

PHÂN LẬP TUYỂN CHỌN VI KHUẨN NỘI SINH ĐỐI KHÁNG VỚI NẤM (*Fusarium oxysporum*) GÂY BỆNH THỐI RỄ TAM THẮT (*Panax pseudoginseng* Wall)

Vũ Văn Định^{1*}

TÓM TẮT

Tam thất (*Panax pseudoginseng* Wall) là cây lâm sản ngoài gỗ có giá trị kinh tế cao, nấm *Fusarium oxysporum* gây bệnh thối rễ là những trở ngại chính để phát triển loài cây này trên diện rộng. Áp dụng biện pháp hóa học để phòng trừ bệnh hại cây Tam thất thường không đảm bảo vệ sinh an toàn thực phẩm và ảnh hưởng đến môi trường sinh thái. Nghiên cứu vi khuẩn nội sinh trong cây Tam thất có khả năng đối kháng với nấm *F. oxysporum* gây bệnh thối rễ. Số lượng các chủng vi khuẩn nội sinh phân lập được từ các bộ phận của cây là khác nhau. Từ 27 chủng vi khuẩn nội sinh đã được phân lập từ lá, thân, rễ của cây Tam thất đã xác định có 22 chủng có hiệu lực kháng nấm *F. oxysporum* trong đó tuyển chọn được 3 chủng (PP16; PP18; PP23) có hiệu lực kháng nấm cao với đường kính vòng kháng nấm lần lượt là 21,2; 20,7; 20,8 mm. Phân tích di truyền phân tử dựa trên trình tự 16S rARN cho thấy chủng PP16 có tên khoa học là *Bacillus subtilis* và 2 chủng PP18; PP23 thuộc loài *Bacillus aryabhattai*.

Từ khóa: *Panax pseudoginseng* Wall, *Fusarium oxysporum*, vi khuẩn nội sinh, bệnh thối rễ.

1. MỞ ĐẦU

Tam thất tên khoa học là *Panax pseudoginseng* Wall (*Panax repens* Maxim), tên đồng nghĩa: *Panax notoginseng* (Burkill) F. H. Chen ex C. Y. Wu & K. M. Feng thuộc họ Ngũ gia bì Araliaceae (Võ Văn Chi, 2012). Đặc biệt trong Tam thất có 3 hoạt chất đặc trưng Ginsenosid Rb1, Ginsenosid Rg1, Majonosid R2 (MS2). Do Tam thất có nhiều hoạt chất quý nên có khả năng điều trị một số bệnh ung thư (Nguyễn *et al.*, 1994). Đối với cây Tam thất cả củ, hoa, nụ, lá đều rất có giá trị vì có tác dụng bổ dưỡng, tăng sức đề kháng, điều hòa miễn dịch, bảo vệ tim chống lại các tác nhân gây loạn nhịp ngăn ngừa xơ vữa động mạch, tăng khả năng chịu đựng của cơ thể khi bị thiếu oxy (Võ Văn Chi, 2012). Ngoài tác dụng kể trên Tam thất giúp lưu thông tuần hoàn máu, giảm lượng Cholesterol trong máu, hạ đường huyết, kích thích hệ miễn dịch, ức chế vi khuẩn, giảm tiểu đường, chống viêm tốt (Nguyễn Văn Đạt và Trần Thị Phương Anh, 2013).

Áp dụng biện pháp hóa học để phòng trừ bệnh hại đối với cây dược liệu nói chung và cây Tam thất nói riêng sẽ không đảm bảo vệ sinh an toàn thực phẩm. Vi sinh vật nội sinh (VSVNS) có khả năng kiểm soát và ngăn cản quá trình xâm nhiễm của mầm

bệnh trên thực vật (Sturz và Matheson, 1996), ở côn trùng (Azevedo *et al.*, 2000) và cả ở tuyến trùng (Hallmann *et al.*, 1997). Trong một số trường hợp chúng có thể đẩy mạnh tốc độ nảy mầm của hạt, thúc đẩy sự hình thành cây con trong điều kiện bất lợi và nâng cao khả năng tăng trưởng của thực vật thiết lập mối quan hệ hai bên cùng có lợi (Bent và Chanway, 1998). Vi sinh vật nội sinh thúc đẩy quá trình sinh trưởng của cây chủ vì đã tạo ra một hàng rào kiểm soát sinh học bằng cách tiêu diệt trực tiếp các mầm bệnh đã xâm nhiễm vào cây chủ (Chanway, 1998). Nghiên cứu này trình bày phân lập tuyển chọn các chủng vi khuẩn nội sinh đối kháng với nấm *Fusarium oxysporum* gây bệnh thối rễ cây Tam thất (*Panax pseudoginseng* Wall) trồng tại huyện Si Ma Cai và huyện Mường Khương của tỉnh Lào Cai từ đó làm cơ sở khoa học cho việc phòng trừ bệnh hại cây Tam thất bằng biện pháp sinh học.

2. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Địa điểm thu mẫu

Huyện Mường Khương, huyện Si Ma Cai của tỉnh Lào Cai.

2.2. Vật liệu

24 mẫu Tam thất (*Panax pseudoginseng* Wall) thu tại huyện Mường Khương và huyện Si Ma Cai của tỉnh Lào Cai; nấm *Fusarium oxysporum* gây bệnh hại cây Tam thất của Phòng thí nghiệm, Trung

¹ Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam

*Email: vudinhfsiv@gmail.com

tâm Nghiên cứu Bảo vệ rừng, Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam.

Các loại vật liệu, dụng cụ thí nghiệm, trang thiết bị sử dụng trong nghiên cứu: Hóa chất: (NaCl; KH_2PO_4 ; NaOH; Pepton; K_2HPO_4 ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; Agar khoai tây, D-Glucose, cồn; dụng cụ thí nghiệm: đĩa petri, ống nghiệm, que trang, que cấy, đèn cồn, pipatman; máy móc, thiết bị khác: cân điện tử, máy chuẩn độ pH, nồi hấp, tủ định ôn, tủ cấy, máy lắc.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Phân lập vi khuẩn nội sinh trong cây Tam thất

Nghiên cứu được thực hiện ở 2 huyện có diện tích trồng Tam thất của tỉnh Lào Cai (huyện Mường Khương và huyện Si Ma Cai). Mỗi huyện chọn 1 vườn trồng cây Tam thất giai đoạn 6 - 12 tháng tuổi, mỗi vườn chọn 1 - 2 luống ngẫu nhiên, mỗi luống lập 3 ô tiêu chuẩn ($1 \text{ m}^2/\text{OTC}$) ở 3 vị trí đầu luống, giữa luống và cuối luống, mỗi luống thu 1 - 2 mẫu điển hình bao gồm cả cây không bị bệnh và cây bị bệnh tổng số 24 mẫu (mỗi địa điểm 12 mẫu).

Hai mươi bốn mẫu (24) Tam thất (lá, thân, rễ (củ)) được rửa sạch dưới vòi nước để loại bỏ đất, tạp chất và làm khô mẫu tại nhiệt độ phòng trong 20 phút. Mẫu cây Tam thất được chia thành 3 phần: lá, thân, rễ và được khử trùng riêng rẽ trong điều kiện vô trùng. Mẫu thực vật được rửa với nước cất khử trùng 2 đến 3 lần, sau đó được khử trùng với NaClO 5% trong 5 phút. Rửa mẫu một lần $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 2,0% (w/v) trong 1 phút để loại bỏ NaClO dư. Tiếp tục xử lý mẫu bằng ethanol 70% trong 10 phút, rửa lại bằng nước cất khử trùng để loại bỏ ethanol. Tiến hành thu dịch rửa mẫu lần cuối với nước cất khử trùng và cấy trải trên môi trường LB nhằm kiểm tra độ sạch của mẫu sau khi khử trùng (El - Deeb *et al.*, 2013). Mẫu được cắt thành các miếng nhỏ có kích thước $0,5 \times 1 \text{ cm}$. Sau đó các miếng nhỏ này được đặt trong các ống nghiệm chứa 4,5 ml môi trường PBS (NaCl: 8,5 gam, KH_2PO_4 : 6,8 gam, NaOH: 1,16 gam, nước cất: 1.000 ml, điều chỉnh pH: 7) nút bông và bịt miệng ống nghiệm bằng giấy để qua đêm. Phân lập vi khuẩn theo phương pháp pha loãng tới hạn và trang trên môi trường King'B (Pepton: 20 g; K_2HPO_4 : 1,5 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$: 1,5 g; Agar 17 g và bổ sung nước đủ 1.000 ml). Sau đó tách làm thuần các chủng vi khuẩn nội sinh (VKNS) trên môi trường PDA (khoai tây: 200 g; D - Glucose: 20 g; Agar: 17 g; nước cất: 1.000 ml) nuôi vi khuẩn trong điều kiện nhiệt độ 28°C .

2.3.2. Đánh giá hiệu lực của vi khuẩn nội sinh đối kháng nấm *Fusarium oxysporum*

Các mẫu vi khuẩn sau khi phân lập được cấy chính giữa đĩa hộp lồng có chứa môi trường PDA đồng thời cấy nấm *F. oxysporum* gây bệnh hại rễ Tam thất vào sát mép hộp lồng tạo thành tam giác sau đó để trong tủ định ôn ở nhiệt độ 28°C sau 72 giờ đánh giá hiệu lực kháng nấm bệnh, thời gian theo dõi thí nghiệm trong vòng 15 ngày. Đường kính vòng kháng nấm được tính bằng công thức sau:

$$V (\text{mm}) = D (\text{mm}) - d (\text{mm})$$

Trong đó: D là đường kính trung bình vòng kháng nấm sự phát triển của nấm bao quanh khuẩn lạc tính theo 2 chiều vuông góc; d là đường kính trung bình tính theo 2 chiều vuông góc của khuẩn lạc.

Căn cứ vào trị số V, xác định được chủng vi khuẩn có hiệu lực kháng nấm *Fusarium oxysporum*.

Hiệu lực kháng nấm bệnh của các chủng vi khuẩn nội sinh phân thành 5 cấp theo phương pháp của Phạm Quang Thu và Nguyễn Thị Thúy Nga, 2007) cụ thể như sau:

Hiệu lực kháng rất mạnh (++++): Đường kính vòng kháng $V \geq 20 \text{ mm}$.

Hiệu lực kháng mạnh (+++): Đường kính vòng kháng $10 \text{ mm} \leq V < 20 \text{ mm}$.

Hiệu lực kháng trung bình (++) : Đường kính vòng kháng $5 \text{ mm} \leq V < 10 \text{ mm}$.

Hiệu lực kháng yếu (+): Đường kính vòng kháng $1 \text{ mm} \leq V < 5 \text{ mm}$.

Không có hiệu lực (-): Đường kính vòng kháng $V < 1 \text{ mm}$.

2.3.3. Định danh vi khuẩn nội sinh có hoạt tính đối kháng với nấm gây bệnh cao

Định danh vi khuẩn bằng sinh học phân tử. Từ các chủng vi khuẩn được nuôi cấy trên môi trường PDA, tiến hành tách ADN theo các bước sau:

Tách chiết ADN: Sinh khối được chia nhỏ và đưa vào ống eppendorf 1,5 ml đã bổ sung $500 \mu\text{l} \times \text{SSC}$. Lắc đều và ủ ở 99°C trong 10 phút. Ly tâm 13.000 vòng/phút trong 2 phút. Hút bỏ phần dịch và tiến hành rửa tế bào 1 lần bằng nước cất vô trùng. Thêm khoảng 100 μl hạt thủy tinh có đường kính 0,2 - 0,5 mm (Roth, Đức), 100 μl dung dịch phenol/chloroform (tỉ lệ 1 : 1) và 100 μl nước cất vô

trùng. Lắc ở 1.400 vòng/phút trong 10 phút trên máy Thermocomfort (Eppendorf, Đức) sau đó ly tâm 13.000 vòng/phút trong 10 phút. Lấy phần dịch trong phía trên có chứa ADN làm khuôn cho phản ứng PCR. ADN sau khi tách chiết được giữ ở -20°C.

Phân loại sinh vật bằng giải trình tự: Phân đoạn rADN của vi khuẩn được khuếch đại trên thiết bị C1000 Touch™ Thermal Cycler (Bio-Rad, Mỹ) với chương trình nhiệt được thiết lập với pha biến tính ở 94°C trong 3 phút kế tiếp là 30 chu kỳ nhiệt (94°C trong 40 giây, 52°C trong 40 giây và 72°C trong 2 phút). Quá trình khuếch đại được hoàn tất ở 72°C trong 10 phút và sau đó sản phẩm PCR được bảo quản ở 10°C.

Sản phẩm PCR sau khi khuếch đại được phân tích trình tự tại hãng 1st BASE (Malaysia). Các chuỗi ADN được so sánh với cơ sở dữ liệu của GenBank thông qua giao diện tìm kiếm BLAST nucleotide-nucleotide đặt tại National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Mỹ: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> hoặc <http://www.ezbiocloud.net/>.

Mỗi sử dụng trong phân loại: 16s27F trình tự (5'→3'): 5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3'; 16s1492R: 5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'.

Xây dựng cây phát sinh chủng loại: Xây dựng cây chủng loại phát sinh: trình tự ADN ribosome 16s của chủng nghiên cứu và những trình tự tương đồng với chúng được chuyển tải về sau đó xử lý bằng phần mềm BioEdit. Sau đó công cụ Muscle trong chương trình MEGA 7 được sử dụng để so sánh sắp xếp các trình tự. Cây phát sinh chủng loại được xây dựng dựa trên sự biến đổi về khoảng cách sai khác trình tự theo Kimura (1980), sử dụng phương pháp neighbour - joining (Saitou và Nei, 1987) trong MEGA. Chương trình phân tích được thực hiện từ 1.000 dữ liệu lấy ngẫu nhiên. Thanh chén trong cây phân loại thể hiện % sự khác biệt giữa các trình tự phân tích.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Phân lập vi khuẩn nội sinh trong cây Tam thất

Từ 24 mẫu (lá, thân, rễ) Tam thất thu tại huyện Mường Khương và huyện Si Ma Cai của tỉnh Lào Cai đã phân lập được 27 chủng vi khuẩn nội sinh kết quả được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Số lượng vi khuẩn nội sinh từ các bộ phận cây Tam thất

TT	Bộ phận của cây	Địa điểm	Số chủng	Ký hiệu vi khuẩn nội sinh
1	Lá Tam thất	Huyện Mường Khương	3	PP1, PP2, PP3.
2	Thân Tam thất		5	PP7, PP8, PP9, PP10, PP11.
3	Rễ (củ) cây Tam thất		5	PP16, PP17, PP18, PP19, PP20.
4	Lá Tam thất	Huyện Si Ma Cai	3	PP4, PP5, PP6.
5	Thân Tam thất		4	PP12, PP13, PP14 PP15.
6	Rễ (củ) cây Tam thất		7	PP21, PP22, PP23, PP24, PP25, PP26, PP27.
	Tổng		27	

Bảng 1 cho thấy tổng số lượng các chủng vi khuẩn nội sinh phân lập được từ các bộ phận của cây Tam thất ở Lào Cai (27 chủng). Lá cây Tam thất phân lập được 6 chủng vi khuẩn nội sinh (mỗi khu vực phân lập được 3 chủng) chiếm 22,22%. Phần thân phân lập được tổng số 9 chủng vi khuẩn nội sinh chiếm 33,33% (các mẫu Tam thất thu tại huyện Mường Khương phân lập được 5 chủng, các mẫu Tam thất thu tại huyện Si Ma Cai phân lập được 4 chủng). Rễ (củ) cây Tam thất phân lập được số lượng nhiều nhất 12 chủng vi khuẩn nội sinh chiếm 44,45% trong đó mẫu Tam thất thu tại huyện Si Ma Cai phân lập được 5 chủng và mẫu Tam thất thu tại huyện Mường Khương phân lập được 7 chủng.

3.2. Đánh giá hiệu lực của vi khuẩn nội sinh đối kháng nấm *Fusarium oxysporum*

Từ 27 chủng vi khuẩn nội sinh (VKNS) phân lập được tiến hành thử hiệu lực kháng nấm *Fusarium oxysporum*. Kết quả thử nghiệm hiệu lực kháng nấm gây bệnh được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2 cho thấy hiệu lực kháng nấm *F. oxysporum* của các chủng vi khuẩn nội sinh phân lập được là có sự khác nhau rõ rệt về mặt thống kê ($F_{pr} < 0,001$). Trong số 27 chủng có 22 chủng vi khuẩn nội sinh có khả năng kháng nấm *F. oxysporum*, 5 chủng không có khả năng kháng. Lá cây Tam thất phân lập được 6 chủng vi khuẩn nội sinh, trong đó cả 6 chủng

đều có hiệu lực kháng nấm gây bệnh. Thân cây Tam thất phân lập được 9 chủng vi khuẩn nội sinh có 7 chủng có hiệu lực kháng nấm và 2 chủng không có hiệu lực (PP13, PP14). Rễ (củ) cây Tam

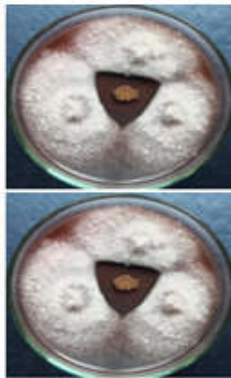
thất phân lập được 12 chủng VKNS, trong đó có 9 chủng có hiệu lực kháng nấm và 3 chủng VKNS không có hiệu lực (PP24, PP25, PP26).

Bảng 2. Hiệu lực của vi khuẩn nội sinh kháng nấm *Fusarium oxysporum*

TT	Bộ phận của cây	Số lượng	Chủng vi khuẩn	Đường kính vòng kháng nấm (mm)	Khả năng kháng nấm gây bệnh	Hiệu lực kháng
1	Lá	7	PP1	11,2 ⁱ	+++	Mạnh
2			PP2	10,4 ^h	++	Trung bình
3			PP3	9,3 ^e	++	Trung bình
4			PP4	13,6 ^l	+++	Mạnh
5			PP5	11,5 ^j	+++	Mạnh
6			PP6	14,7 ^m	+++	Mạnh
7	Thân	9	PP7	12,3 ^k	+++	Mạnh
8			PP8	17,6 ^q	+++	Mạnh
9			PP9	13,5 ^l	+++	Mạnh
10			PP10	14,6 ^m	+++	Mạnh
11			PP11	15,2 ⁿ	+++	Mạnh
12			PP12	9,8 ^g	++	Trung bình
13			PP13	0 ^a	-	Không hiệu lực
14			PP14	0 ^a	-	Không hiệu lực
15			PP15	19,5 ^r	+++	Mạnh
16			PP16	21,2 ^t	++++	Rất mạnh
17	Rễ (củ)	12	PP17	16,5 ^o	+++	Mạnh
18			PP18	20,7 ^s	++++	Rất mạnh
19			PP19	4,5 ^b	+	Yếu
20			PP20	8,9 ^d	++	Trung bình
21			PP21	8,5 ^c	++	Trung bình
22			PP22	9,5 ^f	++	Trung bình
23			PP23	20,8 ^s	++++	Rất mạnh
24			PP24	0 ^a	-	Không hiệu lực
25			PP25	0 ^a	-	Không hiệu lực
26			PP26	0 ^a	-	Không hiệu lực
27			PP27	17,3 ^p	+++	Mạnh
			Lsd	0,1371		
			F pr	<0,001		

Như vậy từ kết quả thử hiệu lực các chủng VKNS với nấm (*F. oxysporum*) gây bệnh hại rễ cây Tam thất đã chọn được 3 chủng có hiệu lực kháng nấm rất mạnh (PP16; PS18; PP23) các chủng này đều có đường kính vòng kháng nấm lớn hơn 20 mm.

12 chủng có hiệu lực kháng nấm mạnh; 6 chủng có hiệu lực kháng nấm trung bình; 1 chủng có hiệu lực kháng nấm yếu và 4 chủng không có hiệu lực kháng nấm *F. oxysporum*.



Hình 1. Chủng PP16 đối kháng với nấm *F. oxysporum*



Hình 2. Chủng PP18 đối kháng với nấm *F. oxysporum*

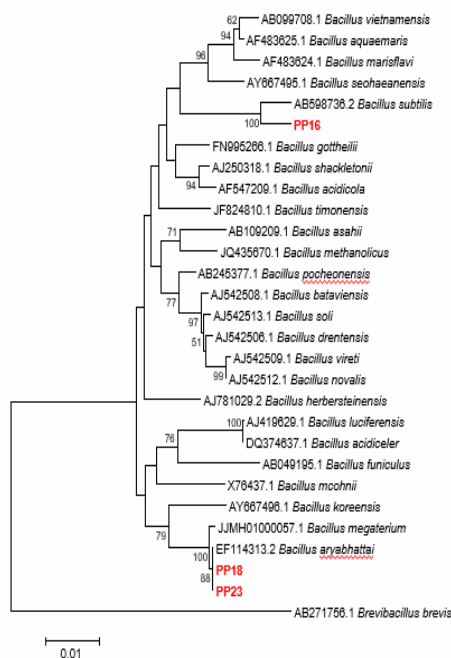


Hình 3. Chủng PP23 đối kháng với nấm *F. oxysporum*



Hình 4. Chủng PP25 (không có khả năng đối kháng với nấm *F. oxysporum*)

3.3. Kết quả định danh vi khuẩn nội sinh có hoạt tính đối kháng với nấm gây bệnh cao



Hình 5. Vị trí phân loại của chủng PP16, PP18, PP23 với các loài có quan hệ họ hàng gần với các loài thuộc chi *Bacillus*

Cây phân loại được xây dựng dựa trên trình tự ADN ribosome 16S của chủng PP16 (*Bacillus subtilis*); PP18, PP23 (*Bacillus aryabhattai*) và những loài đã biết thuộc chi *Bacillus* bằng việc sử dụng phần mềm MEGA7 theo phương pháp Kimura 2-parameter. Việc so sánh được thực hiện theo 1.000 lần thực hiện ngẫu nhiên. *Brevibacillus brevis* được

sử dụng như nhóm ngoài. Thanh chèn tương ứng 1% sự khác biệt.

3.4. Thảo luận

Theo Cho *et al.* (2007) đã phân lập được 63 chủng vi khuẩn nội sinh từ thân củ sâm *P. ginseng* 5 năm tuổi. Trong các chủng phân lập có 3 chủng thuộc chi *Arthrobacter*, 3 chủng thuộc chi *Serratia* và các chủng thuộc chi *Bacillus* chiếm đa số. Các nghiên cứu trước đây cũng đã phân lập vi khuẩn nội sinh ở loài sâm *Panax ginseng* (Hàn Quốc) được 51 chủng vi khuẩn nội sinh, trong đó có tới 21 chủng thuộc chi *Bacillus* (Vendan *et al.*, 2010). Vi sinh vật nội sinh đã và đang được quan tâm nghiên cứu nhiều do những tương tác hữu ích đối với sự sinh trưởng của thực vật. Một số tác động có lợi của vi sinh vật nội sinh có thể liệt kê như: giúp tăng cường khả năng trao đổi chất, kích thích sinh trưởng, miễn dịch cho cây chủ bằng cách chuyển hóa hoặc tổng hợp các sản phẩm trao đổi chất (Shahzad *et al.*, 2017). Theo nghiên cứu của Rufin *et al.*, 2020 đã phân lập vi sinh vật nội sinh từ hạt, lá, thân ở 2 loài Tam thất *Panax ginseng* Meyer và *Panax notoginseng* (Burkill) F. H. Chen. Kết quả phân lập được 347 chủng vi khuẩn và 21 chủng nấm, trong đó có các chủng phân lập từ rễ (củ) chiếm số lượng nhiều nhất 19 chi trong tổng số 42 chi phân lập được còn các chi khác được phân lập từ lá, thân, hạt, hoa. Nghiên cứu đã chọn được một số chủng vi khuẩn nội sinh *Bacillus* sp. có khả năng kiểm soát sinh học chống chịu các bệnh gây bệnh thối rễ Tam thất như: *F. oxysporum*, *Ralstonia* sp., *Pythium* sp., *Rhizoctonia solani*. Một số nghiên cứu về vi khuẩn nội sinh *Bacillus subtilis* BA02 có tiềm năng phòng trừ bệnh nấm cây trồng. *Bacillus*

subtilis được biết đến như một tác nhân kiểm soát sinh học có hiệu quả cao đối với nhiều loại nấm và vi khuẩn gây bệnh trên cây trồng (Nguyễn Lý Nhơn và Nguyễn Như Nhứt, 2013); *B. megaterium* đã được công nhận là một endophyte và là một tác nhân tiềm năng cho việc kiểm soát sinh học các bệnh thực vật. Khả năng cố định đạm cũng đã được chứng minh ở một số chủng *B. megaterium* (De Vos, P *et al.*, 2009). *B. megaterium* ST2-9 còn được nhắc tới với khả năng chịu mặn và có chức năng kích thích sinh trưởng cây trồng nhờ tổng hợp hormone thực vật Indole-3-Acetic Acid (IAA) (Nguyễn Khởi Nghĩa và Nguyễn Thị Kiều Oanh, 2017). Cả chủng *Bacillus subtilis* đã được các nhà khoa học nghiên cứu để ứng dụng sản xuất chế phẩm sinh học trước đó. Cụ thể là chế phẩm sinh học Biochie bao gồm một số chủng thuộc chi *Bacillus* (*Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*,...). Vi khuẩn *Bacillus aryabhattai* là loài có mức độ an toàn sinh học cao dùng để sản xuất các chế phẩm sinh học (Huỳnh Văn Tiền và cộng sự, 2015). Đây là một chủng linh hoạt với đa tác dụng có tiềm năng lớn ứng dụng cho nông nghiệp và công nghệ sinh học (Francisco *et al.*, 2020). Như vậy 2 loài vi khuẩn nội sinh *Bacillus subtilis* và *Bacillus aryabhattai* có mức độ an toàn sinh học cao được nghiên cứu và ứng dụng rất nhiều trong các lĩnh vực khác nhau đặc biệt trong lĩnh vực nông nghiệp và dược liệu.

4. KẾT LUẬN

Phân lập vi khuẩn nội sinh từ lá, thân, rễ cây (củ) cây Tam thất ở Lào Cai đã phân lập được tổng số 27 chủng vi khuẩn nội sinh. Trong đó phân lập được 6 chủng VKNS từ lá cây Tam thất chiếm 22,22%, 9 chủng từ thân cây chiếm 33,33% và số lượng VKNS phân lập được nhiều nhất là từ bộ phận rễ (củ) của Tam thất với số lượng 12 chủng chiếm 44,45%.

Trong số 27 chủng VKNS khác nhau phân lập được từ các bộ phận của cây Tam thất có 22 chủng VKNS có khả năng đối kháng với nấm *F. oxysporum* gây bệnh cây Tam thất. Trong đó có 3 chủng VKNS (PP16; PP18; PP23) có hiệu lực kháng nấm rất mạnh (đường kính vòng kháng nấm lần lượt là: 21,2; 20,7; 20,8 mm); 12 chủng có hiệu lực kháng mạnh; 6 chủng có hiệu lực kháng nấm trung bình; 1 chủng có hiệu lực kháng nấm yếu và 4 chủng không có hiệu lực kháng nấm *F. oxysporum*.

Phân tích di truyền phân tử dựa trên trình tự 16S rARN đã xác định được chủng PP16 là *Bacillus*

subtilis và 2 chủng PP18, PP23 thuộc *Bacillus aryabhattai*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Azevedo JL, Maccheroni J Jr, Pereira O and Ara WL. (2000). *Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants*. Electr J Biotech 3: 40 - 65.
2. Bent E and Chanway (1998). *The growth - promoting effects of a bacterial endophyte on lodgepole pine are partially inhibited by the presence of other rhizobacteria*. Can J Microbiol 44: 980 – 988.
3. Chanway CP (1998). Bacterial endophytes: ecological and practical implications. Sydowia 50: 149 - 170.
4. Cho K., Hong S., Lee S., Kim Y., Kahng G., Lim Y., Kim H., Yun H. (2007). Endophytic bacterial communities in ginseng and their antifungal activity against pathogens. Microbial Ecology, 54: 341 - 351.
5. De Vos, P. *et al.* (2009). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes*. Springer.
6. El - Deeb B., Fayez K., Gherbawy Y. (2013). Isolation and characterization of endophytic bacteria from *Plectranthus tenuiflorus* medicinal plant in Saudi Arabia desert and their antimicrobial activities. Journal of Plant Interactions, 8: 56 - 64.
7. Francisco X. Nascimento, Anabel G. Hernández, Bernard R. Glick, Márcio J. Rossi (2020). Các hoạt động thúc đẩy tăng trưởng thực vật và phân tích bộ gen của cây kháng stress *Bacillus megaterium* STB1, một loại vi khuẩn quan tâm đến nông nghiệp và công nghệ sinh học. Biotechnology Reports, Volume 25, e00406.
8. Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J Mol Evol, 16, pp. 111 - 120.
9. Hallmann J, Quadt- Hallmann A, Mahaffee WF & Kloepper JW (1997). *Bacterial endophytes in agricultural crops*. Can J Microbiol 43: 895 - 914.
10. Huỳnh Văn Tiền, Trương Trọng Ngón, Cao Ngọc Diệp (2015). Tối ưu hóa khả năng tổng hợp chất kết tụ sinh học của chủng vi khuẩn *Bacillus aryabhattai* KG12S và thử nghiệm xử lý nước thải sau biogas từ trại chăn nuôi heo. Tạp chí Khoa học - Trường Đại học Cần Thơ. Phần B: Nông nghiệp, Thủy sản và Công nghệ Sinh học: số 37, tr 32 - 41.
11. Nguyen MD, Kasai R, Ohtani K, Ito A, Nguyen TN, Yamasaki K, Tanaka O (1994). Saponins

from Vietnamese ginseng, *Panax vietnamensis* Ha et Grushv. collected in central Vietnam. II. *Chem Pharm Bull* 42 (1): 115 - 122.

12. Nguyễn Văn Đạt, Trần Thị Phương Anh (2013). Bước đầu nghiên cứu xây dựng khóa định loại các chi trong họ Ngũ gia bì (Araliaceae) ở Việt Nam. *Hội nghị khoa học toàn quốc về sinh thái và tài nguyên sinh vật lần thứ 5*: 44 - 51.

13. Nguyễn Lý Nhon và Nguyễn Như Nhứt (2013). Khảo sát khả năng đối kháng nấm bệnh cây trồng và ảnh hưởng của các điều kiện tăng sinh của một số chủng *Bacillus subtilis* phân lập ở Việt Nam. *Hội nghị khoa học công nghệ sinh học toàn quốc* 2013.

14. Nguyễn Khởi Nghĩa và Nguyễn Thị Kiều Oanh (2017). Tuyển chọn chất mang và chất nền sản xuất chế phẩm vi sinh chứa ba dòng vi khuẩn chịu mặn kích thích sinh trưởng cây trồng (Burkholderia cepacia BL1-010, *Bacillus megaterium* ST2-9 và *Bacillus aquimaris* KG6-3). *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 15 (2), p381 - 392.

15. Phạm Quang Thu và Nguyễn Thị Thuý Nga (2007). Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn nội sinh để phòng trừ nấm *Cryptosporiopsis eucalypti* Sankaran

& Sutton gây bệnh cháy lá bạch đàn. *Thông tin Khoa học Kỹ thuật Lâm nghiệp* số 4/2007.

16. Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, 4, pp. 406 - 425.

17. Rufin Marie Kouipou Toghueo, Diane Yimta Youmbi, Fabrice Fekam Boyom (2020). Endophytes from *Panax* species. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 31 (2021) 101882: 1 - 22.

18. Shahzad R., Khan A., Bilal S., Asaf S., Lee I. (2017). Plant growth - promoting endophytic bacteria versus pathogenic infections: an example of *Bacillus amyloliquefaciens* RWL-1 and *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici in tomato. *Peer J* 5, e3107.

19. Sturz AV and Matheson BG (1996). *Populations of endophytic bacteria which influence host-resistance to Erwinia-induced bacterial soft rot in potato tubers*. *Plant Soil* 184: 265 - 271.

20. Vendan R., Yu Y., Lee S., Rhee Y. (2010). Diversity of endophytic bacteria in ginseng and their potential for plant growth promotion. *The Journal of Microbiology*, 48: 559-565.

21. Võ Văn Chi (2012). *Từ điển cây thuốc Việt Nam (Tập II (Bộ mới))*. Nxb Y học.

ISOLATING AND SCREENING BACTERIAL ENDOPHYTES FOR RESISTANCE TO *Fusarium oxysporum* CAUSING ROOT - ROT DISEASE IN *Panax pseudoginseng* Wall

Vu Van Dinh¹

¹Vietnamese Academy of Forest Sciences
Email: vudinhfsiv@gmail.com

Summary

Panax pseudoginseng Wall is a non-timber forest product with high economic value, the fungus *Fusarium oxysporum* causing root rot disease is the main obstacle to its widespread development. Current chemical measures to prevent diseases of *Panax pseudoginseng* Wall is often unhygienic and detrimental to the ecological environment. Research on Bacterial Endophytes in *P. pseudoginseng* that have the ability to antagonize the fungus *F. oxysporum* causing root rot disease. Intensive study on this type of bacteria would helps to elucidate their role in the biological control of plant pathogens. The number of Bacterial Endophytes strains isolated from plant parts varies. 22 out of twenty-seven (27) strains of Bacterial Endophytes isolated from leaves, stems, and roots of *Panax pseudoginseng* Wall were effective against *F. oxysporum* and among these 22 strains, 3 strains (PP16; PP18; PP23) prove to have the strongest antifungal effect, with the diameter of the antifungal ring is 21.2; 20.7; 20.8 mm, respectively. Molecular genetic analysis based on 16S rRNA sequence showed the following result: strain PP16 is *Bacillus subtilis*, 2 strains of PP1811; PP23 are *Bacillus aryabhattai*.

Keywords: *Panax pseudoginseng* Wall, *fusarium oxysporum*, bacterial endophytes, root-rot disease.

Người phản biện: GS.TS. Nguyễn Văn Tuất

Ngày nhận bài: 22/9/2021

Ngày thông qua phản biện: 22/10/2021

Ngày duyệt đăng: 29/10/2021