



Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ

Số chuyên đề: Công nghệ Sinh học

website: [sj.ctu.edu.vn](http://sj.ctu.edu.vn)



DOI:10.22144/ctu.jsi.2019.045

## PHÂN LẬP THỰC KHUẨN THỂ TỪ ĐẤT TRỒNG CÂY DƯỢC LIỆU CÓ KHẢ NĂNG ỨC CHẾ VI KHUẨN *Ralstonia solanacearum* Ở MỘT SỐ TỈNH ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG

Trương Thị Bích Vân<sup>1\*</sup>, Nguyễn Ngọc Hải Uyên<sup>1</sup>, Nguyễn Song Hân<sup>1</sup>, Nguyễn Thanh Như Ngọc<sup>1</sup>, Nguyễn Văn Trúc<sup>1</sup>, Lê Tuấn Kiệt<sup>1</sup>, Mã Ngọc Thiên<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Bích Hiền<sup>1</sup>, Nguyễn Hoàng Vũ<sup>1</sup>, Lê Hoàng Bảo Ngọc<sup>2</sup> và Lê Nguyễn Khôi Nguyên<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

<sup>2</sup>Trường Đại học An Giang

\*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Trương Thị Bích Vân (email: [tbvan@ctu.edu.vn](mailto:tbvan@ctu.edu.vn))

### Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 13/11/2018

Ngày nhận bài sửa: 04/01/2019

Ngày duyệt đăng: 12/04/2019

### Title:

Isolating bacteriophages from medicinal plant field soils having ability to infect *Ralstonia solanacearum*, a phytopathogenic bacterial wilt in some Mekong Delta provinces

### Từ khóa:

Bệnh héo xanh, đĩnh lăng, gừng, húng chanh, nghệ, *Ralstonia solanacearum*, thực khuẩn thể

### Keywords:

Bacteriophage, bacterial wilt, *Curcuma longa* L, *Coleus aromaticus* Benth, *Polyscias fruticosa* L, *Zingiber officinale*

### ABSTRACT

*Ralstonia solanacearum* is a phytopathogenic bacterium which has been recorded on more than 200 species belonging to 50 botanical families. To prevent wilt disease, farmers often use chemical compounds control the bacterium, however, this measure has shown negative impacts affecting the environment. Bacteriophage can infect bacteria and the use of bacteriophage is considered as a potential biological method in bio-controlling bacterial wilt disease. The aim of this study was carried out to isolate bacteriophages from the soil of medicinal plants that have lysis bacteria that cause wilt disease on plants. The bacteriophages were isolated from the soil and surveyed base on the double agar-plaque assay method. Thirty five bacteriophages were isolated from soil samples of medicinal plants such as *Zingiber officinale*, *Curcuma longa* L., *Coleus aromaticus* Benth and *Polyscias fruticosa* L. The host range of bacteriophages showed that a total of 29 phages have clear plaques on 9 *Ralstonia solanacearum* strains. Particularly, seven bacteriophage strains named as  $\phi$ G7,  $\phi$ G8,  $\phi$ DL3,  $\phi$ DL6,  $\phi$ H6,  $\phi$ H23 and  $\phi$ H24 had wide host range and capable of lysis on *Ralstonia solanacearum* more than 72 hours in vitro conditions.

### TÓM TẮT

*Ralstonia solanacearum* là vi khuẩn gây bệnh héo xanh trên 200 loài thực vật thuộc 50 họ khác nhau và được xếp thứ hai trong danh sách các tác nhân gây bệnh nguy hiểm nhất trên cây trồng. Để phòng trị bệnh héo xanh, nông dân thường sử dụng các biện pháp hóa học, tuy nhiên biện pháp này đã cho thấy những tác động tiêu cực làm ảnh hưởng đến môi trường. Thực khuẩn thể ký sinh và ức chế vi khuẩn và sử dụng thực khuẩn thể được xem là biện pháp sinh học tiềm năng trong việc phòng trừ bệnh héo xanh. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm phân lập các dòng thực khuẩn thể từ đất trồng cây dược liệu có khả năng ly giải vi khuẩn gây bệnh héo xanh trên cây trồng. Thực khuẩn thể được phân lập từ đất và khảo sát vết tan dựa vào phương pháp agar 2 lớp. Ba mươi lăm dòng thực khuẩn thể có khả năng ức chế vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* đã được phân lập từ mẫu đất trồng cây dược liệu như cây gừng (*Zingiber officinale*), nghệ (*Curcuma longa* L.), húng chanh (*Coleus aromaticus* Benth) và đĩnh lăng (*Polyscias fruticosa* L.). Kết quả đánh giá phổ ký chủ của các dòng thực khuẩn thể phân lập cho thấy có 29 dòng thực khuẩn thể tạo vết tan rõ ràng đối với 9 dòng vi khuẩn gây bệnh *Ralstonia solanacearum*. Đặc biệt 7 dòng thực khuẩn thể ký hiệu  $\phi$ G7,  $\phi$ G8,  $\phi$ DL3,  $\phi$ DL6,  $\phi$ H6,  $\phi$ H23 và  $\phi$ H24 có khả năng ly giải vi khuẩn hơn 72 giờ trong điều kiện phòng thí nghiệm.

Trích dẫn: Trương Thị Bích Vân, Nguyễn Ngọc Hải Uyên, Nguyễn Song Hân, Nguyễn Thanh Như Ngọc, Nguyễn Văn Trúc, Lê Tuấn Kiệt, Mã Ngọc Thiên, Nguyễn Thị Bích Hiền, Nguyễn Hoàng Vũ, Lê Hoàng Bảo Ngọc và Lê Nguyễn Khôi Nguyên, 2019. Phân lập thực khuẩn thể từ đất trồng cây dược liệu có khả năng ức chế vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* ở một số tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 55(Số chuyên đề: Công nghệ Sinh học)(2): 65-73.

## 1 MỞ ĐẦU

*Ralstonia solanacearum* (*R. solanacearum*) là tác nhân gây bệnh héo xanh trên 200 loài thực vật thuộc 50 họ khác nhau, vi khuẩn gây hại trên nhiều loài cây trồng như cà chua, khoai tây, ớt, lạc, chuối,... (Hayward, 2000). Năm 1892, Halsted lần đầu tiên nghiên cứu về bệnh héo xanh trên cây cà chua (Griffith *et al.*, 1997) Trong qui định của liên minh Châu Âu, *R. solanacearum* được xem là một trong những sinh vật cần phải kiểm soát và cách ly. Vi khuẩn *R. solanacearum* dễ dàng lây nhiễm qua đất, nước tưới, thiết bị nông nghiệp, vật dụng bị nhiễm (Janse, 1996). Bệnh do vi khuẩn *R. solanacearum* gây ra rất khó phòng trị và gây tổn thất nặng nề do vi khuẩn có phạm vi ký chủ rộng và lưu tồn lâu trong đất (Nguyễn Tất Thắng và *ctv.*, 2011). Ngày nay, biện pháp phòng trị bệnh bằng hóa chất đã cho thấy những tác động tiêu cực như mất cân bằng sinh thái, dễ dẫn đến việc kháng thuốc của vi sinh vật gây bệnh cây trồng và gây ô nhiễm môi trường sinh thái. Trong xu hướng tiến đến một nền nông nghiệp hữu cơ, việc đẩy mạnh ứng dụng các chế phẩm sinh học nhằm cải tạo đất, cân bằng hệ vi sinh vật đất đã và đang là vấn đề cấp thiết của Việt Nam nói riêng và thế giới nói chung. Việc sử dụng biện pháp sinh học bằng thực khuẩn thể có đặc tính ức chế sự phát triển vi khuẩn gây bệnh được coi là sự lựa chọn phù hợp.

Thực khuẩn thể (TKT) được phát hiện bởi Twort năm 1915 và d'Herelle năm 1917 (Harper and Kutter, 2008). Các nghiên cứu chuyên sâu về TKT đã được thực hiện từ năm 1920 đến 1940 bao gồm các nghiên cứu do d'Herelle thực hiện dùng để điều trị bệnh tả và các bệnh về đường ruột khác, các kết quả nghiên cứu này được ứng dụng để chữa cho hơn một triệu bệnh nhân mắc bệnh tả và kiết lị ở vùng Assam, Ấn Độ (Summers, 2016). Trong nông nghiệp, TKT được áp dụng trong việc phòng trừ vi khuẩn *Erwinia amylovora* trên cây đào (Schnabel and Jones, 2001), vi khuẩn *R. solanacearum* và *Xanthomonas campestris* gây bệnh héo xanh và đốm trên cà chua (Fox, 2000). Việc sử dụng TKT để kiểm soát dịch bệnh là phương pháp bảo vệ thực vật có triển vọng cao. Phương pháp này có thể được sử dụng như một phần của chiến lược quản lý dịch hại tổng hợp (Jones *et al.*, 2007). Có nhiều nghiên cứu về thực khuẩn ký sinh trên vi khuẩn gây bệnh trên thực vật, trong đó nổi bật với những nghiên cứu về việc kiểm soát bệnh héo xanh do vi khuẩn *R. solanacearum* gây ra trên đối tượng cây trồng có giá trị kinh tế cao như: cà chua, khoai tây và thuốc lá,... đã được công bố như phage  $\phi$ RSL1,  $\phi$ RSA1 (Fujiwara *et al.*, 2008; Yamada *et al.*, 2010), Raltonia phage  $\phi$ RS603,  $\phi$ RS611 và  $\phi$ RS138 (Van *et al.*, 2014; 2015).

Ở Việt Nam trong những năm gần đây đã có một số nghiên cứu sử dụng TKT trong phòng trị bệnh do vi khuẩn trên cây trồng như Nguyễn Thị Trúc Giang (2014) đã phân lập TKT có khả năng ức chế vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* gây bệnh cháy bìa lá lúa. Nghiên cứu phân lập TKT phân giải vi khuẩn *Escherichia coli* gây bệnh tiêu chảy ở gà Mai Huỳnh Dư An (2016). Nghiên cứu đánh giá hiệu quả phòng trừ bệnh thối hạt trên lúa do vi khuẩn *Burkholderia glumae* (Phan Quốc Huy, 2016). Trần Hưng Minh (2016) tiến hành phân lập và bước đầu đánh giá hiệu quả của TKT trong phòng trừ bệnh thối gốc lúa do vi khuẩn *Erwinia chrysanthemi*.

Trước đây các nghiên cứu về phân lập TKT được tiến hành trên các mẫu bệnh hoặc môi trường đất, nước có chứa mẫu bệnh trong khi các nghiên cứu về TKT trên mẫu đất trồng cây được liệu hầu như chưa có. Các nghiên cứu về vi sinh vật nội sinh phân lập từ các cây được liệu như phân lập nấm nội sinh từ rễ cây Nghệ ức chế nấm *Colletotrichum gloeosporioides* gây bệnh đốm lá trên cây Nghệ (Gupta *et al.*, 2016). Theo công bố của Krishnapura and Belur (2015) (2016) đã phân lập được 50 dòng vi sinh vật nội sinh từ rễ các cây thuộc họ gừng (*Zingiberaceae*). Yuan and Gao (2016) thực hiện ba nghiên cứu về TKT phân lập từ vùng rễ cây gừng có khả năng ức chế vi khuẩn *Bacillus pumilus* gây bệnh thối rễ gừng. Cây đinh lăng được biết đến như một loại thuốc nam có khả năng kháng khuẩn và kháng viêm (Đỗ Tất Lợi, 2004), bên cạnh đó những hợp chất hóa học tồn tại trong tinh dầu của lá húng chanh được các nhà khoa học nghiên cứu, tìm hiểu về chức năng và hoạt tính của chúng trong việc kháng khuẩn và diệt nấm (Prudent, 2011). Các nghiên cứu về ứng dụng TKT để ức chế vi khuẩn cho đến nay vẫn còn hạn chế do TKT là một loại virus nên yếu tố về an toàn sinh học đặt lên hàng đầu. Những cây được liệu kể trên từ lâu đã được biết đến như là những cây có vị thuốc chứa nhiều hợp chất kháng khuẩn trong dân gian. Chính vì vậy, nghiên cứu phân lập TKT từ đất trồng cây được liệu có khả năng ức chế vi khuẩn *R. solanacearum* được thực hiện nhằm tìm được nguồn TKT có khả năng kháng khuẩn mà không phân lập trực tiếp từ mẫu cây bệnh.

## 2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Hóa chất và vật liệu thí nghiệm

- Nguồn TKT phân lập từ các mẫu đất trồng cây được liệu (gừng, nghệ, húng chanh và đinh lăng) thu tại nhà vườn một số tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long (thành phố Cần Thơ, các tỉnh Sóc Trăng và Vĩnh Long).
- Nguồn vi khuẩn: 9 dòng *R. Solanacearum* được phân lập từ cây bị bệnh héo xanh đánh số từ

RS2 (phân lập từ cây Vụn thọt), RS3 (phân lập từ cây dưa leo), RS5 (phân lập từ cây gừng), RS6, RS7 và RS8 (phân lập từ cây hoa cúc), RS4, RS9 và RS10 (phân lập từ cây ớt) được cung cấp từ Bộ môn Bảo vệ thực vật, Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ.

– Môi trường nuôi cấy vi khuẩn và thực khuẩn King's B (Shurtleff and Averre, 1997) gồm có pepton,  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ ,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , agar, nước cất, chuẩn độ pH 7,0 – 7,2.

## 2.2 Phân lập thực khuẩn thể

Nghiên cứu sử dụng phương pháp khảo sát vết tan (plaque) agar hai lớp (double agar-plaque assay) (Kropinski, 2009): 10 g đất trồng cây được liệu cho vào ống falcon chứa 20 mL môi trường King's B lỏng và lắc với vận tốc 150 rpm trong 24 giờ để tăng sinh số lượng thực khuẩn thể. Sau đó, dung dịch được ly tâm với vận tốc 12.000 rpm trong 10 phút, thu lấy phần dịch trong là TKT thô. Hỗn hợp gồm dung dịch TKT thô, vi khuẩn *R. solanacearum* và 3 mL môi trường King's B 0,5% agar được trải đĩa môi trường King's B 1,7% agar. Đĩa được ủ ở 28°C trong 24 giờ và quan sát sự hình thành vết tan của thực khuẩn thể. Từng vết tan riêng biệt được hoà tan với 1 mL nước cất, lắc đều và giữ ở 4°C trong 24 giờ, ly tâm hỗn hợp với vận tốc 6.000 rpm trong 5 phút và thu lấy phần dịch trong, lặp lại các bước phân lập TKT đến khi quan sát thấy sự đồng đều về kích thước vết tan.

## 2.3 Khảo sát phổ ký chủ của các dòng thực khuẩn thể

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại và sử dụng phương pháp nhỏ giọt trên bề mặt agar hai lớp (double agar – drop method) (Kropinski, 2009).

Đĩa petri môi trường King's B 1,7% được kê ô và đánh số, cho vào đĩa hỗn hợp gồm 3 mL môi trường King's B 0,5% agar và 1 mL huyền phù từng dòng vi khuẩn *R. solanacearum* ( $OD_{600} = 0,5$ ) trên tất cả 9 dòng vi khuẩn và phơi đĩa 15-20 phút. Sau đó, dùng micropipette rút 2  $\mu$ L huyền phù từng dòng thực khuẩn nhỏ vào các ô tương ứng. Đĩa petri được ủ ở 28°C trong 24 giờ và quan sát vết tan được hình thành.

## 2.4 Khảo sát khả năng ức chế vi khuẩn *R. solanacearum* trong điều kiện phòng thí nghiệm

### 2.4.1 Khảo sát đường kính vết tan của các chủng thực khuẩn thể

Nghiên cứu sử dụng phương pháp agar hai lớp (double layer agar – plaque assay) (Kropinski, 2009) với bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên 3 lần lặp lại. Trộn 200  $\mu$ L TKT ( $10^8$  PFU/mL) và 200  $\mu$ L dịch huyền phù vi khuẩn *R. solanacearum* ( $OD_{600nm}=0,5$  trong

đương mật số vi khuẩn sống là  $5,47 \times 10^5$  CFU/mL) vào 3 mL môi trường King's B 0,5% agar. Hỗn hợp được hòa đều và trải trên môi trường King's B. Đĩa được ủ trong điều kiện 28°C quan sát và đo ngẫu nhiên đường kính 10 vết tan trên 1 đĩa petri của từng dòng TKT sau 24 giờ, 48 giờ và 72 giờ (đơn vị tính: mm).

### 2.4.2 So sánh số lượng khuẩn lạc của dòng vi khuẩn *R. solanacearum* RS10 khi có và không chủng riêng lẻ 2 dòng thực khuẩn thể

Nghiên cứu được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại và sử dụng phương pháp trải đếm để đánh giá phần trăm vi khuẩn *R. solanacearum* bị ức chế bởi các dòng thực khuẩn. Huyền phù vi khuẩn được pha loãng đến  $10^{-6}$ . Đĩa thứ 1: trải 50  $\mu$ L trên môi trường King's B 1,7% agar. Đĩa thứ 2: trải 50  $\mu$ L hỗn hợp huyền phù vi khuẩn và 10  $\mu$ L thực khuẩn thể trên môi trường King's B 1,7% agar. Đĩa được ủ ở 28°C và tiến hành đếm số khuẩn lạc của vi khuẩn xuất hiện sau 24 giờ, 48 giờ và 72 giờ.

## 2.5 Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu thí nghiệm được tính toán và xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2013. Kiểm định Tukey và phép thử Duncan được sử dụng để so sánh các giá trị trung bình ở độ tin cậy 95%.

## 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1 Phân lập các dòng thực khuẩn thể từ đất trồng cây được liệu ở một số tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long

Các mẫu đất vùng rẫy trồng gừng, nghệ, húng chanh và đinh lăng ở thành phố Cần Thơ và các tỉnh Sóc Trăng và Vĩnh Long đã phân lập được 35 dòng TKT (Bảng 1). Trong đó, 13 dòng TKT được phân lập từ vùng đất trồng gừng (phage gừng:  $\phi$ G) và 5 dòng được phân lập từ đất vùng rẫy của cây nghệ (phage Nghệ:  $\phi$ N) ở thành phố Cần Thơ và tỉnh Sóc Trăng. Từ mẫu đất vùng rẫy cây húng chanh ở địa bàn thành phố Cần Thơ và tỉnh Vĩnh Long phân lập được 11 dòng TKT (phage Húng chanh:  $\phi$ H) có khả năng ức chế vi khuẩn *R. solanacearum*. Trong đó, 6 dòng được tìm thấy ở thành phố Cần Thơ và 5 dòng ở tỉnh Vĩnh Long. Tương tự, có 6 dòng TKT được phân lập từ đất trồng cây đinh lăng (phage đinh lăng:  $\phi$ DL).

Theo Williamson *et al.* (2005), TKT tồn tại trong đất với mật số từ  $10^8$  đến  $10^9$  trong mỗi gram đất khô. Nghiên cứu của Kalpage *et al.* (2015) đã phân lập được 6 dòng TKT hiệu quả trong việc kiểm soát vi khuẩn *R. solanacearum* gây bệnh héo xanh trên cà chua từ vùng đất trồng rau và vùng giàu chất hữu cơ. Theo Wommack and Colwell (2000) TKT có thể tìm thấy chủ yếu ở những nơi có vi khuẩn tồn tại bao gồm cả đất và mẫu cây bệnh. Kết quả này cũng tương đồng kết quả nghiên cứu của Yuan and Gao

(2016) nghiên cứu về TKT phân lập từ vùng rễ cây gừng có khả năng ức chế vi khuẩn *Bacillus pumilus* gây bệnh thối rễ gừng. Tuy nhiên, chưa có nghiên cứu về TKT được phân lập từ đất vùng rễ cây đình lăng. Ngoài ra, một số nghiên cứu về vi sinh vật được phân lập từ các cây cùng họ Araliaceae cũng

đã được thực hiện. Nghiên cứu của Zheng *et al.* (2017) cho thấy đã phân lập được tổng cộng 89 dòng nấm nội sinh từ rễ, thân, lá và hạt của *Panax notoginseng* có khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh thối rễ.

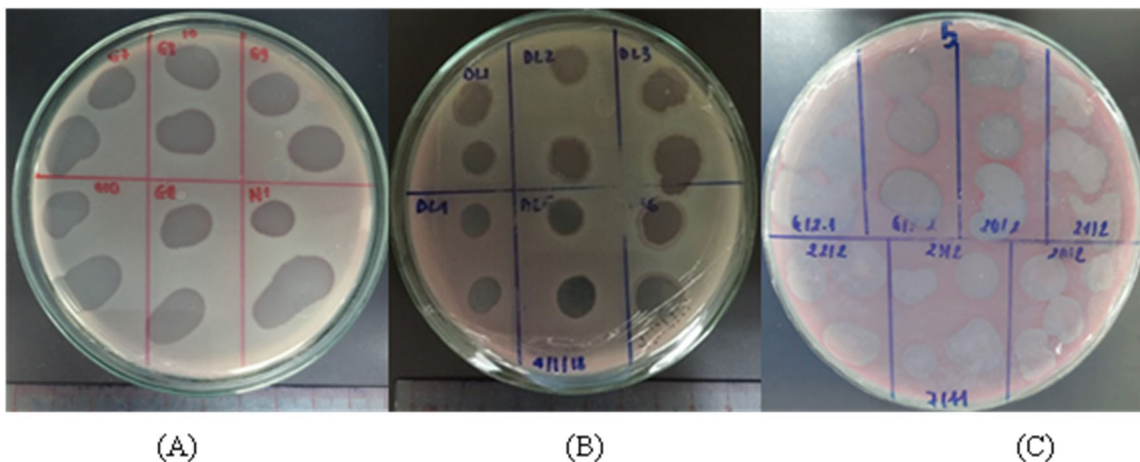
**Bảng 1: Các dòng TKT được phân lập từ đất trồng cây dược liệu ở một số tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long**

Mã TKT	Loại trồng cây	Địa điểm phân lập
φG1, φG2, φG3, φG4, φG5, φG12	Gừng	Quận Ninh Kiều, thành phố Cần Thơ
φG6, φG7, φG8, φG9, φG10, φG11, φ11	Gừng	Huyện Châu Thành, tỉnh Sóc Trăng
φN1, φN2, φN3, φN4	Nghệ	Quận Ninh Kiều, thành phố Cần Thơ
φN12	Nghệ	Huyện Châu Thành, tỉnh Sóc Trăng
φH1, φH2, φH3, φH4, φH5, φH6	Húng chanh	Thành phố Cần Thơ
φH20, φH21, φH22, φH23, φH24	Húng chanh	Tỉnh Vĩnh Long
φDL1, φDL2, φDL3	Đình lăng	Phường Hưng Lợi, Quận Ninh Kiều, thành phố Cần Thơ
φDL4, φDL5	Đình lăng	Phường Xuân Khánh, Quận Ninh Kiều, thành phố Cần Thơ
φDL6	Đình lăng	Phường Long Tuyền, Quận Bình Thủy, thành phố Cần Thơ

**3.2 Khảo sát phổ ký chủ và đánh giá khả năng ức chế của TKT trên vi khuẩn *R. solanacearum***

Trong số 35 dòng TKT phân lập được chỉ có 6 dòng TKT thể hiện hoạt động ức chế vi khuẩn gây bệnh rất yếu vì xuất hiện vết tan mờ và không ổn định trong quá trình phân lập. Do đó, 29 dòng TKT còn lại cho vết tan rõ ràng và ổn định được lựa chọn để khảo sát phổ ký chủ dựa trên 9 dòng vi khuẩn *R. solanacearum* và kết quả được trình bày ở Bảng 2 cho thấy nhóm TKT được phân lập từ gừng và nghệ có khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh mạnh hơn cho vết tan rõ ràng. Đặc biệt là hai dòng TKT ký hiệu

φG7 và φG8 (Hình 1A) có khả năng ức chế vi khuẩn và ly giải hết toàn bộ bề mặt vi khuẩn trên đĩa và ức chế được 5 trong tổng số 9 dòng vi khuẩn ký chủ. Tương tự, cả 6 dòng TKT phân lập từ đất trồng đình lăng đều cho vết tan rõ ràng thể hiện khả năng ức chế vi khuẩn khá tốt (Hình 1B), trong đó hai dòng TKT ký hiệu φDL3 và φDL6 có khả năng xâm nhiễm được 3 dòng vi khuẩn gây bệnh. Bốn dòng TKT ký hiệu φDL1, φDL2, φDL4 và φDL5 có khả năng xâm nhiễm được 2 trong tổng số 9 dòng vi khuẩn gây bệnh thử nghiệm. Nhóm TKT phân lập được từ đất trồng cây Húng chanh cũng cho vết tan rõ ràng, thể hiện khả năng ức chế vi khuẩn mạnh (Hình 1C) và có phổ ký chủ gần giống nhau.



**Hình 1: Khả năng lây nhiễm và phổ ký chủ của thực khuẩn thể phân lập từ đất trồng gừng và nghệ (A); đình lăng (B) và húng chanh (C)**

Kết quả trình bày ở Bảng 2 cho thấy trong số 9 dòng vi khuẩn gây bệnh *R. solanacearum* được khảo

sát dòng vi khuẩn ký hiệu RS10 nhạy cảm nhất với TKT vì có đến 29 trong tổng số 29 TKT có khả năng

xâm nhiễm và ức chế dòng vi khuẩn này, tiếp đến là dòng vi khuẩn ký hiệu RS5 bị xâm nhiễm bởi 18 trong tổng số 29 TKT thử nghiệm, dòng vi khuẩn RS2 bị xâm nhiễm bởi 16 trong tổng số 29 TKT và dòng RS3 là dòng ít mẫn cảm nhất với TKT vì chỉ có 1 trong tổng số 29 TKT thử nghiệm có khả năng xâm nhiễm được dòng vi khuẩn này. Kutateladze and Adamia (2010) cho thấy TKT là 1 loài kí sinh rất chuyên biệt lên 1 loài vi khuẩn hoặc vài dòng trong cùng một loài. Trong nhóm TKT phân lập từ đất trồng gừng dòng TKT ký hiệu φG7 và φG8 có phổ ký chủ rộng nhất, thông qua việc xâm nhiễm 5 trong tổng số 9 dòng vi khuẩn gây bệnh thử nghiệm.

Trong nhóm TKT phân lập từ đất trồng húng chanh các dòng TKT ký hiệu φH6, φH20, φH21, φH22, φH23 và φH24 có phổ ký chủ khá rộng, có khả năng xâm nhiễm 5 trong tổng số 9 kí chủ. Trong nhóm TKT phân lập từ đất trồng đinh lăng các TKT ký hiệu φDL3 và φDL6 có khả năng xâm nhiễm 3 trong tổng số 9 ký chủ và 4 dòng TKT từ đất trồng đinh lăng còn lại chỉ có khả năng xâm nhiễm 2 trong tổng số 9 ký chủ. Kết quả này cho thấy TKT phân lập từ đất trồng cây Đinh lăng có ký chủ đặc hiệu trong khi TKT phân lập từ đất trồng gừng, nghệ và húng chanh có phổ ký chủ rộng hơn.

**Bảng 2: Phổ kí chủ của 29 dòng TKT được phân lập từ đất trồng cây dược liệu**

STT	TKT	Mã vi khuẩn										Số dòng VK
		RS2	RS3	RS4	RS5	RS6	RS7	RS8	RS9	RS10		
1	φG1	-	-	-	-	+	-	+	+	+	4	
2	φG2	+	-	-	-	+	-	+	-	+	4	
3	φG3	-	-	-	+	-	+	-	-	+	3	
4	φG4	-	-	-	-	+	-	-	-	+	2	
5	φG5	-	-	+	+	+	-	-	-	+	4	
6	φG6	+	-	+	+	-	-	-	-	+	4	
7	φG7	-	-	-	+	+	+	-	+	+	5	
8	φG8	-	+	-	+	-	+	-	+	+	5	
9	φG9	-	-	-	-	-	-	-	+	+	2	
10	φG10	+	-	-	-	-	-	-	-	+	2	
11	φG11	+	-	-	+	-	-	-	-	+	3	
12	φN1	+	-	-	+	-	-	-	-	+	3	
13	φH1	+	-	+	-	-	-	+	-	+	4	
14	φH2	+	-	+	-	-	-	+	-	+	4	
15	φH3	+	-	+	-	-	-	+	-	+	4	
16	φH4	+	-	+	-	-	-	+	-	+	4	
17	φH5	+	-	+	-	-	-	+	-	+	4	
18	φH6	+	-	+	+	-	-	+	-	+	5	
19	φH20	+	-	+	+	-	-	+	-	+	5	
20	φH21	+	-	+	+	-	-	+	-	+	5	
21	φH22	+	-	+	+	-	-	+	-	+	5	
22	φH23	+	-	+	+	-	-	+	-	+	5	
23	φH24	+	-	+	+	-	-	+	-	+	5	
24	φDL1	-	-	-	+	-	-	-	-	+	2	
25	φDL2	-	-	-	+	-	-	-	-	+	2	
26	φDL3	-	-	-	+	-	+	-	-	+	3	
27	φDL4	-	-	-	+	-	-	-	-	+	2	
28	φDL5	-	-	-	-	-	-	+	-	+	2	
29	φDL6	-	-	-	+	-	+	-	-	+	3	
Tổng số TKT kí sinh		16	1	13	18	5	5	14	4	29		

\* Ghi chú: dấu + là TKT xâm nhiễm vi khuẩn và dấu - là TKT không xâm nhiễm vi khuẩn

Kết quả phổ ký chủ cho thấy trong 9 dòng vi khuẩn *R. solanacearum*, RS10 là mẫn cảm với tất cả các dòng TKT, hầu hết 29 dòng TKT đều có thể xâm nhiễm trên RS10, kể đến là RS5 bị xâm nhiễm bởi 18/29 dòng TKT, RS2 có 16/29 dòng TKT xâm nhiễm. Kết quả cho thấy TKT có thể xâm nhiễm trên

hiều dòng vi khuẩn với mức độ mạnh yếu khác nhau thể hiện qua vết tan rã hay mờ và mỗi dòng TKT chỉ có 1 ký chủ chính. Muốn xác định hoạt tính sinh học của từng dòng TKT phải xác định được ký chủ chính của TKT đó.

**3.3 Khả năng phân giải vi khuẩn *R. solanacearum* trong điều kiện phòng thí nghiệm**

Kết quả về phổ ký chủ TKT xác định được RS10 và RS2 là 2 dòng vi khuẩn ký chủ chính của 7 dòng TKT cho hiệu quả phân giải mạnh nhất. Thí nghiệm đánh giá khả năng phân giải vi khuẩn gây bệnh của

7 dòng TKT  $\phi$ G7,  $\phi$ G8,  $\phi$ DL3,  $\phi$ DL6 trên ký chủ RS10 và  $\phi$ H6,  $\phi$ H23,  $\phi$ H24 trên ký chủ RS2 qua các thời điểm 24 giờ, 48 giờ và 72 giờ. Đường kính vết tan thể hiện khả năng phân giải hoàn toàn hay không hoàn toàn và khả năng kháng lại của vi khuẩn đối với TKT trong điều kiện phòng thí nghiệm.

**Bảng 3: Đường kính vết tan tạo bởi các dòng TKT khi xâm nhiễm vi khuẩn *R. solanacearum* trong điều kiện phòng thí nghiệm**

STT	Vi khuẩn	TKT	Đường kính vết tan		
			24 giờ	48 giờ	72 giờ
1	RS10	$\phi$ G7	3 <sup>a</sup>	8 <sup>b</sup>	8 <sup>b</sup>
2	RS10	$\phi$ G8	2 <sup>a</sup>	4 <sup>b</sup>	4 <sup>b</sup>
3	RS10	$\phi$ DL3	3,13 <sup>a</sup>	3,52 <sup>b</sup>	3,83 <sup>b</sup>
4	RS10	$\phi$ DL6	2,93 <sup>a</sup>	3,35 <sup>b</sup>	3,63 <sup>b</sup>
5	RS2	$\phi$ H6	1,833 <sup>a</sup>	1,367 <sup>b</sup>	0,9667 <sup>b</sup>
6	RS2	$\phi$ H23	2,767 <sup>a</sup>	2,4333 <sup>b</sup>	2,1667 <sup>b</sup>
7	RS2	$\phi$ H24	3,500 <sup>a</sup>	3,033 <sup>b</sup>	2,567 <sup>b</sup>

\*Ghi chú: các giá trị trung bình trong cùng một hàng có các mẫu tự theo sau giống nhau biểu thị sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 5% theo phép thử Duncan

Kết quả khảo sát đường kính vết tan của 7 dòng TKT đối với 2 dòng vi khuẩn gây bệnh sau 72 giờ thí nghiệm được trình bày ở Bảng 3 cho thấy đường kính vết tan của 7 dòng TKT thử nghiệm có sự khác biệt ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 5%. Đường kính vết tan của hai dòng TKT ký hiệu  $\phi$ G7 và  $\phi$ G8 đối với dòng vi khuẩn RS10 có chiều hướng tăng lên sau 48 giờ. Ở thời điểm 24 giờ thí nghiệm đường kính trung bình của vết tan của hai dòng  $\phi$ G7 và  $\phi$ G8 lần lượt đạt 3 mm và 2 mm nhưng đến 48 giờ đường kính vết tan tăng lên gấp đôi tương ứng với 8 mm và 4 mm và không thay đổi sau 72 giờ thí nghiệm. Hai dòng thực khuẩn thể  $\phi$ DL3 và  $\phi$ DL6, đường kính vết tan đối với dòng vi khuẩn RS10 ở thời điểm 24 giờ lần lượt đạt 3,13 và 2,93 mm. Thời điểm 48 giờ, đường kính vết tan của hai dòng thực khuẩn này đều có xu hướng tăng chậm và lần lượt đạt 3,52 mm và 3,35 mm. Thời điểm 72 giờ, đường kính của cả hai dòng thực khuẩn này tăng lên lần lượt đạt 3,83 và 3,63 mm. Kết quả trên cho thấy trên cùng một dòng vi khuẩn là RS10, 4 dòng thực khuẩn  $\phi$ G7,  $\phi$ G8,  $\phi$ DL3 và  $\phi$ DL6 cho hiệu quả phân giải vi khuẩn mạnh và ổn định. Ngược lại, kích thước vết tan có chiều hướng giảm theo thời gian thí nghiệm đối với 3 dòng TKT  $\phi$ H6,  $\phi$ H23 và  $\phi$ H24 trên ký chủ là vi khuẩn RS2. Ở thời điểm 24 giờ đường kính vết tan trung bình của 3 dòng thực khuẩn  $\phi$ H6,  $\phi$ H23 và  $\phi$ H24 lần lượt đạt 1,833 mm, 2,767 và 3,5 mm. Tuy nhiên, đến thời điểm 72 giờ thì kích thước vết tan giảm xuống lần lượt còn 0,9667 mm, 2,1667 mm và 2,567 mm. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Tan *et al.* (2009) đã phân lập được 132 dòng thực khuẩn từ nước cống có khả năng kiểm soát vi khuẩn *R. solanacearum* và 5 dòng thực khuẩn kiểm soát vi khuẩn *Erwinia chrysanthemi* nhưng các dòng

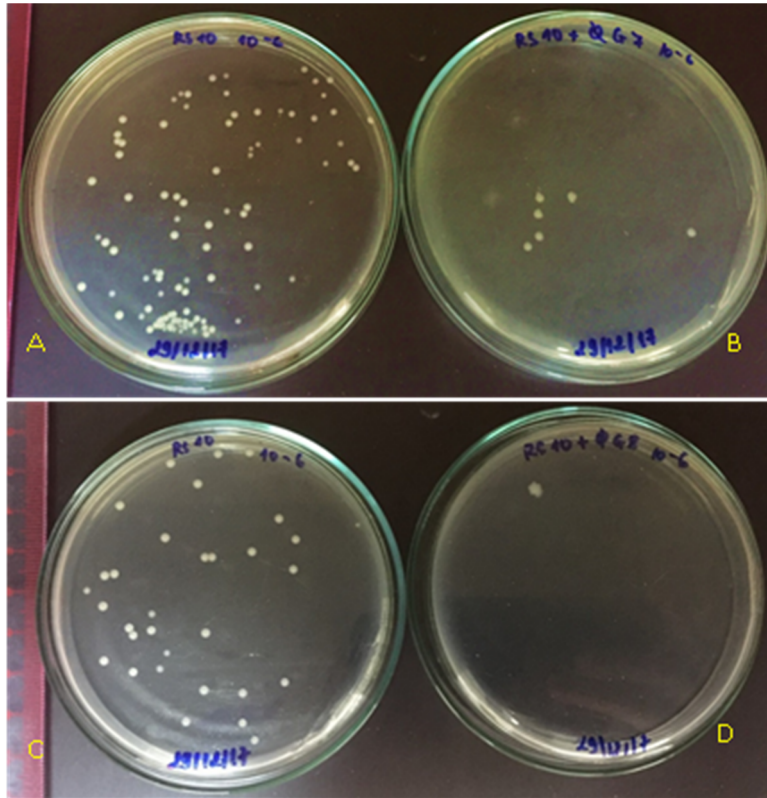
thực khuẩn này cho đường kính vết tan lớn hơn các dòng TKT khác từ 6 - 17 mm trong khoảng thời gian từ 24 đến 48 giờ. Đường kính vết tan có chiều hướng gia tăng và tạo thành đường viền mờ bên ngoài vết tan có thể được giải thích là do sự phân giải vi khuẩn gây bệnh của enzyme được tiết ra từ TKT nhằm phá hủy màng tế bào vi khuẩn gây bệnh (Cisek *et al.*, 2017). Kết quả này cũng phù hợp với Nguyễn Minh Tâm (2015) đã phân lập TKT từ mẫu bệnh héo xanh trên dưa leo và đường kính vết tan của 5 dòng TKT phân lập có khả năng kiểm soát vi khuẩn gây bệnh *R. solanacearum* dao động từ 3,73 - 8,11 mm trong khoảng thời gian từ 24 đến 72 giờ thí nghiệm.

**3.4 Số lượng khuẩn lạc của vi khuẩn RS10 trong điều kiện có và không chủng hai dòng thực khuẩn  $\phi$ G7 và  $\phi$ G8**

Kết quả so sánh số lượng khuẩn lạc của vi khuẩn RS10 trong điều kiện có và không chủng thực khuẩn thể  $\phi$ G7 và  $\phi$ G8 với 3 lần lặp lại cho thấy có sự khác biệt rõ rệt về mật số vi khuẩn giữa hai nghiệm thức có và không chủng thực khuẩn thể. Nghiệm thức đối chứng là vi khuẩn RS10 không chủng TKT có mật số vi khuẩn đạt 92 khuẩn lạc xuất hiện trên đĩa đếm trải tương đương với mật số  $1840 \times 10^6$  CFU/mL, cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với 2 nghiệm thức có chủng TKT  $\phi$ G7 và  $\phi$ G8, lần lượt là 4 và 5 khuẩn lạc trên đĩa đếm trải tương đương với mật số  $80 \times 10^6$  CFU/mL và  $100 \times 10^6$  CFU/mL cho thấy có sự giảm rõ rệt về mật số của vi khuẩn khi có chủng TKT. Hình 2 cho thấy sự khác biệt rõ về mật số khuẩn lạc của vi khuẩn RS10 giữa nghiệm thức đối chứng không chủng TKT (Hình 2A và 2C) với nghiệm thức chủng TKT  $\phi$ G7 và  $\phi$ G8 (Hình 2B và 2D).

Thông qua các chỉ tiêu đường kính vết tan 7 dòng TKT  $\phi$ G7,  $\phi$ G8,  $\phi$ DL3,  $\phi$ DL6 trên ký chủ RS10 và  $\phi$ H6,  $\phi$ H23,  $\phi$ H24 trên ký chủ RS2 qua các thời điểm 24 giờ, 48 giờ và 72 giờ và so sánh mật số vi khuẩn trên môi trường có và không có chủng hai dòng TKT  $\phi$ G7 và  $\phi$ G8 cho kết quả ức chế vi khuẩn

*R. solanacearum* khá mạnh trong điều kiện phòng thí nghiệm. Kết quả này cũng tương tự như các nghiên cứu của Makari *et al.* (2013) đã phân lập được dòng TKT ký hiệu HMPM-2012 có khả năng ức chế vi khuẩn *R. solanacearum* gây bệnh héo xanh trên gừng và cà chua.



**Hình 2: Mật số vi khuẩn RS10 ở nghiệm thức không chủng TKT (A và C) và ở nghiệm thức có chủng thực khuẩn thể G7 (B) và G8 (D)**

#### 4 KẾT LUẬN

Các mẫu đất trồng cây dược liệu như gừng, nghệ, đinh lăng và húng chanh ở các tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long phân lập được 35 dòng thực khuẩn thể, trong đó có 29 dòng TKT có khả năng ly giải vi khuẩn *R. solanacearum* cho hiệu quả tốt với vết tan rõ ràng và duy trì hiệu lực đến 72 giờ. Khảo sát vết tan của 7 dòng TKT  $\phi$ G7,  $\phi$ G8,  $\phi$ DL3,  $\phi$ DL6 trên ký chủ RS10 và  $\phi$ H6,  $\phi$ H23,  $\phi$ H24 trên ký chủ RS2 cho thấy kích thước vết tan ổn định và có chiều hướng tăng theo thời gian. Đặc biệt, khả năng ức chế vi khuẩn của 2 dòng TKT  $\phi$ G7 và  $\phi$ G8 có sự khác biệt có ý nghĩa đối với sự sinh trưởng của vi khuẩn gây bệnh khi không có và có chủng thực khuẩn. Kết quả nghiên cứu cho thấy các dòng thực khuẩn thể được phân lập từ đất trồng cây dược liệu có triển vọng để ứng dụng cho việc quản lý và điều trị bệnh héo xanh trên cây trồng do vi khuẩn *R. solanacearum*. Những kết quả của nghiên cứu bước

đầu cho những nghiên cứu tiếp theo trong điều kiện nhà lưới.

#### LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được hoàn thành với sự hỗ trợ từ đề tài nghiên cứu khoa học cấp cơ sở của Trường Đại Học Cần Thơ (Mã số đề tài: T2017-91).

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Cisek, A. A., Dąbrowska, I., Gregorczyk, K. P and Wyzewski, Z., 2017. Phage therapy in bacterial infections treatment: One hundred years after the discovery of bacteriophages. *Curr Microbiol.* 74(2): 277–283.
- Đỗ Tất Lợi, 2004. Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam, lần thứ 12, Nhà xuất bản Y học. Thành phố Hồ Chí Minh, 294 trang.
- Fox, J.L., 2000. Phage treatments yield healthier tomato, pepper plants. *ASM News* 66, pp: 455–456.
- Fujiwara, A., Kawasaki, T., Usami, S., Fujie, M and Yamada, T. 2008. Genomic characterization of

- Ralstonia solanacearum phage phiRSA1 and its related prophage (phiRSX) in strain GMI1000. *J Bacteriol.* 190(1): 143–156 6.
- Griffith, C. S., Peterson, P. D. Jr and Campbell, C. L., 1997. Byron David Halsted and Experiment Station Plant Pathology 1889 to 1900. *Plant disease.* 81(5): 545-549.
- Gupta, S., Kaul, S., Singh, B., Ram, A. C and Dhar, M. K., 2016. Production of Gentsyl Alcohol from *Phoma herbarum* Endophytic in *Curcuma longa* L. and Its Antagonistic Activity Towards Leaf Spot Pathogen *Colletotrichum gloeosporioides*. *Appl Biochem Biotechnol.* 180:1093–1109.
- Harper, D.R and Kutter, E., 2008. Bacteriophage: Therapeutic Uses. In *The Encyclopedia of Life Sciences.* E-Publishing Inc. John Wiley & Sons, Ltd, 1-7.
- Hayward, A. C., 2000. “*Ralstonia solanacearum*” in encyclopedia of microbiology, 2nd Edn, Vol. 4 San Diego, CA: Academic Press, 32–42.
- Janse, J. D., 1996. Potato brown rot in western Europe-history, present occurrence and some remarks on possible origin, epidemiology and control strategies. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin.* 26: 679-695.
- Jones, J.B., Jackson, L.E, Balogh, B., Obradovic, A., Iriarte, F.B and Momol, M. T. 2007. Bacteriophages for plant disease control. *Annu Rev Phytopathol.* 45: 245–262.
- Kalpage, M.D and Costa, D.M., 2015. Isolation of bacteriophages and determination of their efficiency in controlling *Ralstonia solanacearum* causing bacterial wilt of tomato. *Tropical Agricultural Research.* 26(1): 140–151.
- Krishnapura, P. R and Belur, P., 2015. Isolation and Screening of Endophytes from the Rhizomes of Some Zingiberaceae Plants for L-Asparaginase Production. *Preparative Biochemistry & Biotechnology.* 46(3): 281-287.
- Kropinski, A. M., Mazzocco, A., Waddell, T. E., Lingohr, E. and Johnson, R. P., 2009. Enumeration of bacteriophages by double agar overlay plaque assay, *Methods in Molecular Biology*, 1 February, 501: 69-76.
- Kutateladze, M., and Adamia, R., 2010. Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics. *Trends in biotechnology.* 28: 591–595.
- Makari, H. K., Palaniswamy, M. and Angayarkanni, J., 2013. Isolation of lytic bacteriophage against *Ralstonia solanacearum* causing wilting symptoms in ginger (*Zingiber officinale*) and potato (*Solanum tuberosum*) plants. *International Research Journal of Biological Sciences*, 10 November, 2(11): 78-84.
- Mai Huỳnh Dur An, Nguyễn Trọng Ngự, Nguyễn Thị Thu Nga, Phan Hữu Bằng, Bùi Khánh Lâm, Lưu Huỳnh Anh và Huỳnh Chí Nghĩa, 2016. Thứ nghiệm khả năng phân giải vi khuẩn *Escherichia coli* của thực khuẩn thể (Bacteriophage) phân lập tại các trại gà thương phẩm. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn.* 11: 139-146.
- Nguyễn Minh Tâm, 2015. Phân lập và khảo sát hiệu quả phòng trị của thực khuẩn thể đối với bệnh héo xanh dưa leo do vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* trong điều kiện in vitro và nhà lưới. *Luận văn tốt nghiệp kỹ sư Bảo vệ Thực vật.* Trường Đại học Cần Thơ.
- Nguyễn Tấn Thắng, Đỗ Tấn Dũng và Nguyễn Văn Tuất. 2011. Nghiên cứu bệnh héo xanh vi khuẩn (*Ralstonia solanacearum* Smith) hại cây khoai tây vùng Hà Nội - phụ cận và biện pháp phòng trừ. *Tạp chí Khoa học và Phát triển.* 9(5): 725 – 734.
- Nguyễn Thị Trúc Giang, 2014. Nghiên cứu biện pháp phòng trị bệnh cháy bìa lá (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) trên lúa bằng thực khuẩn thể. *Luận văn tốt nghiệp kỹ sư Bảo Vệ Thực Vật.* Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Đại học Cần Thơ. Thành phố Cần Thơ.
- Phan Quốc Huy, Nguyễn Minh Trung, Hồ Cảnh Thịnh và Nguyễn Thị Thu Nga, 2016. Đánh giá hiệu quả của thực khuẩn thể trong phòng trừ bệnh thối hạt trên lúa do vi khuẩn *Burkholderia glumae*. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ.* 45: 70-78.
- Prudent, D., Perineau, F., Bessiere, J. M., Michel, G. M. and Baccou, J. C., 2011. Analysis of the essential oil of wild oregano from martinique (*Coleus aromaticus* Benth.) - evaluation of its Bacteriostatic and Fungistatic properties. *Journal of Essential Oil Research.* 7(2): 165-173.
- Schnabel, E.L. and Jones, A.L. 2001. Isolation and characterization of five *Erwinia amylovora* bacteriophages and assessment of phage resistance in strains of *Erwinia amylovora*. *Appl Environ Microbiol.* 67: 59–64.
- Shurtleff, M. C. and Averre, C. W., 1997. *The plant disease clinic and field diagnosis of abiotic diseases.* APS press. Minneesata. 245 pages.
- Summers, W.C. 2016. Felix Hubert d’Herelle (1873–1949): History of a scientific mind. *Bacteriophage.* 6 (4): 4 pages.
- Tan, G.H., Nordin, M.S., Napsiah, A.R and Rosnah, H., 2009. Lysis activity of bacteriophages isolated from sewage against *Ralstonia solanacearum* and *Erwinia chrysanthemi*. *J. Trop. Agric. and Fd. Sc.* 37(2): 203– 209.
- Trần Hưng Minh, Ngô Văn Chí, Phạm Minh Phú và Nguyễn Thị Thu Nga, 2016. Phân lập và bước đầu đánh giá hiệu quả của thực khuẩn thể trong phòng trừ bệnh thối gốc lúa do vi khuẩn *Erwinia chrysanthemi*. *Tạp chí khoa học Trường Đại học Cần Thơ.* 3: 185-192.
- Van, T.T.B., Yoshida, S., Miki, K., Kondo, A. and Kamei, K., 2014. Genomic characterization of phiRS603, a filamentous bacteriophage that is infectious to the phytopathogen *Ralstonia*



- solanacearum. *Microbiology and Immunology*. 58: 697–700.
- Van, T.T.B., Yoshida, S., Miki, K., Kondo, A. and Kamei, K., 2015. Complete genome sequence of a filamentous bacteriophage, RS611, that infects the phytopathogen *Ralstonia solanacearum*. *Archives of Virology*. 160(3): 865-7.
- Van, T.T.B., Kondo, A., Miki, K., Kamei, K., Thao, D. T. P., Namikawa, R., Huan, P. K. N., 2015. Genomic characterization of *Ralstonia solanacearum* phage  $\phi$ RS138 of the family siphoviridae. *Archives of Virology*. 161(2):483-6.
- Yamada, T., Satoh, S., Ishikawa, H., Fujiwara, A., Kawasaki, T., Fujie, M and Ogata, H. 2010. A jumbo phage infecting the phytopathogen *Ralstonia solanacearum* defines a new lineage of the Myoviridae family. *Virology*. 398(1):135–147.
- Yuan, Y. H. and Gao, M.Y., 2016. Characteristics and complete genome analysis of a novel jumbo phage infecting pathogenic *Bacillus pumilus* causing ginger rhizome rot disease. *Archives of Virology*. 16(12): 3597–3600.
- Williamson, K.E., Radosevich, M and Wommack, K.E., 2005. Abundance and diversity of viruses in six Delaware soils. *Applied & Environmental Microbiology*. 71:3119–3125.
- Wommack, K. E. and Colwell, R.R., 2000. Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems. *Microbiology and Molecular Biology Review*, 1 March.64(1): 69-114.
- Zheng, Y. K., Miao, C. P., Chen, H. H., Huang, F. F., Xia, M. X., Chen, W and Zhao, L. X., 2017. Endophytic fungi harbored in *Panax notoginseng*: diversity and potential as biological control agents against host plant pathogens of root-rot disease. *J Ginseng Res*. 41:353-360.