG TRỪ NẤM BỆNH VÀ
ĐẶC ĐIỂM DI TRUYỀN HỆ GEN CỦA XẠ KHUẨN
VÙNG RỄ CÂY SÂM NGỌC LINH DI THỰC TẠI TỈNH
YÊN BÁI**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

LÊ THỊ ANH TUYẾT

**SINH HỌC THỰC
NGHIỆM**

2026

Hà Nội - 2026

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Lê Thị Ánh Tuyết

**NGHIÊN CỨU ĐẶC TÍNH PHÒNG TRỪ NẤM BỆNH VÀ ĐẶC
ĐIỂM HỆ GEN CỦA XẠ KHUẨN VÙNG RỄ CÂY SÂM NGỌC
LINH DI THỰC TẠI TỈNH YÊN BÁI**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8 42 01 14

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

TS. Quách Ngọc Tùng

Hà Nội - 2026

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đề tài nghiên cứu: **“Nghiên cứu đặc tính phòng trừ nấm bệnh và đặc điểm di truyền hệ gen của xạ khuẩn vùng rễ cây sâm Ngọc Linh di thực tại tỉnh Yên Bái”** là công trình nghiên cứu của cá nhân tôi và tập thể nghiên cứu dưới sự hướng dẫn của TS. Quách Ngọc Tùng.

Các kết quả nghiên cứu trong luận văn đảm bảo trung thực, khách quan nhất và chưa được công bố trong bất kỳ công trình nghiên cứu nào khác và được sự đồng ý của tập thể nghiên cứu. Các tài liệu tham khảo và nội dung kế thừa từ các công trình khác đều đã được trích dẫn đầy đủ theo đúng quy định.

Tôi xin chịu hoàn toàn trách nhiệm trước pháp luật và hội đồng đánh giá về tính trung thực của các số liệu và kết quả nêu trong luận văn này.

Hà Nội, ngày 11 tháng 06 năm 2026

Tác giả luận văn

Lê Thị Ánh Tuyết

LỜI CẢM ƠN

Trước hết, tôi xin chân thành cảm ơn Ban Lãnh đạo, Phòng Đào tạo cùng các phòng chức năng của Học viện Khoa học và Công nghệ. Đặc biệt, tôi xin gửi lời tri ân tới các thầy, cô giáo Khoa Sinh học đã tận tâm giảng dạy, trang bị cho tôi nền tảng kiến thức vững chắc trong suốt quá trình học tập bậc cao học.

Với lòng biết ơn sâu sắc, tôi xin gửi lời cảm ơn tới Thầy hướng dẫn là TS. Quách Ngọc Tùng, cán bộ tại Phòng Thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ lên men và Kỹ thuật cải biến sinh tổng hợp hoạt chất sinh học, Viện Sinh học đã luôn tận tình hướng dẫn, truyền đạt những kiến thức quý báu và định hướng cho tôi trong suốt quá trình thực hiện luận văn này.

Tôi xin gửi lời cảm ơn ThS. Trần Xuân Khôi cùng Ban lãnh đạo và các cán bộ nghiên cứu thuộc Phòng Thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ lên men và Kỹ thuật cải biến sinh tổng hợp hoạt chất sinh học đã tạo điều kiện thuận lợi nhất để tôi hoàn thành nghiên cứu này.

Luận văn được thực hiện nhờ sự hỗ trợ kinh phí từ Đề tài Phát triển công nghệ cấp Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam “Nghiên cứu phát triển công nghệ tạo giá thể hữu cơ vi sinh nhằm nâng cao năng suất và phòng trừ nấm gây bệnh hại trên cây sâm Ngọc Linh”, mã số đề tài: UDPTCN.02/25-27 do ThS. Trần Xuân Khôi chủ nhiệm.

Cuối cùng, tôi xin gửi lời tri ân sâu sắc tới gia đình và bạn bè đã luôn đồng hành, chia sẻ, ủng hộ và khích lệ tôi hết mình, là chỗ dựa tinh thần vững chắc cho tôi trong suốt thời gian qua.

Hà Nội, ngày 11 tháng 06 năm 2026

Học viên

Lê Thị Ánh Tuyết

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ CÁI VIẾT TẮT.....	vi
DANH MỤC CÁC BẢNG.....	vii
DANH MỤC CÁC HÌNH.....	viii
MỞ ĐẦU.....	1
Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1. TÌNH HÌNH DỊCH BỆNH HẠI DO NẤM TRÊN SÂM NGỌC LINH	3
1.1.1. Đặc điểm sinh học và thành phần hóa học của sâm Ngọc Linh	3
1.1.2. Dịch bệnh hại do nấm gây ra trên sâm Ngọc Linh	4
1.1.2.1. Tổng quan tình hình dịch bệnh hại do nấm trên cây sâm	4
1.1.2.2. Đặc điểm và đặc tính gây bệnh của nấm <i>Fusarium</i>	5
1.1.2.3. Đặc điểm của nấm <i>Rhizoctonia solani</i> gây bệnh	6
1.1.3. Các biện pháp phòng trừ nấm gây hại.....	7
1.1.3.1. Biện pháp vật lý	7
1.1.3.2. Biện pháp hóa học.....	8
1.1.3.3. Biện pháp sinh học.....	8
1.2. TỔNG QUAN VỀ XẠ KHUẨN VÙNG RỄ VÀ ỨNG DỤNG TRONG TRỒNG TRỌT.....	9
1.2.1. Giới thiệu về xạ khuẩn	9
1.2.2. Đặc điểm của xạ khuẩn vùng rễ	9
1.2.3. Phương pháp phân loại xạ khuẩn	10
1.2.4. Cơ chế đối kháng của xạ khuẩn đối với các vi sinh vật gây bệnh ..	10
1.2.4.1. Sản xuất các loại kháng sinh hay chất kháng nấm tự nhiên. 11	
1.2.4.2. Sản xuất enzym phân hủy thành tế bào nấm.....	11
1.2.4.3. Sản xuất các hợp chất hữu cơ dễ bay hơi.....	12
1.2.5. Đặc tính kích thích sinh trưởng của xạ khuẩn vùng rễ	12
1.3. CÔNG NGHỆ GIẢI TRÌNH TỰ GEN THỂ HỆ MỚI VÀ ỨNG DỤNG TRONG NGHIÊN CỨU XẠ KHUẨN.....	14
1.3.1. Lịch sử phát triển và đặc điểm của các công nghệ giải trình tự gen hiện nay	14

1.3.1.1. Công nghệ giải trình tự Illumina.....	14
1.3.1.2. Công nghệ giải trình tự Pacific Biosciences	15
1.3.1.3. Công nghệ giải trình tự Oxford Nanopore	16
1.3.2. Đặc điểm di truyền hệ gen xạ khuẩn.....	16
1.3.3. Các cụm gen tham gia sinh tổng hợp hoạt chất kháng nấm.....	17
1.4. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU XẠ KHUẨN TẠI VIỆT NAM.....	19
Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	22
2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU	22
2.1.1. Vật liệu và chủng giống	22
2.1.2. Hóa chất và thiết bị	22
2.1.3. Môi trường	22
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	23
2.2.1. Phân lập các chủng xạ khuẩn từ đất vùng rẫy cây sâm Ngọc Linh ..	23
2.2.2. Sàng lọc các chủng có khả năng kháng nấm bằng phương pháp đối kháng trên đĩa thạch	23
2.2.3. Đánh giá hoạt tính kháng nấm của dịch nuôi cấy xạ khuẩn.....	24
2.2.4. Đánh giá khả năng sinh các hợp chất bay hơi ức chế nấm bệnh	24
2.2.5. Đánh giá hoạt tính kháng nấm của cao chiết thô bằng phương pháp khuếch tán trên giếng thạch	25
2.2.6. Đánh giá tác động của cao chiết thô đến sự nảy mầm và hình thái của bào tử nấm.....	26
2.2.7. Phương pháp đánh giá khả năng sinh enzym ngoại bào và IAA	26
2.2.8. Đánh giá khả năng kích thích nảy mầm của hạt giống	27
2.2.9. Phương pháp định danh xạ khuẩn.....	27
2.2.9.1. Phân loại dựa trên đặc điểm hình thái.....	27
2.2.9.2. Phân loại xạ khuẩn dựa trên giải trình tự gen 16Sr RNA	27
2.2.10. Giải trình tự hệ gen của chủng xạ khuẩn tiềm năng	28
2.2.11. Chú giải và phân tích di truyền hệ gen.....	29
2.2.12. Xử lý thống kê.....	30
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	31
3.1. Phân lập và tuyển chọn các chủng xạ khuẩn có đặc tính kháng nấm	31
3.2. Đánh giá đặc tính kháng nấm của chủng xạ khuẩn PV1.....	33

3.2.1. Đánh giá khả năng đối kháng trực tiếp nấm bệnh của chủng xạ khuẩn PV1	33
3.2.2. Đánh giá hoạt tính kháng nấm của dịch nuôi cấy chủng PV1	35
3.2.3. Đánh giá khả năng tổng hợp các chất bay hơi ức chế nấm bệnh	36
3.2.4. Đánh giá hoạt tính kháng nấm của cao chiết thô	37
3.2.5. Đánh giá khả năng ức chế nảy mầm bào tử nấm của cao chiết thô chủng PV1	39
3.2.6. Khả năng sinh tổng hợp enzym ngoại bào của chủng PV1	41
3.3. Nghiên cứu tiềm năng kích thích sinh trưởng thực vật của chủng PV1	43
3.3.1. Đánh giá khả năng sinh indole - 3 - acetic axit	43
3.3.2. Đánh giá khả năng kích thích nảy mầm của hạt giống	44
3.4. Định danh chủng xạ khuẩn PV1	46
3.4.1. Phân loại dựa trên đặc điểm hình thái	46
3.4.2. Phân loại bằng phân tích trình tự gen 16S rRNA	46
3.5. Giải trình tự và phân tích đặc điểm di truyền hệ gen liên quan đến các hợp chất kháng nấm của chủng PV1	48
3.5.1. Giải trình tự, lắp ráp và chú giải hệ gen chủng PV1	48
3.5.2. Định danh chủng PV1 dựa trên dữ liệu toàn bộ hệ gen	52
3.5.3. Phân tích đặc điểm di truyền hệ gen liên quan đến các hợp chất kháng nấm của chủng <i>S. globosus</i> PV1	53
3.5.4. Phân tích các cụm gen mã hóa enzym phân giải vách tế bào nấm .	58
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	61
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	62
PHỤ LỤC.....	74

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ CÁI VIẾT TẮT

Chữ viết tắt	Tên đầy đủ tiếng Anh	Tên tiếng Việt
AntiSMASH	Antibiotics & Secondary Metabolite Analysis Shell	Hệ phân tích kháng sinh và chất chuyển hóa thứ cấp
BGC	Biosynthetic Gene Cluster	Cụm gen sinh tổng hợp
CAZy	Carbohydrate-Active Enzymes	Cơ sở dữ liệu các enzyme hoạt động trên carbohydrate
CBM	Carbohydrate-Binding Module	Mô-đun liên kết carbohydrate
CCS	Circular consensus sequence	Trình tự đồng thuận
CDS	Coding sequence	Vùng trình tự mã hóa
DNA	Deoxyribonucleic acid	Axit deoxyribonucleic
GH	Glycoside hydrolase	Enzym thủy phân glycoside
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes	Bách khoa toàn thư Kyoto về gen và hệ gen
KTCC		Khuẩn ty cơ chất
KTKS		Khuẩn ty khí sinh
NCBI	National Center for Biotechnology Information	Trung tâm Thông tin Công nghệ Sinh học Quốc gia
NCTC	The National Collection of Type Cultures	Bộ sưu tập Quốc gia về các chủng chuẩn
NGS	Next-generation sequencing	Giải trình tự thế hệ mới
NRPS	Peptide non-ribosomal	Peptide không ribosome
ORF	Open reading frame	Khung đọc mở
PCR	Polymerase chain reaction	Phản ứng chuỗi polymer
PKS	Polyketide synthase	Enzym tổng hợp polyketide
RiPP	Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides	Peptide được tổng hợp bởi ribosome và biến đổi sau dịch mã
RNA	Ribonucleic acid	Axit ribonucleic
rRNA	Ribosomal ribonucleic acid	Axit ribosomal ribonucleic
SP	Signal Peptide	Peptide tín hiệu
VOCs	Volatile Organic Compounds	Các hợp chất bay hơi
WGS	Whole Genome Sequencing	Giải trình tự toàn bộ hệ gen

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 3.1. Sàng lọc các chủng xạ khuẩn có khả năng ức chế nấm bệnh	32
Bảng 3.2. Hoạt tính kháng nấm của chủng PV1	33
Bảng 3.3. Khả năng sinh enzym của chủng PV1	41
Bảng 3.4. Các đặc điểm hệ gen của chủng PV1.....	50
Bảng 3.5. Các cụm BGC được dự đoán bằng công cụ AntiSMASH.....	54
Bảng 3.6. Các gen mã hóa chitinase trong hệ gen chủng <i>S. globosus</i> PV1	58

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 1.1. Các cơ chế đối kháng chính của xạ khuẩn đối với mầm bệnh hại cây trồng [42]	12
Hình 1.2. Bản đồ hệ gen chủng <i>Streptomyces</i> sp. HP-A2021 [56]	17
Hình 3.1. Hình ảnh minh hoạ kết quả phân lập xạ khuẩn trên môi trường TWYE ..	31
Hình 3.2. Hoạt tính đối kháng nấm gây bệnh của chủng PV1	34
Hình 3.3. Hoạt tính ức chế nấm của dịch nuôi cấy chủng PV1 ở các nồng độ khác nhau	35
Hình 3.4. Khả năng ức chế nấm bệnh của các hợp chất hữu cơ bay hơi VOC	37
Hình 3.5. Khả năng kháng nấm của dịch chiết thô chủng PV1 nồng độ 100 µg/mL	38
Hình 3.6. Tác động của 20 µg/mL cao chiết thô tới sự nảy mầm bào tử chủng <i>F. solani</i> PAV1 và <i>C. gloeosporioides</i> PAV3 được quan sát dưới kính hiển vi quang học độ phóng đại 100X	40
Hình 3.7. Hoạt tính phân giải cơ chất trên đĩa thạch của chủng PV1	42
Hình 3.8. Khả năng sinh tổng hợp IAA của chủng PV1	43
Hình 3.9. Hình minh hoạ (A) và khả năng kích thích nảy mầm của chủng PV1 trên hạt lúa (B)	44
Hình 3.10. Hình ảnh minh hoạ (A) và kết quả kích thích nảy mầm của chủng PV1 trên hạt ngưu tất (B)	45
Hình 3.11. Điện di đồ sản phẩm PCR khuếch đại gen 16S rRNA của chủng PV1 trên gel agarose 1%. M: thang DNA chuẩn 1 kb	47
Hình 3.12. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc (A) và cây phát sinh loài thể hiện mối quan hệ di truyền giữa chủng PV1 và các chủng xạ khuẩn tham chiếu dựa trên trình tự gen 16S rRNA (B)	48
Hình 3.13. Biểu đồ chất lượng cơ sở được tạo bởi FastQC thông qua dữ liệu thô của đoạn đọc 1 (A) và 2 (B)	49
Hình 3.14. Bản đồ hệ gen dự thảo của chủng PV1	50
Hình 3.15. Phân loại các nhóm gen chức năng của PV1 và các chủng tham chiếu bằng cơ sở dữ liệu RAST	51
Hình 3.16. Cây phát sinh chủng loại dựa trên bộ gen của chủng PV1	52
Hình 3.17. Biểu đồ nhiệt độ so sánh độ tương đồng ANI giữa chủng PV1 và các chủng tham chiếu	53

Hình 3.18. Các cụm BGC tổng hợp chất kháng nấm được dự đoán trên hệ gen chủng PV1	55
Hình 3.19. Các cụm BGC tổng hợp chất kháng khuẩn được dự đoán trên hệ gen chủng PV1	56
Hình 3.20. Dự đoán miền cấu trúc của 5 chitinase dựa theo phân tích trình tự axit amin.	60

MỞ ĐẦU

Sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) là một trong những loại dược liệu quý và có giá trị của Việt Nam, phân bố chủ yếu ở vùng núi Ngọc Linh, Quảng Ngãi và Đà Nẵng sau sát nhập. Sâm Ngọc Linh được sử dụng để bồi bổ sức khỏe, hỗ trợ tiêu giảm kích thích khối u, tăng cường hệ miễn dịch và phòng chống bệnh ung thư. Trong thị trường Việt Nam, giá sâm dao động khoảng 40 - 200 triệu đồng/kg, tùy thuộc vào tuổi và nguồn gốc. Sâm tự nhiên bị người dân bản địa khai thác triệt để và đang bị đe dọa tuyệt chủng ở mức độ nghiêm trọng. Chính vì vậy, sâm Ngọc Linh được gọi tên chung là sâm Việt Nam và được phê duyệt nằm trong chương trình phát triển sâm Việt Nam đến năm 2030, định hướng đến năm 2045 theo Quyết định số 611/QĐ-TTg ngày 1/6/2023 của Thủ tướng Chính phủ. Với định hướng trên, cây sâm sẽ được di thực tại nhiều vùng sinh thái khác nhau nhằm bảo tồn và tạo ra thương hiệu sâm Việt Nam.

Trồng sâm ở quy mô lớn giúp tăng sản lượng nhưng đồng thời cũng đối mặt với mối đe dọa từ nấm gây bệnh hại, đặc biệt tỷ lệ mắc bệnh ngày càng cao đối với vùng trồng sâm nhiều năm. Cây nhiễm bệnh thường xuất hiện triệu chứng chẳng hạn như bị héo, thối rễ, rễ bị gi hoặc làm cây còi cọc, ảnh hưởng tiêu cực đến năng suất cây trồng. Nấm gây bệnh phần lớn là các loài thuộc chi *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Phytophthora*, *Colletotrichum*, *Pestalotiopsis*, *Pythium*,... Các bệnh thường gặp ở cây sâm chủ yếu do nấm gây bệnh nằm trong đất gây ra, bao gồm một số loài *Fusarium solani* (thối rễ hoặc rỉ sét), *Rhizoctonia solani* (đứt rễ, thối gốc, chết rạp), *Colletotrichum* spp. (thán thư, héo xanh) và *Pythium* spp. (gây bệnh thối rễ) [1]. Theo ghi nhận thực tế của Công ty cổ phần đầu tư Panax Việt Nam - đơn vị di thực cây sâm Ngọc Linh tới Yên Bái, dịch chết rạp, thối, lở cổ rễ diễn ra nghiêm trọng trên cây sâm 1-2 năm tuổi. Đặc biệt, cây nuôi cấy mô là đối tượng nhạy cảm nhất với các loại nấm bệnh. Các biện pháp hoá học có hiệu quả ngay lập tức nhưng dư lượng thuốc diệt nấm bệnh làm ảnh hưởng đến chất lượng vệ sinh an toàn thực phẩm và gây ô nhiễm môi trường. Đối với cây trồng lâu năm như sâm, thường trên 6 năm mới thu hoạch, việc sử dụng thuốc hoá học sẽ làm tăng dư lượng thuốc bảo vệ thực vật trong củ sâm.

Hiện nay, kiểm soát sinh học các bệnh lây truyền qua đất bằng cách sử dụng vi sinh vật là một giải pháp thay thế quan trọng. Trong hệ sinh thái phức tạp của vùng rễ, xạ khuẩn *Streptomyces* là nhóm vi sinh vật giữ vai trò quan trọng trong việc ức chế nấm bệnh thông qua khả năng sinh tổng hợp chất kháng nấm, cạnh tranh dinh dưỡng và enzym ngoại bào, đồng thời góp phần thúc đẩy sinh trưởng và phát triển cây trồng. Chủng *Streptomyces* sp. YIM PH20095 sinh chất streptenazine A-C và

baraphenazine E để ức chế nấm *Fusarium oxysporum*, *Alternaria panax*, *Phoma herbarum* gây bệnh thối cổ rễ sâm *Panax notoginseng* [2]. Tuy nhiên, chưa có nhiều công bố và chế phẩm thương mại từ xạ khuẩn sử dụng trong bảo vệ cây sâm Ngọc Linh.

Gần đây, sự phát triển vượt bậc của công nghệ giải trình tự toàn bộ hệ gen (Whole-genome sequencing, WGS) đã tạo ra bước tiến quan trọng trong nghiên cứu xạ khuẩn. Với khả năng giải mã toàn bộ hệ gen một cách nhanh chóng, WGS giảm thời gian nghiên cứu, sàng lọc hiệu quả các chủng xạ khuẩn tiềm năng, xác định chính xác các hoạt chất và đặc biệt đánh giá chính xác độ an toàn sinh học của chủng trước khi thử nghiệm trên diện rộng. Với các triển vọng nghiên cứu trên, đề tài: “**Nghiên cứu đặc tính phòng trừ nấm bệnh và đặc điểm di truyền hệ gen của xạ khuẩn vùng rễ cây Sâm Ngọc Linh di thực tại tỉnh Yên Bái**” được thực hiện với mục tiêu không chỉ tuyển chọn được chủng xạ khuẩn có tiềm năng phòng trừ nấm gây bệnh mà còn cung cấp những dữ liệu khoa học nền tảng về hệ gen nhằm canh tác sâm Ngọc Linh di thực theo hướng hữu cơ tại các tỉnh miền núi như Yên Bái.

Mục tiêu của đề tài

Đánh giá được các đặc tính kháng nấm của xạ khuẩn vùng rễ cây sâm Ngọc Linh di thực tại Yên Bái và từ đó xác định mối liên hệ di truyền hệ gen liên quan đến đặc tính kháng nấm của chủng tiềm năng.

Nội dung nghiên cứu

- 1) Phân lập và tuyển chọn các chủng xạ khuẩn tiềm năng từ đất vùng rễ cây sâm Ngọc Linh di thực tại tỉnh Yên Bái.
- 2) Đánh giá đặc tính kháng nấm của chủng xạ khuẩn tiềm năng.
- 3) Đánh giá tiềm năng kích thích sinh trưởng thực vật của chủng tiềm năng
- 4) Phân loại chủng xạ khuẩn tiềm năng dựa trên đặc điểm hình thái và phân tích trình tự gen 16S rRNA
- 5) Giải trình tự, phân tích đặc điểm di truyền hệ gen và mối liên hệ di truyền liên quan đến đặc tính kháng nấm.

Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. TÌNH HÌNH DỊCH BỆNH HẠI DO NẤM TRÊN SÂM NGỌC LINH

1.1.1. Đặc điểm sinh học và thành phần hóa học của sâm Ngọc Linh

Sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) là một trong những loài dược liệu quý hiếm và có giá trị đặc cao của Việt Nam. Loài này được phát hiện lần đầu tiên trong tự nhiên vào năm 1973 tại vùng núi Ngọc Linh, thuộc địa phận hai tỉnh Quảng Nam và Kon Tum. Đến năm 1985, Hà Thị Dung và I.V. Grushvitsky đã chính thức mô tả và công bố loài với tên khoa học *Panax vietnamensis* Ha et Grushv., thuộc chi *Panax*, họ *Araliaceae* [3]. Hiện, cây sâm được phê duyệt nằm trong chương trình phát triển sâm Việt Nam đến năm 2030, định hướng đến năm 2045 theo Quyết định số 611/QĐ-TTg ngày 1/6/2023 của Thủ tướng Chính phủ.

Sâm Ngọc Linh là cây thân thảo sống lâu năm, sinh trưởng chậm và chiều cao dao động từ 40 -100 cm. Cây mọc thẳng đứng và thân rễ dưới đất dạng đốt trúc mang các sẹo đặc trưng do thân khí sinh rụng qua hàng năm. Lá mọc tập trung ở đỉnh thân, dạng kép hình chân vịt mọc vòng, mỗi lá gồm 5 lá chét, mép có răng cưa, chóp nhọn và có lông ở cả hai mặt. Cây từ 3-5 năm tuổi bắt đầu ra hoa, hoa lưỡng tính màu vàng nhạt, mọc thành tán đơn dưới tán lá và thẳng trục với thân, mỗi tán gồm khoảng 60 - 100 hoa nhỏ. Mỗi quả thường chứa một hạt, đôi khi hai hạt, số quả trung bình trên mỗi cây dao động từ 10 - 30 quả. Thân rễ và rễ củ là bộ phận quan trọng và có giá trị dược liệu cao nhất của Sâm Ngọc Linh [4, 5]. Chu kỳ sinh trưởng của sâm Ngọc Linh hiện rõ tính mùa vụ: nảy chồi vào tháng 1 sau giai đoạn ngủ đông, ra hoa kết quả từ tháng 4 - 6, quả chín trong khoảng tháng 7 - 9 và ngủ đông từ tháng 11 - 12. Theo khuyến cáo, cây nên được thu hoạch khi đạt tối thiểu 5 năm tuổi để đảm bảo giá trị dược liệu.

Quần thể tự nhiên của sâm Ngọc Linh tập trung ở các khu vực núi cao, điển hình là dãy núi Ngọc Linh trải dài trên địa phận huyện Tu Mơ Rông, Đăk Tô của tỉnh Kon Tum và huyện Nam Trà My, tỉnh Quảng Nam cũ (nay là Quảng Ngãi). Tại các vùng bản địa, sâm Ngọc Linh sinh trưởng tối ưu dưới các tán rừng nguyên sinh độ cao từ 1200 m trở lên so với mực nước biển, nơi có độ che phủ lớn (thường trên 70%), khí hậu mát mẻ và có tầng thảm mục dày [4]. Bên cạnh các vùng phân bố tự nhiên, nhằm đáp ứng nhu cầu bảo tồn nguồn gen và phát triển nguồn kinh tế dược liệu, sâm Ngọc Linh hiện nay đã được di thực thành công tại một số địa phương có điều kiện vi khí hậu và thổ nhưỡng tương đồng như Lâm Đồng, Vĩnh Phúc, Yên Bái.

Về thành phần hóa học, sâm Ngọc Linh có hơn 300 hợp chất có hoạt tính sinh học và phân loại thành nhiều nhóm khác nhau, chẳng hạn như saponin, flavonoid,

phenolic,... Các hợp chất này thể hiện nhiều hoạt tính dược lý quan trọng như phòng chống khối u, chống viêm, bảo vệ thần kinh, chống căng thẳng [6].

Saponin triterpenoid là nhóm các hợp chất thứ cấp quan trọng quyết định giá trị dược lý và thương mại của sâm Ngọc Linh. Các hợp chất này được sinh tổng hợp và tích lũy trong hầu hết các bộ phận của cây và chia thành 4 nhóm chính dựa trên cấu trúc khung aglycone bao gồm: protopanaxadiol (PPD), protopanaxatriol (PPT), ocotillol (OCT) và oleanane (OA) [7]. Về mặt cấu trúc, hai nhóm PPD và PPT thuộc khung dammaran rất phổ biến trong chi *Panax*. Chúng bao gồm các chất ginsenoside như Rb1, Rb2, Rc, Rd (thuộc nhóm PPD) và Re, Rg1 (thuộc nhóm PPT). Nhóm OA có cấu trúc khung hệ 5 vòng và liên kết với nhau qua các gốc glucuronic axit. Các đại diện tiêu biểu của nhóm này bao gồm ginsenoside Ro và chikusetsusaponin IV/Iva [7]. Đặc biệt nhất trong sâm Ngọc Linh phải kể đến nhóm OCT, nhóm này sở hữu cấu trúc mang vòng epoxy đặc trưng ở vị trí C-20 với đại diện nổi bật nhất là majonoside R2 (MR2). Theo nghiên cứu của và cộng sự, MR2 có khả năng ức chế đáng kể đối với kháng nguyên sớm của virus Epstein-Barr (EBV-EA) do chất thúc đẩy khối u phorbol acetate gây ra và ngăn chặn sự hình thành khối u trên gan và da ở chuột [8]

1.1.2. Dịch bệnh hại do nấm gây ra trên sâm Ngọc Linh

1.1.2.1. Tổng quan tình hình dịch bệnh hại do nấm trên cây sâm

Trồng sâm ở quy mô lớn giúp tăng sản lượng nhưng đồng thời cũng đối mặt với mối đe dọa từ nấm gây bệnh hại, đặc biệt là đối với vùng trồng sâm nhiều năm. Các cây nhiễm bệnh thường xuất hiện triệu chứng như héo rũ, thối rễ, rễ bị gỉ hoặc chậm phát triển, ảnh hưởng nghiêm trọng đến năng suất và chất lượng mùa vụ.

Theo tổng hợp các công bố khoa học về chi *Panax* từ năm 1995 đến năm 2024 trên các cơ sở dữ liệu như Web of Science, PubMed và Google Scholar, Zhaobei, Wang và cộng sự đã ghi nhận có khoảng 31 chi nấm là tác nhân gây bệnh trên các chi *Panax*. Trong đó, phần lớn là các loài thuộc chi *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Phytophthora*, *Colletotrichum*, *Pestalotiopsis*, *Pythium*,... Các bệnh thường gặp ở cây sâm chủ yếu do nấm gây bệnh nằm trong đất gây ra, bao gồm một số loài như *Fusarium*, *Rhexocercosporidium panacis*, *Cylindrocarpon structans*, *Phytophthora cactorum* gây bệnh thối rễ hoặc rỉ sét, *Alternaria panax* gây bệnh bạc lá và các loài *Pythium* gây bệnh thối rễ [1]. Trong số các mầm bệnh này, *A. panax* là tác nhân chính gây ra bệnh bạc lá hàng năm tại Mỹ mà người trồng sâm phải đối mặt. Liyanapathiranage và cộng sự (2023) đã báo cáo sự xuất hiện của bệnh đốm lá và héo vàng do *P. nanjingensis* và *Colletotrichum* spp. gây ra ở cây sâm *Panax quinquefolius* [9]. *Fusarium solani* và *Fusarium oxysporum* là những loại nấm bệnh điển hình có

tính xâm lấn cao gây bệnh thối rễ ở các vùng sản xuất sâm của Trung Quốc [10]. Một số nghiên cứu đã chỉ ra rằng 20% các cây sâm Mỹ trên 3 năm mắc bệnh thối rễ khi được trồng trên đất mới canh tác và tỷ lệ này là 70% khi được trồng trên đất tái canh tác [11].

Việt Nam nằm trong vùng khí hậu nhiệt đới gió mùa với đặc trưng nhiệt độ và độ ẩm luôn ở mức cao. Do đó, tạo điều kiện thuận lợi cho cả sinh trưởng thực vật và các tác nhân gây bệnh. Đối với cây *P. vietnamensis*, các bệnh do nấm gây ra đang trở thành một trong những thách thức lớn đối với công tác bảo tồn và phát triển loài dược liệu quý này tại Việt Nam. Theo báo cáo thống kê của Ủy ban nhân dân tỉnh Kon Tum, trong đợt dịch bùng phát vào giữa năm 2022, tại huyện Tu Mơ Rông và Đăk Gle đã làm chết hơn 38.000 cây sâm, ước tính thiệt hại hàng chục tỉ đồng. Liên quan đến vấn đề này, một cuộc khảo sát đã được tiến hành trên tổng diện tích 15 ha bao gồm các trang trại sâm ở Kon Tum và một số vùng trồng khác. Kết quả đã ghi nhận hai bệnh phổ biến là thán thư và thối mềm lá với tỉ lệ mắc bệnh lần lượt khoảng 30% và 26%. Trong số 79 chủng nấm được phân lập từ lá bị nhiễm bệnh, đã xác định và định danh được 2 chủng *Neocosmospora ipomoeae* NL5 và *Fusarium miscanthi* KT2.1.2 là tác nhân gây bệnh thối mềm lá [12].

Tình trạng dịch bệnh không chỉ xảy ra ở vùng trồng đặc hữu mà còn diễn biến phức tạp ở các vùng trồng di thực mới. Tại vùng di thực Mù Cang Chải, Yên Bái, các số liệu khảo sát thực địa tại vườn ươm của Công ty cổ phần đầu tư Panax Việt Nam cho thấy tỷ lệ cây giống sâm Ngọc Linh bị chết do nấm tấn công lên tới trên 30% tổng số cây con dưới 1 năm tuổi. Dịch bệnh trên sâm Ngọc Linh di thường mang tính quy luật mùa vụ, chúng bùng phát mạnh nhất vào mùa mưa (từ tháng 5 đến tháng 10) khi nhiệt độ và độ ẩm cao. Nấm gây bệnh xâm nhiễm trực tiếp vào hệ rễ, gây tổn thương mô thực vật và tạo tiền đề cho sự xâm nhiễm thứ cấp của các vi sinh vật gây bệnh khác. Do đó, cần có các biện pháp phòng trừ nấm hiệu quả theo hướng hữu cơ bền vững.

1.1.2.2. Đặc điểm và đặc tính gây bệnh của nấm *Fusarium*

Nấm *Fusarium* thuộc ngành nấm túi *Ascomycota*, hệ sợi nấm phân nhánh, có vách ngăn và sinh sản vô tính bằng bào tử. Bào tử nấm *Fusarium* thường tồn tại trong đất ở trạng thái nghỉ, khi gặp điều kiện thích hợp chúng nảy mầm và xâm nhập vào cây chủ. *Fusarium* spp. phân bố rộng khắp trên toàn cầu và được xác định là tác nhân chính gây ra các bệnh lây truyền qua đất nguy hiểm nhất ở thực vật và được xếp vào top 10 chi nấm gây bệnh thực vật quan trọng nhất trên thế giới [13]. Trong quá trình lây nhiễm, các chi *Fusarium* thường tồn tại dưới dạng phức hệ loài và gây ra nhiều triệu chứng bệnh lý vô cùng phức tạp.

Ở giai đoạn hoại sinh, chúng sản xuất các độc tố và enzym phân giải cellulose làm suy yếu cấu trúc mô và hệ thống phòng vệ của thực vật. Nhóm các hợp chất này vô cùng đa dạng bao gồm: aflatoxin, fumonisin, terpene, độc tố T-2, deoxynivalenol, enniatin,... cùng các dẫn xuất indole terpene, alkaloid và siderophore [14]. Đặc biệt, *Fusarium* spp. còn sản sinh ra axit fusaric, một chất chuyển hóa thứ cấp làm rối loạn sinh lý tế bào, tăng stress oxy hóa và ức chế hệ thống enzym chống oxy hóa (catalase, ascorbate peroxidase) dẫn đến héo rũ và chết cây [15, 16]

Trên thế giới, *Fusarium* gây ra những thiệt hại vô cùng nặng nề cho các vùng trồng sâm. Tại Trung Quốc, *Fusarium flocciferum* là tác nhân chính gây ra hiện tượng thối rễ hàng loạt ở sâm *Panax notoginseng* trên một diện tích trồng lên đến hơn 4000 ha. Các triệu chứng điển hình bao gồm lá héo đột ngột, biểu bì rễ teo lại, rễ chuyển sang màu vàng sẫm, mềm và thối rữa [10]. Tương tự, một báo cáo gần đây vào năm 2026 tại bang Tennessee (Hoa Kỳ) cho thấy *F. oxysporum* đã tàn phá các quần thể sâm Mỹ (*Panax quinquefolius*) gây ra hiện tượng thối rễ trên các cây sâm 5 năm tuổi đang trong thời kỳ thu hoạch với tỷ lệ mắc bệnh lên tới 50%. Những cây sâm bị nhiễm *Fusarium* lá sẽ chuyển sang màu đỏ ở giai đoạn đầu, sau đó héo rũ và chết khô. Song song với đó, hệ rễ cũng sẽ xuất hiện các vết hoại tử màu nâu trên bề mặt biểu bì rễ, sau đó lan rộng vào nhu mô và gây thối rễ hoàn toàn [17].

1.1.2.3. Đặc điểm của nấm *Rhizoctonia solani* gây bệnh

R. solani là một loài nấm gây bệnh phổ biến trong đất thuộc ngành *Basidiomycota* và có khả năng gây bệnh trên nhiều loại cây trồng khác nhau. Sự xâm nhiễm của chúng gây ra hàng loạt bệnh lý như thối rễ, loét thân, chết cây con, để lại hậu quả nặng nề về kinh tế [18]. Theo nghiên cứu của Putnam, M. (2025), *R. solani* là một trong những tác nhân gây bệnh trong đất phổ biến trên các loài sâm thuộc chi *Panax*, đặc biệt gây hiện tượng lở cổ rễ ở giai đoạn cây con. Nấm có khả năng gây hại ngay từ giai đoạn nảy mầm, làm thối hạt giống trong đất và gây chết cây trước hoặc ngay sau khi mọc. Ở cây con đã hình thành, bệnh biểu hiện qua các vết loét tại vùng cổ rễ gần mặt đất, dẫn đến hiện tượng đổ rạp. Ngoài ra, *R. solani* còn gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến hệ rễ, làm rễ chính biến dạng, đổi màu và suy giảm hoặc mất hoàn toàn rễ phụ [19].

Khả năng tàn phá của nấm còn được thể hiện qua các nghiên cứu trên các cây trồng khác, ví dụ khi nghiên cứu tác nhân gây bệnh ở cây đậu Hà Lan, Sharma và cộng sự (2015) đã báo cáo rằng *R. solani* là tác nhân gây bệnh chiếm ưu thế (76% chủng phân lập) gây thiệt hại năng suất lên đến 75%. Trong đó, các nhóm tương hợp AG 4 và AG 2-1 là các tác nhân phổ biến và có độc lực cao nhất. Kết quả thực nghiệm

cho thấy AG 2-1 làm giảm tỷ lệ nảy mầm, trong khi AG 4 gây thối rễ và suy giảm sinh trưởng nghiêm trọng [20].

Khác với nhiều loài nấm khác được phân loại dựa trên hình thái bào tử, *Rhizoctonia* (đặc biệt là *R. solani*) được phân loại thành các nhóm tương hợp (Anastomosis Groups - AGs) dựa trên khả năng dung hợp màng tế bào và trao đổi nội chất của sợi nấm. Mỗi nhóm AG sở hữu những đặc tính sinh học riêng biệt về độc lực, phổ ký chủ và khả năng thích nghi sinh thái [21]. Quá trình gây bệnh của *Rhizoctonia* spp. trên thực vật là một quá trình phức tạp gồm 3 bước chính: (i) Nhận diện và tiếp cận cây chủ: hệ sợi nấm sẽ định hướng sinh trưởng về phía cây chủ dưới tác động của các tín hiệu hóa học do rễ cây tiết ra như các chất dinh dưỡng, axit hữu cơ, oxylipin,... và hình thành các cấu trúc chuyên hóa như giác bám và các đốm xâm nhiễm [22]. (ii) Xâm nhiễm: Nấm phá vỡ lớp biểu bì và cutin của rễ bằng cách kết hợp áp lực cơ học từ sự phát triển của hệ sợi với việc bài tiết hệ enzym thủy phân vách tế bào. Đồng thời, tận dụng các lỗ mở tự nhiên như khí khổng, hoặc vết thương để xâm nhập [23]. (iii) Ức chế hệ miễn dịch bằng cách sinh ra các protein tác động.

Một số protein do nấm tiết ra có khả năng ức chế hệ thống miễn dịch của thực vật. Chẳng hạn, protein RsCRP1 tác động trực tiếp lên ty thể và lục lạp làm gián đoạn các quá trình sản xuất năng lượng và quang hợp, LysM ức chế phản ứng miễn dịch của cây do chitin kích hoạt, giúp nấm tránh được sự nhận diện của hệ thống phòng vệ thực vật như con đường axit salicylic và ethylen và RsSCR10 - một protein nhỏ giàu cysteine, có khả năng gây chết tế bào và thúc đẩy quá trình hoại tử mô [24–26].

1.1.3. Các biện pháp phòng trừ nấm gây hại

Các loài nấm như *Fusarium* spp. và *Rhizoctonia solani* là những tác nhân gây bệnh rất nguy hiểm, tồn tại lâu dài trong đất và khó kiểm soát do cơ chế xâm nhiễm phức tạp. Vì vậy, việc nghiên cứu và áp dụng các biện pháp phòng trừ nấm gây hại một cách hiệu quả là rất cần thiết nhằm hạn chế thiệt hại và bảo vệ năng suất cây trồng. Hiện nay, các biện pháp phòng trừ được thực hiện bằng nhiều biện pháp kết hợp, bao gồm:

1.1.3.1. Biện pháp vật lý

Các biện pháp vật lý là hướng tiếp cận thân thiện với môi trường, sử dụng các tác động như nhiệt và bức xạ để tiêu diệt mầm bệnh trong đất và vật liệu trồng. Nhiệt hóa đất bằng năng lượng mặt trời hoặc hơi nước có thể loại bỏ hoặc làm giảm một số mầm bệnh sống trong đất, chẳng hạn như *Verticillium dahliae*, *F. oxysporum*, *P. ultimum*, *Agrobacterium* spp., *P. cinnamomi*, *Sclerotium rolfsii* và *R. solani*. Theo nghiên cứu của Panth và cộng sự, xử lý đất bằng hơi nước ở nhiệt độ trên 70 °C trong 30 phút có thể diệt trừ các mầm bệnh phổ biến trong đất như *Pythium* và *Verticillium*

[27]. Mặc dù thân thiện với môi trường nhưng các kỹ thuật vật lý khó có thể áp dụng trên quy mô lớn do phụ thuộc hoàn toàn vào khí hậu, địa hình và đặc thù canh tác. Đồng thời, các phương pháp này thường tiêu tốn nhiều năng lượng và thời gian xử lý kéo dài nên không khả thi trong thực tế sản xuất.

1.1.3.2. Biện pháp hóa học

Đây là phương pháp phổ biến nhất nhờ khả năng ức chế hoặc tiêu diệt mầm bệnh nhanh. Tuy nhiên chúng có nguy cơ hình thành các chủng kháng thuốc và ảnh hưởng đến các loài không phải mục tiêu và hệ sinh thái. Hơn nữa, đối với cây trồng lâu năm như sâm, thường trên 6 năm mới thu hoạch, việc sử dụng thuốc hoá học sẽ làm tăng dư lượng trong củ sâm và ảnh hưởng đến sức khoẻ người sử dụng.

Nghiên cứu của Gong và cộng sự (2022) trên 122 chủng *R. solani* cho thấy nhiều chủng đã xuất hiện khả năng kháng tebuconazole ở mức trung bình đến cao. Phân tích di truyền các chủng kháng thuốc tebuconazole phát hiện các đột biến mới trong gen cytochrome CYP51, đây là gen mã hóa enzym mục tiêu của nhóm thuốc ức chế khử methyl sterol (DMI) có thể liên quan đến cơ chế kháng thuốc của nấm [28]. Kết quả này cho thấy việc sử dụng thuốc hóa học cần được quản lý để hạn chế sự phát triển của các chủng nấm kháng thuốc.

1.1.3.3. Biện pháp sinh học

Sử dụng các vi sinh vật làm tác nhân kiểm soát sinh học ngày càng được quan tâm như một giải pháp thay thế bền vững cho các biện pháp truyền thống trong việc phòng trừ bệnh trên cây trồng. Một số chi vi khuẩn như *Bacillus*, *Streptomyces* và *Lysobacter* được xem là tác nhân kiểm soát sinh học tiềm năng nhờ khả năng ức chế mầm bệnh thực vật thông qua sản xuất kháng sinh, cạnh tranh dinh dưỡng và kích thích cơ chế kháng bệnh của cây [29].

Nhiều nghiên cứu đã chứng minh tiềm năng của các biện pháp sinh học trong việc kiểm soát mầm bệnh. Nghiên cứu của Urgan và cộng sự (2018) đã ghi nhận 20 chủng *Streptomyces* spp. phân lập từ đất có hoạt tính ức chế *F. culmorum* và *F. graminearum* [30]. Theo Rashmi Srivastava và cộng sự (2010), tổ hợp vi khuẩn *Pseudomonas*, nấm *Trichoderma harzianum* và *Glomus intraradices* có hiệu quả tốt trong việc kiểm soát bệnh héo rũ do nấm *Fusarium* ở cà chua, giảm tỷ lệ mắc bệnh và mức độ nghiêm trọng lần lượt là 74% và 67% trong chậu và ngoài đồng ruộng [31]. So với phương pháp hóa học và vật lý, biện pháp sinh học an toàn và bền vững hơn nhưng hiệu quả chậm và phụ thuộc vào điều kiện môi trường cũng như các tương tác sinh học và phi sinh học trong đất.

1.2. TỔNG QUAN VỀ XẠ KHUẨN VÙNG RỄ VÀ ỨNG DỤNG TRONG TRỒNG TRỌT

1.2.1. Giới thiệu về xạ khuẩn

Xạ khuẩn thuộc về lớp Actinobacteria, bộ Actinomycetales, bao gồm 10 dưới bộ, 35 họ, 110 chi và 1000 loài. Đáng chú ý, xạ khuẩn có khuẩn lạc khô, dạng phóng xạ, tỷ lệ GC > 70% và có đặc điểm hình thái khác biệt với vi khuẩn Gram (+) do sự hình thành hệ sợi [32]. Xạ khuẩn được phân bố rộng rãi trong đất và có thể chiếm tới 30% tổng số vi sinh vật đất, với mật độ khoảng 10^6 - 10^9 tế bào/g đất. Trong quần xã xạ khuẩn đất, chi *Streptomyces* thường chiếm ưu thế và có thể chiếm hơn 90% tổng số xạ khuẩn phân lập được từ đất hoặc vùng rễ thực vật [33]. Phần lớn xạ khuẩn là vi sinh vật hiếu khí, tuy nhiên một số loài có khả năng phát triển trong điều kiện kỵ khí và có khả năng hình thành bào tử giúp chúng thích nghi tốt hơn trong các điều kiện bất lợi của môi trường.

Về mặt hình thái, xạ khuẩn thể hiện sự chuyển tiếp độc đáo giữa vi khuẩn và nấm. Dù có cấu trúc tế bào nhân sơ với vách tế bào chứa peptidoglycan nhưng chúng lại phát triển dưới dạng hệ sợi phân nhánh phức tạp. Tổ chức hình thái này bao gồm 2 phần chính: Khuẩn ty cơ chất đâm sâu vào môi trường để hấp thụ dinh dưỡng và khuẩn ty khí sinh mang các chuỗi bào tử ở dạng trần và cấu thành nên bề mặt của xạ khuẩn. Hầu hết xạ khuẩn là sinh vật hoại sinh, sống trong đất và trải qua phần lớn chu kỳ sống dưới dạng bào tử. Tuy nhiên, ngành này đã thích nghi với nhiều môi trường sinh thái khác nhau như nước, không khí, trầm tích,...[33].

Chu kỳ sống của xạ khuẩn *Streptomyces* là một quá trình biệt hóa đa bào phức tạp, khác biệt hoàn toàn với cơ chế phân đôi của các vi khuẩn đơn bào thông thường. Vòng đời xạ khuẩn bắt đầu khi một bào tử gặp điều kiện thuận lợi và nảy mầm thành sợi nấm cơ chất. Khi nguồn dinh dưỡng cạn kiệt, xạ khuẩn trải qua một bước ngoặt quan trọng là chết tế bào theo chương trình. Lúc này, phần lớn sợi nấm sinh dưỡng sẽ tự phân giải để giải phóng các nguyên liệu như axit amin, đường và nucleotide. Đây là nguồn năng lượng cần thiết để vi khuẩn biệt hóa nên hệ sợi thứ hai, gọi là sợi nấm khí sinh. Cuối cùng, các sợi này biệt hóa thành các chuỗi bào tử và chúng sẽ phát tán vào môi trường để bắt đầu một vòng đời mới [33].

1.2.2. Đặc điểm của xạ khuẩn vùng rễ

Vùng rễ là lớp đất hẹp bao quanh hệ thống rễ của cây và chịu ảnh hưởng trực tiếp từ các chất tiết của rễ. Đây là nơi tập trung số lượng lớn các vi sinh vật bởi chúng có khả năng hướng hóa mạnh mẽ với các chất hữu cơ do rễ thực vật tiết ra như axit amin, đường và các hợp chất chuyển hóa thứ cấp. Trong số các vi sinh vật vùng rễ, xạ khuẩn *Streptomyces* được ghi nhận có vai trò đặc biệt quan trọng trong hệ sinh thái

đất. Nhờ khả năng thích nghi tốt với điều kiện môi trường khắc nghiệt và khả năng phân giải nhiều hợp chất hữu cơ phức tạp như cellulose, chitin và lignin, xạ khuẩn tham gia tích cực vào quá trình phân hủy chất hữu cơ và hình thành mùn trong đất. Ngoài ra, nhiều loài xạ khuẩn vùng rễ còn có khả năng sản sinh các enzym ngoại bào, siderophore, phytohormone, cũng như các hợp chất kháng nấm và vi khuẩn khác, góp phần thúc đẩy sinh trưởng thực vật, ức chế các vi sinh vật gây bệnh trong đất [34]. Sự phân bố của xạ khuẩn vùng rễ cũng phụ thuộc vào pH của môi trường như xạ khuẩn thường tập trung ở các vùng đất rễ có pH ở mức trung tính, kiềm yếu hoặc axit yếu với dải pH sinh trưởng dao động từ 6 - 9. Các nghiên cứu phân lập từ vùng rễ của nhiều loài thực vật cho thấy sự đa dạng của xạ khuẩn với nhiều chi khác nhau như *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Nocardia*, *Actinoplanes*, *Amycolatopsis*, *Kribbella* và *Saccharopolyspora* [35].

1.2.3. Phương pháp phân loại xạ khuẩn

Phân loại xạ khuẩn theo phương pháp truyền thống dựa trên các đặc điểm hình thái và sinh lý như: cấu trúc hệ sợi khí sinh và hệ sợi cơ chất, hình dạng và cách sắp xếp của bào tử, cũng như các đặc điểm sinh hóa và hóa học của thành tế bào. Tuy nhiên, trong những năm gần đây, các phương pháp sinh học phân tử đã được ứng dụng rộng rãi trong phân loại và định danh xạ khuẩn. Phân tích trình tự gen 16S rRNA là phương pháp phổ biến và đáng tin cậy để xác định mối quan hệ phát sinh chủng loài và phân loại các nhóm xạ khuẩn. Các gen mã hóa 5S rRNA, 16S rRNA và 23S rRNA nằm cạnh nhau, có cùng một operon và có cơ chế điều hòa chung. Tuy nhiên, trong các loại rRNA, thì 16S rRNA là phù hợp nhất cho nghiên cứu phân loại xạ khuẩn vì gen mã hóa 16S rRNA có kích thước khoảng 1540 bp phù hợp cho các nghiên cứu phân loại. Trong khi đó, hai gen còn lại quá dài hoặc quá ngắn để giải trình tự bằng công nghệ Sanger.

Từ năm 2022, các tiêu chuẩn định danh quốc tế đã xác định rằng: phân tích trình tự 16S rRNA và sinh lý, sinh hoá là điều kiện cần nhưng chưa đủ. Để chứng minh chủng hoặc loài mới cần bổ sung các kết quả phân tích hệ gen chuyên sâu như giải trình tự toàn bộ hệ gen và tính toán chỉ số tương đồng hệ gen trung bình (Average Nucleotide Identity - ANI) [36]. Việc chuyển dịch từ phân tích đơn gen sang phân tích hệ gen không chỉ giúp giải quyết các nút thắt trong phân loại mà còn mở ra cơ hội khai thác các tiềm năng di truyền của xạ khuẩn trong các nghiên cứu ứng dụng thực tiễn sau này.

1.2.4. Cơ chế đối kháng của xạ khuẩn đối với các vi sinh vật gây bệnh

Trên thế giới, nhiều chủng xạ khuẩn vùng rễ đã chứng minh được khả năng tác động kép: vừa thúc đẩy sinh trưởng thực vật, vừa thể hiện hoạt tính kháng khuẩn

và kháng nấm mạnh. Nhờ những ưu điểm này, chúng được đánh giá là các tác nhân kiểm soát sinh học tiềm năng nhằm phòng trừ mầm bệnh trong đất và giảm sự phụ thuộc vào thuốc bảo vệ thực vật hóa học trong sản xuất nông nghiệp bền vững. Các chủng xạ khuẩn thực hiện chức năng kiểm soát sinh học thông qua nhiều con đường khác nhau:

1.2.4.1. Sản xuất các loại kháng sinh hay chất kháng nấm tự nhiên

Xạ khuẩn là nguồn cung cấp dồi dào các hợp chất có hoạt tính kháng nấm mạnh như nystatin, filipin, candicidin và natamycin. Trong đó, nystatin là kháng sinh kháng nấm đầu tiên được sản xuất từ xạ khuẩn *Streptomyces noursei* vào năm 1950. Hợp chất này có khả năng ức chế nhiều loài nấm gây bệnh, đặc biệt là các loài thuộc chi *Candida*. Ngày nay, *S. noursei* vẫn là vi sinh vật chủ lực để sản xuất các nystatin thương mại. Về bản chất, nystatin cùng với filipin, candicidin hay natamycin đều thuộc nhóm kháng sinh polyene macrolide, chúng liên kết trực tiếp với các phân tử ergosterol trên màng tế bào nấm, tạo ra các lỗ xóp làm rò rỉ nội chất và dẫn đến chết tế bào [37]. Bên cạnh polyen macrolide, xạ khuẩn còn là nguồn gốc của nhiều loại kháng sinh quan trọng thuộc nhóm aminoglycoside và macrolide không polyene như: streptomycin, kanamycin và erythromycin. Khác với cơ chế tác động lên màng tế bào như nhóm polyen, các hợp chất này tập trung tấn công vào bộ máy tổng hợp protein của vi sinh vật gây hại bằng cách liên kết với các tiểu phần của ribosome, ức chế quá trình dịch mã và kéo dài chuỗi peptide [38]. Một số hợp chất như cycloheximide phân lập từ *S. griseus* thể hiện khả năng ức chế mạnh mẽ quá trình tổng hợp protein ở sinh vật nhân thực. Do đó, hợp chất này được ứng dụng phổ biến trong quá trình kiểm soát tạp nhiễm trong điều kiện phòng thí nghiệm [39]. Trong nhóm các peptide kháng nấm, nikkomycin (đặc biệt là biến thể nikkomycin Z) là một chất chuyển hóa thứ cấp được sản xuất bởi *Streptomyces tendae* được chứng minh có khả năng kháng nấm mạnh mẽ thông qua cơ chế liên kết cạnh tranh với trung tâm hoạt động của enzym chitinase, hơn nữa chúng có tính chọn lọc cao và không gây độc cho vật chủ [40].

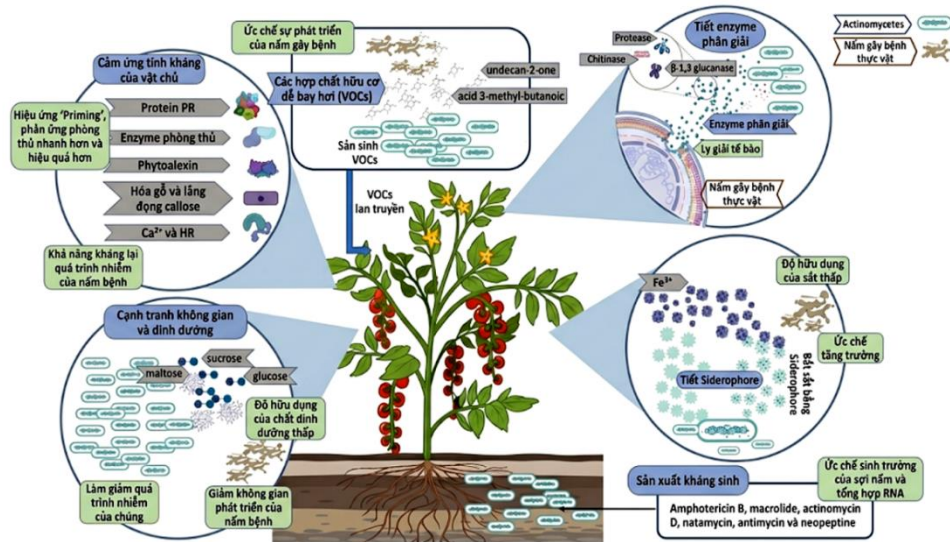
1.2.4.2. Sản xuất enzym phân hủy thành tế bào nấm

Hầu hết các xạ khuẩn đều có bản chất hoại sinh, cùng với khả năng sản xuất các enzym thủy phân ngoại bào như chitinase, cellulase, β -1,3-glucanase, lipase và xylanase. Các enzym này có khả năng phân giải các polymer cấu tạo nên thành tế bào của nấm và các vi khuẩn gây bệnh, từ đó góp phần ức chế các mầm bệnh thực vật. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh rằng các loài xạ khuẩn, đặc biệt là các chủng thuộc chi *Streptomyces*, có khả năng sản xuất đa dạng các enzym ngoại bào tham gia vào cơ chế đối kháng với các vi sinh vật gây bệnh thực vật. Jang và cộng sự (2011) đã

phân lập được chủng *Streptomyces* sp. AM50 từ nhà máy cưa tại Hàn Quốc và tiến hành sàng lọc khả năng sản xuất các enzym ngoại bào. Kết quả cho thấy chủng *Streptomyces* sp. AM50 có khả năng sản xuất đồng thời các β -1,3-glucanase, chitinase và cellulase trong điều kiện hiếu khí ở 30 °C. Dịch nuôi cấy ngoại bào của chủng này cho phép ức chế hiệu quả *Phytophthora capsica* thông qua cơ chế làm trương phồng và ly giải hoàn toàn sợi nấm [41, 42].

1.2.4.3. Sản xuất các hợp chất hữu cơ dễ bay hơi

Các hợp chất hữu cơ dễ bay hơi (VOC) là các hợp chất có trọng lượng phân tử thấp, dễ bay hơi ở nhiệt độ và áp suất bình thường, cho phép chúng khuếch tán qua khí quyển và đất. Các hợp chất hữu cơ dễ bay hơi do Actinomycetes sản sinh có vai trò quan trọng trong kiểm soát nấm bệnh thực vật, kích thích sinh trưởng cây trồng, gây độc tuyến trùng và cảm ứng khả năng kháng bệnh toàn thân ở thực vật [43]. Các VOC gây sưng phồng sợi nấm, biến dạng hoặc phá hủy bào tử, đồng thời làm thay đổi cấu trúc thành tế bào nấm. Chủng *Streptomyces setonii* WY228 sinh ra 2-ethyl-5-methylpyrazine và dimethyl disulfide đã được chứng minh có thể ức chế sự nảy mầm của bào tử cũng như sự phát triển của sợi nấm [43]. Ngoài ra, nhiều VOC khác được ghi nhận từ *Nocardiosis* sp., bao gồm S-methyl ethanethioate, 1,2-dimethyldisulfane, axit 2-methyl propanoic, axit axetic, axit 3-methyl-butanoic, undecan-2-one, nonan-2-one và 2-isopropyl-5-methylcyclohexan-1-ol, đều góp phần ức chế sự phát triển của sợi nấm [44].



Hình 1.1. Các cơ chế đối kháng chính của xạ khuẩn đối với mầm bệnh hại cây trồng [42]

1.2.5. Đặc tính kích thích sinh trưởng của xạ khuẩn vùng rễ

Nhờ sở hữu nhiều đặc tính sinh học có lợi, xạ khuẩn vùng rễ hiện đang trở thành một trong những giải pháp thay thế tiềm năng cho các hóa chất bảo vệ thực vật

truyền thống. Nhóm vi sinh vật này có thể tác động tích cực đến sự phát triển của cây trồng thông qua việc cải thiện khả năng hấp thu dinh dưỡng, sản xuất các chất điều hòa sinh trưởng và tăng cường khả năng chống chịu của cây đối với các điều kiện bất lợi trong môi trường.

- **Sản xuất các hormon tăng trưởng:** Một số chủng xạ khuẩn vùng rễ có khả năng tổng hợp các chất điều hòa sinh trưởng thực vật như indole-3-acetic axit (IAA), và gibberellin giúp tăng cường sự phát triển của hệ rễ, cải thiện khả năng hấp thu dinh dưỡng của cây trồng. Theo Vimala Devi và cộng sự (2024) cho thấy chủng *Streptomyces* sp. VSMKU1027 không chỉ có khả năng tổng hợp IAA mà còn thể hiện hoạt tính đối kháng mạnh đối với các nấm gây bệnh thực vật quan trọng trong đất như *Rhizoctonia solani* và *Fusarium oxysporum*. Ngoài ra, VSMKU1027 còn sản xuất nhiều enzym thủy phân như protease và thể hiện khả năng tổng hợp IAA cao nhất sau 6 ngày nuôi cấy ở 35 °C, pH 6,5 với môi trường ISP2 bổ sung 0,4% L-tryptophan [45].

- **Cố định Nito:** Nito là nguyên tố dinh dưỡng thiết yếu đối với cây trồng và thường được cung cấp thông qua quá trình cố định nito sinh học. Theo báo cáo của Wanruxu và cộng sự (2025), chủng *Streptomyces* sp. GD-4 phân lập từ đất vùng rễ cây *Leymus secalinus* có tác dụng thúc đẩy sinh trưởng lá và rễ của các loại cỏ thức ăn gia súc. Phân tích bộ gen của GD-4 cho thấy nhiều gen liên quan đến chuyển hóa nito, photpho và lưu huỳnh. Ngoài ra, các gen có khả năng liên quan đến thúc đẩy tăng trưởng thực vật như sinh tổng hợp axit IAA, sản xuất trehalose, siderophore và hòa tan photphat. Nghiên cứu này tạo nền tảng cho việc cải tạo đất ở các vùng cao nguyên [46].

- **Hòa tan photphat:** Trong đất, phần lớn phospho tồn tại ở dạng khó tan hoặc bị cố định trong các hợp chất khoáng, khiến cây trồng khó hấp thu. Nhiều nghiên cứu chứng minh rằng xạ khuẩn có khả năng hòa tan phospho khó tan trong đất thông qua việc tiết axit hữu cơ làm giảm pH môi trường và giải phóng phosphate hòa tan. Vargas-Hoyos và cộng sự (2021) đã phân lập được chủng *Streptomyces* sp. 3AS4 từ rễ cây lúa mì ở vùng Cerrado- Brazil với khả năng chuyển hoá khoảng 410 µg/mL từ phytate, 300 µg/mL từ calcium phosphate và 200 µg/mL từ đá phosphate, chủ yếu thông qua việc sản xuất axit gluconic và axit 2-ketogluconic. Thí nghiệm nhà kính trên cây đậu tương (*Glycine max*) cho thấy việc cấy chủng *Streptomyces* sp. 3AS4 giúp tăng chiều cao cây khoảng 17% trong điều kiện đất tự nhiên so với đối chứng. Đáng chú ý, khi kết hợp với đá phosphate, chiều cao cây tăng khoảng 80% và tỷ lệ thân hay rễ tăng khoảng 30% so với cây không cấy chủng [47].

1.3. CÔNG NGHỆ GIẢI TRÌNH TỰ GEN THỂ HỆ MỚI VÀ ỨNG DỤNG TRONG NGHIÊN CỨU XẠ KHUẨN

1.3.1. Lịch sử phát triển và đặc điểm của các công nghệ giải trình tự gen hiện nay

Giải trình tự toàn bộ hệ gen (Whole Genome Sequencing, WGS) là phương pháp xác định toàn bộ trình tự nucleotide của DNA trong bộ gen của sinh vật. Trong nghiên cứu vi sinh vật, các công nghệ WGS đóng vai trò quan trọng trong việc phân tích đặc điểm di truyền, khám phá các gen có chức năng sinh học đặc biệt và xác định được mối quan hệ tiến hóa giữa các loài. Công nghệ giải trình tự gen (Next-Generation Sequencing, NGS) đã trải qua nhiều giai đoạn phát triển từ thế hệ thứ nhất đến các công nghệ hiện đại ngày nay. Phương pháp giải trình tự hệ gen thứ nhất được phát triển từ những năm 1970, điển hình là phương pháp Sanger. Phương pháp này có độ chính xác cao và từng được xem là “tiêu chuẩn vàng” trong giải trình tự DNA. Năm 1995, hệ gen của *Haemophilus influenzae* với kích thước khoảng 1,8 Mb và *Mycoplasma genitalium* với kích thước khoảng 0,57 Mb đã được công bố. Hệ gen đầu tiên của cổ khuẩn như *Methanocaldococcus jannaschii* cũng được công bố. Tuy nhiên, do hạn chế về thông lượng thấp, tốc độ chậm và chi phí cao, phương pháp Sanger chỉ phù hợp khi nghiên cứu các đoạn gen có kích thước nhỏ thay vì toàn bộ hệ gen. Dự án giải mã bộ gen người hoàn thành năm 2003 là một minh chứng điển hình, nó kéo dài 13 năm và tiêu tốn 3 tỷ đô la khi sử dụng nền tảng này [48, 49]. Những hạn chế về thời gian và chi phí của phương pháp Sanger đã thúc đẩy sự phát triển của các công nghệ giải trình tự mới hiện đại và hiệu quả hơn. Dựa trên sự cải tiến về công nghệ và nguyên lý, các phương pháp NGS hiện đại được chia làm 2 nhóm chính là công nghệ giải trình tự gen thể hệ thứ 2 và thứ 3. Các trình nền tảng giải trình tự tiêu biểu hiện nay bao gồm:

1.3.1.1. Công nghệ giải trình tự Illumina

Đây là công nghệ giải trình tự thể hệ thứ hai được sử dụng rộng rãi nhất nhờ độ chính xác cao và chi phí thấp. Phương pháp này dựa trên nguyên lý tổng hợp DNA kết hợp phát tín hiệu huỳnh quang, tạo ra các đoạn đọc ngắn (short reads) có độ dài khoảng 150 - 300 bp, phù hợp sử dụng để giải trình tự hệ gen vi khuẩn. Quá trình giải trình tự Illumina bắt đầu bằng việc phân mảnh DNA thành các đoạn ngắn và gắn adapter đặc hiệu ở hai đầu. Sau đó các đoạn DNA được cố định trên flow cell và khuếch đại bằng PCR tạo thành các cụm. Tiếp theo, trình tự được xác định bằng cách tổng hợp DNA với các nucleotide được gắn huỳnh quang; mỗi chu kỳ chỉ một nucleotide được gắn vào chuỗi đang tổng hợp. Tín hiệu huỳnh quang phát ra sẽ được ghi nhận để xác định loại nucleotide tương ứng. Sau mỗi chu kỳ, tín hiệu huỳnh quang

được loại bỏ để tiếp tục các chu kỳ tiếp theo. Tuy nhiên, do chiều dài đoạn đọc ngắn, công nghệ Illumina gặp hạn chế trong việc lắp ráp các hệ gen có nhiều vùng lặp lại hoặc các gen có cấu trúc phức tạp.

1.3.1.2. Công nghệ giải trình tự Pacific Biosciences

Công nghệ giải trình tự phân tử đơn đã đạt được những bước tiến vượt bậc kể từ khi được hình thành ý tưởng vào năm 1989. Công nghệ giải trình tự phân tử đơn đã đạt được những bước tiến vượt bậc kể từ khi được hình thành ý tưởng vào năm 1989. Những đóng góp tiên phong từ PacBio đã mở ra khả năng giải trình tự đọc dài theo thời gian thực mà không cần khuếch đại PCR. Công nghệ SMRT của PacBio đã làm thay đổi lĩnh vực phân tích axit nucleic nhờ cải thiện độ chính xác, tính di động và thông lượng, qua đó trở thành công cụ quan trọng trong việc giải mã các hệ gen phức tạp và phát hiện các biến thể cấu trúc [50]. SMRT cho phép ghi nhận theo thời gian thực các nucleotide được gắn nhãn huỳnh quang khi chúng được tổng hợp dọc theo từng phân tử DNA khuôn riêng lẻ. Phản ứng giải trình tự kết thúc khi DNA khuôn và enzym polymerase tách rời nhau. Độ dài đoạn đọc trung bình từ thiết bị PacBio khoảng 2 kb, và một số đoạn đọc có thể dài hơn 20 kb. Các đoạn đọc dài đặc biệt hữu ích cho việc lắp ráp de novo các bộ gen mới, vì chúng có thể bao phủ nhiều vùng lặp lại và nhiều base hơn [51]. Khác với công nghệ Illumina, PacBio không cần khuếch đại PCR mà giải trực tiếp từ một phân tử DNA duy nhất.

Ban đầu, DNA đích được gắn các adapter để tạo thành cấu trúc vòng (SMRTbell). Phân tử DNA này sau đó được đưa vào các vi giếng siêu nhỏ gọi là zero-mode waveguides (ZMW), trong đó enzym DNA polymerase được cố định ở đáy. Trong quá trình giải trình tự, các nucleotide được gắn nhãn huỳnh quang sẽ được thêm vào hệ thống. Khi một nucleotide phù hợp được polymerase gắn vào mạch DNA đang tổng hợp, nó sẽ phát ra tín hiệu huỳnh quang đặc trưng. Các tín hiệu này được ghi nhận liên tục theo thời gian thực dưới dạng các xung ánh sáng và được chuyển đổi thành các đỉnh tín hiệu tương ứng với từng loại base (A, T, G, C), từ đó xác định trình tự DNA [50]. Nhờ cấu trúc vòng của thư viện SMRTbell, enzym polymerase có thể đọc lặp lại nhiều lần trên cùng một phân tử DNA, tạo ra các đoạn đọc nhỏ (subreads). Các subreads này được xử lý và căn chỉnh bằng các công cụ tin sinh học để tạo ra trình tự đồng thuận vòng (Circular consensus sequence, CCS) với độ chính xác cao. Do đó, PacBio trở thành một giải pháp tối ưu cho việc lắp ráp mới hệ gen và phân tích các cấu trúc di truyền phức tạp.

Tính đến năm 2026, ước tính có hơn 200.000 hệ gen vi khuẩn và xạ khuẩn đã được giải trình tự bằng các nền tảng của PacBio. Một dự án của Wellcome Sanger Institute phối hợp với PacBio đã giải trình tự hơn 3000 bộ gen vi khuẩn hoàn chỉnh

từ Bộ sưu tập giống quốc gia (The National Collection of Type Cultures, NCTC) bằng công nghệ PacBio [52]. Một nghiên cứu khác đã công bố 217 bộ gen hoàn chỉnh của *Salmonella enterica* được giải trình tự bằng PacBio và đưa vào cơ sở dữ liệu NCBI để phục vụ giám sát bệnh truyền qua thực phẩm [53]. Trong cơ sở dữ liệu NCBI Pathogen Detection, hiện có hơn 1,7 triệu bộ gen của các chủng vi sinh vật gây bệnh, tuy nhiên phần lớn được tạo ra bằng Illumina và chỉ một phần nhỏ là bộ gen hoàn chỉnh chất lượng cao được tạo bằng PacBio. Đối với xạ khuẩn, hiện chưa có số lượng thống kê chính thức.

1.3.1.3. Công nghệ giải trình tự Oxford Nanopore

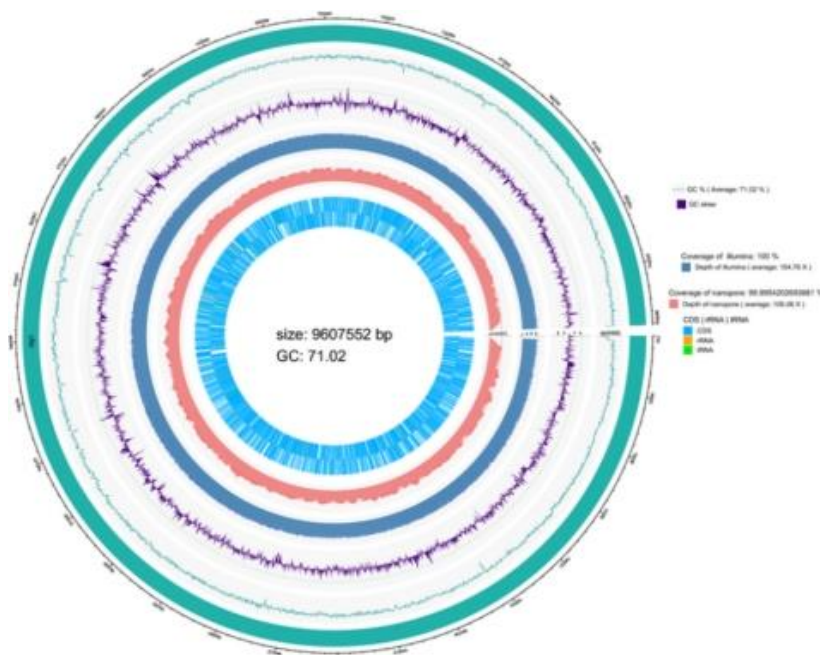
Đây cũng là công nghệ giải trình tự thế hệ thứ ba, hoạt động dựa trên nguyên lý sự thay đổi điện thế khi các phân tử DNA đi qua các lỗ nano protein được gắn trên một màng polymer sinh học. Trong quá trình giải trình tự, phân tử DNA sợi đơn được đưa qua lỗ nanopore nhờ một protein vận chuyển. Khi từng nucleotide đi qua nanopore, chúng sẽ gây ra sự thay đổi đặc trưng trong dòng điện ion chạy qua màng [54]. Hệ thống cảm biến sẽ ghi nhận các biến đổi tín hiệu điện theo thời gian thực, sau đó các tín hiệu này được xử lý bằng thuật toán để xác định trình tự nucleotide tương ứng. Không giống như công nghệ Illumina hay PacBio, Oxford Nanopore không sử dụng tín hiệu huỳnh quang và không yêu cầu quá trình khuếch đại PCR. Nhờ đó, công nghệ này có thể giải trình tự trực tiếp các phân tử DNA rất dài, với chiều dài đoạn đọc có thể vượt quá 100 kb, thậm chí lên đến hàng megabase. Tuy nhiên công nghệ Oxford Nanopore vẫn tồn tại một số nhược điểm như tỷ lệ sai số cao, yêu cầu khắt khe về chất lượng DNA đầu vào và đòi hỏi hệ thống tính toán tin sinh học cấu hình cao, do đó giảm khả năng ứng dụng trong các nghiên cứu quy mô lớn.

1.3.2. Đặc điểm di truyền hệ gen xạ khuẩn

Khi nghiên cứu hệ gen của xạ khuẩn, đặc biệt là các loài thuộc chi *Streptomyces*, *Streptomyces* có kích thước bộ gen lớn hơn so với vi khuẩn. Kích thước nhỏ nhất được ghi nhận ở chủng *Streptomyces xiamenensis* (khoảng 5,96 Mb) và kích thước lớn nhất ở chủng *Streptomyces rapamycinicus* (khoảng 12,7 Mb) [55]. Hơn nữa, hệ gen của *Streptomyces* thường có cấu trúc nhiễm sắc thể dạng thẳng và khác với phần lớn vi khuẩn có nhiễm sắc thể dạng vòng. Đặc biệt, hệ gen xạ khuẩn chứa nhiều vùng gen linh động liên quan đến sự tiến hóa và đa dạng hóa chức năng sinh học.

Hệ gen của *Streptomyces* thường được chia thành vùng lõi (core region) và vùng ngoại vi (subtelomeric region). Vùng lõi nằm ở trung tâm nhiễm sắc thể chứa điểm khởi đầu sao chép OriC cùng với các gen thiết yếu liên quan đến các quá trình

sinh học cơ bản như sao chép DNA, phiên mã, dịch mã và chuyên hóa trung tâm. Vùng này có tính bảo thủ cao và ít xảy ra biến động di truyền. Vùng ngoại vi nằm ở đầu hai đầu mút của nhiễm sắc thể, đây là vùng có tính biến động cao và thường chứa nhiều cụm gen liên quan đến thích nghi môi trường, chuyển hóa thứ cấp và trao đổi vật chất với môi trường [55]. Nghiên cứu của Li LF và cộng sự (2023) đã đánh giá tiềm năng sinh tổng hợp chất kháng nấm của chủng *Streptomyces* sp. HP-A2021 được phân lập từ đất vùng rễ của cây *Ginkgo biloba* thông qua giải trình tự WGS. Kết quả, *Streptomyces* sp. HP-A2021 sở hữu nhiễm sắc thể dạng thẳng với kích thước 9.607.552 bp và hàm lượng GC đạt 71,02% (Hình 1.2). Quá trình chú thích bộ gen đã ghi nhận sự hiện diện của 8534 vùng mã hóa protein (Coding sequence, CDS), cùng với 76 gen tRNA và 18 gen rRNA. Khi so sánh với chủng gần nhất là *Streptomyces coeruleorubidus* JCM 4359, giá trị tương đồng di truyền đạt 64,2% theo dDDH và 92,41% theo ANI. Ngoài ra, nghiên cứu đã xác định được tổng cộng 33 cụm gen liên quan đến sinh tổng hợp các chất chuyển hóa thứ cấp với chiều dài trung bình khoảng 105.594 bp. Các cụm gen này mã hóa cho những hợp chất điển hình như thiotetroamide, alkylresorcinol, coelichelin và geosmin [56].



Hình 1.2. Bản đồ hệ gen chủng *Streptomyces* sp. HP-A2021 [56]

1.3.3. Các cụm gen tham gia sinh tổng hợp hoạt chất kháng nấm

Một đặc điểm nổi bật của hệ gen xạ khuẩn là sự hiện diện của nhiều cụm gen sinh tổng hợp (Biosynthetic Gene Cluster, BGC) mã hóa cho các hợp chất chuyển hóa thứ cấp. Các BGC quan trọng thường gặp trong hệ gen *Streptomyces* bao gồm các hệ polyketide synthase dạng I và II (PKS-I, PKS-II), non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) và các peptide được tổng hợp bởi ribosome và biến đổi sau dịch

mã (Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides- RiPP). Các hệ PKS-I, PKS-II và NRPS đóng vai trò chính trong quá trình lắp ráp và sinh tổng hợp các hợp chất sinh học, đặc biệt là kháng sinh. Các gen này thường được tổ chức thành các cụm gen riêng biệt, trong đó mỗi gen chứa nhiều module hoặc domain, mỗi module đảm nhiệm một bước cụ thể trong quá trình tổng hợp phân tử. Ngược lại, RiPP được hình thành thông qua quá trình tổng hợp peptide ban đầu bởi ribosome, sau đó trải qua các biến đổi sau dịch mã để tạo ra các hợp chất có hoạt tính sinh học, bao gồm lantipeptide, lassopeptide, thiopeptide và bacteriocin [57]. Các nghiên cứu tổng hợp gần đây cũng cho thấy trung bình mỗi hệ gen *Streptomyces* chứa khoảng 30 - 40 BGC, nhưng chỉ một phần nhỏ trong số đó được biểu hiện. Đặc biệt, nghiên cứu sử dụng công nghệ chỉnh sửa gen CRISPR đã nhấn mạnh rằng phần lớn các BGC vẫn chưa được khai thác do không biểu hiện trong điều kiện nuôi cấy thông thường [58].

Các phân tích tin sinh học chỉ ra rằng, các hoạt tính sinh học của các BGC được quy định chặt chẽ bởi cấu trúc di truyền của chúng. Nổi bật nhất là nhóm cụm gen T1PKS chịu trách nhiệm sinh tổng hợp các kháng sinh phổ rộng thuộc họ polyene macrolide. Về mặt di truyền, cụm T1PKS có kích thước rất lớn, cấu tạo từ nhiều khung đọc mở (Open reading frame, ORF) chứa các module lặp lại. Mỗi module mang một hệ enzym đa miền như KS, AT, KR, DH, ER xúc tác nối tiếp nhau, tạo ra các cấu trúc vòng có ái lực đặc hiệu với ergosterol trên màng tế bào, làm rò rỉ nội bào và tiêu diệt nấm. Điển hình là các cụm gen *nys*, *pim*, *amph* sinh tổng hợp nystatin, pimaricin và amphotericin [59]. Bên cạnh PKS, các cụm gen NRPS và cụm lai PKS-NRPS cũng đóng góp quan trọng vào hoạt tính kháng nấm thông qua sự linh hoạt của bộ ba miền chức năng cốt lõi: gồm adenyl hóa (A), ngưng tụ (C) và thiolation (T). Khác với quá trình dịch mã ribosome thông thường, hệ thống này cho phép tích hợp các axit amin không sinh protein để tạo ra những peptide có khả năng ức chế trực tiếp quá trình hình thành vách tế bào nấm [60]. Ngoài ra, hệ gen xạ khuẩn còn chứa các BGC đặc hiệu mã hóa chất ức chế enzym đích, tiêu biểu như cụm operon *val* (chứa các gen từ *valA* đến *valN*) có chức năng sinh tổng hợp validamycin. Validamycin ức chế enzym α -glucosidase, làm gián đoạn quá trình chuyển hóa đường trong tế bào nấm và ngăn chúng phát triển. Tương tự, các BGC sinh tổng hợp polyoxin là chất ức chế enzym chitin synthase dẫn tới suy yếu vách tế bào nấm và khiến nấm không thể sinh trưởng bình thường [61, 62].

Phân tích hệ gen của chủng *Streptomyces* sp. 21So2-11 đã xác định được tổng cộng 28 BGC với chiều dài trung bình khoảng 38,8 kb, bao gồm các nhóm chính như PKS, NRPS, các cụm lai PKS-NRPS, terpen, RiPP và siderophore [63]. Trong số này, sáu BGC cho thấy độ tương đồng cao (>75%) với các cụm gen đã biết liên quan đến

sinh tổng hợp các hợp chất như melanin, coelichelin, ectoine và hopene, trong khi phần lớn các BGC còn lại có độ tương đồng thấp, gợi ý tiềm năng tạo ra các hợp chất mới. Đáng chú ý, một số cụm gen được dự đoán liên quan đến sinh tổng hợp các hợp chất có hoạt tính sinh học quan trọng, bao gồm kháng sinh và siderophore. Cụ thể, cụm gen lai PKS-NRPS có khả năng tham gia sinh tổng hợp naphthomycin, trong khi hệ PKS type II liên quan đến sản xuất gaudimycin. Ngoài ra, sự hiện diện của cụm gen desferrioxamine cũng cho thấy tiềm năng tổng hợp siderophore, góp phần vào khả năng cạnh tranh và thích nghi của vi khuẩn trong môi trường [63].

Thông qua công cụ antiSMASH 7.0, Park, HS. và cộng sự (2024) đã xác định được 37 BGC tiềm năng nằm trên nhiễm sắc thể của chủng *Streptomyces collinus* Inha504, trong đó nhiều cụm được dự đoán liên quan đến hoạt tính kháng nấm. Các BGC này bao gồm 15 cụm thuộc nhóm polyketide synthase (PKS) và non-ribosomal peptide synthetase (NRPS), cụ thể là các cụm T1PKS, T2PKS, T3PKS, NRPS và các cụm lai NRPS - PKS. Bên cạnh đó, các cụm còn lại được phân loại vào các nhóm chuyển hóa thứ cấp khác, bao gồm 5 cụm terpen, 4 cụm lanthipeptide, 3 cụm siderophore, 2 cụm melanin, 1 cụm lassopeptide và 1 cụm ectoine. Đáng chú ý, BGC số 35 được dự đoán có khả năng cao tham gia sinh tổng hợp lucencomycin là một macrolide polyene có hoạt tính kháng nấm mạnh thông qua cơ chế tương tác với màng tế bào nấm làm thay đổi tính thấm của màng và rối loạn chức năng của tế bào [64].

1.4. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU XẠ KHUẨN TẠI VIỆT NAM

Tại Việt Nam, nghiên cứu về xạ khuẩn đã có những bước tiến đáng kể, chuyển dịch từ các phương pháp phân lập, sàng lọc truyền thống sang ứng dụng sinh học phân tử và hệ gen học. Các hướng tiếp cận chủ yếu tập trung vào việc tìm kiếm các chủng có hoạt tính sinh học mạnh từ hệ sinh thái đa dạng như đất nông nghiệp, môi trường biển, đất rừng và đặc biệt là vùng rễ cây dược liệu mang lại giá trị kinh tế cao. Nhiều kết quả nổi bật đã tạo tiền đề quan trọng cho việc phát triển các chế phẩm.

Bên cạnh các nghiên cứu về kiểm soát sinh học, việc khai thác xạ khuẩn như nguồn sản sinh các hợp chất kháng sinh cũng là một hướng nghiên cứu được quan tâm từ sớm tại Việt Nam. Nhiều chủng thuộc chi *Streptomyces* phân lập từ các môi trường khác nhau đã được chứng minh có khả năng tổng hợp các chất chuyển hóa thứ cấp có hoạt tính kháng vi sinh vật. Tiêu biểu, Cao Đức Tuấn và cộng sự (2019) đã phân lập được 10 hợp chất từ chủng *Streptomyces* sp. G278, trong đó có hai hợp chất lần đầu tiên được ghi nhận từ nguồn tự nhiên là 2,5-Bis(5-tert-butyl-2-benzoxazolyl)thiophene và 3-hydroxyl-2-methylpyridine. Các hợp chất thu nhận được đã được đánh giá hoạt tính trên nhiều chủng vi sinh vật có ý nghĩa lâm sàng, cho thấy một số hợp chất có khả năng kháng khuẩn và kháng nấm đáng chú ý [65].

Gần đây, Huỳnh Thị Ngọc Ni và cộng sự (2024) đã phân lập được 181 chủng xạ khuẩn từ các mẫu thu thập tại Việt Nam và xác định 5 chủng có tiềm năng kháng *Mycobacterium smegmatis*. Từ chủng *Streptomyces alboniger* A121 có hoạt tính mạnh nhất, nhóm nghiên cứu đã phân lập được hai hợp chất obscurolide B2 β và chartreusin, trong đó chartreusin thể hiện hoạt tính kháng lao, kháng khuẩn đối với một số vi khuẩn Gram dương và hoạt tính gây độc tế bào trên nhiều dòng tế bào ung thư. Những kết quả này cho thấy xạ khuẩn ở Việt Nam là nguồn tài nguyên giàu tiềm năng cho việc phát hiện các hợp chất tự nhiên có giá trị trong phát triển thuốc kháng sinh và thuốc chống lao mới [66].

Trong lĩnh vực kiểm soát sinh học nông nghiệp, Lê Minh Tường và cộng sự (2014) đã phân lập thành công hơn 260 chủng xạ khuẩn từ đất trồng lúa tại Đồng bằng sông Cửu Long, trong đó tuyển chọn được 26 chủng thể hiện khả năng ức chế mạnh nấm *Pyricularia oryzae* gây bệnh đạo ôn [67]. Ngoài môi trường đất và hệ thực vật trên cạn, xạ khuẩn từ môi trường biển cũng nhận được nhiều sự quan tâm nhờ khả năng sinh tổng hợp các chất chuyển hóa thứ cấp mới. Trần Thị Thanh Hoa và cộng sự (2020) đã phân lập và sàng lọc được 61 chủng *Actinomycetes* từ 80 mẫu sinh vật biển và trầm tích tại đảo Lý Sơn, Quảng Ngãi, trong đó có nhiều chủng thể hiện hoạt tính kháng mạnh mẽ với các vi khuẩn gây bệnh nguy hiểm như *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*,... [68].

Đối với nhóm cây dược liệu, việc tìm kiếm các hoạt chất thứ cấp mang lại nhiều kết quả khả quan. Vũ Thị Hạnh Nguyên và cộng sự (2020) đã tiến hành phân lập 111 chủng xạ khuẩn từ rễ, thân và lá của cây quế (*Cinnamomum cassia* Presl) tại Hòa Bình. Nghiên cứu đã sàng lọc được 38 chủng có hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định phần lớn thuộc 3 chi riêng biệt là *Streptomyces*, *Microbacterium* và *Nocardia*. Kết quả phân tích di truyền cũng chỉ ra sự hiện diện của các gen sinh tổng hợp quan trọng như PKS và NRPS ở phần lớn các chủng sinh kháng sinh, minh chứng cho tiềm năng khai thác hợp chất tự nhiên từ vi sinh vật liên kết với cây dược liệu [69]. Ngoài ra, chủng xạ khuẩn *Streptomyces variabilis* LCP18 từ cây màng tang được chứng minh sinh isoprenetin, genistein, daidzein, syringic axit, daucosterol có hoạt tính sinh học đáng chú ý [70]. Điều này cho thấy xạ khuẩn không chỉ có khả năng đối kháng với mầm bệnh mà còn là nguồn cung cấp vật liệu cho công nghiệp dược phẩm. Không chỉ dừng lại ở việc đánh giá hoạt tính kháng sinh, nhiều nghiên cứu gần đây cũng đã tập trung làm sáng tỏ cơ chế đối kháng nấm của xạ khuẩn thông qua việc khảo sát vai trò của các enzym ngoại bào như chitinase, cellulase, protease. Trịnh Thị Vân Anh và cộng sự (2021) đã chứng minh enzym thủy phân chitin/chitosan từ xạ khuẩn có khả năng tạo chitio-oligosaccharide ức chế sự phát triển của *Fusarium*

oxysporum. Ở nồng độ 0,3‰, chitio-oligosaccharide có thể ức chế 98% sự nảy mầm của bào tử sau 24 giờ và hoạt tính này vẫn được duy trì sau 48 giờ [71].

Sự bùng nổ của các công nghệ giải trình tự gen thế hệ mới đã đưa các nghiên cứu về xạ khuẩn bước vào kỷ nguyên hệ gen học. Thay vì chỉ dựa vào quá trình sàng lọc đơn thuần, các nhà nghiên cứu đã tập trung sang hướng khai thác hệ gen để định hướng phát hiện và khai thác các hợp chất tiềm năng. Các nền tảng giải trình tự tiên tiến như PacBio hay Illumina đã được ứng dụng thành công để lắp ráp hệ gen hoàn chỉnh của nhiều chủng *Streptomyces* tiềm năng. Năm 2023, Nguyễn Thị Thu và cộng sự đã giải mã thành công hệ gen hoàn chỉnh của chủng *Streptomyces* sp. VNUA74 phân lập từ đất trồng chuối ở Hưng Yên bằng công nghệ PacBio RS II và DNBseq. Kết quả thu được bộ gen có kích thước 7,25 Mb với hàm lượng G+C đạt 72,69 % [72]. Cùng năm, Quách Ngọc Tùng và cộng sự (2023) đã khẳng định tiềm năng đối kháng của chủng xạ khuẩn nội sinh *Streptomyces albus* RC2 đối với 3 chủng nấm gây bệnh phổ biến trên cây công nghiệp như *Lasiodiplodia theobromae*, *Fusarium fujikuroi*, và *Scopulariopsis gossypii*. Hệ gen chủng RC2 được giải trình tự bằng công nghệ Illumina có chứa 15 BGC với độ tương đồng >45% so với các BGC tham chiếu trên cơ sở dữ liệu. Kết quả này không chỉ định hướng phát triển chế phẩm vi sinh phòng trừ bệnh mà còn mở ra triển vọng tách chiết các hợp chất kháng nấm mới [73].

Nhìn chung, sự kết hợp giữa các phương pháp vi sinh vật học truyền thống với công nghệ giải trình tự gen và các công cụ phân tích tin sinh học đã tạo ra những bước tiến quan trọng trong nghiên cứu xạ khuẩn tại Việt Nam. Các kết quả đạt được không chỉ làm phong phú nguồn dữ liệu về đa dạng xạ khuẩn mà còn khẳng định tiềm năng to lớn của nguồn tài nguyên này trong việc phát hiện các hợp chất tự nhiên mới từ các hệ sinh thái đặc thù. Đồng thời, xu hướng khai thác dữ liệu hệ gen và các cụm gen sinh tổng hợp hợp chất thứ cấp đang mở ra những cơ hội mới trong nghiên cứu và ứng dụng xạ khuẩn phục vụ nông nghiệp, y dược và công nghệ sinh học.

Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

2.1.1. Vật liệu và chủng giống

Vật liệu: 05 mẫu đất vùng rễ cây sâm Ngọc Linh 3-4 năm tuổi được thu thập tại xã Mù Căng Chải, tỉnh Yên Bái, Việt Nam vào tháng 9 năm 2025.

Chủng giống: Các chủng nấm gây bệnh *Fusarium solani* PAV1, *Rhizoctonia solani* PAV2 và *Colletotrichum gloeosporioides* PAV3 được cung cấp bởi công ty Panax và lưu giữ tại Phòng Thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ lên men và Kỹ thuật cải biến sinh tổng hợp hoạt chất sinh học, Viện Sinh học.

2.1.2. Hóa chất và thiết bị

- Hóa chất: Tryptone, peptone (Sigma-Aldrich, Mỹ); cao nấm men, cao thịt (Án Độ); glycerol (Merck, Đức); MgCl₂, KCl, NaCl, MgSO₄, K₂HPO₄, Na₂HPO₄ (Trung Quốc); KH₂PO₄, (NH₄)₂SO₄, NH₄Cl, FeSO₄ (Sigma-Aldrich, Mỹ); Ca₃(PO₄)₂ (Trung Quốc); tinh bột tan, thạch (Việt Nam); D-mannitol, myo-inositol, sucrose, D-fructose, D-galactose, D-glucose (Sigma-Aldrich, Mỹ); dextrose (Trung Quốc); casamino acids, cao malt (Sigma-Aldrich, Mỹ); bột kiều mạch (Sigma-Aldrich, Mỹ); L-arginine, L-lysine, L-tryptophan, L-asparagine, L-cysteine, L-threonine (Sigma-Aldrich, Mỹ),...

- Thiết bị: Máy ly tâm (Biofuge Fresco, Kendro, Đức); máy vortex (Đức); máy lắc ổn nhiệt (BSI-25R CPT, Mỹ); nồi khử trùng (ALP MC-40DP, Nhật Bản); lò vi sóng (Sharp, Nhật Bản); kính hiển vi (Carson, Mỹ); tủ nuôi cấy (Esco, Singapore); tủ an toàn sinh học (Esco, Australia); máy đo pH (Trung Quốc); máy điện di DNA (Nhật Bản); máy PCR (Bio-Rad, Mỹ); máy đo mật độ quang (OD) (Hitachi, Nhật Bản); tủ lạnh sâu -80°C (Trung Quốc); cân phân tích (Precisa, Thụy Sĩ),...

2.1.3. Môi trường

Môi trường YIM38 (g/L): Cao Matl 4,0; cao nấm men 4,0; glucose 4,0; vi lượng 0,1; nước 1000 mL; pH 7,2.

Môi trường PDA (g/L): Khoai tây 200; glucose 15; agar 20; nước 1000 mL; pH 7,0.

Môi trường Tap Water Yeast Extract (TWYE) (g/L): Cao nấm men 0,25; K₂HPO₄ 0,5, agar 18,0; nước máy 1000 mL

Môi trường ISP2 (g/L): cao nấm men 3,0; cao malt 10,0; dextrose 4,0; agar 20,0; nước 1000 mL; pH 7-7,2.

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Phân lập các chủng xạ khuẩn từ đất vùng rẫy cây sâm Ngọc Linh

Mẫu đất vùng rẫy (5 mẫu) thu thập tại vùng rẫy cây sâm di thực tại Mù Căng Chải, Yên Bái được bảo quản trong túi zip và vận chuyển về Phòng Thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ lên men và Kỹ thuật cải biến sinh tổng hợp hoạt chất sinh học, Viện Sinh học. Các chủng xạ khuẩn được phân lập bằng phương pháp pha loãng thập phân [74]. Đầu tiên, các mẫu đất được xử lý nhiệt ở 65 °C trong 2 giờ để chọn lọc các vi sinh vật sinh bào tử và ức chế sự phát triển của các vi sinh vật không mong muốn. Cân 25 g mẫu đất trộn với 225 mL nước cất vô trùng và khuấy trong 15 - 20 phút ở tốc độ 200 vòng/phút trên máy lắc. Hỗn hợp dịch đất được để yên 10 phút ở nhiệt độ phòng để cho các hạt lớn lắng xuống và sau đó pha loãng từ 10^{-3} đến 10^{-7} trong điều kiện vô trùng. Khoảng 100 μ L từ các dung dịch pha loãng được trải đều lên các đĩa môi trường TWYE có bổ sung 50 mg/mL nystatin, 25 mg/mL $K_2Cr_2O_7$ và 25 mg/mL axit nalidixic nhằm ức chế sự phát triển của nấm và vi khuẩn.

Các đĩa sau khi cấy được ủ ở nhiệt độ 28 °C trong 6 ngày trong điều kiện hiếu khí. Sau 6 - 10 ngày, lựa chọn các khuẩn lạc có đặc điểm hình thái như khuẩn lạc phát triển chậm, khô, xù xì và sắc tố đặc trưng. Những khuẩn lạc này được cấy chuyển nhiều lần trên môi trường YIM38 thạch để tinh sạch, đảm bảo thu được chủng thuần khiết. Cuối cùng, các chủng xạ khuẩn sau khi tinh sạch được bảo quản trong glycerol 30 % ở -80 °C để phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo.

2.2.2. Sàng lọc các chủng có khả năng kháng nấm bằng phương pháp đối kháng trên đĩa thạch

Khả năng đối kháng của các chủng xạ khuẩn đối với các nấm gây bệnh được đánh giá bằng phương pháp đối kháng trực tiếp trên môi trường PDA theo Wei và cộng sự (2020) [75]. Các chủng xạ khuẩn được cấy chấm điểm tại bốn vị trí đối xứng trên đĩa thạch PDA, cách tâm đĩa khoảng 2,5 cm. Sau đó, một khối thạch chứa hệ sợi nấm gây bệnh được đặt tại vị trí trung tâm của đĩa. Đĩa PDA chỉ cấy nấm được sử dụng làm đối chứng.

Sau khi ủ ở 28 °C trong 5 ngày, mức độ đối kháng được xác định thông qua phần trăm ức chế sinh trưởng nấm (GI) theo công thức của Wei và cộng sự (2020) [75]. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

$$GI = [(R - R1)/R] \times 100\%$$

Trong đó: GI (%): (%) biểu thị mức độ ức chế của dòng xạ khuẩn so với sự phát triển tự nhiên của nấm; R: Bán kính hoặc chiều dài sợi nấm phát triển trong đĩa

đối chứng (không có xạ khuẩn); R1: Bán kính hoặc chiều dài sợi nấm phát triển trong đĩa có xạ khuẩn.

Đối với bước sàng lọc ban đầu, các chủng xạ khuẩn phân lập được đánh giá khả năng đối kháng đối với hai loài nấm gây bệnh là *F. solani* PAV1 và *R. solani* PAV2 nhằm tuyển chọn chủng có hoạt tính kháng nấm tốt nhất. Chủng được tuyển chọn tiếp tục được đánh giá khả năng đối kháng đối với ba loài nấm gây bệnh gồm *F. solani* PAV1, *R. solani* PAV2 và *C. gloeosporioides* PAV3.

2.2.3. Đánh giá hoạt tính kháng nấm của dịch nuôi cấy xạ khuẩn

Hoạt tính kháng nấm của dịch nuôi cấy không bào được đánh giá thông qua khả năng ức chế sinh trưởng của nấm khi bổ sung trực tiếp vào đĩa thạch môi trường PDA [33]. Bào tử của chủng xạ khuẩn tiềm năng được cấy vào 100 mL môi trường PDB trong bình tam giác dung tích 500 mL với tốc độ lắc 200 vòng/phút trong 6 ngày ở 30 °C. Dịch nuôi cấy không tế bào của chủng xạ khuẩn được thu nhận bằng cách ly tâm ở tốc độ 10.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4 °C, sau đó lọc qua màng lọc 0,22 µm để đảm bảo loại bỏ hoàn toàn tế bào xạ khuẩn.

Đồng thời, các chủng nấm *F. solani* PAV1, *R. solani* PAV2 và *C. gloeosporioides* PAV3 được cấy trên môi trường PDA và ủ ở nhiệt độ 28 °C cho đến khi hệ sợi phát triển đồng đều. Các khối thạch chứa hệ sợi nấm đường kính 9 mm, cắt từ rìa khuẩn lạc đang sinh trưởng được sử dụng làm nguồn giống trong thí nghiệm đối kháng.

Tiếp theo, dịch nuôi cấy sau khi loại bỏ tế bào được bổ sung vào môi trường PDA theo tỉ lệ 10%, 20% và 30% (v/v). Sau khi môi trường đã được chuẩn bị, một khối thạch chứa sợi nấm đang phát triển tốt được đặt vào trung tâm đĩa và tiếp tục ủ ở 28 °C trong thời gian 5 ngày. Sau 5 ngày, hoạt tính kháng nấm được xác định thông qua phần trăm ức chế sinh trưởng của sợi nấm so với đối chứng không bổ sung dịch nuôi cấy không tế bào. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

2.2.4. Đánh giá khả năng sinh các hợp chất bay hơi ức chế nấm bệnh

Phương pháp này dựa trên việc sử dụng đĩa petri hai ngăn, nhằm ngăn cách hoàn toàn sự tiếp xúc trực tiếp và sự khuếch tán của các hợp chất kháng sinh hòa tan trong môi trường thạch từ xạ khuẩn sang nấm kiểm định. Hiệu quả ức chế nấm phụ thuộc vào khả năng sinh tổng hợp và khuếch tán của các hợp chất hữu cơ dễ bay hơi (Volatile Organic Compounds - VOCs) từ ngăn nuôi cấy xạ khuẩn sang ngăn nuôi cấy nấm thông qua không gian không khí bên trong đĩa [76].

Đầu tiên, chủng xạ khuẩn PV1 được cấy trải đều trên ngăn chứa môi trường ISP2 và ủ ở nhiệt độ 28 °C trong 48 giờ. Sau đó, một khối thạch chứa hệ sợi nấm

đang phát triển được đặt vào tâm của ngăn chứa môi trường PDA. Toàn bộ đĩa Petri được bọc kín bằng 3 lớp parafilm và tiếp tục nuôi ủ trong tối ở nhiệt độ 28 °C trong 4-5 ngày. Hoạt tính kháng nấm được xác định dựa trên hiệu quả ức chế đường kính sợi nấm của các hợp chất hữu cơ dễ bay hơi khuếch tán qua không gian không khí bên trong đĩa.

2.2.5. Đánh giá hoạt tính kháng nấm của cao chiết thô bằng phương pháp khuếch tán trên giếng thạch

Phương pháp thu nhận cao chiết thô từ dịch nuôi cấy ngoại bào của xạ khuẩn được tiến hành theo mô tả của Janardhan và cộng sự (2014) [77]. Bào tử của chủng xạ khuẩn tiềm năng được cấy vào 20 mL môi trường PDB trong bình tam giác dung tích 50 mL với tốc độ lắc 200 vòng/phút trong 4 ngày ở 28 °C. Sau giai đoạn hoạt hóa, 10% (v/v) dịch nuôi cấy được chuyển vào 200 mL môi trường PDB mới với tốc độ lắc 200 vòng/phút trong 6 ngày ở 28 °C.

Sau quá trình lên men, dịch nuôi cấy tế bào được tách riêng bằng phương pháp lọc và ly tâm ở tốc độ 10.000 vòng/phút trong 30 phút ở 4 °C. Các hợp chất ngoại bào từ dịch nuôi cấy được chiết xuất bằng phương pháp chiết lỏng-lỏng, sử dụng dung môi ethyl acetate theo tỷ lệ 1:3 (v/v) và được cô đặc bằng máy cô quay chân không ở điều kiện 50 °C [77]. Cao chiết thô sau đó được sấy, cân và bảo quản ở 4 °C cho các thí nghiệm tiếp theo.

Hoạt tính kháng nấm được đánh giá bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch. Cao chiết thô được hòa tan trong dung dịch dimethylsulfoxide (DMSO) 0,5% (v/v) và điều chỉnh đến nồng độ 100 µg/mL, sau đó bổ sung vào các giếng thạch đã chuẩn bị sẵn. Dung môi DMSO không chứa cao chiết được sử dụng làm đối chứng âm. Các chủng nấm kiểm định *F. solani* PAV1, *R. solani* PAV2 và *C. gloeosporioides* PAV3 được nuôi cấy trên môi trường thạch PDA ở 28 °C cho đến khi hệ sợi phát triển đồng đều. Sau đó, một khối thạch chứa hệ sợi nấm đang sinh trưởng được đặt vào các đĩa môi trường PDA. Đồng thời, trên bề mặt môi trường thạch tiến hành tạo các giếng có đường kính khoảng 6 mm và bổ sung cao chiết thô. Tất cả các đĩa được đem ủ ở 28 °C và thí nghiệm được dừng khi nấm bệnh mọc bao phủ toàn đĩa đối chứng. Phần trăm ức chế sinh trưởng (GI) được tính theo công thức của Wei và cộng sự (2020) [75].

2.2.6. Đánh giá tác động của cao chiết thô đến sự nảy mầm và hình thái của bào tử nấm

Hai chủng nấm gây bệnh sinh bào tử như *F. solani* PAV1 và *C. gloeosporioides* PAV3 được nuôi cấy trên môi trường thạch PDA ở 28 °C. Sau khoảng 7 ngày, bào tử nấm được thu nhận bằng cách rửa bề mặt khuẩn lạc bằng nước cất vô trùng và lọc qua gạc vô trùng để loại bỏ hoàn toàn sợi nấm. Mật độ bào tử được xác định bằng phương pháp pha loãng và điều chỉnh mật độ về mức khoảng 10^8 CFU/mL.

Tiếp theo, cao chiết thô được bổ sung vào môi trường lỏng PDB chứa huyền phù bào tử nấm sao cho đạt nồng độ cuối cùng là 20 µg/mL. Hỗn hợp môi trường và dịch bào tử không có cao chiết được sử dụng làm mẫu đối chứng. Cuối cùng, tất cả các mẫu được đem ủ ở 28 °C và khả năng nảy mầm của bào tử sẽ được kiểm tra dưới kính hiển vi quang học sau 16 - 24 giờ nuôi cấy.

2.2.7. Phương pháp đánh giá khả năng sinh enzym ngoại bào và IAA

Khả năng sinh enzym ngoại bào của chủng xạ khuẩn được xác định bằng phương pháp cấy trên môi trường thạch đĩa có bổ sung cơ chất đặc hiệu. Chủng xạ khuẩn được cấy chấm điểm lên bề mặt các môi trường có chứa nguồn cơ chất tương ứng: 1% tinh bột (w/v), 1% carboxymethyl cellulose (CMC) (w/v) và 1% chitin (w/v). Sau đó, các đĩa được ủ ở 28 °C trong 5 ngày. Sau thời gian ủ, hoạt tính enzym được xác định thông qua vòng phân giải cơ chất xung quanh khuẩn lạc.

Khả năng sinh IAA của chủng xạ khuẩn tiềm năng được xác định bằng phương pháp so màu, sử dụng thuốc thử Salkowski, có điều chỉnh từ phương pháp của Bano và Musarrat (2003) và Abd-alla và cs. (2013). Chủng xạ khuẩn được nuôi cấy trên môi trường ISP2 ở 28 °C trong 5 ngày để thu sinh khối hoạt hóa. Sau đó, một vòng cấy được chuyển vào môi trường lỏng YIM38 có bổ sung tryptophan nồng độ 10 mg/L nhằm cung cấp tiền chất cho quá trình sinh tổng hợp IAA. Mẫu được nuôi lắc ở 28 °C với tốc độ 120 - 150 vòng/phút trong khoảng 5 ngày. Sau thời gian nuôi cấy, dịch nuôi được ly tâm ở 10.000 vòng/phút trong 10 phút để thu dịch nổi. Lấy 1 mL dịch nổi phản ứng với 2 mL thuốc thử Salkowski và ủ trong tối ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Sự xuất hiện màu hồng đặc trưng chứng tỏ sự có mặt của IAA và được xác định bằng cách đo mật độ quang tại bước sóng 530 nm bằng máy quang phổ UV - Vis [78, 79]. Hàm lượng IAA được xác định dựa trên đường chuẩn được xây dựng từ các dung dịch chuẩn IAA với nồng độ khác nhau đã biết.

2.2.8. Đánh giá khả năng kích thích nảy mầm của hạt giống

Khả năng kích thích sinh trưởng thực vật của chủng PV1 ở giai đoạn nảy mầm được đánh giá thông qua thử nghiệm trên hạt lúa và hạt ngưu tất phương pháp đĩa giấy lọc, bao gồm:

- *Xử lý bề mặt hạt giống*: Các hạt giống khỏe mạnh được chọn lọc và tiến hành khử trùng bề mặt bằng cách ngâm trong ethanol 70% trong khoảng 1 phút, sau đó được rửa lại bằng nước cất vô trùng, tiếp tục ngâm trong dung dịch 2% NaClO trong 3 phút, rửa lại bằng 70% ethanol trong 30 giây. Cuối cùng, hạt được rửa sạch hoàn toàn bằng nước cất vô trùng 3 lần để loại bỏ dư lượng hóa chất [80].

- *Bố trí thí nghiệm*: 60 hạt giống sau khi khử trùng bề mặt được chia làm 2 lô: Lô thí nghiệm ngâm với tế bào của chủng PV1 nồng độ 10^8 CFU/mL trong nước muối sinh lý 0,85% (w/v). Lô đối chứng ngâm trong nước muối sinh lý vô trùng, không chứa tế bào trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau khi ngâm, vớt hạt ra và đặt lên các đĩa petri vô trùng đã lót sẵn giấy ẩm. Các đĩa được đậy kín, ủ trong tối ở nhiệt độ phòng và theo dõi tỷ lệ nảy mầm của hạt. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

2.2.9. Phương pháp định danh xạ khuẩn

2.2.9.1. Phân loại dựa trên đặc điểm hình thái

Đặc điểm hình thái của các chủng xạ khuẩn được khảo sát bằng cách nuôi cấy trên môi trường tiêu chuẩn ISP2 ở nhiệt độ 28 °C. Quá trình theo dõi được thực hiện định kỳ sau các khoảng thời gian 7, 14 và 21 ngày nhằm đánh giá màu sắc của khuẩn ty khí sinh (KTKS), khuẩn ty cơ chất (KTCC) và khả năng sinh các sắc tố tan. Việc phân loại màu sắc được thực hiện theo phương pháp mô tả của Shirling và Gottlieb (1966) [81, 82].

2.2.9.2. Phân loại xạ khuẩn dựa trên giải trình tự gen 16Sr RNA

DNA tổng số của các chủng xạ khuẩn phân lập được tách chiết bằng bộ kit TracePure™ Nucleic axit (LabNova, Việt Nam), theo đúng hướng dẫn của nhà sản xuất. Vùng gene 16S rRNA được khuếch đại bằng phản ứng PCR sử dụng cặp môi phổ biến dành cho vi khuẩn bao gồm 27F (5'-TAACACATGCAAGTCGAACG-3') và 1429R (5'-GGTGTGACGGGCGGTGTGTA-3'). Phản ứng PCR được thực hiện với tổng thể tích 25 μ L chứa hỗn hợp PCR Master Mix, cặp môi đặc hiệu và DNA khuôn. Chu trình nhiệt được thiết lập trên máy luân nhiệt bao gồm: biến tính ở 95°C trong vòng 5 phút; tiếp theo là 30 chu kỳ lặp lại gồm biến tính ở 95 °C trong 1 phút, gắn môi ở 55 °C. trong 1 phút, kéo dài chuỗi ở 72 °C trong 5 phút; kết thúc bằng bước kéo dài cuối cùng ở 72 °C trong 10 phút và giữ mẫu ở nhiệt độ 4 °C.

Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1%, đối chiếu với thang DNA chuẩn (Thermo Scientific, Hoa Kỳ) để xác định kích thước và độ đặc hiệu. Các sản phẩm PCR đạt chất lượng được gửi đến First BASE Laboratories Sdn. Bhd. (Malaysia) để tiến hành giải trình tự. Trình tự gen 16S rRNA của chủng PV1 được so sánh với các trình tự tương đồng trên ngân hàng dữ liệu GenBank bằng công cụ BLASTN. Các trình tự của các chủng chuẩn tham chiếu có độ tương đồng cao được lựa chọn để xây dựng cây phát sinh loài. Trình tự gen 16S rRNA được căn chỉnh với các chủng chuẩn bằng phần mềm MEGA v.11 và cây phát sinh loài được dựng theo phương pháp Neighbor-Joining với mô hình Kimura 2-parameter và kiểm định Bootstrap 1000 lần lặp.

2.2.10. Giải trình tự hệ gen của chủng xạ khuẩn tiềm năng

DNA tổng số của chủng xạ khuẩn được tách chiết bằng Kit theo như mục 2.2.9.2. DNA cần có độ tinh sạch tốt như tỷ lệ OD_{260/280} khoảng 1,8 được định lượng bằng các phương pháp huỳnh quang như Qubit và kiểm tra kích thước bằng hệ thống điện di mao quản để đảm bảo phù hợp cho bước xử lý tiếp theo. Sau khi chuẩn bị, DNA được tiến hành phân mảnh khoảng 150 - 300 bp bằng Kit nhằm tạo ra các đoạn có kích thước mong muốn. Quá trình này thường được thực hiện bằng enzym trong điều kiện ủ ở 37 °C trong 20 phút để cắt DNA và sau đó tăng nhiệt lên khoảng 65 °C để bất hoạt enzym. Tiếp theo là bước xử lý đầu và gắn đuôi A. Trong bước này, các enzym đặc hiệu sẽ chuyển đổi các đầu DNA về dạng đầu bằng và bổ sung một nucleotide adenine ở đầu 3'. Điều này tạo điều kiện thuận lợi cho việc gắn adapter ở bước tiếp theo. Phản ứng thường được thực hiện theo hai giai đoạn nhiệt độ, ví dụ 20 °C trong khoảng 30 phút để sửa đầu mút và 65 °C trong 30 phút để hoàn tất quá trình gắn đuôi. Sau khi DNA đã được chuẩn bị đầu mút, các adapter đặc hiệu của hệ thống Onso sẽ được gắn vào hai đầu phân tử DNA thông qua phản ứng ligation. Hỗn hợp phản ứng bao gồm DNA đã xử lý, adapter, buffer và ligase, được ủ ở khoảng 20 °C trong 20 phút. Các adapter này chứa các trình tự cần thiết để DNA có thể gắn lên flow cell và được nhận diện trong quá trình giải trình tự. Sau bước ligation, thư viện DNA được làm sạch bằng hạt từ. Quá trình làm sạch bao gồm việc thêm hạt từ vào mẫu, ủ để DNA gắn vào hạt, sau đó sử dụng nam châm để tách hạt ra khỏi dung dịch, rửa bằng ethanol 80% và cuối cùng là giải hấp DNA trong dung dịch đệm phù hợp. Thư viện sau đó được khuếch đại bằng PCR nhằm tăng số lượng phân tử DNA đủ cho quá trình giải trình tự. Cuối cùng, thư viện DNA được kiểm tra chất lượng và định lượng trước khi đưa vào giải trình tự. Nồng độ DNA được xác định bằng Qubit hoặc qPCR, trong khi phân bố kích thước được đánh giá bằng Bioanalyzer Thư viện đạt tiêu chuẩn

sau đó được pha loãng đến nồng độ yêu cầu, xử lý theo hướng dẫn của hệ thống và nạp lên flow cell của nền tảng Onso để tiến hành giải trình tự.

2.2.11. Chú giải và phân tích di truyền hệ gen

Dữ liệu giải trình tự thô từ nền tảng Onso PacBio được đánh giá chất lượng ban đầu bằng công cụ FastQC v0.12.1 để xác định các chỉ số về đoạn đọc, chất lượng base, hàm lượng GC và sự hiện diện của các trình tự adapter. Dựa trên báo cáo chất lượng, các đoạn trình tự được xử lý thông qua phần mềm Trimmomatic v0.39 ở chế độ giải trình tự cặp. Quy trình cắt tỉa bao gồm việc loại bỏ các trình tự adapter quy chuẩn và loại bỏ các nucleotide có chất lượng thấp ở cả hai đầu của mỗi read (LEADING:3 và TRAILING:3). Các tệp dữ liệu sau khi làm sạch được tái kiểm tra bằng FastQC để đảm bảo tính toàn vẹn và chất lượng trước khi tiến hành lắp ráp.

Quá trình lắp ráp hệ gen *de novo* được thực hiện phần mềm Unicycler v0.4.8. Độ hoàn thiện của lắp ghép *de novo* được phân tích thông qua sử dụng BUSCO v3. Hệ gen của chủng tuyển chọn được chú giải bằng nền tảng RASTk trên nền cơ sở dữ liệu SEED kết hợp với hệ thống chú giải bộ gen vi khuẩn Prokaryotic Genomes Annotation Pipeline (PGAP) của NCBI. Các gen được phân loại theo chức năng dựa theo cơ sở dữ liệu GO (Gene Ontology) và COG (Cluster of Orthologous Groups) thông qua công cụ EggNOG-mapper v1.0.3 [83]. Ngoài ra, các gen chức năng được tham chiếu trên cơ sở dữ liệu KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) và bản đồ bộ gen tạo bằng phần mềm PATRIC [84, 85].

Các gen mã hóa cho các protein liên quan đến sinh tổng hợp các hợp chất chuyển hóa thứ cấp được dự đoán bằng công cụ AntiSMASH [86]. Các khung đọc mở (ORFs) sau đó được phân tích trình tự bằng công cụ tìm kiếm BLASTp với ngưỡng giá trị E-value $\leq 1e-5$, sử dụng các trình tự protein tham chiếu trong cơ sở dữ liệu. Các trình tự amino axit được giống hàng với các thông số mặc định và kết quả có độ tương đồng cao nhất (dựa trên tỷ lệ phần trăm chiều dài giống hàng và mức độ tương đồng) được lựa chọn để chú giải chức năng cho các gen dự đoán. Toàn bộ các gen sau khi được chú giải tiếp tục được phân loại chức năng dựa trên hệ thống phân loại COG. Trình tự hệ gen chủng tuyển chọn được đăng ký trên cơ sở dữ liệu Gen Bank (NCBI) dựa theo hướng dẫn của NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

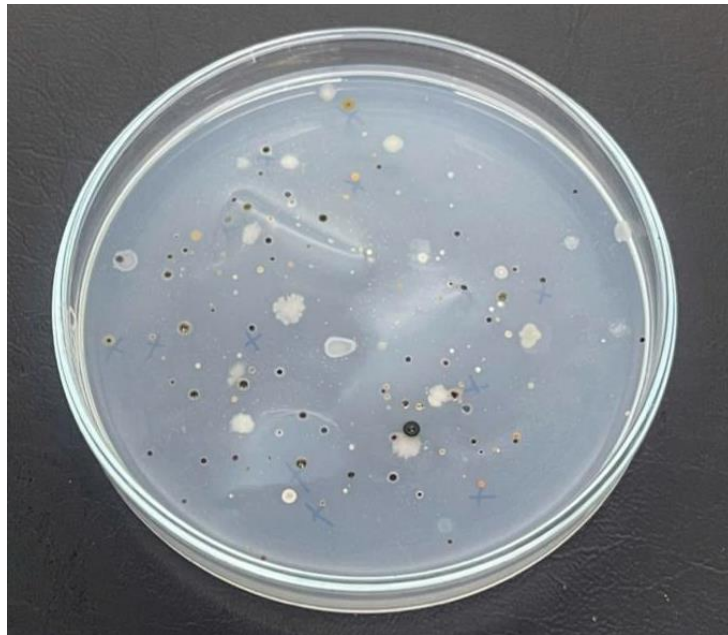
2.2.12. Xử lý thống kê

Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Dữ liệu thực nghiệm được xử lý bằng phương pháp thống kê sinh học trên nền tảng phần mềm Microsoft Excel 2016. Kết quả được trình bày dưới dạng giá trị trung bình \pm độ lệch chuẩn (Mean \pm SD). Xử lý thống kê bằng trắc nghiệm Student sử dụng phần mềm Prism phiên bản 9.0 (Graph Pad Software). Giá trị $p < 0,05$ được coi là có ý nghĩa thống kê.

Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập và tuyển chọn các chủng xạ khuẩn có đặc tính kháng nấm

Từ 5 mẫu đất vùng rễ cây sâm Ngọc Linh di thực tại Mù Căng Chải, Yên Bái, đã phân lập được 8 chủng xạ khuẩn với hình thái khác nhau trên môi trường TWYE (Hình 3.1). Với hàm lượng chất hữu cơ thấp, TWYE hạn chế sự phát triển nhanh của vi khuẩn và nấm thông thường và tạo điều kiện thuận lợi cho xạ khuẩn phát triển. Sau đó, các chủng được cấy thuần và làm sạch trên môi trường YIM38. Các chủng này thể hiện sự đa dạng về hình thái màu sắc khuẩn lạc, khả năng sinh bào tử và khả năng thích nghi tốt trên các môi trường nuôi cấy chuyên biệt.



Hình 3.1. Hình ảnh minh họa kết quả phân lập xạ khuẩn trên môi trường TWYE

Khả năng đối kháng của 8 chủng xạ khuẩn phân lập được đánh giá thông qua phân trăm ức chế sự phát triển của hệ sợi nấm *R. solani* PAV2 và *F. solani* PAV1 thông qua phương pháp nuôi cấy đối kháng trên môi trường thạch. Kết quả cho thấy các chủng xạ khuẩn thể hiện mức độ đối kháng khác nhau đối với từng loài nấm kiểm định, phản ánh sự khác biệt về khả năng sinh tổng hợp các hợp chất kháng nấm giữa các chủng. Chi tiết về phân trăm ức chế sinh trưởng của từng chủng đối với từng đối tượng nấm được trình bày tại Bảng 3.1.

Bảng 3.1. Sàng lọc các chủng xạ khuẩn có khả năng ức chế nấm bệnh

Chủng xạ khuẩn	Phần trăm ức chế sợi nấm (%)	
	<i>R. solani</i> PAV2	<i>F. solani</i> PAV1
PV1	28,5 ± 3,9%	48,3 ± 5,8%
PV2	-	-
PV3	-	-
PV4	18,1 ± 2,2%	-
PV5	-	58,7 ± 7,2%
PV6	-	-
PV7	-	-
PV8	-	22,4 ± 5,9%

Ghi chú: (-) không có hoạt tính kháng

Kết quả Bảng 3.1 cho thấy có sự phân hóa rõ rệt về phổ kháng nấm và hoạt tính ức chế nấm giữa các chủng xạ khuẩn vùng rễ cây sâm Ngọc Linh. Trong 8 chủng phân lập, 4 chủng thể hiện khả năng kháng ít nhất một tác nhân nấm gây bệnh (chiếm 50%). Trong đó, chủng PV1 cho khả năng kháng đồng thời cả 2 chủng nấm gây bệnh là *R. solani* PAV2 và *F. solani* PAV1 với phần trăm ức chế hệ sợi tương ứng lần lượt là 28,5% và 48,3%. Các chủng còn lại chỉ tác động lên một đối tượng nấm duy nhất. Cụ thể, chủng PV4 cho khả năng ức chế *R. solani* PAV2 yếu, trong khi đó PV5 và PV8 kháng *F. solani* PAV1 với phần trăm ức chế hệ sợi tương ứng đạt lần lượt là 58,7% và 22,4%. Do đó, chủng PV1 được lựa chọn làm đối tượng cho các nghiên cứu tiếp theo nhằm làm rõ cơ chế kháng nấm.

Xạ khuẩn cư trú trong đất vùng rễ các loài sâm thuộc chi *Panax* là nguồn cung cấp các hoạt chất kháng nấm tự nhiên vô cùng tiềm năng. Năm 2020 Peng và cộng sự đã phân lập được 42 chủng xạ khuẩn từ 12 mẫu đất vùng rễ cây sâm *P. notoginseng*. Trong đó 40/42 chủng (chiếm 95,2%) có khả năng kháng nấm và kháng khuẩn ở các điều kiện nuôi cấy khác nhau. Đặc biệt, nghiên cứu của Peng cũng ghi nhận nhiều chủng có hoạt tính kháng mạnh đối với *F. solani*, điển hình là chủng *Streptomyces viridosporus* SYP-A7053 với đường kính vòng kháng nấm đạt 11,8 mm [87]. Trong một nghiên cứu tương tự vào năm 2020, Trần Thị Hoa và cộng sự đã phân lập thành công 2 chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. X12 và *Streptomyces* sp. NL2 có khả năng đối kháng với *Fusarium oxysporum* gây bệnh héo vàng và *R. solani* gây bệnh lở cổ rễ [88].

Không chỉ giới hạn trên đối tượng sâm, các chủng xạ khuẩn có hoạt tính kháng nấm mạnh còn được tìm thấy phổ biến trong đất vùng rễ của nhiều loài cây dược liệu khác. Djemouai, N. và cộng sự (2022) đã phân lập được 11 chủng xạ khuẩn từ đất vùng rễ cây thanh hao hoa vàng (*Artemisia herba-alba*). Đặc biệt, chủng *Streptomyces* sp. BKS30 đối kháng mạnh với hầu hết các loại vi nấm thử nghiệm như *Aspergillus carbonarius*, *Penicillium expansum* và *F. oxysporum* f. sp. *albedinis* [89].

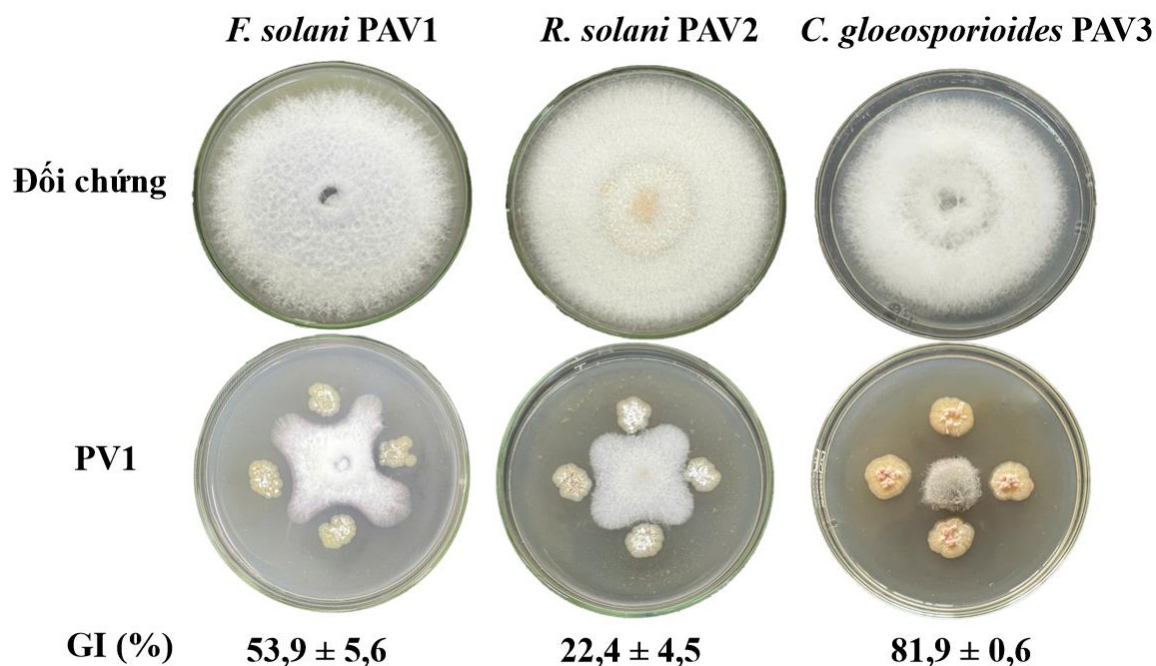
3.2. Đánh giá đặc tính kháng nấm của chủng xạ khuẩn PV1

3.2.1. Đánh giá khả năng đối kháng trực tiếp nấm bệnh của chủng xạ khuẩn PV1

Trong các thử nghiệm sàng lọc ban đầu, chủng PV1 thể hiện hoạt tính đối kháng rõ rệt với *F. solani* PAV1 và *R. solani* PAV2. Dựa trên kết quả này, chủng PV1 được lựa chọn để tiếp tục đánh giá chi tiết khả năng kháng 3 loài nấm gây bệnh thực vật gồm *F. solani* PAV1, *R. solani* PAV2 và *C. gloeosporioides* PAV3 bằng phương pháp cấy chấm điểm. Đây là những tác nhân gây bệnh quan trọng trên nhiều loại cây trồng, có khả năng gây ảnh hưởng đáng kể đến năng suất và chất lượng nông sản. Việc mở rộng thử nghiệm trên nhiều đối tượng nấm bệnh khác nhau cho phép đánh giá toàn diện hơn phổ hoạt tính kháng nấm của chủng PV1, đồng thời xác định khả năng ứng dụng tiềm năng của chủng này trong phát triển các tác nhân kiểm soát sinh học. Kết quả chi tiết được thể hiện ở Hình 3.2 và Bảng 3.2.

Bảng 3.2. Hoạt tính kháng nấm của chủng PV1

STT	Chủng nấm kiểm định	Phần trăm ức chế (GI, %)
1	<i>F. solani</i> PAV1	53,9 ± 5,6%
2	<i>R. solani</i> PAV2	22,4 ± 4,5%
3	<i>C. gloeosporioides</i> PAV3	81,9 ± 0,6%



Hình 3.2. Hoạt tính đối kháng nấm gây bệnh của chủng PV1

Tương tự như kết quả sàng lọc trên, chủng PV1 sở hữu phổ kháng tương đối rộng với khả năng ức chế đồng thời cả 3 chủng nấm kiểm định. Đặc biệt, hoạt tính đối kháng với chủng *C. gloeosporioides* PAV3 đạt mức cao nhất với tỷ lệ phần trăm ức chế là $81,9 \pm 0,6\%$. *C. gloeosporioides* là tác nhân chính gây bệnh thán thư, thường tấn công và gây thiệt hại nặng nề trên nhiều loại cây dược liệu có giá trị cao như sâm Ngọc Linh. Chúng có khả năng thích nghi mạnh và thường rất khó kiểm soát, do đó kết quả đạt được cho thấy tiềm năng đánh chú ý của chủng PV1 trong việc kiểm soát bệnh thán thư.

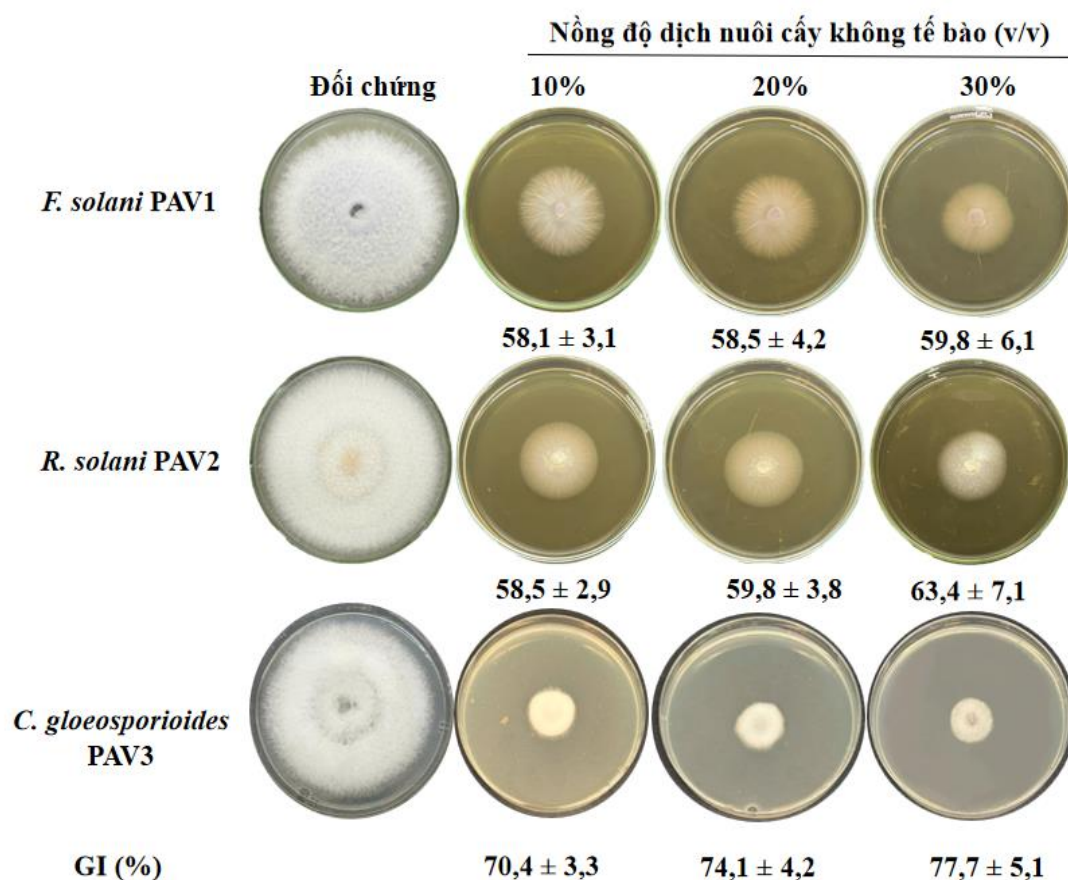
Đối với các tác nhân gây bệnh ở rễ, chủng PV1 thể hiện hoạt tính kháng nấm ở mức trung bình với phần trăm ức chế đạt $53,9 \pm 5,6\%$ đối với chủng *F. solani* PAV1 và $22,4 \pm 4,5\%$ đối với chủng *R. solani* PAV2. Sự chênh lệch đáng kể về mức độ đối kháng giữa các chủng nấm gây bệnh khác nhau cho thấy tác động của PV1 lên các mầm bệnh có tính chọn lọc. Sự khác biệt này xuất phát từ sự đa dạng cấu trúc và thành phần vách tế bào của các loài nấm dẫn đến khả năng chống chịu khác nhau trước các chất chuyển hóa thứ cấp từ xạ khuẩn.

Các kết quả này cũng tương đồng với những công bố gần đây. Cụ thể, phần trăm ức chế *F. solani* PAV1 của PV1 gần như tương đương với chủng *Streptococcus albus* VCCM 2275 ($52,8 \pm 5,3\%$) trong nghiên cứu của Quách Ngọc Tùng và cộng sự năm 2025 [90]. Đồng thời, khả năng ức chế *C. gloeosporioides* PAV3 của PV1 ($81,9 \pm 0,6\%$) cũng hoàn toàn phù hợp với nghiên cứu của Tianyan Yun và cộng sự (2025) khi đánh giá hoạt tính kháng nấm của chủng xạ khuẩn *Streptomyces lydicus*

6G-OA-10. Trong nghiên cứu này, nhóm tác giả cũng ghi nhận 78,3% ức chế nấm *C. gloeosporioides* [91].

3.2.2. Đánh giá hoạt tính kháng nấm của dịch nuôi cấy chủng PV1

Kết quả đối kháng trực tiếp đã chứng minh chủng PV1 có khả năng ức chế mạnh mẽ các chủng vi nấm gây bệnh. Để làm rõ cơ chế đối kháng của chủng PV1 là kết quả của quá trình cạnh tranh về dinh dưỡng, sinh các chất kháng nấm hay enzym, dịch nuôi cấy đã loại bỏ tế bào của chủng PV1 đã được thu nhận và thử nghiệm hoạt tính kháng 3 chủng nấm và kết quả được trình bày ở Hình 3.3.



Hình 3.3. Hoạt tính ức chế nấm của dịch nuôi cấy chủng PV1 ở các nồng độ khác nhau

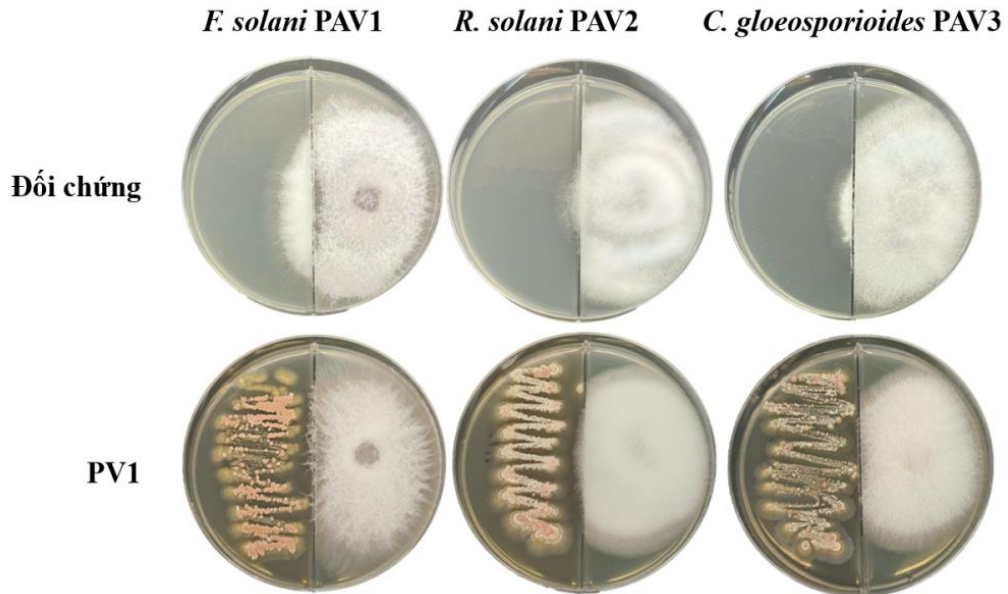
Dịch nuôi cấy loại bỏ tế bào của chủng PV1 có khả năng kìm hãm sự phát triển hệ sợi của các chủng vi nấm thử nghiệm. Hoạt tính đối kháng này phụ thuộc rõ rệt vào nồng độ dịch nuôi cấy sử dụng. Ở tất cả các nồng độ khảo sát, chủng PV1 đều thể hiện hoạt tính kháng mạnh mẽ nhất đối với *C. gloeosporioides* PAV3 với phần trăm ức chế dao động từ 70,4 - 77,7% (Hình 3.3). Đối với hai chủng nấm gây bệnh vùng rễ, mức độ kháng có thấp hơn nhưng vẫn đạt phần trăm tương đối cao. Cụ thể, ở nồng độ 30% phần trăm kháng *F. solani* PAV1 và *R. solani* PAV2 đạt lần lượt $59,8 \pm 6,1\%$ và $63,4 \pm 7,1\%$, tương ứng. Sự khác biệt về mức độ ức chế sự phát triển của

sợi nấm cho thấy phổ tác động của PV1 mang tính chọn lọc, có thể liên quan đến sự khác nhau về cấu trúc thành tế bào, thành phần glucan - chitin và khả năng tác động của các hợp chất thứ cấp trong dịch nuôi cấy. Sự gia tăng hoạt tính đối kháng theo nồng độ dịch nuôi cấy không chỉ khẳng định sự hiện diện của các hợp chất có hoạt tính kháng nấm do PV1 tiết ra mà còn củng cố thêm giả thuyết hoạt tính sinh học thường tỷ lệ thuận với nồng độ chế phẩm, phản ánh hiệu ứng cộng gộp hoặc liều đáp ứng của các metabolite thứ cấp.

Trên thế giới, các nghiên cứu về hệ vi sinh vật vùng rễ cây sâm thuộc chi *Panax* đã ghi nhận nhiều kết quả khả quan trong việc tìm kiếm các chủng đối kháng tiềm năng. So sánh với các nghiên cứu gần đây trên hệ vi sinh vật vùng rễ chi *Panax*, kết quả của chủng PV1 nằm trong khoảng giá trị tương đương hoặc cao hơn ở một số chủng đã công bố. Cụ thể, Qiu YuHao và cộng sự (2026) đã phân lập được 43 chủng xạ khuẩn từ đất vùng rễ cây sâm Mỹ (*Panax quinquefolius* L.), trong đó có 9 chủng thể hiện khả năng kháng đồng thời cả hai tác nhân gây bệnh thối rễ là *F. solani* và *F. oxysporum*. Đáng chú ý, chủng *Streptomyces murinus* XF-3 được ghi nhận có hoạt tính đối kháng mạnh mẽ nhất với *F. solani* và *F. oxysporum* lần lượt là $76,67 \pm 1,99\%$ và $81,67 \pm 0,64\%$ khi bổ sung 10% (v/v) dịch nuôi cấy [92]. Không chỉ tác động đến các nhóm vi nấm gây bệnh thối rễ, dịch nuôi cấy của các chủng *Streptomyces* spp. cũng có tác dụng ức chế mạnh mẽ sự phát triển của các đối tượng vi nấm gây bệnh thán thư trên lá. Trong nghiên cứu của Nguyễn Thị Thủy Tiên và cộng sự (2022), dịch nuôi cấy của chủng xạ khuẩn *Streptomyces murinus* NARZ có khả năng ức chế 50% sự phát triển của nấm *Collectotrichum acutatum* C1 sau 120 giờ nuôi cấy ở nồng độ 30% [93].

3.2.3. Đánh giá khả năng tổng hợp các chất bay hơi ức chế nấm bệnh

Bên cạnh cơ chế tổng hợp hoạt chất thứ cấp, các hợp chất hữu cơ bay hơi (volatile organic compounds - VOCs) cũng đóng vai trò quan trọng trong hoạt tính ức chế nấm bệnh của xạ khuẩn. Để làm rõ vai trò riêng biệt của nhóm hợp chất này, thí nghiệm nuôi cấy đĩa thạch 2 ngăn đã được tiến hành nhằm đánh giá tác động của VOCs trong điều kiện tách biệt vật lý giữa vi khuẩn và vi nấm thử nghiệm. Kết quả được trình bày tại Hình 3.4.

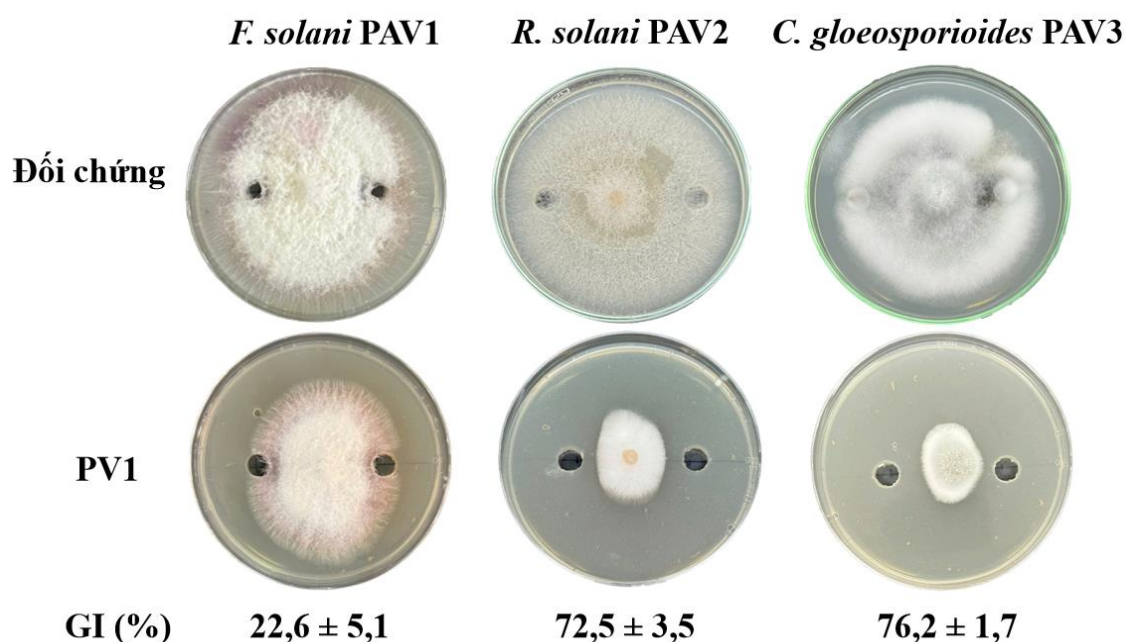


Hình 3.4. Khả năng ức chế nấm bệnh của các hợp chất hữu cơ bay hơi VOC

Kết quả Hình 3.4 cho thấy hệ sợi 3 chủng nấm thử nghiệm không bị ức chế bởi các hợp chất hữu cơ bay hơi VOCs từ chủng PV1. Điều này cho thấy VOCs không đóng vai trò chính trong hoạt tính kháng nấm của chủng PV1 trong điều kiện khảo sát. Kết quả này gợi ý rằng, chủng PV1 nhiều khả năng ức chế nấm bệnh nhờ khả năng sinh các hoạt chất thứ cấp hoặc các enzym ngoại bào như chitinase. Do đó, việc làm rõ các cụm gen liên quan đến sinh tổng hợp các hợp chất thứ cấp và các gen mã hóa enzym thủy phân trong hệ gen của PV1 đóng vai trò quan trọng trong việc giải thích cơ chế di truyền của hoạt tính kháng nấm quan sát được.

3.2.4. Đánh giá hoạt tính kháng nấm của cao chiết thô

Mặc dù dịch nuôi cấy của chủng PV1 thể hiện rõ hoạt tính kháng nấm, tuy nhiên dịch nuôi cấy là hỗn hợp của nhiều thành phần chuyển hóa phức tạp khác nhau. Vì vậy, dịch lên men được tách chiết bằng ethyl acetate và thu nhận cao chiết thô nhằm đánh giá hoạt tính kháng nấm của nhóm hợp chất có hoạt tính sinh học, đặc biệt là các hợp chất có khả năng hòa tan trong dung môi hữu cơ. Hoạt tính kháng nấm của cao chiết thô được xác định bằng phương pháp khuếch tán trên giềng thạch. Kết quả được trình bày ở Hình 3.5.



Hình 3.5. Khả năng kháng nấm của dịch chiết thô chủng PV1 nồng độ 100 $\mu\text{g/mL}$

Kết quả Hình 3.5 cho thấy ở các đĩa đối chứng hệ sợi của các chủng nấm đều phát triển tốt. Khuẩn lạc lan rộng theo hình tròn đồng tâm từ điểm cấy ban đầu và hệ sợi bao phủ toàn bộ bề mặt đĩa cấy. Ngược lại, đối với các đĩa thí nghiệm được xử lý với cao chiết thô PV1, hệ sợi nấm bị kìm hãm phát triển. Thay vì lan rộng, hệ sợi nấm bị ép thành một khối nhỏ, đặc và co cụm ở chính giữa đĩa thạch. Những biến đổi về mặt hình thái hệ sợi nấm quan sát được trên các đĩa thạch hoàn toàn đồng nhất với các kết quả về phần trăm ức chế.

Cụ thể, cao chiết thô chủng PV1 ở nồng độ 100 $\mu\text{g/mL}$ có khả năng kìm hãm mạnh mẽ nhất đối với nấm gây bệnh thán thư *C. gloeosporioides* PAV3 và bệnh lở cổ rễ *R. solani* PAV2 với phần trăm ức chế tương ứng lần lượt là $76,2 \pm 1,7\%$ và $72,5 \pm 3,5\%$ (Hình 3.5). Trong khi đó, hoạt tính đối kháng đối với *F. solani* PAV1 chỉ đạt $22,6 \pm 5,1\%$. Điều này cho thấy sự khác biệt rõ rệt về mức độ nhạy cảm giữa các loài nấm kiểm định.

Sự chênh lệch này có thể liên quan đến sự khác biệt về cấu trúc thành tế bào và thành phần hóa sinh của vách tế bào giữa các loài nấm, đặc biệt là tỷ lệ chitin, glucan và các protein cấu trúc, từ đó ảnh hưởng đến khả năng tiếp cận cũng như phổ tác động của các hợp chất kháng nấm trong cao chiết. Ngoài ra, khả năng đáp ứng thấp của *F. solani* PAV1 cũng có thể liên quan đến cơ chế kháng tự nhiên tốt hơn của loài nấm này đối với một số nhóm hợp chất thứ cấp trong cao chiết.

So sánh với kết quả từ dịch nuôi cấy thô ban đầu, có thể nhận thấy hoạt tính đối kháng đối với *F. solani* PAV1 giảm đáng kể sau quá trình chiết xuất bằng ethyl

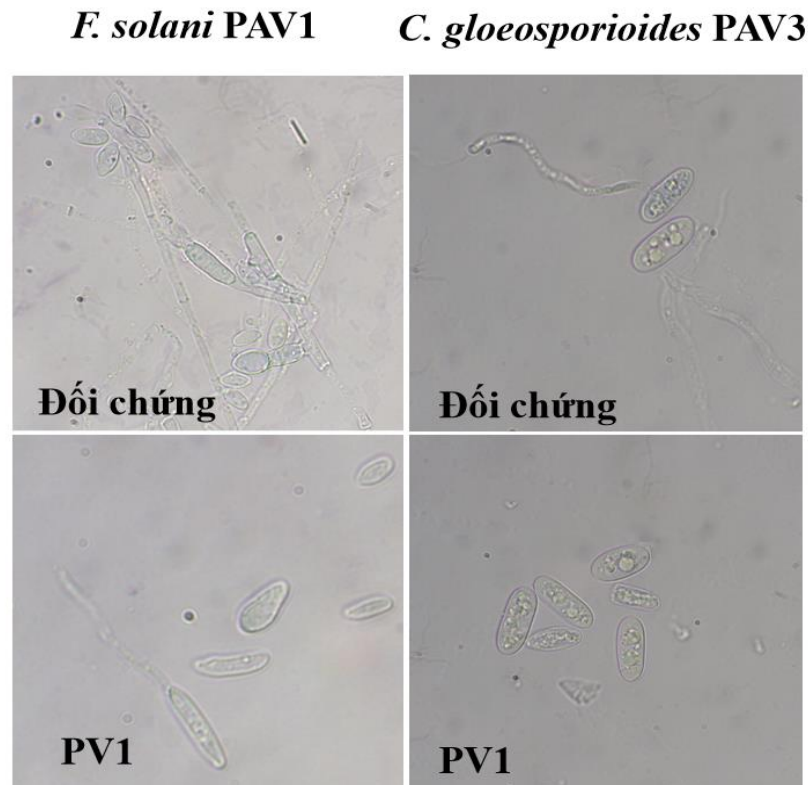
acetate. Sự suy giảm này gợi ý rằng các thành phần tham gia ức chế *F. solani* PAV1 có thể không hoàn toàn nằm trong phân đoạn tan trong ethyl acetate, chúng bị mất hoặc giảm hoạt tính trong quá trình cô quay và thu hồi dung môi. Bên cạnh đó, hoạt tính kháng nấm ban đầu của dịch nuôi cấy có thể không chỉ do các hợp chất chuyển hóa thứ cấp, mà còn liên quan đến các thành phần có bản chất protein hoặc peptide, bao gồm enzyme ngoại bào (như chitinase) và các peptide kháng khuẩn. Các thành phần này thường có tính nhạy cảm cao với điều kiện xử lý như nhiệt độ cao và áp suất giảm trong quá trình cô quay. Do đó có thể bị biến tính hoặc mất hoạt tính sinh học, dẫn đến sự suy giảm rõ rệt hiệu quả ức chế khi so sánh với dịch nuôi cấy ban đầu.

Kết quả này có nhiều điểm tương đồng với công bố của Qiu YuHao và cộng sự (2026) về chủng *Streptomyces murinus* XF-3 phân lập từ cây sâm Mỹ. Trong nghiên cứu này, cao chiết thô từ dung môi ethyl acetate đạt nồng độ 98 mg/mL đã tạo ra các vòng kháng nấm rõ rệt với *F. solani* và *F. oxysporum* lần lượt là $37,28 \pm 1,32$ mm và $36,64 \pm 0,14$ mm, tương ứng. Bằng phương pháp sắc ký cột và quang phổ NMR đã xác định được chất chuyển hóa kháng nấm cốt lõi của XF-3 là actinomycin D với giá trị EC_{50} là 2,08 $\mu\text{g/mL}$ và 11,48 $\mu\text{g/mL}$ đối với hai tác nhân gây bệnh *F. solani* và *F. oxysporum*, tương ứng [92].

Các kết quả thu được cho thấy, hoạt tính kháng nấm của chủng PV1 không đồng nhất giữa các loài nấm kiểm định, phản ánh tính phức tạp trong cơ chế tác động của chủng này. Sự khác biệt rõ rệt giữa *F. solani* PAV1 so với *C. gloeosporioides* PAV3 và *R. solani* PAV2 cho thấy chủng PV1 có thể đồng thời sinh tổng hợp nhiều nhóm hợp chất hoặc yếu tố sinh học với phổ tác động và mức độ ổn định khác nhau.

3.2.5. Đánh giá khả năng ức chế nảy mầm bào tử nấm của cao chiết thô chủng PV1

Trong chu kỳ gây bệnh của nấm, sự nảy mầm của bào tử là giai đoạn khởi nguồn quan trọng nhất cho quá trình xâm nhiễm vào mô thực vật. Trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu chứng minh các hợp chất chiết xuất từ xạ khuẩn có khả năng ức chế sự nảy mầm bào tử nấm bệnh. Trên cơ sở đó, hai chủng nấm gây bệnh là *F. solani* PAV1 và *C. gloeosporioides* PAV3 được sử dụng để đánh giá tác động của 20 $\mu\text{g/mL}$ cao chiết thô đến khả năng nảy mầm của bào tử. Kết quả được trình bày ở Hình 3.6.



Hình 3.6. Tác động của 20 µg/mL cao chiết thô tới sự nảy mầm bào tử chủng *F. solani* PAV1 và *C. gloeosporioides* PAV3 được quan sát dưới kính hiển vi quang học độ phóng đại 100X

Ở các mẫu đối chứng, cả hai chủng nấm PAV1 và PAV3 nảy mầm cũng như có sự phát triển tốt trên môi trường PDB. Hầu hết các sợi nấm phát triển kéo dài, tạo thành mạng lưới hệ sợi dày đặc, đan xen lẫn nhau. Ngược lại, sự hiện diện của cao chiết PV1 với nồng độ 20 µg/mL đã gây ra những tác động ức chế rõ rệt lên chu kỳ sinh trưởng của bào tử nấm (Hình 3.6). Cụ thể, đối với *F. solani* PAV1 tỷ lệ nảy mầm của bào tử suy giảm nghiêm trọng. Một số ít bào tử nảy mầm nhưng sợi nấm chỉ phát triển được một đoạn ngắn, điều này chứng tỏ các hoạt chất trong cao chiết của chủng PV1 đã ức chế quá trình kéo dài sợi nấm. Tác động ức chế cũng thể hiện rõ rệt đối với bào tử của *C. gloeosporioides* PAV3, quá trình nảy mầm của bào tử dường như bị ức chế hoàn toàn. Phần lớn các bào tử đều ở trạng thái ngủ và không nảy mầm, chứng tỏ PV1 đã tiết ra các hợp chất ức chế quá trình nảy mầm của bào tử.

Đã có nhiều công bố trên thế giới ghi nhận khả năng kháng nấm mạnh mẽ của cao chiết các loài xạ khuẩn. Điển hình, nghiên cứu của Dengfeng và cộng sự (2021) đã ghi nhận ảnh hưởng cao chiết từ chủng *Streptomyces huiliensis* SCA2-4T đến sự nảy mầm của bào tử nấm *F. oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4. Trong điều kiện đối chứng, tỷ lệ nảy mầm đạt $94,33 \pm 2,08\%$, tuy nhiên tỷ lệ này giảm xuống còn 8,09% khi xử lý với cao chiết SCA2 - 4T. Bên cạnh đó, nghiên cứu cũng chỉ ra

rằng cao chiết từ xạ khuẩn cũng làm thay đổi cấu trúc tế bào nấm với các đặc trưng như thành tế bào và màng tế bào trở nên không đều và dày lên; nhiều bào quan như nhân và không bào bị phá vỡ; cấu trúc ty thể bị tổn thương nghiêm trọng [94]. Ngoài ra, Evangelista-Martínez và cộng sự (2020) cũng đã minh chứng chủng *Streptomyces* CACIS-1.5CA có khả năng ức chế mạnh sự nảy mầm của nhiều bào tử nấm như *Colletotrichum* sp., *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Botrytis* sp., với hiệu suất ức chế lên tới 92 - 100% sau 22 giờ nuôi cấy [95].

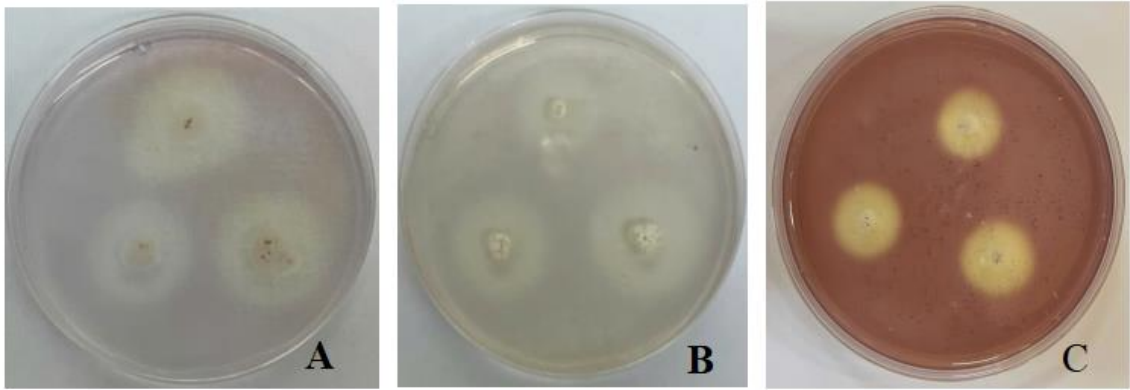
3.2.6. Khả năng sinh tổng hợp enzym ngoại bào của chủng PV1

Khả năng tiết enzym ngoại bào là một trong những đặc điểm quan trọng giúp xạ khuẩn thích nghi và cạnh tranh với nấm bệnh trong môi trường đất, đặc biệt là vùng rễ cây trồng. Kết quả đánh giá hoạt tính enzym ngoại bào được trình bày ở Bảng 3.3 và Hình 3.7

Bảng 3.3. Khả năng sinh enzym của chủng PV1

Enzym ngoại bào	Đường kính vòng phân giải (D-d, mm)
Amylase	17,67 ± 1,53
Cellulase	21,33 ± 3,06
Chitinase	36,67 ± 2,08

Kết quả Bảng 3.3 cho thấy chủng PV1 có khả năng sinh chitinase, cellulase và amylase, thể hiện bằng các vòng phân giải xung quanh khuẩn lạc. Trong số các enzym được khảo sát, chitinase thể hiện hoạt tính mạnh nhất với đường kính vòng phân giải là 36,67 ± 2,08 mm, cao gấp 1,7 lần so với hoạt tính cellulase (21,33 ± 3,06) và gấp hơn 2 lần so với hoạt tính của amylase (17,67 ± 1,53). Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu đã công bố về các chủng xạ khuẩn vùng rễ có khả năng tiết đa dạng enzym ngoại bào như chitinase, cellulase và protease. Các enzyme này không chỉ đóng vai trò quan trọng trong quá trình phân giải chất hữu cơ trong đất, mà còn góp phần ức chế sự phát triển của các vi sinh vật gây bệnh thực vật. Đặc biệt, hoạt tính enzym chitinase cao của PV1 còn cho thấy tiềm năng ứng dụng trong kiểm soát sinh học nấm bệnh gây hại, thông qua việc phá vỡ cấu trúc chitin của vách tế bào nấm.



Hình 3.7. Hoạt tính phân giải cơ chất trên đĩa thạch của chủng PV1

A: Chitin; B: CMC; C: Tinh bột

Chitin là thành phần chính cấu tạo nên vách tế bào của hầu hết các loài nấm gây bệnh. Vì vậy, các vi sinh vật có khả năng sinh chitinase thường được xem là tác nhân đối kháng sinh học tiềm năng, cho phép chúng phân hủy thành tế bào của các chủng nấm gây bệnh và phá vỡ cấu trúc sợi nấm.

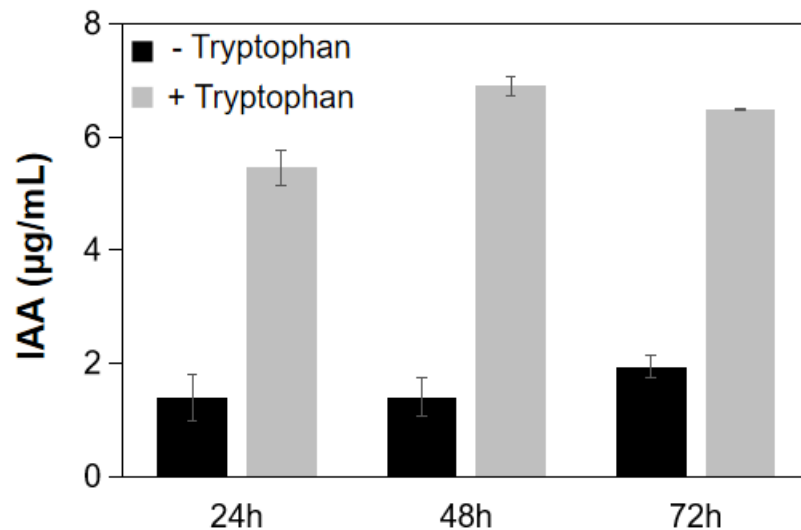
Trên thế giới, nhiều nghiên cứu đã công bố về các chủng xạ khuẩn vùng rễ có khả năng sinh enzyme chitinase và thể hiện hoạt tính kháng nấm mạnh. Theo nghiên cứu của Meriem Gasmi và cộng sự (2019), khi phân lập các chủng xạ khuẩn sinh chitinase từ đất cát bán khô hạn tại Algeria đã ghi nhận rằng 100% các chủng phân lập có khả năng phân giải chitin dạng keo ở điều kiện pH trung tính và nhiệt độ dao động từ 30 - 40 °C. Các chủng này chủ yếu thuộc các chi *Streptomyces* và *Micromonospora*, trong đó một số chủng thể hiện hoạt tính chitinase mạnh ngay cả ở nhiệt độ cao. Hoạt tính kháng nấm được chứng minh có liên quan chặt chẽ đến sự hiện diện của các gen chitinase thuộc họ glycosyl hydrolase 18 (GH18) [96]. Tương tự, một nghiên cứu gần đây cũng đã ghi nhận các chủng thuộc loài *Streptomyces albus* có khả năng sinh chitinase mạnh và thể hiện hoạt tính ức chế đáng kể đối với các loài nấm gây bệnh thực vật như *Fusarium graminearum*, *Rhizoctonia solani* [97]. Những kết quả này càng củng cố vai trò của chitinase như một yếu tố then chốt trong cơ chế đối kháng nấm của xạ khuẩn.

Bên cạnh chitinase, các enzyme ngoại bào khác như cellulase và amylase cũng đóng vai trò quan trọng trong hệ sinh thái đất. Chúng phân giải cellulose và thành nguồn carbon cung cấp cho sinh trưởng đồng thời giúp vi khuẩn tận dụng nguồn tinh bột từ rễ và xác bã thực vật góp phần nâng cao khả năng sinh trưởng. Theo báo cáo của Chu Thanh Bình (2024), chủng xạ khuẩn *S. thermocarboxydus* MIP_GN36 phân lập từ đất vùng rễ cây gừng có khả năng sinh tổng hợp cellulase ngoại bào mạnh mẽ. Trong điều kiện nuôi cấy tối ưu có bổ sung 1,5% CMC, hoạt tính enzyme của chủng đạt 22,5 U/mL sau 120 giờ nuôi cấy [98].

3.3. Nghiên cứu tiềm năng kích thích sinh trưởng thực vật của chủng PV1

3.3.1. Đánh giá khả năng sinh indole - 3 - acetic axit

IAA là một phytohormone quan trọng thuộc nhóm auxin, đóng vai trò chủ chốt trong việc kích thích sự phân chia tế bào và phát triển hệ rễ của thực vật. Khả năng sinh tổng hợp IAA của chủng PV1 được đánh giá định lượng qua các mốc thời gian 24, 48 và 72 giờ, trong điều kiện có và không có bổ sung tiền chất L-tryptophan. Kết quả cho thấy chủng PV1 có khả năng sinh tổng hợp IAA ngay cả khi không bổ sung tiền chất, với hàm lượng dao động từ 1,4 - 1,9 $\mu\text{g/mL}$ (Hình 3.8). Tuy nhiên, khi môi trường được bổ sung L-tryptophan lượng IAA gia tăng một cách mạnh mẽ. Cụ thể, hàm lượng IAA đạt $5,45 \pm 0,32 \mu\text{g/mL}$ ở 24 giờ và đạt đỉnh cực đại ở mốc 48 giờ với giá trị $6,9 \pm 0,17 \mu\text{g/mL}$. Sau 72 giờ, hàm lượng IAA có xu hướng giảm nhẹ xuống còn $6,48 \pm 0,02 \mu\text{g/mL}$, có thể do sự cạn kiệt dinh dưỡng hoặc tiền chất trong quá trình lên men. Kết quả này khẳng định quá trình tổng hợp IAA của chủng PV1 phụ thuộc lớn vào con đường IpyA. Bên cạnh đó, con đường IAM và TAM cũng có thể diễn ra nhưng chỉ có một số loài xạ khuẩn được ghi nhận là có các gen mã hoá 2 con đường này.



Hình 3.8. Khả năng sinh tổng hợp IAA của chủng PV1

Ghi chú: - Tryptophan: Không bổ sung Tryptophan

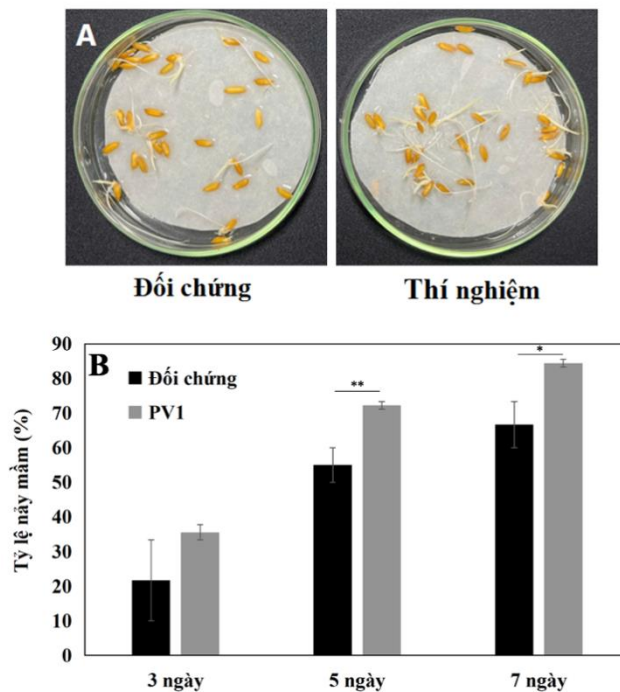
+ Tryptophan: Có bổ sung Tryptophan

Theo nhiều nghiên cứu, các chủng *Streptomyces* sống trong đất vùng rễ có khả năng sản sinh IAA và thúc đẩy sự phát triển của cây trồng. Trong môi trường tự nhiên, vùng rễ liên tục bài tiết ra các chất hữu cơ, trong đó có tryptophan. Tryptophan đóng vai trò là tiền chất tham gia vào quá trình sinh tổng hợp IAA ở vi sinh vật. Khả năng sinh tổng hợp IAA của chủng PV1 tương đồng với nhiều nghiên cứu trước đây về các dòng xạ khuẩn vùng rễ. Cụ thể, nghiên cứu của Khamna và cs. (2009) các

chủng *Streptomyces* phân lập từ cây dược liệu ở Thái Lan có khả năng sinh tổng hợp IAA với hàm lượng dao động từ 5,5 đến 144 $\mu\text{g/mL}$. Đáng chú ý, chủng *Streptomyces* CMU-H009 phân lập từ đất vùng rễ cây sả cho khả năng sinh tổng hợp IAA lên tới 144 $\mu\text{g/mL}$ [99]. Mặc dù, khả năng sinh tổng hợp IAA của chủng PV1 thấp hơn so với một số chủng đã công bố, nhưng sự gia tăng hàm lượng rõ rệt khi bổ sung tryptophan mở ra tiềm năng lớn trong việc tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy hoặc phối hợp với các tiền chất khác để nâng cao hiệu quả sinh tổng hợp IAA.

3.3.2. Đánh giá khả năng kích thích nảy mầm của hạt giống

Bên cạnh khả năng sinh tổng hợp IAA, tiềm năng kích thích sinh trưởng thực vật của chủng PV1 còn được đánh giá thông qua tỷ lệ nảy mầm của hạt giống cây lúa và ngưu tất. Kết quả được ghi nhận ở Hình 3.9 và Hình 3.10.

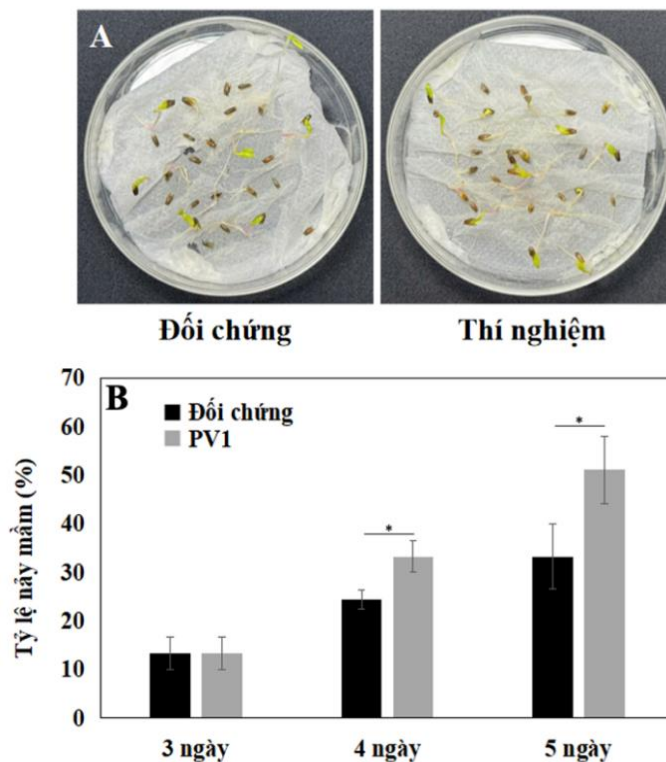


Hình 3.9. Hình minh họa (A) và khả năng kích thích nảy mầm của chủng PV1 trên hạt lúa (B)

Kết quả Hình 3.9 cho thấy chủng xạ khuẩn PV1 có ảnh hưởng tích cực đến sự nảy mầm của hạt lúa. Ngay từ ngày thứ 3 sau khi gieo hạt, lô thí nghiệm khi được xử lý với chủng PV1 đã ghi nhận tỷ lệ nảy mầm đạt $35,6 \pm 2,2\%$, cao gấp khoảng 1,6 lần so với lô đối chứng ($21,7 \pm 11,7\%$). Điều này chứng tỏ chủng PV1 giúp hạt phá vỡ trạng thái ngủ đông nhanh hơn. Xu hướng này tiếp tục được duy trì với các mốc thời gian tiếp theo. Cụ thể, vào ngày thứ 5 tỷ lệ nảy mầm tăng nhanh chóng, đạt $72,2 \pm 1,1\%$, trong khi lô đối chứng chỉ đạt $55,0 \pm 5,0\%$. Đến ngày thứ 7, tỷ lệ nảy mầm của hạt ở lô thí nghiệm đạt tới $84,4 \pm 1,1\%$ nhưng lô đối chứng chỉ dừng lại ở mức $66,7 \pm 6,7\%$ (Hình 3.9). Bên cạnh việc gia tăng tỷ lệ nảy mầm, chất lượng mầm ở lô xử lý

với PV1 cũng được cải thiện. Quan sát thực nghiệm cho thấy rễ mầm và chồi mầm phát triển tốt hơn với xu hướng dài và đồng đều hơn so với lô đối chứng.

Để đánh giá phổ tác động kích thích sinh trưởng của chủng PV1, thử nghiệm tiếp tục được đánh giá trên đối tượng cây dược liệu là ngưu tất. Kết quả Hình 3.10 cho thấy chủng PV1 cũng thể hiện khả năng kích thích nảy mầm trên đối tượng này. Ở mốc thời gian sau 3 ngày, tỷ lệ nảy mầm đều tương đương nhau khoảng 13,3% ở cả 2 lô đối chứng và thí nghiệm. Nguyên nhân do cấu trúc lớp vỏ của chúng khá dày, do đó cần thời gian ngậm nước dài hơn để bắt đầu quá trình trao đổi chất bên trong phôi. Tuy nhiên, bắt đầu từ ngày thứ 4, khi lô xử lý với PV1 đạt tỷ lệ nảy mầm $33,3 \pm 3,3\%$ thì lô đối chứng chỉ đạt $24,4 \pm 1,9\%$. Vào ngày thứ 5, dưới tác động của các chất chuyển hóa từ PV1 đã giúp tỷ lệ nảy mầm ở lô thí nghiệm đạt $51,1 \pm 6,9\%$, cao gấp 1,5 lần so với lô đối chứng ($33,3 \pm 6,6\%$). Ngoài ra, chất lượng mầm của hạt ngưu tất cũng được cải thiện đáng kể so với lô đối chứng. Quan sát trên các đĩa thực nghiệm cho thấy ở lô có bổ sung PV1 rễ mầm bung ra khỏi vỏ to, khỏe và chiều dài vượt trội so với các đĩa đối chứng.



Hình 3.10. Hình ảnh minh họa (A) và kết quả kích thích nảy mầm của chủng PV1 trên hạt ngưu tất (B)

Các kết quả này cho thấy chủng PV1 có khả năng thúc đẩy quá trình nảy mầm và sinh trưởng ban đầu của cây trồng, đặc biệt trong giai đoạn cây con. Cơ chế tác động có thể liên quan đến quá trình sản sinh ra các chất điều hòa sinh trưởng như IAA

và các enzym ngoại bào. Sự kết hợp giữa sản sinh IAA và hoạt tính enzym ngoại bào tạo nên một cơ chế tác động kép: vừa kích thích trực tiếp sinh trưởng thực vật thông qua điều hòa hormone, vừa cải thiện môi trường dinh dưỡng xung quanh rễ thông qua phân giải các hợp chất hữu cơ phức tạp. Điều này đặc biệt quan trọng trong điều kiện đất nghèo dinh dưỡng hoặc chịu stress sinh học và phi sinh học, khi cây trồng cần sự hỗ trợ từ hệ vi sinh vật vùng rễ để duy trì tăng trưởng ổn định.

Kết quả nghiên cứu này phù hợp với nhiều công bố trước đây về vai trò của xạ khuẩn trong kích thích sinh trưởng thực vật thông qua cơ chế sinh IAA. Cụ thể, trong nghiên cứu của Krisana Lasudee và cộng sự (2018) đã chứng minh chủng *S. thermocarboxydus* S3 có khả năng kích thích sinh trưởng trên cây *Vigna radiata* và *Oryza sativa* thông qua việc sản sinh IAA. Việc tăng sinh trưởng được thể hiện qua sự gia tăng chiều dài rễ, sinh khối tươi và khả năng thích nghi với các điều kiện bất lợi của môi trường như thiếu dinh dưỡng hoặc hạn hán [100]. Một nghiên cứu khác của Khamna và cộng sự (2009) cũng đã ghi chủng *Streptomyces* sp. CMU-H009 phân lập từ vùng rễ cây nhận khả năng tổng hợp IAA của cây được liệu có khả năng sinh ra 300 mg/L IAA trong điều kiện bổ sung 2 mg/mL L-tryptophan. Dịch tiết của chủng này trực tiếp làm tăng tỷ lệ nảy mầm và chiều dài rễ của các đối tượng thử nghiệm như ngô và đậu đũa [101].

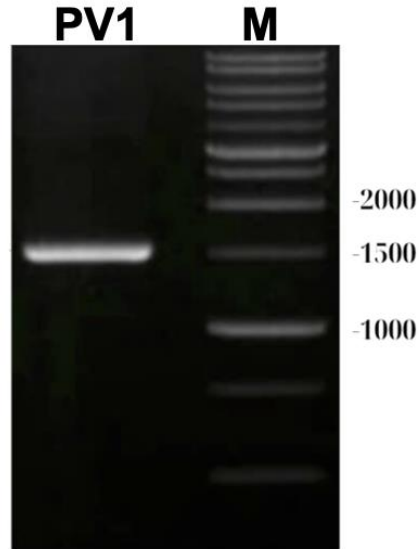
3.4. Định danh chủng xạ khuẩn PV1

3.4.1. Phân loại dựa trên đặc điểm hình thái

Sử dụng phương pháp phân loại truyền thống của chủng xạ khuẩn PV1 dựa trên đặc điểm hình thái của chủng. Chủng PV1 được nuôi cấy phát triển trên môi trường thạch sơ bản ISP2 trong 96 giờ ở 30 °C để quan sát đặc điểm hình thái và màu sắc khuẩn lạc. Sau 4 ngày nuôi cấy, khuẩn lạc của chủng PV1 có màu vàng nhạt khi chưa hình thành bào tử, bề mặt lồi, khô và khuẩn lạc màu trắng hồng khi hình thành bào tử (Hình 3.12A). Mặc dù hình thái học vẫn là một đặc điểm quan trọng cần xem xét khi định danh chủng nhưng nó không đủ để phân biệt giữa nhiều loài.

3.4.2. Phân loại bằng phân tích trình tự gen 16S rRNA

Để phân loại chủng PV1, nghiên cứu giải trình tự và phân tích trình tự 16S rRNA đã được thực hiện. DNA tổng số của PV1 được tách chiết bằng Kit và cho một băng DNA rõ nét trên gel agarose 1%. Mẫu DNA này được sử dụng làm vật liệu di truyền nhằm khuếch đại gen 16S rRNA và sản phẩm PCR khuếch đại gen 16S rRNA cho băng rõ nét với kích thước khoảng 1500 bp tương ứng với kích thước mong đợi. Sản phẩm PCR thu được trong thí nghiệm là đặc hiệu và đáp ứng tiêu chuẩn để tinh sạch DNA. Sản phẩm PCR tinh sạch được gửi tới First BASE Laboratories Sdn. Bhd. (Malaysia) để giải trình tự.

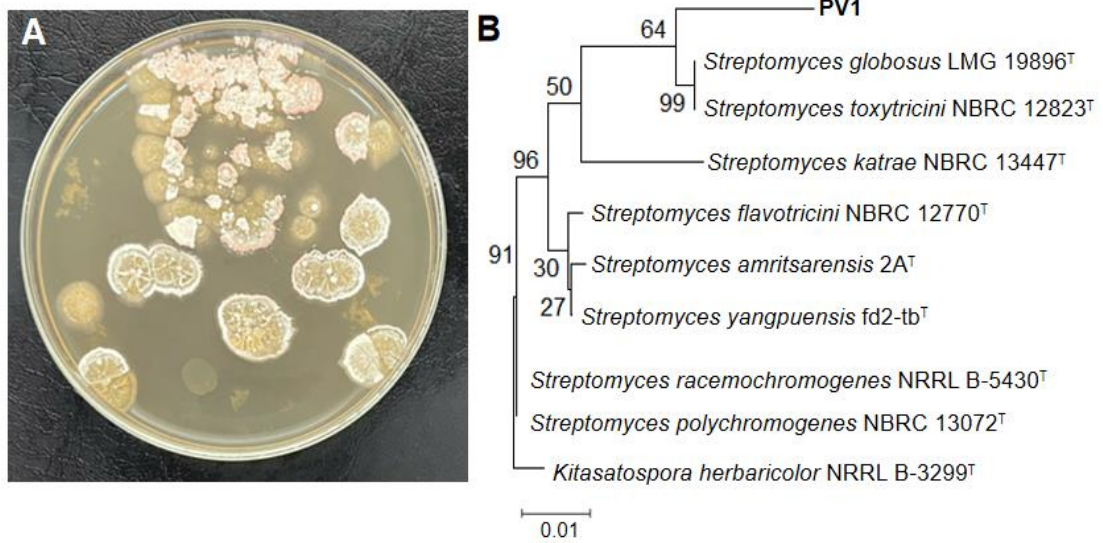


Hình 3.11. Điện di đồ sản phẩm PCR khuếch đại gen 16S rRNA của chủng PV1 trên gel agarose 1%. M: thang DNA chuẩn 1 kb

Trình tự gen 16S rRNA của chủng xạ khuẩn PV1 có kích thước 1536 bp và được so sánh với các trình tự tham chiếu trên cơ sở dữ liệu GenBank bằng công cụ BLASTN. Đoạn gen này có mức tương đồng với các trình tự trên NCBI > 99% và có độ dài đoạn so sánh đạt 97% so với các chủng thuộc chi *Streptomyces* được đối chiếu trên Ngân hàng dữ liệu gen NCBI như *Streptomyces globosus* LMG 19896^T (99,6%), *Streptomyces toxytricini* NBRC 12823^T (99,53%) và *Streptomyces toxytricini* NRRL B-5426^T (99,53%).

Phân tích cây phát sinh chủng loại cũng cho thấy chủng PV1 nằm trong cùng một nhánh với các loài trên với giá trị bootstrap 64%, chứng tỏ mối quan hệ di truyền gần gũi và đáng tin cậy. Ngoài ra, PV1 cũng có quan hệ phát sinh với các loài khác như *Streptomyces katrae* và *Streptomyces flavotricini*, tuy nhiên khoảng cách di truyền xa hơn. Nhóm các loài *Streptomyces* tạo thành một nhánh riêng biệt và tách biệt rõ ràng với chi *Kitasatospora*, khẳng định vị trí phân loại của chủng nghiên cứu.

Kết hợp kết quả phân loại hình thái và phương pháp phân tích trình tự 16S rRNA, chủng PV1 nhiều khả năng thuộc loài *Streptomyces globosus*. Trình tự gen 16S rRNA được đăng ký trên GenBank với mã số PZ146952. Để khẳng định chính xác kết quả phân loại trên, công nghệ giải trình tự hệ gen cần được tiến hành.



Hình 3.12. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc (A) và cây phát sinh loài thể hiện mối quan hệ di truyền giữa chủng PV1 và các chủng xạ khuẩn tham chiếu dựa trên trình tự gen 16S rRNA (B)

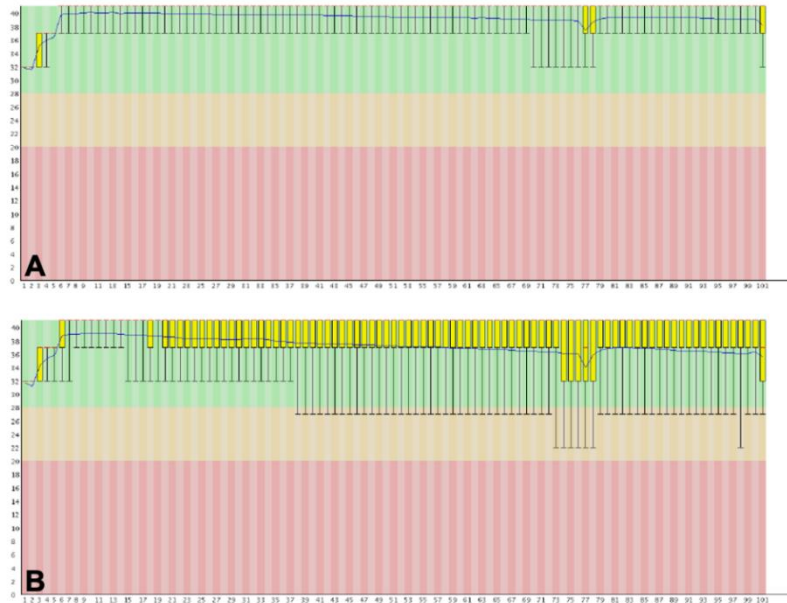
3.5. Giải trình tự và phân tích đặc điểm di truyền hệ gen liên quan đến các hợp chất kháng nấm của chủng PV1

3.5.1. Giải trình tự, lắp ráp và chú giải hệ gen chủng PV1

Để đảm bảo hiệu quả của quá trình giải trình tự hệ gen, mẫu DNA tổng số từ chủng PV1 được tách chiết bằng bộ kit chuyên dụng. Sau khi tách chiết, chất lượng DNA được đánh giá nghiêm ngặt qua hai bước kiểm tra. Đầu tiên, kết quả điện di trên gel agarose 0,8% cho thấy DNA có độ nguyên vẹn cao, băng đậm, sắc nét, không bị đứt gãy và hoàn toàn sạch RNA. Nồng độ DNA được xác định bằng máy Qubit fluorometer theo hướng dẫn của nhà sản xuất, đạt 33 ng/ μ L. Độ tinh sạch của DNA được đánh giá bổ sung bằng máy NanoDrop thông qua tỷ lệ hấp thụ A_{260}/A_{280} , đạt giá trị 2,0. Các thông số về nồng độ và chất lượng cho thấy mẫu DNA thu được hoàn toàn đáp ứng tiêu đề để tiến hành giải trình tự. Thư viện DNA chuẩn bị cho hệ thống Onso (PacBio) sau bước QC đạt nồng độ 23 ng/ μ L.

Dữ liệu thô thu nhận từ hệ thống Onso PacBio được phân tích và chứa 3.447.515 đoạn đọc, 517.127.2250 bp với chiều dài các đoạn đọc dao động từ 35 – 151 bp và tỷ lệ GC đạt 71,5%. Sử dụng phần mềm tinh sạch để loại bỏ các đoạn đọc lỗi, các trình tự trùng lặp và các trình tự gán đã tạo ra tệp dữ liệu có 3.255.939 đoạn đọc với 485.237.570 bp, tỷ lệ GC đạt 71,7%. Biểu đồ chất lượng base tạo bởi phần mềm FastQC được sử dụng để kiểm tra chất lượng tổng thể của dữ liệu được tạo ra. Biểu đồ này cho thấy phạm vi giá trị chất lượng ở mỗi chu kỳ. Các trục X và Y lần lượt là số chu kỳ và điểm chất lượng phred. Điểm chất lượng phred 20 có nghĩa là độ

chính xác 99% và các đoạn đọc có điểm chất lượng trên 20 thường được coi là chất lượng tốt (Hình 3.13). Kết quả cho thấy chất lượng base của mẫu PV1 khá tốt và đủ để tiến hành bước lắp ghép *de novo*.



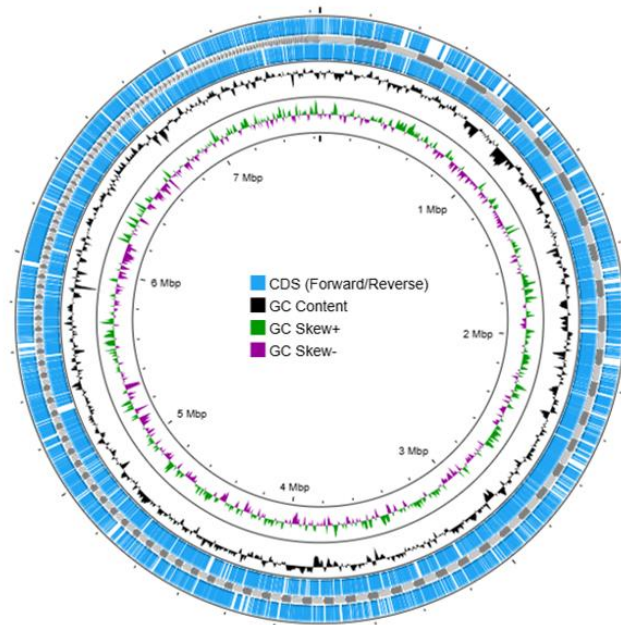
Hình 3.13. Biểu đồ chất lượng cơ sở được tạo bởi FastQC thông qua dữ liệu thô của đoạn đọc 1 (A) và 2 (B)

Lắp ráp *de novo* là một phương pháp xây dựng trình tự hệ gen sinh vật từ các trình tự thô đã được giải mà không cần dựa vào trình tự hệ gen tham chiếu. Do vậy, phần mềm Unicycler v0.4.8 đã được sử dụng với các thông số tối ưu để lắp ráp *de novo*. Hệ gen chủng PV1 được lắp ráp *de novo* bằng Unicycler với kết quả gồm 307 contig và hệ gen thẳng. Kết quả đánh giá BUSCO cho thấy mức độ hoàn chỉnh của hệ gen khá cao. Cụ thể, trong tổng số 148 nhóm BUSCO được khảo sát, có 146 BUSCO hoàn chỉnh và tồn tại dưới dạng bản sao đơn chiếm 98,1%. Điều này cho thấy phần lớn các gen bảo thủ đã được lắp ráp đầy đủ trong hệ gen. Đáng chú ý, không phát hiện BUSCO trùng lặp (0%) cho thấy quá trình lắp ráp hệ gen ít xảy ra hiện tượng lặp đoạn. Nhìn chung, với tỷ lệ BUSCO hoàn chỉnh đạt gần 98,1%, chất lượng bộ gen lắp ráp là tốt và có độ hoàn chỉnh cao, đủ tin cậy để sử dụng cho các phân tích tiếp theo. Hệ gen PV1 được đăng kí trên DDBJ/ENA/GenBank với mã số JBVQCE000000000 (Phụ lục 2).

Kết quả chú giải hệ gen bằng PGAP (NCBI) cho thấy hệ gen PV1 có kích thước 7,64 Mb bao gồm 307 contig và có hàm lượng GC đạt 73,5% (Bảng 3.4). Hệ gen chứa 6904 gen mã hoá cho 6691 trình tự CDS, 722 tRNA, 3 rRNA, 3 ncRNA và không chứa plasmid. Bản đồ hệ gen chủng PV1 được thể hiện ở Hình 3.14.

Bảng 3.4. Các đặc điểm hệ gen của chủng PV1

Đặc điểm hệ gen	Thông số
Kích thước hệ gen (Mb)	7,64
Hàm lượng GC (%)	73,5
Tổng số gen	6904
Tổng số trình tự mã hóa protein (CDS)	6691
Số gen rRNA	3
Số gen tRNA	72
Số gen ncRNA	3

**Hình 3.14. Bản đồ hệ gen dự thảo của chủng PV1**

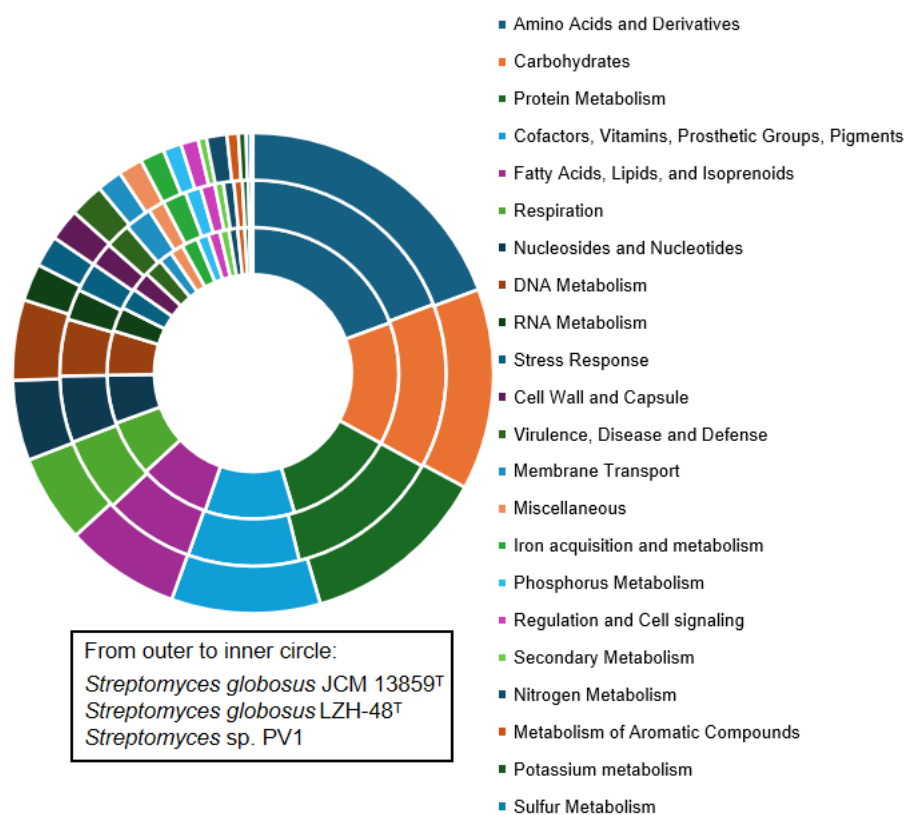
Ghi chú: Từ ngoài vào trong: Vòng 1 thể hiện kích thước hệ gen; Vòng 2 và 3 thể hiện các vùng mã hóa protein (CDS) trên mạch thuận và mạch nghịch; Vòng 4 thể hiện hàm lượng GC; Vòng 5 thể hiện chỉ số GC skew

Kết quả phân tích các nhóm chức năng hệ gen bằng công cụ RAST cho thấy các gen của PV1 được phân bố vào nhiều nhóm chức năng khác nhau, phản ánh khả năng trao đổi chất đa dạng của chủng (Hình 3.15). Hệ gen PV1 sở hữu số lượng lớn các trình tự mã hóa protein (CDS) tập trung vào các nhóm: Amin Acids and Derivatives (344 CDSs), carbohydrates (241 CDSs), Protein Metabolism (220 CDSs). Khi đối chiếu với hai chủng chuẩn là *S. globosus* JCM 13859^T và *S. globosus* LZH-48^T, mặc dù số lượng CDS trong các nhóm này của PV1 có thấp hơn đôi chút

nhưng cấu trúc phân bố các nhóm chức năng chính vẫn thể hiện sự thống nhất đặc trưng của loài *S. globosus*.

Bên cạnh các nhóm chức năng chính, hệ gen của chủng PV1 còn ghi nhận tỷ lệ đáng kể các gen liên quan đến chuyển hóa lipid, tổng hợp cofactor và vitamin, cùng các quá trình hô hấp và vận chuyển qua màng. Sự hiện diện của các nhóm gen này cho thấy chủng có khả năng duy trì các hoạt động chuyển hóa phức tạp, đồng thời tăng cường khả năng thích nghi với các điều kiện môi trường khác nhau thông qua việc điều hòa trao đổi chất và sử dụng linh hoạt các nguồn năng lượng.

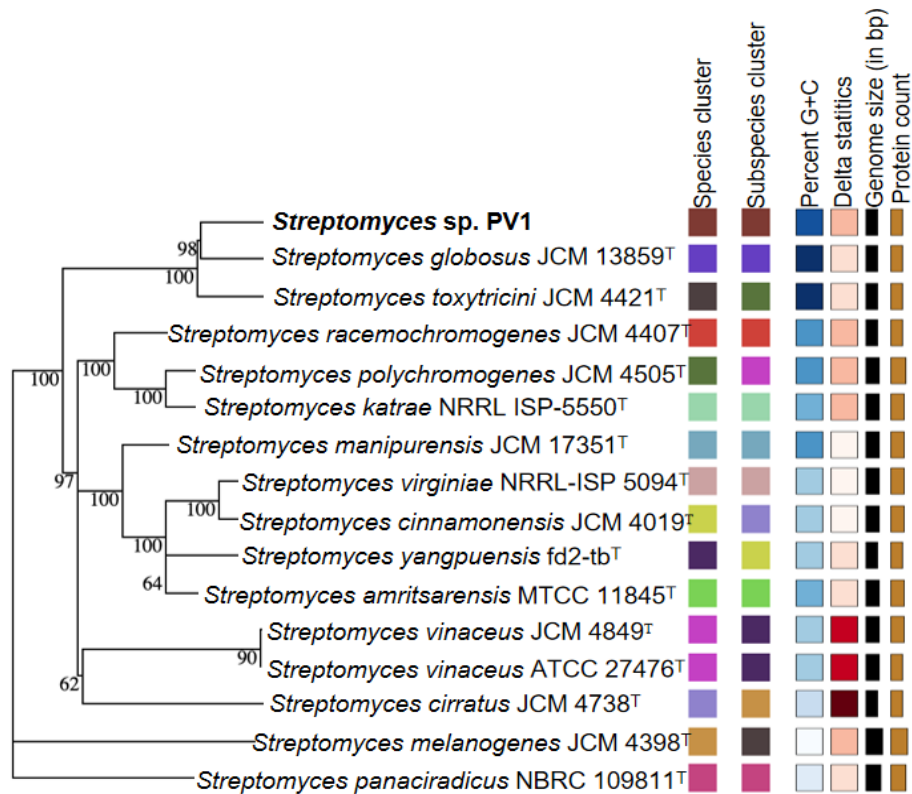
Đáng chú ý, kết quả phân tích từ hệ thống Subsystem cũng xác định được các cụm gen liên quan đến đáp ứng stress (như chống chịu sốc nhiệt, stress oxy hóa), chuyển hóa thứ cấp và cơ chế bảo vệ (hệ thống kháng sinh, bơm đẩy ngược). Các đặc điểm này cho thấy khả năng thích nghi tốt của chủng PV1 trong môi trường đất vùng rẫy - nơi thường xuyên xuất hiện các biến động về dinh dưỡng, oxy hóa, pH và áp lực cạnh tranh vi sinh vật. Đồng thời, sự hiện diện của các nhóm gen liên quan đến chuyển hóa thứ cấp và cơ chế bảo vệ cũng củng cố giả thuyết rằng chủng PV1 sở hữu tiềm năng sinh tổng hợp các hợp chất có hoạt tính sinh học, góp phần vào khả năng cạnh tranh sinh thái và hoạt tính đối kháng đã được quan sát trong các thí nghiệm trước đó.



Hình 3.15. Phân loại các nhóm gen chức năng của PV1 và các chủng tham chiếu bằng cơ sở dữ liệu RAST

3.5.2. Định danh chủng PV1 dựa trên dữ liệu toàn bộ hệ gen

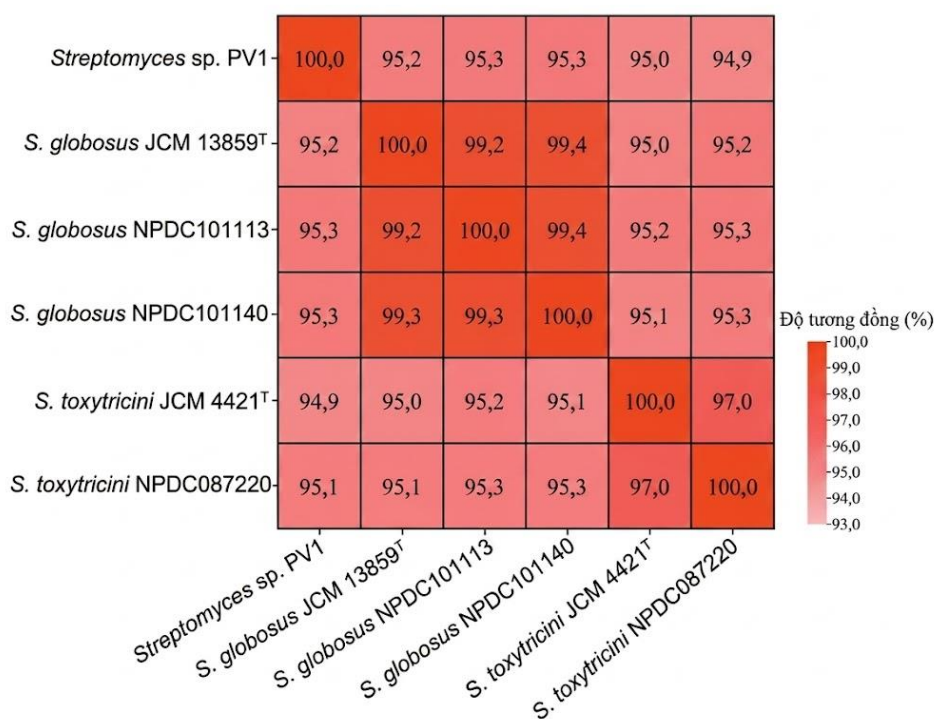
TYGS là một công cụ tin sinh học được sử dụng để phân loại vi khuẩn hiện đại vì cho phép so sánh hệ gen của chủng nghiên cứu với các chủng chuẩn đã được công bố. Khoảng cách hệ gen và giá trị dDDH từ TYGS là tiêu chí quan trọng để xác định loài vi khuẩn. Thông thường, giá trị dDDH $\geq 70\%$ cho thấy hai chủng thuộc cùng một loài. Trong phân tích này, hệ gen của chủng PV1 và các hệ gen thuộc chi *Streptomyces* có giá trị dDDH dao động từ 18,5 - 69,2%, trong đó giá trị cao nhất được ghi nhận với *S. globosus* JCM 13859^T (69,2%). Cây phát sinh loài dựa trên toàn bộ hệ gen được xây dựng trên hệ thống TYGS (Hình 3.16). Kết quả cho thấy chủng PV1 nằm cùng một nhánh tiến hóa với chủng chuẩn *S. globosus* JCM 13859^T với giá trị bootstrap ở mức tin cậy rất cao (98%). Bên cạnh đó, các giá trị đi kèm như cụm loài, hàm lượng GC và kích thước hệ gen của PV1 hoàn toàn tương đồng với các đại diện tiêu biểu của loài *S. globosus* và tách biệt rõ ràng với các loài lân cận như *S. toxytricini* hay *S. racemochromogenes*.



Hình 3.16. Cây phát sinh chủng loại dựa trên bộ gen của chủng PV1

Phân tích ANI được sử dụng rộng rãi trong phân loại vi khuẩn dựa trên hệ gen vì phương pháp này cho phép đánh giá mức độ tương đồng trình tự nucleotide trung bình giữa hai hệ gen với độ chính xác cao. So với các phương pháp truyền thống như so sánh trình tự gen 16S rRNA, ANI có độ phân giải cao hơn và phản ánh tốt hơn mối quan hệ di truyền giữa các chủng vi khuẩn. Thông thường, giá trị ANI khoảng \geq

95 - 96% được xem là ngưỡng xác định hai chủng thuộc cùng một loài. Do đó, việc phân tích ANI giúp xác định chính xác vị trí phân loại của chủng vi khuẩn hỗ trợ phân biệt các loài gần nhau và cung cấp bằng chứng đáng tin cậy cho các nghiên cứu phân loại học và tiến hóa. Kết quả biểu đồ heatmap ở Hình 3.17 cho thấy chủng PV1 có độ tương đồng ANI với chủng *S. globosus* JCM 13859^T đạt 95,2% và đạt trên 95,3% so với các chủng *S. globosus* khác (NPDC101113, NPDC101140). Trong khi đó, độ tương đồng với loài có quan hệ gần gũi nhất là *S. toxytricini* chỉ dao động quanh mức 95%. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với ngưỡng phân định loài vi khuẩn mới (95 - 96%), qua đó khẳng định chắc chắn vị trí phân loại của chủng PV1 là *S. globosus*.



Hình 3.17. Biểu đồ nhiệt độ so sánh độ tương đồng ANI giữa chủng PV1 và các chủng tham chiếu

3.5.3. Phân tích đặc điểm di truyền hệ gen liên quan đến các hợp chất kháng nấm của chủng *S. globosus* PV1

Gần đây, việc giải mã các cụm gen sinh tổng hợp chất chuyển hóa thứ cấp BGCs liên quan đến quá trình tạo ra các hợp chất kháng vi sinh vật đã trở nên hiệu quả hơn nhờ sự hỗ trợ của giải trình tự toàn bộ hệ gen và khai thác dữ liệu hệ gen. Dựa trên công cụ antiSMASH đã xác định được 45 cụm BGC, trong đó 12 BGC có độ tương đồng cao hoặc trung bình với các BGC đã biết. Các cụm này bao gồm các enzym tổng hợp peptide không ribosome (NRPS), các enzym tổng hợp polyketide loại I và loại III (PKS), terpene, siderophore, ectoine và lanthipeptide loại I, IV (Bảng 3.5).

Bảng 3.5. Các cụm BGC được dự đoán bằng công cụ AntiSMASH

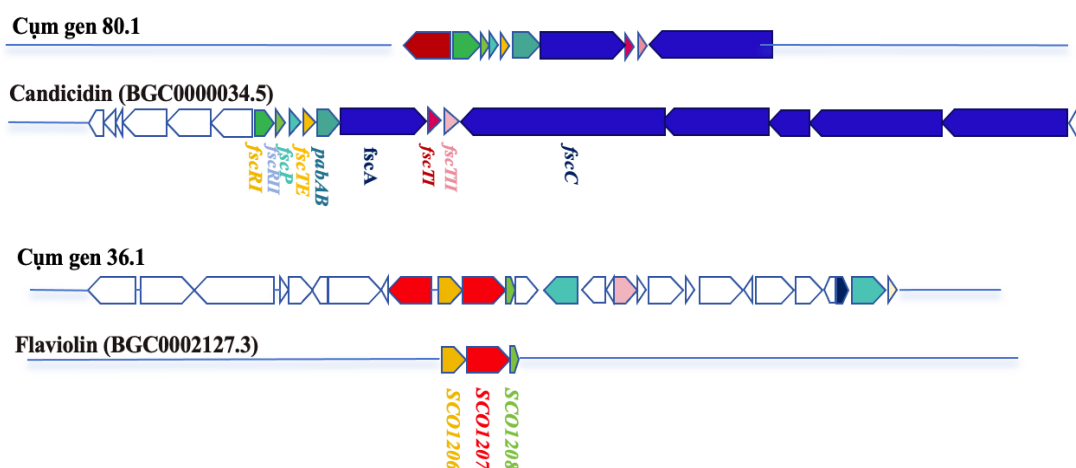
Vùng	Loại cụm gen	Kích thước (bp)	Cụm gen tham chiếu	Mức độ tương đồng	Hoạt tính sinh học
4.1	T1PKS, ectoine, transAT-PKS, butyrolactone, NRPS, linaridin	110,009	Kirromycin	Cao	Kháng khuẩn
6.1	NI-siderophore	29,788	Desferrioxamine B/desferrioxamine E	Cao	Tạo phức sắt, kháng khuẩn
17.1	NRP-metallophore, NRPS, ectoine	60,301	Peucechelin	Trung bình	Tạo phức sắt, kháng khuẩn
18.1	NRP-metallophore, NRPS, terpene	60,193	Mirubactin	Cao	Kháng khuẩn
19.1	lanthipeptide-class-iv	14,162	Venezuelin	Cao	Kháng vi sinh vật
26.1	melanin, terpene	40,479	Melanin	Cao	Sắc tố bảo vệ, hỗ trợ kháng khuẩn
28.1	lanthipeptide-class-i, NRPS, NRPS-like	55,689	Streptothricin	Trung bình	Kháng khuẩn
29.1	NRPS	61,343	Leupeptin	Trung bình	Ức chế protease
34.1	terpene	28,258	Isorenieratene	Cao	Chống oxy hóa
36.1	T3PKS	35,303	Flaviolin	Cao	Kháng nấm
52.1	T3PKS, guanidinotides	27,158	Pheganomycin	Trung bình	Kháng khuẩn
80.1	NRPS-like, T1PKS	33,222	Candicidin	Trung bình	Kháng nấm

Kết quả phân tích hệ gen bằng antiSMASH cho thấy chủng PV1 sở hữu hai cụm gen sinh tổng hợp (BGCs) có liên quan trực tiếp đến hoạt tính kháng nấm, bao

gồm cụm 36.1 và 80.1. Đây được xem là các cụm gen trọng tâm, góp phần định hình tiềm năng đối kháng nấm của chủng.

Cụm 36.1 thuộc nhóm T3PKS (type III polyketide synthase), có kích thước khoảng 35.303 bp và được dự đoán tham gia sinh tổng hợp flaviolin với mức độ tương đồng cao. Flaviolin là một hợp chất thuộc nhóm naphthoquinone, có hoạt tính kháng nấm ở mức trung bình, đồng thời đóng vai trò quan trọng trong các quá trình sinh lý của vi sinh vật như điều hòa cân bằng oxy hóa - khử và bảo vệ tế bào trước stress oxy hóa. Trong bối cảnh sinh thái vùng rễ, flaviolin không chỉ đóng vai trò như một chất kháng nấm trực tiếp mà còn giúp vi sinh vật tăng khả năng thích nghi trong môi trường cạnh tranh cao, nơi áp lực từ vi sinh vật đối kháng và điều kiện bất lợi luôn hiện diện. Điều này cho thấy cụm 36.1 mang ý nghĩa kép: vừa tham gia đối kháng sinh học, vừa hỗ trợ tồn tại và thích nghi sinh thái.

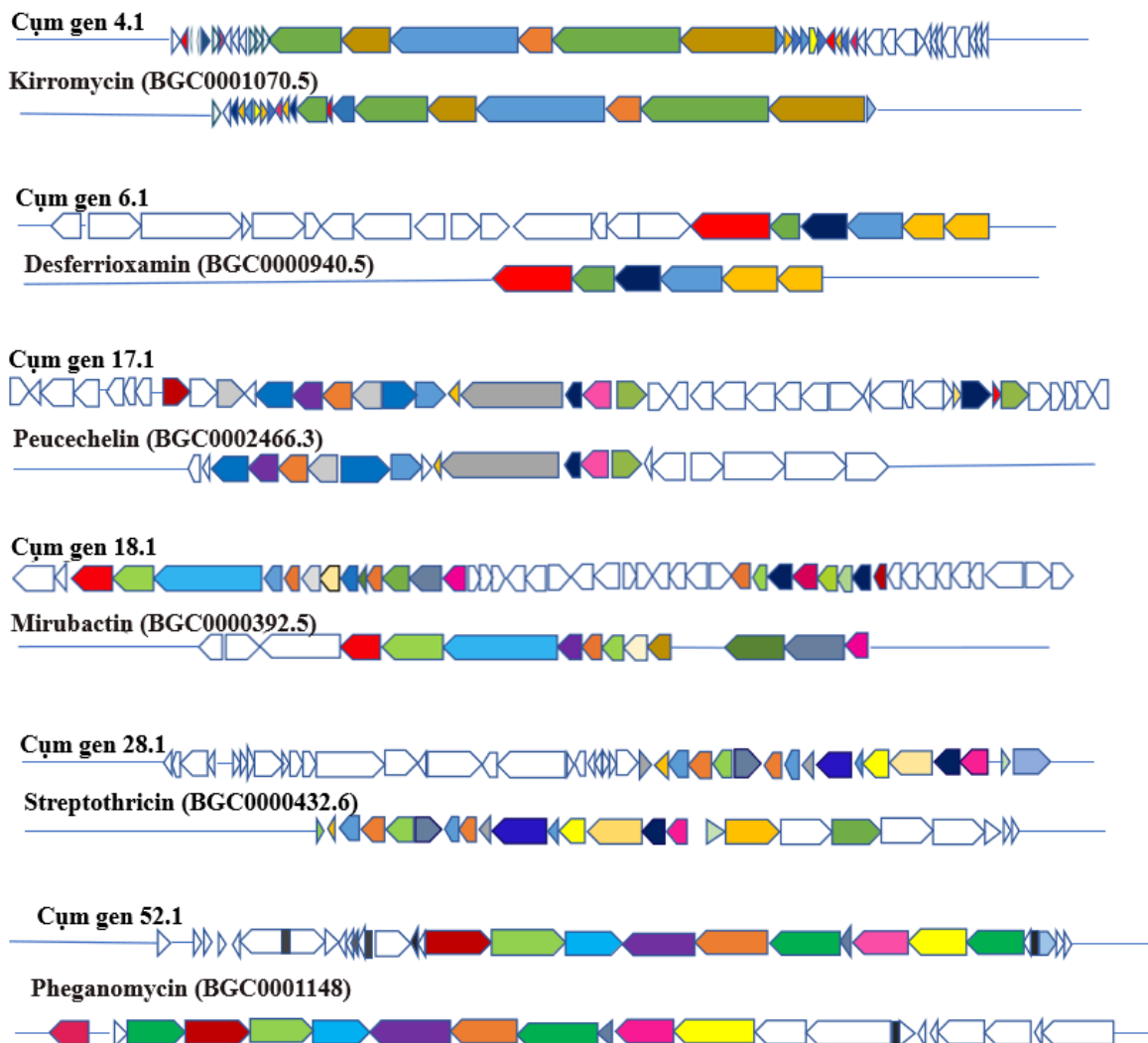
Cụm 80.1 thuộc nhóm NRPS-like kết hợp T1PKS, có kích thước khoảng 33.222 bp và thể hiện mức độ tương đồng trung bình với cụm sinh tổng hợp candicidin ở *Streptomyces* sp. FR-008. Candicidin là một kháng sinh thuộc nhóm polyene macrolide, có cơ chế tác động đặc trưng bằng cách gắn vào ergosterol của màng tế bào nấm, làm thay đổi tính thấm màng, rò rỉ nội chất và dẫn đến tiêu diệt tế bào nấm. Tuy nhiên, mức độ tương đồng trung bình cho thấy cụm 80.1 ở PV1 có thể không hoàn toàn giống hệ candicidin điển hình, mà có khả năng là một biến thể tiến hóa hoặc cụm lai, từ đó có thể tạo ra các dẫn xuất mới với phổ hoạt tính hoặc mức độ độc tính sinh học khác biệt. Đây là một điểm quan trọng vì nó mở ra khả năng khai thác các hợp chất kháng nấm mới có nguồn gốc tự nhiên (Hình 3.18).



Hình 3.18. Các cụm BGC tổng hợp chất kháng nấm được dự đoán trên hệ gen chủng PV1

Bên cạnh khả năng kháng nấm, hệ gen của chủng PV1 còn sở hữu các cụm BGC mã hóa cho các hợp chất kháng khuẩn tạo nên khả năng đối kháng toàn diện

trong môi trường vùng rễ. Kết quả phân tích bằng antiSMASH cho thấy sự hiện diện của 6 cụm BGC có độ tương đồng cao với các hợp chất đã biết, bao gồm: kirromycin, desferrioxamine, peucechelin, mirubactin, venezuelin, streptothricin và pheganomycin (Hình 3.19).



Hình 3.19. Các cụm BGC tổng hợp chất kháng khuẩn được dự đoán trên hệ gen chủng PV1

Đầu tiên, streptothricin là một nhóm kháng sinh tự nhiên do các loài thuộc chi *Streptomyces* sản xuất như *Streptomyces lavendulae*. Chất này có cấu trúc đặc trưng gồm nhân streptolidin liên kết với chuỗi β -lysine có độ dài biến thiên. Về hoạt tính sinh học, streptothricin thể hiện phổ kháng khuẩn rộng như *Escherichia coli*, *Salmonella* và *Acinetobacter baumannii*. Cơ chế tác dụng chủ yếu liên quan đến việc ức chế quá trình dịch mã protein tại ribosome gây sai lệch tổng hợp protein và dẫn đến chết tế bào. Ngoài ra, streptothricin còn biểu hiện hoạt tính kháng nấm *Alternaria*, *Fusarium oxysporum* và *Colletotrichum* [102]. Phân tích hệ gen cho thấy BGC ở vùng 28.1 có độ tương đồng trung bình với BGC tổng hợp streptothricin

(BGC0000432) ở *Streptomyces rochei* NBRC 12908 [103]. Các gen NRPS ở cụm BGC 28.1 có độ tương đồng từ 51-75% so với 4 NRPS từ cụm BGC tham chiếu. Hơn nữa, sự sắp xếp các gen cũng khác biệt, điều này khẳng định cụm BGC 28.1 có thể sinh tổng hợp streptothricin và các dạng dẫn xuất từ streptothricin.

Tiếp theo, cụm BGC ở vùng 4.1 có độ tương đồng cao với BGC tham chiếu sinh tổng hợp kirromycin (BGC0001070.5) từ *Streptomyces collinus* Tu 365. Cụm gen 4.1 có kích thước khoảng 120.339, gần tương đồng với BGC mã hoá kirromycin tham chiếu (115.024 bp). Đặc biệt, BGC 4.1 này còn chứa 5 gen PKS và 2 gen NRPS và tương đồng cao với các gen tương ứng với độ tương đồng đạt 65 - 73%. Kirromycin là một loại kháng sinh phổ hẹp nhưng có tính đặc hiệu cao. Về cơ chế, chất này tác động lên yếu tố kéo dài chuỗi EF-Tu của vi khuẩn *E. coli*, *Staphylococcus aureus* làm gián đoạn quá trình vận chuyển aminoacyl-tRNA đến ribosome và ngăn cản sự kéo dài chuỗi polypeptide.

Cụm BGC 52.1 được dự đoán liên quan đến sinh tổng hợp pheganomycin và thể hiện mức độ tương đồng trung bình với BGC tham chiếu BGC0001148. Các gen trong cụm này có độ tương đồng trên 50% so với cụm chuẩn. Pheganomycin là một hợp chất kháng khuẩn có khả năng ức chế sinh trưởng vi khuẩn thông qua tác động lên các quá trình chuyển hóa thiết yếu hoặc tổng hợp protein, đồng thời thể hiện hoạt tính trên một số vi khuẩn gây bệnh quan trọng như *Mycobacterium smegmatis*, *Staphylococcus aureus* và *Bacillus subtilis*.

Bên cạnh đó, hệ gen PV1 còn chứa nhiều cụm BGC liên quan đến sinh tổng hợp siderophore, bao gồm desferrioxamine B/E (cụm 6.1), peucechelin (cụm 17.1) và mirubactin (cụm 18.1). Trong đó, cụm 17.1 có mức độ tương đồng cao với cụm sinh tổng hợp peucechelin (BGC0002466) từ *Streptomyces peucetius subsp. caesius* ATCC 27952, với mức độ bảo tồn cao về cả tổ chức gen và trình tự (trên 60%). Siderophore là nhóm hợp chất có vai trò tạo phức mạnh với ion sắt (Fe^{3+}), giúp vi sinh vật hấp thu sắt hiệu quả trong môi trường hạn chế dinh dưỡng. Nghiên cứu của Barona-GómezF và cộng sự (2006) đã báo cáo rằng các cụm gen *des* và *cch* được xác định chịu trách nhiệm sinh tổng hợp các siderophore như desferrioxamine và coelichelin ở *Streptomyces coelicolor* A3(2) và *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877 [104]. Điều này cho thấy hệ thống siderophore là một đặc điểm phổ biến và có tính bảo tồn cao trong chi *Streptomyces*, đóng vai trò thiết yếu trong chiến lược cạnh tranh sinh thái của chúng.

Sự hiện diện đồng thời của ba hệ siderophore khác nhau trong PV1, bao gồm hệ desferrioxamine B/E, hệ peucechelin và hệ mirubactin, cho thấy chủng này sở hữu năng lực cạnh tranh dinh dưỡng rất mạnh thông qua cơ chế thu nhận sắt hiệu quả.

Việc làm giảm hàm lượng sắt tự do trong môi trường vùng rễ không chỉ giúp PV1 chiếm ưu thế sinh thái mà còn gián tiếp ức chế sự phát triển của các vi sinh vật gây bệnh, vốn phụ thuộc vào nguồn sắt ngoại sinh cho quá trình sinh trưởng. Bên cạnh đó, khả năng huy động và chuyển hóa sắt của PV1 cũng có thể góp phần cải thiện trạng thái dinh dưỡng trong vùng rễ, từ đó hỗ trợ sinh trưởng và phát triển của thực vật trong hệ sinh thái đất.

3.5.4. Phân tích các cụm gen mã hóa enzym phân giải vách tế bào nấm

Bên cạnh các cụm gen sinh tổng hợp hợp chất thứ cấp, *Streptomyces* cũng tiết chitinase để phân giải vách tế bào nấm, giảm tính toàn vẹn của tế bào nấm, hạn chế sự sinh trưởng và làm giảm khả năng xâm nhiễm trên cây trồng [105]. Phân tích hệ gen cho thấy chủng *S. globosus* PV1 chứa 5 gen mã hóa enzym thủy phân chitin, bao gồm *chiA*, *chiB*, *chiC*, *chiD*, và *chiG* (Bảng 3.6). Sự hiện diện đồng thời của nhiều gen chitinase có thể góp phần nâng cao hiệu quả phân giải chitin thông qua cơ chế phối hợp giữa các enzyme, từ đó tăng cường khả năng ức chế nấm bệnh và mở rộng phổ tác động đối với các đối tượng gây bệnh khác nhau. Điều này cho thấy chủng *S. globosus* PV1 không chỉ có tiềm năng kháng nấm thông qua sinh tổng hợp các chất chuyển hóa thứ cấp mà còn có thể sử dụng cơ chế phân hủy trực tiếp cấu trúc vách tế bào nấm để tăng cường hiệu quả đối kháng.

Bảng 3.6. Các gen mã hóa chitinase trong hệ gen chủng *S. globosus* PV1

Tên gen	Chức năng dự đoán	Vị trí	Mã gen tham chiếu	Độ tương đồng (%)
<i>chiA</i>	Chitinase	<i>orf_4233</i>	BAA75642.1	68%
<i>chiB</i>	Endochitinase/ Chitodextrinase	<i>orf_1658</i>	WP_010987038.1	83%
<i>chiC</i>	Chitinase	<i>orf_4364</i>	P36909.1	78%
<i>chiD</i>	Chitinase	<i>orf_5929</i>	WP_011027783.1	32%
<i>chiG</i>	Chitinase	<i>orf_4287</i>	WP_011027151.1	75%

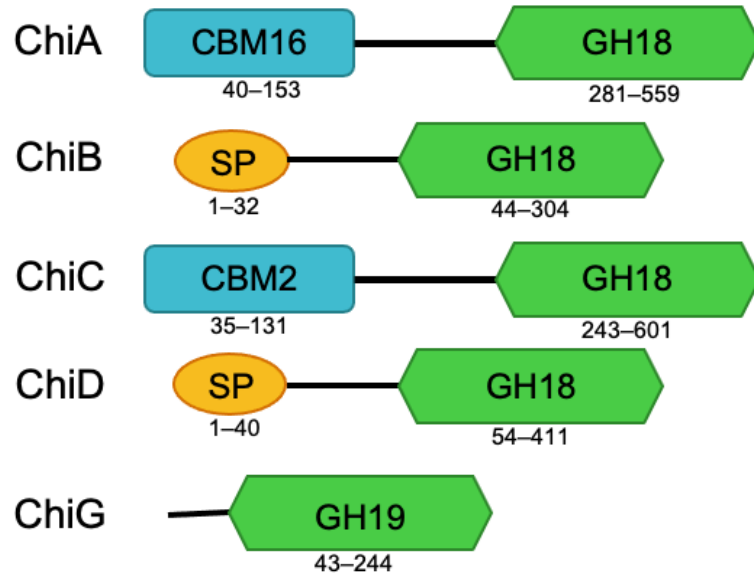
Kết quả Bảng 3.6 cho thấy 5 chitinase có độ tương đồng trình tự axit amin ở mức thấp tới trung bình so với các trình tự chitinase chuẩn tham chiếu trên GenBank, dao động từ 32-75%. Hơn nữa, các giá trị E-value thấp, điều này chứng tỏ các trình tự này mã hóa cho chitinase với độ chính xác cao và không trùng lặp đoạn trong hệ gen. Hoạt tính endochitinase của *chiB* đóng vai trò cắt đứt các liên kết bên trong chuỗi polymer chitin dài của vách tế bào nấm thành các đoạn ngắn. Sau đó, các chitinase

khác sẽ tiếp tục thủy phân các đoạn này thành các đơn phân N-acetylglucosamine. Cơ chế này đã được ghi nhận là con đường chính trong quá trình phân hủy chitin ở xạ khuẩn và vi sinh vật đất [105]. Đáng chú ý, gen *chiD* tuy có độ tương đồng thấp (32%) nhưng chỉ số E-value lại rất có ý nghĩa, điều này gợi mở về sự hiện diện cả một biến thể chitinase đặc thù, hoặc đã trải qua quá trình biến đổi để thích nghi với các cấu trúc chitin phức tạp của các loài nấm gây bệnh.

dbCAN là một công cụ tin sinh học và máy chủ web, được thiết kế và sử dụng rộng rãi nhằm tự động hóa việc chú giải các enzym hoạt động trên carbohydrate trong dữ liệu hệ gen. Cơ sở dữ liệu Carbohydrate-Active Enzymes (CAZy) là hệ thống phân loại dựa trên trình tự lớn nhất thế giới dành riêng cho các enzyme tham gia vào quá trình tổng hợp và phân hủy carbohydrate. Phân tích bằng dbCAN và chú giải các enzym trên CAZy, kết quả cho thấy có 5 chitinase được chia thành 2 họ enzym thủy phân glycoside (Glycoside hydrolase GH), gồm họ GH18 (ChiA, ChiB, ChiC, ChiD) và GH19 (ChiG) (Hình 3.20). Trong GH18, có 2 chitinase (Orf_1658, Orf_5929) chứa peptide tín hiệu và vùng xúc tác. Ngoài ra, có thêm 2 enzym khác đồng thời mang mô-đun liên kết carbohydrate và vùng GH18, bao gồm CBM16 + GH18 (Orf_4233) và CBM2 + GH18 (Orf_4364). Sự có mặt của CBM có thể làm tăng khả năng liên kết của enzym với cơ chất chitin.

Kết quả đáng chú ý là sự có mặt của *chiG* mã hoá chitinase thuộc nhóm GH19 (Hình 3.17). Chitinase thuộc GH19 là nhóm thủy phân chitin bằng cách cắt liên kết β -1,4-glycosidic trong phân tử chitin. Ban đầu, GH19 được phát hiện chủ yếu ở thực vật và liên quan đến cơ chế phòng vệ chống nấm bệnh [106]. Tuy nhiên, nhiều nghiên cứu gần đây cho thấy một số vi sinh vật như vi khuẩn và xạ khuẩn cũng có khả năng sản sinh chitinase thuộc họ GH19. So với chitinase thuộc họ GH18, enzyme GH19 có cấu trúc và cơ chế xúc tác khác biệt và thể hiện hoạt tính kháng nấm mạnh do khả năng phân giải hiệu quả vách tế bào chứa chitin của nấm gây bệnh. Ví dụ, SaChiB thuộc nhóm GH19 từ *Streptomyces alfalfae* có khả năng phân giải chitin tinh thể và thể hiện hoạt tính kiểm soát sinh học đối với các nấm gây bệnh thực vật [106]. Enzym này hoạt động tốt trong khoảng pH rộng và có khả năng thủy phân cả chitooligosaccharide. Nghiên cứu tách dòng, biểu hiện, và xác định hoạt tính gen *chiG* sẽ khẳng định kết quả dự đoán và chứng minh liệu *chiG* có phải là chitinase mới không. Như vậy, hệ thống chitinase nội và ngoại bào phong phú cùng với khả năng sinh tổng hợp các hợp chất kháng nấm phổ rộng là nền tảng vững chắc cho khả năng kiểm soát sinh học mạnh mẽ của chủng *S. globosus* PV1.

Như vậy, hệ thống enzym ngoại bào phong phú cùng với khả năng sinh tổng hợp các hợp chất kháng nấm phổ rộng là nền tảng vững chắc cho khả năng kiểm soát sinh học mạnh mẽ của chủng *S. globosus* PV1.



Hình 3.20. Dự đoán miền cấu trúc của 5 chitinase dựa theo phân tích trình tự axit amin.

Ghi chú: SP: peptide tín hiệu; GH: glycoside hydrolase (enzyme thủy phân glycoside); CBM: carbohydrate-binding module (mô-đun liên kết carbohydrate)

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

- Đã phân lập được 8 chủng xạ khuẩn vùng rễ cây sâm ngọc linh di thực tại tỉnh Yên Bái và sàng lọc được chủng PV1 kháng 2 loại nấm bệnh thử nghiệm.
- Đã đánh giá các đặc tính kháng nấm của chủng xạ khuẩn tiềm năng PV1: Chủng xạ khuẩn đối kháng mạnh với *Fusarium solani* PAV1 ($53,9 \pm 5,6\%$), *Rhizoctonia solani* PAV2 ($22,4 \pm 4,5\%$) và *Colletotrichum gloeosporioides* PAV3 ($81,9 \pm 0,6\%$). Dịch nuôi cấy chủng PV1 cũng ức chế 3 chủng nấm với phần trăm ức chế hệ sợi dao động từ 59,8 - 77,7%, trong khi đó các chất bay hơi VOCs không ức chế các nấm thử nghiệm.
- Chủng PV1 có khả năng sinh các enzyme ngoại bào, đặc biệt là chitinase.
- Đã đánh giá các đặc tính kích thích sinh trưởng của chủng PV1. Chủng sinh $6,9 \pm 0,17 \mu\text{g/mL}$ IAA sau 48 giờ và kích thích đáng kể phần trăm nảy mầm hạt lúa và ngưu tất trong điều kiện phòng thí nghiệm.
- Đã định danh chủng PV1 thuộc loài *Streptomyces globosus* bằng phân tích hình thái và trình tự gen 16S rRNA.
- Đã giải trình tự hệ gen và phân tích các đặc điểm di truyền liên quan đến khả năng kháng nấm của chủng PV1 bằng công nghệ Onso PacBio. Hệ gen PV1 có kích thước 7,64 Mb chứa 307 contig, hàm lượng GC đạt 73,5% và 6691 trình tự CDS. Phân tích ANI và dDDH đã khẳng định chủng nghiên cứu thuộc *Streptomyces globosus*.
- Phân tích tin sinh học bằng công cụ antiSMASH đã dự đoán được 12 BGCs sinh tổng hợp các hợp chất thứ cấp, trong đó 2 BGC mã hoá chất kháng nấm và 6 BGCs tiềm năng mã hóa chất kháng khuẩn được phát hiện. Ngoài ra, 5 gen chitinase thuộc 2 họ GH18 và GH19 được xác định nằm rải rác trên hệ gen PV1.

KIẾN NGHỊ

- Thử nghiệm khả năng bảo vệ cây sâm Ngọc Linh khỏi các chủng nấm bệnh và các stress trong điều kiện nhà lưới.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Wang, Z., Wang, S., Yang, H., 2024, Understanding the Pathogenesis, Biocontrol Mechanisms, and Factors Influencing Biocontrol Effectiveness for Soil-Borne Diseases in *Panax* Plants, *Microorganisms*, 12(11), 2278.
2. Chen, X., Hu, L.-F., Huang, X.-S., Zhao, L.-X., Miao, C.-P., Chen, Y.-W., Xu, L.-H., Han, L., Li, Y.-Q., 2019, Isolation and Characterization of New Phenazine Metabolites with Antifungal Activity against Root-Rot Pathogens of *Panax notoginseng* from *Streptomyces*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(41), pp. 11403–11407.
3. Ha, T. D., & Grushvitsky, I. V., 1985, A new species of the genus *Panax*, Araliaceae in Vietnam: *Panax vietnamensis* Ha et Grushv, *Botanicheskii Zhurnal*, 70, pp. 518–522.
4. Nguyễn Thượng Dong, Trần Công Luận, Nguyễn Thị Thu Hương, 2007, Sâm Việt Nam và một số cây thuốc họ Nhân sâm, Nhà xuất bản khoa học và kỹ thuật.
5. Đỗ Tất Lợi, 2004, Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam. Nhà xuất bản Hồng Đức, Hà Nội.
6. Ngau, T. H., Dieu, C. P. K., Hue, C. P. K., Huynh, D. T. N., Do, B. H., Huynh, L. D., 2025, Ethnopharmacology, genetic diversity, phytochemistry and pharmacological effects of *Panax vietnamensis* Ha et Grushv.: A review, *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology: Official Organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer*, 44(1), pp. 73–92.
7. Hou, M., Wang, R., Zhao, S., & Wang, Z., 2021, Ginsenosides in *Panax* genus and their biosynthesis, *Acta Pharmaceutica Sinica. B*, 11(7), pp. 1813–1834.
8. Yamasaki, K., 2000, Bioactive saponins in vietnamese ginseng, *panax vietnamensis*, *Pharmaceutical Biology*, 38 Suppl 1, pp. 16–24.
9. Le, H. K., Phan, T. T., Nguyen, T. M. N., Nguyen, T. C., Tran, C. L., Hansen, P. E., That, Q. T., 2023, A new sesquiterpene lactone from the leaves of *Panax vietnamensis* Ha et Grushv. (Vietnamese ginseng). *Natural Product Research*, 37(21), pp. 3580–3587.
10. Miao, C.-P., Qiao, X.-G., Zheng, Y.-K., Chen, Y.-W., Xu, L.-H., Guan, H.-L., Zhao, L.-X., 2015, First Report of *Fusarium flocciferum* Causing Root Rot of Sanqi (*Panax notoginseng*) in Yunnan, China, *Plant Disease*, 99(11), 1650.

11. Neils, A. L., Brisco-McCann, E. I., Harlan, B. R., Hausbeck, M. K., 2021, Management strategies for *Alternaria* leaf blight on *American ginseng*, *Crop Protection*, 139, 105302.
12. Duong, H. T. P., Pham, D. T., Pham, V. T. T., Le, A. H., Nguyen, T. D., Nguyen, N. X., Khuat, C. T., Dinh, H. T., 2024, Report on emerging foliar soft rot disease on *Panax vietnamensis* and identification of *Neocosmospora ipomoeae* and *Fusarium miscanthi* as causal pathogens, *Journal of Plant Protection Research*, 64(4), pp. 373–384.
13. Xu, X., Dai, T., & Wu, C., 2024, First Report of *Fusarium vanettenii* Causing *Fusarium* Root Rot in *Fatsia japonica* in China, *Forests*, 15(5), 805.
14. Karanyi, Z., Holb, I., Hornok, L., Pocsi, I., Miskei, M., 2013, FSRD: fungal stress response database, *Database*, 2013(0), bat037–bat037.
15. Singh, V. K., Upadhyay, R. S., 2014, Fusaric acid induced cell death and changes in oxidative metabolism of *Solanum lycopersicum* L, *Botanical Studies*, 55(1), 66.
16. Singh, V. K., Singh, H. B., & Upadhyay, R. S., 2017, Role of fusaric acid in the development of ‘*Fusarium wilt*’ symptoms in tomato: Physiological, biochemical and proteomic perspectives, *Plant Physiology and Biochemistry*, 118, pp. 320 - 332.
17. Oksel, C., Subedi, P., Chinnaiah, S., Simmons, T., Arik, B., Laudeman, M., Windham, M. T., Baysal-Gurel, F., 2026, First Report of Root Rot Caused by *Fusarium oxysporum* on American Ginseng (*Panax quinquefolius*) in Tennessee and the United States, *Plant Disease*, 110(2), 537.
18. Akber, M. A., & Fang, X., 2024, Research Progress on Diseases Caused by the Soil-Borne Fungal Pathogen *Rhizoctonia solani* in Alfalfa, *Agronomy*, 14(7), 1483.
19. Putnam, M., 2015, *Ginseng (Panax spp.)-Damping-off*. *Pacific Northwest Pest Management Handbooks*. Text, Pacific Northwest Extension. Retrieved April 3, 2026.
20. Sharma-Poudyal, D., Paulitz, T. C., Porter, L. D., Du Toit, L. J., 2015, Characterization and Pathogenicity of *Rhizoctonia* and *Rhizoctonia* -Like spp. From Pea Crops in the Columbia Basin of Oregon and Washington, *Plant Disease*, 99(5), pp. 604–613.
21. Williamson-Benavides, B. A., & Dhingra, A., 2021, Understanding Root Rot Disease in Agricultural Crops, *Horticulturae*, 7(2), 33.

22. Han, X., Gu, S., Xu, R., Kong, Y., Lou, Y., Wang, Q., Gao, Y., Shang, S., Song, Z., Song, J., Li, J., 2024, Efficient Control of *Rhizoctonia solani* Using Environmentally Friendly pH-Responsive Tannic Acid–Rosin Nano-Microcapsules, *ACS Applied Materials & Interfaces*, pp. 20302–20314.
23. Lakshman, D.K., Roberts, D.P., Garrett, W.M., Natarajan, S.S., Darwish, O., Alkharouf, N., Pain, A., Khan, F., Jambhulkar, P.P., Mitra, A., 2016, Proteomic Investigation of *Rhizoctonia solani* AG 4 Identifies Secretome and Mycelial Proteins with Roles in Plant Cell Wall Degradation and Virulence. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(15), pp. 3101–3110.
24. Tzelepis, G., Dörfors, F., Holmquist, L., Dixelius, C., 2021, Plant mitochondria and chloroplasts are targeted by the *Rhizoctonia solani* RsCRP1 effector, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 544, pp. 86–90.
25. Dörfors, F., Holmquist, L., Dixelius, C., Tzelepis, G., 2019, A LysM effector protein from the basidiomycete *Rhizoctonia solani* contributes to virulence through suppression of chitin-triggered immunity. *Molecular Genetics and Genomics*, 294(5), 1211–1218.
26. Niu, X., Yang, G., Lin, H., Liu, Y., Li, P., Zheng, A., 2021, A Novel, Small Cysteine-Rich Effector, RsSCR10 in *Rhizoctonia solani* Is Sufficient to Trigger Plant Cell Death, *Frontiers in Microbiology*, 12, 684923.
27. Panth, M., Hassler, S. C., Baysal-Gurel, F., 2020, Methods for Management of Soilborne Diseases in Crop Production, *Agriculture*, 10(1), 16.
28. Gong, C., Liu, M., Liu, D., Wang, Q., Hasnain, A., Zhan, X., Pu, J., Liang, Y., Liu, X., Wang, X., 2022, Status of Fungicide Resistance and Physiological Characterization of Tebuconazole Resistance in *Rhizocotonia solani* in Sichuan Province, China, *Current Issues in Molecular Biology*, 44(10), pp. 4859–4876.
29. Ramírez-Pool, J. A., Calderón-Pérez, B., Ruiz-Medrano, R., Ortiz-Castro, R., Xoconostle-Cazares, B., 2024, *Bacillus* Strains as Effective Biocontrol Agents Against Phytopathogenic Bacteria and Promoters of Plant Growth, *Microbial Ecology*, 87(1), 76.
30. Ursan, M., Boiu-Sicuia, O. A., Voaides, C., Stan, V., Bubueanu, C., Cornea, C. P., 2018, The Potential of New *Streptomyces* Isolates as Biocontrol Agents Against *Fusarium* Spp. “Agriculture for Life, Life for Agriculture” Conference Proceedings, 1(1), pp. 594–600.
31. Srivastava, R., Khalid, A., Singh, U. S., Sharma, A. K., 2010, Evaluation of arbuscular mycorrhizal fungus, fluorescent *Pseudomonas* and *Trichoderma*

- harzianum* formulation against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* for the management of tomato wilt, *Biological Control*, 53(1), pp. 24–31.
32. Lechevalier, H. A., Lechevalier, M. P., 1967, Biology of Actinomycetes. *Annual Review of Microbiology*, 21(1), pp. 71–100.
 33. Barka, E.A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Meier-Kolthoff, J.P., Klenk, H.-P., Clément, C., Ouhdouch, Y., van Wezel, G.P., 2016, Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria, *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 80(1), pp. 1–43.
 34. Kaari, M., Manikkam, R., Annamalai, K. K., Joseph, J., 2023, Actinobacteria as a source of biofertilizer/biocontrol agents for bio-organic agriculture, *Journal of Applied Microbiology*, 134(2), lxac047.
 35. Tistechok, S., Roman, I., Fedorenko, V., Luzhetskyy, A. Gromyko, O., 2023, Diversity and bioactive potential of Actinomycetia from the rhizosphere soil of *Juniperus excelsa*, *Folia Microbiologica*, 68(4), pp. 645–653.
 36. Komaki, H., 2023, Recent Progress of Reclassification of the Genus *Streptomyces*, *Microorganisms*, 11(4), 831.
 37. Fjærvik, E., Zotchev, S. B., 2005, Biosynthesis of the polyene macrolide antibiotic nystatin in *Streptomyces noursei*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67(4), pp. 436–443.
 38. Lin, J., Zhou, D., Steitz, T. A., Polikanov, Y. S., Gagnon, M. G., 2018, Ribosome-Targeting Antibiotics: Modes of Action, Mechanisms of Resistance, and Implications for Drug Design, *Annual Review of Biochemistry*, 87(1), pp. 451–478.
 39. Kornfeld, E. C., & Jones, R. G., 1948, The Structure of Actidione, An Antibiotic From *Streptomyces griseus*, *Science*, 108(2808), pp. 437–438.
 40. Larwood, D. J., 2020, Nikkomycin Z—Ready to Meet the Promise? *Journal of Fungi*, 6(4), 261.
 41. Jang, J.-O., Lee, J.-B., Kim, B.-S., Kang, S.-C., Hwang, C.-W., Shin, K.-S., Kwon, G.-S., 2011, Characterization and Antifungal Activity from Soilborne *Streptomyces* sp. AM50 towards Major Plant Pathogens, *Korean Journal of Environmental Agriculture*, 30(3), pp. 346–356.
 42. Torres-Rodriguez, J. A., Reyes-Pérez, J. J., Quiñones-Aguilar, E. E., Hernandez-Montiel, L. G., 2022, Actinomycete Potential as Biocontrol Agent of Phytopathogenic Fungi: Mechanisms, Source, and Applications. *Plants*, 11(23), 3201.

43. Gong, Y., Liu, J.-Q., Xu, M.-J., Zhang, C.-M., Gao, J., Li, C.-G., Xing, K., Qin, S., 2022, Antifungal Volatile Organic Compounds from *Streptomyces setonii* WY228 Control Black Spot Disease of Sweet Potato, *Applied and Environmental Microbiology*, 88(6), e02317-21.
44. Widada, J., Damayanti, E., Alhakim, M. R., Yuwono, T., Mustofa, M., 2021, Two strains of airborne *Nocardiosis alba* producing different volatile organic compounds (VOCs) as biofungicide for *Ganoderma boninense*, *FEMS Microbiology Letters*, 368(20), fnab138.
45. Devi, V. V., Rani, K. C. M. E., Asaph, R. S., Suresh, P., Gomathinayagam, S., Shanmugaiah, V., 2024, Prevalent Plant Growth Hormone Indole-3-acetic Acid Produced by *Streptomyces* sp. VSMKU1027 and its Potential Antifungal Activity against Phytofungus Pathogens, *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 18(4), pp. 2721–2733.
46. Xu, W., Liu, Y., Cheng, Y., Zhang, J., 2025, Plant Growth-Promoting Effect and Complete Genomic Sequence Analysis of the Beneficial Rhizosphere *Streptomyces* sp. GD-4 Isolated from *Leymus secalinus*. *Microorganisms*, 13(2), 286.
47. Vargas Hoyos, H.A., Chiamonte, J.B., Barbosa-Casteliani, A.G., Fernandez Morais, J., Perez-Jaramillo, J.E., Nobre Santos, S., Nascimento Queiroz, S.C., Soares Melo, I., 2021, An Actinobacterium Strain From Soil of Cerrado Promotes Phosphorus Solubilization and Plant Growth in Soybean Plants, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 579906.
48. Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R., 1977, DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), pp. 5463–5467.
49. Finishing the euchromatic sequence of the human genome | Nature. (n.d.). Retrieved April 3, 2026.
50. Tamang, S., 2024, PacBio Sequencing: Principle, Steps, Types, Uses, Diagram. Retrieved April 3, 2026.
51. Motyka-Pomagruk, A., Zoledowska, S., Kabza, M., Lojkowska, E., 2021, PacBio-Based Protocol for Bacterial Genome Assembly, In: Mengoni, A., Bacci, G., Fondi, M. (eds.), *Bacterial Pangenomics*, Vol. 2242, pp. 3–14, Springer US, New York, NY: Springer US.
52. Dicks, J., Fazal, M.-A., Oliver, K., Grayson, N.E., Turnbull, J.D., Bane, E., Stevens, M.J.A., Thomson, N.R., Quail, M.A., Parkhill, J., 2023, NCTC3000:

- a century of bacterial strain collecting leads to a rich genomic data resource, *Microbial Genomics*, 9(5), e000990.
53. Luo, Y., Jang, J. H., Balkey, M., Hoffmann, M., 2025, 217 closed Salmonella reference genomes using PacBio sequencing, *BMC Genomic Data*, 26(1), 15.
 54. Jain, M., Olsen, H. E., Paten, B., Akeson, M., 2016, The Oxford Nanopore MinION: delivery of nanopore sequencing to the genomics community. *Genome Biology*, 17(1), 239.
 55. Bentley, S. D., Chater, K. F., Cerdeño-Tárraga, A.-M., Challis, G. L., Thomson, N. R., James, K. D., ... Hopwood, D. A., 2002, Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2), *Nature*, 417(6885), 141–147.
 56. Li, L.-F., Wu, Q.-X., Wu, H., Li, Y., Peng, Q., Han, R.-H., Zhang, D.-H., Yu, W.-D., Xu, R., Wang, J., Fan, Z., Hou, S.-Y., 2023, Complete Genome Sequence of *Streptomyces* sp. HP-A2021, a Promising Bacterium for Natural Product Discovery, *Biochemical Genetics*, 61(5), pp. 2042–2055.
 57. Komaki, H., & Tamura, T., 2023, Profile of PKS and NRPS Gene Clusters in the Genome of *Streptomyces cellostaticus* NBRC 12849T, *Fermentation*, 9(11), 924.
 58. Lee, Y., Hwang, S., Kim, W., Kim, J. H., Palsson, B. O., Cho, B.-K., 2024, CRISPR-aided genome engineering for secondary metabolite biosynthesis in *Streptomyces*, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 51, kuae009.
 59. Kong, D., Lee, M.-J., Lin, S., & Kim, E.-S., 2013, Biosynthesis and pathway engineering of antifungal polyene macrolides in actinomycetes, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 40(6), pp. 529–543.
 60. Felnagle, E. A., Jackson, E. E., Chan, Y. A., Podevels, A. M., Berti, A. D., McMahon, M. D., Thomas, M. G., 2008, Nonribosomal Peptide Synthetases Involved in the Production of Medically Relevant Natural Products, *Molecular Pharmaceutics*, 5(2), pp. 191–211.
 61. Yu, Y., Bai, L., Minagawa, K., Jian, X., Li, L., Li, J., Chen, S., Cao, E., Mahmud, T., Floss, H. G., Zhou, X., Deng, Z., 2005, Gene cluster responsible for validamycin biosynthesis in *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *jinggangensis* 5008, *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9), pp. 5066–5076.

62. Chen, W., Huang, T., He, X., Meng, Q., You, D., Bai, L., Li, J., Wu, M., Li, R., Xie, Z., Zhou, H., Zhou, X., Tan, H., Deng, Z., 2009, Characterization of the polyoxin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces cacaoi* and engineered production of polyoxin H, *The Journal of Biological Chemistry*, 284(16), pp. 10627–10638.
63. Du, Y., Han, W., Hao, P., Hu, Y., Hu, T., Zeng, Y., 2024, A Genomics-Based Discovery of Secondary Metabolite Biosynthetic Gene Clusters in the Potential Novel Strain *Streptomyces* sp. 21So2-11 Isolated from Antarctic Soil, *Microorganisms*, 12(6), 1228.
64. Park, H.-S., Kang, S.-H., Choi, S.-S., Kim, E.-S., 2024, Isolation of *Streptomyces* inhibiting multiple-phytopathogenic fungi and characterization of lucensomycin biosynthetic gene cluster, *Scientific Reports*, 14(1), 7757.
65. Cao, D. T., Tran, V. H., Vu, V. N., Mai, H. D. T., Le, T. H. M., Vu, T. Q., Nguyen, H. H., Chau, V. M., Pham, V. C., 2019, Antimicrobial metabolites from a marine-derived Actinomycete *Streptomyces* sp. G278, *Natural Product Research*, 33(22), pp. 3223–3230.
66. Huynh, N. T. N., Pham, N. T., Tran, C. V., Nguyen, D. T., Dinh, M. T. N., Nguyen, V. T., Nguyen, M. H., Ngo, H. V., Ho, A. N., Cheng, J., Suh, J. W., Tran, S. V., Nguyen, T. K. N., Tran, T. T. P., 2024, Screening for Antimycobacterial Activity of Actinomycetes Collected in Vietnam – Isolation and Activity of Metabolites from *Streptomyces alboniger* (A121), *Natural Product Communications*, 19(1), pp. 1–13.
67. Lê Minh Tường, Trần Thị Thu Em, 2014, Phân lập và tuyển chọn xạ khuẩn đối kháng nấm *Pyricularia oryzae* từ đất trồng lúa tại Đồng bằng sông Cửu Long, *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 33, tr. 76–82.
68. Thanh Hoa, T. T., Hong Minh, L. T., Quyen, V. T., Mai Anh, N., Mai Huong, D. T., Van Minh, C., Van Cuong, P., 2020, Screening and identification of actinomycetes having antimicrobial activity isolated from marine organisms and sediment samples in Ly Son island, Quang Ngai, *Vietnam Journal of Biotechnology*, 18(1), pp. 187–196.
69. Vu, T. H. N., Nguyen, Q. H., Dinh, T. M. L., Quach, N. T., Khieu, T. N., Hoang, H., Chu-Ky, S., Vu, T. T., Chu, H. H., Lee, J., Kang, H., Li, W.J., Phi, Q.T., 2020, Endophytic actinomycetes associated with *Cinnamomum cassia* Presl in Hoa Binh province, Vietnam: Distribution, antimicrobial activity and, genetic features. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 66(1), pp. 24–31.

70. Quach, N. T., Nguyen, Q. H., Vu, T. H. N., Le, T. T. H., Ta, T. T. T., Nguyen, T. D., Doan, T. V., Nguyen, T. V., Dang, T. T., Nguyen, X. C., Chu, H. H., Phi, Q. T., 2021, *Plant-derived bioactive compounds produced by Streptomyces variabilis LCP18 associated with Litsea cubeba (Lour.) Pers as potential target to combat human pathogenic bacteria and human cancer cell lines*, *Brazilian Journal of Microbiology*, 52(3), pp. 1215–1224.
71. Van Anh, T. T., Quynh Uyen, N., Ngoc Hong, N., Thi Lam, D., Van Vinh, H., 2022, Preparation of fusarium oxysporum-inhibiting chito-oligosaccharide by chitin/chitosan-hydrolyzing enzyme from actinomycetes, *Vietnam Journal of Biotechnology*, 19(4), pp. 765–770.
72. Nguyen, T. T., Dinh, S. T., Nguyen, C. X., 2023, Genome characterization of *Streptomyces* sp. strain VNUA74, a potential biocontrol against pathogenic fungus *Colletotrichum* spp. *Microbiology Resource Announcements*, 12(12), e00873-23.
73. Quach, N. T., Vu, T. H. N., Nguyen, T. T. A., Le, P. C., Do, H. G., Nguyen, T. D., Thao, P. T. H., Nguyen, T. T. L., Chu, H. H., Phi, Q.-T., 2023, Metabolic and genomic analysis deciphering biocontrol potential of endophytic *Streptomyces albus* RC2 against crop pathogenic fungi, *Brazilian Journal of Microbiology*, 54(4), pp. 2617–2626.
74. Dari, K., B chet, M., Blondeau, R., 1995, Isolation of soil *Streptomyces* strains capable of degrading humic acids and analysis of their peroxidase activity. *FEMS Microbiology Ecology*, 16(2), pp. 115–122.
75. Wei, Y., Zhao, Y., Zhou, D., Qi, D., Li, K., Tang, W., ... Wang, W. (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, 1712.
76. Stulanovic, N., Bensaada, D., Belde, L., Adam, D., Hanikenne, M., Focant, J.-F., Stefanuto, P.-H., Rigali, S., 2025, Antifungal and other bioactive properties of the volatilome of *Streptomyces scabiei*, *Applied and Environmental Microbiology*, 91(10), pp. e0086325.
77. Janardhan, A., Kumar, A. P., Viswanath, B., Saigopal, D. V. R., Narasimha, G., 2014, Production of Bioactive Compounds by Actinomycetes and Their Antioxidant Properties, *Biotechnology Research International*, 2014, pp. 1–8.

78. Bano, N., & Musarrat, J., 2003, Characterization of a New *Pseudomonas aeruginosa* Strain NJ-15 as a Potential Biocontrol Agent, *Current Microbiology*, 46(5), pp. 324–328.
79. Abd-Alla, M. H., El-Sayed, E. A., Rasmey, A.-H. M., 2013, Indole-3-acetic acid (IAA) production by *Streptomyces atrovirens* isolated from rhizospheric soil in Egypt, *Journal of Biology and Earth Sciences*, 3(2), B182–B193.
80. Davoudpour, Y., Schmidt, M., Calabrese, F., Richnow, H. H., Musat, N. 2020, High resolution microscopy to evaluate the efficiency of surface sterilization of Zea Mays seeds. *PLOS ONE*, 15(11), e0242247.
81. Shirling, E. B., Gottlieb, D., 1966, Methods for characterization of *Streptomyces* species, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 16(3), pp. 313–340.
82. Tresner, H. D., Danga, F., 1958, Hydrogen sulfide production by *Streptomyces* as a criterion for species differentiation, *Journal of Bacteriology*, 76(3), pp. 239–244.
83. Cantalapiedra, C. P., Hernández-Plaza, A., Letunic, I., Bork, P., & Huerta-Cepas, J., 2021, eggNOG-mapper v2: Functional Annotation, Orthology Assignments, and Domain Prediction at the Metagenomic Scale, *Molecular Biology and Evolution*, 38(12), pp. 5825–5829.
84. Kanehisa, M., Sato, Y., Kawashima, M., Furumichi, M., Tanabe, M., 2016, KEGG as a reference resource for gene and protein annotation, *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D457–D462.
85. Davis, J. J., Boisvert, S., Brettin, T., Kenyon, R. W., Mao, C., Olson, R., Overbeek, R., Stevens, R., Xia, F., Yoo, H., 2016, Antimicrobial Resistance Prediction in PATRIC and RAST, *Scientific Reports*, 6(1), pp. 27930.
86. Blin, K., Shaw, S., Vader, L., Szenei, J., Reitz, Z. L., Augustijn, H. E., ... Weber, T., 2025, antiSMASH 8.0: extended gene cluster detection capabilities and analyses of chemistry, enzymology, and regulation. *Nucleic Acids Research*, 53(W1), W32–W38.
87. Peng, F., Zhang, M.-Y., Hou, S.-Y., Chen, J., Wu, Y.-Y., & Zhang, Y.-X., 2020, Insights into *Streptomyces* spp. isolated from the rhizospheric soil of *Panax notoginseng*: isolation, antimicrobial activity and biosynthetic potential for polyketides and non-ribosomal peptides, *BMC Microbiology*, 20(1), 143.
88. Trần Thị Hoa, Nguyễn Thị Hồng Hà, Lương Văn Hào, Phạm Bích Ngọc, Chu Hoàng Hà, Đỗ Tiến Phát, 2020, Nghiên cứu đặc điểm sinh học của một số

- chủng vi sinh vật có hoạt tính kháng nấm phân lập từ cây sâm Ngọc Linh. In *Kỷ yếu Hội nghị Khoa học Công nghệ sinh học toàn quốc 2020*, tr. 364–370, Nhà xuất bản Khoa học tự nhiên và Công nghệ.
89. Djemouai, N., Meklat, A., Gaceb-Terrak, R., Youcef, K. O. H., Nacer, A., Saadi, S. A., Saad, S., Verheecke-Vaessen, C., Bouras, N., 2022, *Streptomyces* species from the rhizosphere of the medicinal plant *Artemisia herba-alba* Asso: screening for biological activities: Biological activities of rhizospheric *Streptomyces* strains, *Biologia*, 77(8), pp. 2281–2299.
 90. Quach, N. T., Vu, T. H. N., Le, M. V., Tran, X. K., Nguyen, V. T., Ngo, C. C., Le, T.T.X., Phi, Q.T., 2026, Functional and Genomic Characterization of *Streptomyces albus* VCCM 22715 as an Antifungal Biocontrol and Plant Growth-Promoting Agent for *Panax vietnamensis*, *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 20(1), pp. 700 -709.
 91. Yun, T., Zang, X., Amjad, M., Vafadar, F., Zahoor, Li, X., Ding, Z.; Jing, T.; He, Y.; Eissa, M. A.; Ma, W., Xie, J, 2025, Antifungal activity of *Streptomyces lydicus* 6G-OA-10 against *Colletotrichum gloeosporioides*: Implications for avocado anthracnose control, *Horticultural Plant Journal*, S2468014125001517.
 92. YuHao, Q., 2026, Isolation and identification of *Streptomyces murinus* XF-3 and its active metabolite actinomycin D against root rot disease of American ginseng. *Asian Journal of Agriculture and Biology*, e2025270.
 93. Nguyễn Thị Thủy Tiên, Nguyễn Huyền Trang, Nguyễn Thụy Đan Hiền, Lê Thanh Long, 2022, Đánh giá khả năng kháng nấm gây bệnh thối rễ sâm Ngọc Linh của các chủng *Streptomyces* phân lập từ vùng rễ, *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, 20(2), tr. 1591–1598.
 94. Qi, D., Zou, L., Zhou, D., Zhang, M., Wei, Y., Zhang, L., Li, Q., Wang, W., 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, 722661.
 95. Evangelista-Martínez, Z., Contreras-Leal, E. A., Corona-Pedraza, L. F., Gastélum-Martínez, É., 2020, Biocontrol potential of *Streptomyces* sp. CACIS-1.5CA against phytopathogenic fungi causing postharvest fruit diseases, *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 30(1), 117.
 96. Gasmí, M., Kitouni, M., Carro, L., Pujic, P., Normand, P., Boubakri, H., 2019, Chitinolytic actinobacteria isolated from an Algerian semi-arid soil:

- development of an antifungal chitinase-dependent assay and GH18 chitinase gene identification, *Annals of Microbiology*, 69(4), pp. 395–405.
97. Ekundayo, F. O., Folorunsho, A. E., Ibanmi, T. A., Olabanji, O. B., 2022, Antifungal activity of chitinase produced by *Streptomyces* species isolated from grassland soils in Futa Area, Akure, *Bulletin of the National Research Centre*, 46(1), 95.
 98. Chu Thanh Binh, 2024, Hoạt tính đối kháng với vi sinh vật gây bệnh cho người của chủng xạ khuẩn *Streptomyces* MIP_GN36 phân lập từ đất vùng rễ cây gừng. *Tạp chí Y học Quân sự*, 369, tr. 52-57.
 99. Khamna, S., Yokota, A., Lumyong, S., 2009, Actinomycetes isolated from medicinal plant rhizosphere soils: diversity and screening of antifungal compounds, indole-3-acetic acid and siderophore production, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(4), pp. 649–655.
 100. Lasudee, K., Tokuyama, S., Lumyong, S., Pathom-aree, W., 2018, Actinobacteria Associated With Arbuscular Mycorrhizal Funneliformis mosseae Spores, Taxonomic Characterization and Their Beneficial Traits to Plants: Evidence Obtained From Mung Bean (*Vigna radiata*) and Thai Jasmine Rice (*Oryza sativa*), *Frontiers in Microbiology*, 9, 1247.
 101. Khamna, S., Yokota, A., Peberdy, J. F., Lumyong, S., 2010, Indole-3-acetic acid production by *Streptomyces* sp. isolated from some Thai medicinal plant rhizosphere soils, *EurAsian Journal of Biosciences*, pp. 23–32.
 102. Zhou, X., Li, P., Sun, Y., Zhang, Z., Yao, C., Li, Q., Wang, Y., 2024, Biological production and simulated moving bed purification of streptothricin F from food waste digestate. *Green Chemistry*, 26(24), pp. 11963–11975.
 103. Maruyama, C., Toyoda, J., Kato, Y., Izumikawa, M., Takagi, M., Shin-ya, K., Nishikawa, M., Kitani, S., Hamano, Y., 2012, A stand-alone adenylation domain forms amide bonds in streptothricin biosynthesis, *Nature Chemical Biology*, 8(9), pp. 791–797.
 104. Barona-Gómez, F., Lautru, S., Francou, F.-X., Leblond, P., Pernodet, J.-L., Challis, G. L., 2006, Multiple biosynthetic and uptake systems mediate siderophore-dependent iron acquisition in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877, *Microbiology*, 152(11), pp. 3355–3366.
 105. Hjort, K., Presti, I., Elväng, A., Marinelli, F., Sjöling, S., 2014, Bacterial chitinase with phytopathogen control capacity from suppressive soil revealed

- by functional metagenomics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(6), pp. 2819–2828.
106. Lv, C., Gu, T., Ma, R., Yao, W., Huang, Y., Gu, J., Zhao, G., 2021, Biochemical characterization of a GH19 chitinase from *Streptomyces alfalfae* and its applications in crystalline chitin conversion and biocontrol, *International Journal of Biological Macromolecules*, 167, pp. 193–201.


PHỤ LỤC

Phụ lục 1: Trình tự 16s rRNA của chủng xạ khuẩn PV1

>PZ146952.1 *Streptomyces globosus* strain PV1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

CATGGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGC
 AAGTCGAACGATGAACCTCCTTCGGGAGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACA
 CGTGGGCAATCTGCCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCG
 GATACGACTGCGGAAGGCATCTTCCGCGGTGGAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAG
 CCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTA
 GCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTA
 CGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGC
 CGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGA
 AAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTA
 ATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGG
 CCAGTCACGTCGGATGTGAAAGCCCGAGGCTTAACCTCGGGTCTGCATTCGATACG
 GGCTGGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCG
 CAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCATTACTGACGC
 TGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCG
 TAAACGTTGGGAACTAGGTGTTGGCGACATTCCACGTCGTCGGTGCCGCAGCTAAC
 GCATTAAGTTCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTG
 ACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAA
 CCTTACCAAGGCTTGACATATACCGGAAACATCCAGAGATGGGTGCCCCCTTGTGG
 TCGGTATACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTA
 AGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTGTGTTGCCAGCATGCCCTTCGGGGTGA
 TGGGGACTCACAGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCA
 AGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAAT
 GAGCTGCGATAACCGTGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATT
 GGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAT
 TGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAG
 TCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCTTGTGGAGGGAGCCGTGCAAGGTGG
 GACTGGCGATTGGGACGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGG
 ATCACCTCCTTT

Phụ lục 2: Thông tin đăng ký trình tự toàn bộ hệ gen chủng *Streptomyces globosus* PV1 trên NCBI


National Library of Medicine
National Center for Biotechnology Information

Nucleotide Advanced

GenBank ▾

Send to: ▾

Streptomyces globosus strain PV1, whole genome shotgun sequencing project

GenBank: JBVQCE000000000.1

i This entry is the master record for a whole genome shotgun sequencing project and contains no sequence data.

Go to: ▾

LOCUS JBVQCE010000000 307 rc DNA linear BCT 07-MAR-2026
 DEFINITION Streptomyces globosus strain PV1, whole genome shotgun sequencing project.
 ACCESSION JBVQCE000000000
 VERSION JBVQCE000000000.1
 DBLINK BioProject: [PRJNA1429808](#)
 BioSample: [SAMN56218128](#)
 KEYWORDS WGS.
 SOURCE Streptomyces globosus
 ORGANISM [Streptomyces globosus](#)
 Bacteria; Bacillati; Actinomycetota; Actinomycetes;
 Kitasatosporales; Streptomycetaceae; Streptomyces.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 307)
 AUTHORS Tran,K.T.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (01-MAR-2026) Institute of Biology, Vietnam Academy of Science and Technology, 18 Hoang Quoc Viet Road, Hanoi 100000, Viet Nam
 COMMENT The Streptomyces globosus whole genome shotgun (WGS) project has the project accession JBVQCE000000000. This version of the project (01) has the accession number JBVQCE010000000, and consists of sequences JBVQCE010000001-JBVQCE010000307. The annotation was added by the NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP). Information about PGAP can be found here: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_prok/

Phụ lục 3: So sánh các nhóm chức năng hệ thống con và số lượng gen của chủng PV1 với các chủng tham chiếu

Nhóm chức năng	PV1	<i>Streptomyces globosus</i> LZH-48	<i>Streptomyces globosus</i> JCM 13859
Amino Acids and Derivatives	344	351	379
Carbohydrates	241	252	265
Protein Metabolism	220	240	247
Cofactors, Vitamins, Prosthetic Groups, Pigments	176	170	196
Fatty Acids, Lipids, and Isoprenoids	139	137	151
Respiration	111	114	116
Nucleosides and Nucleotides	95	102	106
DNA Metabolism	87	87	106
RNA Metabolism	48	47	49
Stress Response	42	45	41
Cell Wall and Capsule	39	37	42
Virulence, Disease and Defense	36	39	45
Membrane Transport	26	41	33
Miscellaneous	26	25	32
Iron acquisition and metabolism	32	36	32
Phosphorus Metabolism	23	24	24
Regulation and Cell signaling	23	22	23
Secondary Metabolism	18	13	11
Nitrogen Metabolism	17	16	27
Metabolism of Aromatic Compounds	14	13	15
Potassium metabolism	9	9	10
Sulfur Metabolism	6	6	6
Phages, Prophages, Transposable elements, Plasmids	0	0	2
Dormancy and Sporulation	1	1	1

Phụ lục 4: Các cụm BGC được dự đoán bằng antiSMASH của chủng PV1

Vùng	Loại BGC	Kích thước	Cụm gen dự đoán	Mức độ tương đồng	Hoạt tính sinh học
2.1	Terpene	21,038	-	-	-
7.1	Lanthipeptide-class-i	26,454	-	-	-
10.1	terpene	21,092	-	-	-
12.1	T1PKS, hglE-KS	51,792	-	-	-
16.1	terpene-precursor	21,065	-	-	-
20.1	tripeptide	21,380	-	-	-
32.1	CDPS	20,741	-	-	-
61.1	RiPP-like	11,308	-	-	-
65.1	butyrolactone	7,772	-	-	-
65.2	RiPP-like	12,349	-	-	-
65.3	NI-siderophore	15,925	-	-	-
75.1	terpene	17,051	-	-	-
76.1	NRPS, lanthipeptide-class-ii	34,018	-	-	-
78.1	terpene	22,220	-	-	-
91.1	Amglyccycl	19,915	-	-	-
97.1	NRPS-like, T1PKS	28,139	-	-	-
105.1	HglE-KS	24,254	-	-	-
108.1	Lanthipeptide-class-i	16,795	-	-	-
147.1	Lanthipeptide-class-i	14,943	-	-	-
159.1	NI-siderophore	14,675	-	-	-
161.1	RiPP-like	9,559	-	-	-
162.1	Terpene	14,19	-	-	-

197.1	HgI-E-KS	9,446	-	-	-
219.1	Terpene	7,657	-	-	-
222.1	NRPS-like	7,419	-	-	-
27.1	NRPS-like, T1PKS	62,472	Maduropeptin	Thấp	-
43.1	T1PKS	27,493	Neocarzinostatin	Thấp	-
47.1	T2PKS, butyrolactone	47,490	Aureonuclemycin	Thấp	-
56.1	T1PKS	44,211	Oligomycin	Thấp	-
62.1	Azole-containing- RiPP	16,579	Lactazole	Thấp	-
63.1	Hydrogen-cyanide	12,937	Aborycin	Thấp	-
77.1	T1PKS	33,959	Concanamycin A	Thấp	-
109.1	NRPS-like	23,904	Lipstatin	Thấp	-
17.1	NRP- metallophore, NRPS, ectoine	60,111	Peucechelin	Trung bình	Thu nhận sắt
28.1	Lanthipeptide- class-i, NRPS, NRPS-like	55,689	Streptothricin	Trung bình	Kháng khuẩn
29.1	NRPS	61,343	Leupeptin	Trung bình	Ức chế Protease
52.1	T3PKS, guanidinotides	27,158	Pheganomycin	Trung bình	Kháng khuẩn
80.1	NRPS-like, T1PKS	33,222	Candicidin	Trung bình	Kháng nấm
4.1	T1PKS, ectoine, transAT-PKS, butyrolactone, NRPS, linaridin	120,399	Kirromycin	Cao	Kháng khuẩn
6.1	NI-siderophore	29,785	Desferrioxamine B/E	Cao	Thu nhận sắt

18.1	NRP-metallophore, NRPS, terpene	60,149	Mirubactin	Cao	Thu nhận sắt
19.1	Lanthipeptide-class-iv	14,162	Venezuelin	Cao	Kháng vi sinh vật
26.1	Melanin, terpene	40,497	Melanin	Cao	Sắc tố bảo vệ/kháng khuẩn
34.1	Terpene	28,258	Isorenieratene	Cao	Sắc tố/chống oxy hóa
36.1	T3PKS	35,303	Flaviolin	Cao	Sắc tố/chống oxy hóa