

ẢNH HƯỞNG CỦA TIÊM RIÊNG RỄ VÀ KẾT HỢP *Trichoderma viride* VÀ *Bacillus* ĐẾN SỰ TĂNG TRƯỞNG CỦA CÂY LẠC VÀ KIỂM SOÁT SINH HỌC NẤM *Fusarium* sp. VÀ *Pythium* sp.

Nguyễn Văn Minh*, Nguyễn Long Hồ, Phạm Thị Thùy Nhung,
Võ Ngọc Yến Nhi, Đan Duy Pháp, Dương Nhật Linh

Trường Đại học Mở tp. Hồ Chí Minh, *nguyenminhou@gmail.com

TÓM TẮT: *Trichoderma* và *Bacillus* là hai vi sinh vật kiểm soát sinh học khả thi nhất ngăn chặn nhiều tác nhân nấm gây bệnh. Chúng tôi đã sàng lọc hoạt tính kháng nấm của *Fusarium* sp. và *Pythium* sp. gây bệnh thối thân, thối rễ, chết non trên cây lạc của 25 chủng *Bacillus*. Kết quả cho thấy, chủng *Bacillus* sp.F9 có khả năng kháng cả hai loại nấm *Fusarium* sp. và *Pythium* sp. cao nhất, lần lượt là $70,92 \pm 1,88\%$ và $64,81 \pm 0,98\%$. Chủng *T. viride* và *Bacillus* sp.F9 được khảo sát khả năng kiểm soát nấm bệnh *Fusarium* sp. và *Pythium* sp., đồng thời khảo sát khả năng kích thích tăng trưởng trên cây lạc. Phương pháp điều trị với 2 nhân tố (*T. viride* và *Bacillus* sp.F9) có hiệu quả cao hơn 1 nhân tố; công thức bổ sung *T. viride* trước *Bacillus* 6 ngày và bổ sung đồng thời *T. viride* và *Bacillus* có tỉ lệ hạt nảy mầm, tỷ lệ cây sống sót, chiều cao cây, khối lượng cây cao hơn các công thức còn lại. Chủng *Bacillus* sp.F9 được định danh là *Bacillus subtilis* F9.

Từ khóa: *Bacillus*, *Fusarium*, *Pythium*, *Trichoderma*, biện pháp sinh học, cây lạc.

MỞ ĐẦU

Lạc là một trong những cây cho dầu quan trọng nhất ở nhiều nơi trên thế giới [7]. Bệnh héo rũ, thối hạt, thối rễ do nấm trên cây lạc là một trong những bệnh gây hại nhiều nhất, giảm số lượng và chất lượng sản phẩm [3, 6]. Nhiều loại thuốc hóa học hiện nay có thể kiểm soát một số bệnh quan trọng trên cây trồng do nấm gây ra. Tuy nhiên, thuốc trừ nấm không phải là biện pháp lâu dài do ảnh hưởng sức khỏe, môi trường và khả năng đề kháng của nấm [9].

Trichoderma được xem là nhân tố tiềm năng, có khả năng kiểm soát sinh học và kích thích tăng trưởng nhiều loại cây trồng nhờ sự cạnh tranh với tác nhân gây bệnh, sinh chất kháng nấm [11, 13]. Bên cạnh đó, nhiều chủng *Bacillus* đã được báo cáo có khả năng kiểm soát sinh học một số loại bệnh cây trồng [8, 14, 15], đồng thời có hoạt tính kích thích tăng trưởng cây trồng [1]. Trên thế giới đã có một số nghiên cứu cho thấy *Trichoderma* và *Bacillus* có khả năng kiểm soát sinh học một số chủng nấm cũng như khả năng kích thích tăng trưởng cây trồng [8, 15]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sàng lọc vi nấm *Trichoderma* và vi khuẩn *Bacillus* có khả năng đối kháng sinh học với cả hai chủng nấm *Pythium* sp. và *Fusarium* sp., đồng thời khảo sát ảnh hưởng riêng rẽ và kết

hợp nấm *Trichoderma* và *Bacillus* lên sự tăng trưởng của cây và khả năng kiểm soát sinh học với cả 2 loại nấm trên mô hình trồng cây lạc thực nghiệm.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu được sử dụng từ bộ sưu tập 60 chủng *Bacillus* và 2 chủng vi nấm (*T. viride*, *T. longi*) do phòng thí nghiệm Công nghệ Vi sinh trường Đại học Mở tp. Hồ Chí Minh cung cấp. Chủng nấm *Fusarium* sp. và *Pythium* sp. được phân lập từ cây lạc bị thối rễ, thối thân, chết non do Phòng Nghiên cứu Khoa học đất, Viện Khoa học kỹ thuật Nông nghiệp miền Nam cung cấp.

Định tính khả năng đối kháng của Bacillus đối với Fusarium sp. và Pythium sp.

Vi khuẩn *Bacillus* thử nghiệm được khảo sát khả năng kháng nấm *Fusarium* sp. và *Pythium* sp. bằng phương pháp nuôi cấy kếp theo mô tả của John et al. (2010) [5]. Trên đĩa môi trường PDA (đường kính 90 mm), vi khuẩn thử nghiệm (mật độ 10^8 CFU/ mL) và nấm bệnh (mật độ 10^6 bào tử/mL) được cấy cách nhau 3 cm. Sau 72 giờ nuôi ở 30°C , xác định độ lớn vòng kháng nấm.

Định tính khả năng đối kháng của Trichoderma sp. đối với Fusarium sp. và Pythium sp.

Nấm *Trichoderma* được khảo sát khả năng kháng nấm *Fusarium* sp. và *Pythium* sp. bằng phương pháp nuôi cấy kép theo mô tả của John et al. (2010) [5]. Trên đĩa môi trường PDA (đường kính 9 cm), chọn 2 vị trí cấy nấm đối kháng và nấm bệnh sao cho khoảng cách giữa chúng là 5 cm. Đường kính nấm bệnh được xác định sau 10 ngày nuôi ủ ở 30°C, kết quả được so sánh với đối chứng không cấy nấm đối kháng.

Khảo sát hoạt tính ức chế nấm

Hoạt tính kháng nấm của vi khuẩn được xác định theo quy trình sau: vi khuẩn thử nghiệm được nuôi lắc 150 vòng/phút ở 37°C. Sau 72 giờ, dịch nuôi cấy được ly tâm (5.100 vòng/phút trong 10 phút), dịch nổi sau ly tâm được lọc qua màng lọc 0,45 µm. Dịch lọc và môi trường PDA đã chuẩn bị (môi trường NA sau khi hấp vô trùng, đặt ở bể ổn nhiệt 50°C) được trộn theo tỷ lệ 1:1, tiến hành đổ đĩa, 20 µL dịch nấm (mật độ 1-2×10⁸ bào tử/ mL) được bơm vào tâm đĩa petri đã chuẩn bị ở trên [4]. Hoạt tính kháng nấm của chủng nấm *Trichoderma* được xác định như sau: 10 µL dịch nấm bệnh và dịch nấm đối kháng (mật độ 1-2×10⁸ bào tử/mL) được cấy vào 2 vị trí cách nhau 5 cm đĩa môi trường PDA (đường kính 9 cm).

Đĩa môi trường PDA không bổ sung dịch lọc vi khuẩn/dịch nấm được sử dụng làm đĩa đối chứng. Ủ ở 30°C, sau 72 giờ, xác định phần trăm ức chế theo công thức: $I (\%) = (C-E)/C \times 100\%$. Trong đó, I là phần trăm ức chế; C là đường kính nấm mốc trên đĩa đối chứng; E là đường kính nấm mốc trên đĩa thử nghiệm [4].

Khảo sát khả năng kết hợp của *T. viride* và *Bacillus*

Nấm *T. viride* và chủng *Bacillus* tuyển chọn được khảo sát khả năng kết hợp làm tiền đề thực hiện thử nghiệm kết hợp trên cây trồng bằng phương pháp nuôi cấy kép theo mô tả của John et al. (2010) [4]. Kết quả được đọc sau 10 ngày nuôi ủ ở 30°C.

Thử nghiệm trên mô hình trồng lạc

Thử nghiệm được bố trí theo các công thức được trình bày ở bảng 3, mỗi thử nghiệm gồm 3 lần lặp lại. Hạt lạc thử nghiệm (được cung cấp bởi Trung tâm Khuyến nông tỉnh Bình Định) được khử trùng bề mặt. Sau đó, hạt được ngâm

với 2 mL dịch vi khuẩn (mật độ 10⁸ CFU/mL) hoặc dịch nấm (10⁶ bào tử/mL) [8]. Ở các công thức bổ sung *Trichoderma* trước *Bacillus*, 2 mL dịch vi khuẩn (mật độ 10⁸ CFU/mL) được tưới vào mỗi gốc cây con. Thử nghiệm được bố trí trong các chậu nhựa có lỗ thoát nước bên dưới. Mỗi chậu gồm 1 kg đất vô trùng trộn với 2 mL dịch nấm bệnh (mật độ 10⁶ bào tử/mL) và được gieo 10 hạt đậu phộng đã được ngâm với dịch khuẩn/dịch nấm [5]. Các chậu thử nghiệm được tưới nước 2 lần/ngày, quan sát tỷ lệ này nấm sau 4, 6, 8, 10 và 12 ngày. Sau đó, mỗi chậu được giữ lại 2 cây để khảo sát chiều cao cây, trọng lượng tươi, trọng lượng khô của thân và rễ, xác định hiệu quả thúc đẩy tăng trưởng GPE (%) theo Wang et al. (2009) [5, 14]. Kết quả được thu nhận sau 6 tuần.

Định danh vi khuẩn

Chủng *Bacillus* F9 có hoạt tính được định danh theo mô tả của Barrow et al. (1993) [2].

Xử lý kết quả

Kết quả được xử lý thống kê ANOVA bằng phần mềm Excel của Microsoft với độ tin cậy $p < 0,05$, và được trình bày gồm giá trị trung bình ± sai số chuẩn.

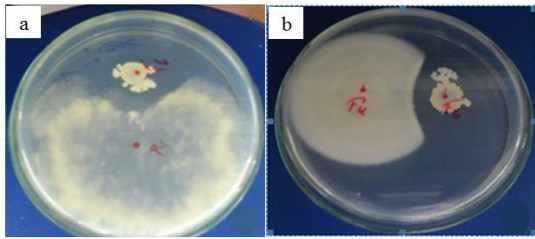
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Khả năng đối kháng của *Trichoderma* và *Bacillus* đối với *Pythium* sp. và *Fusarium* sp.

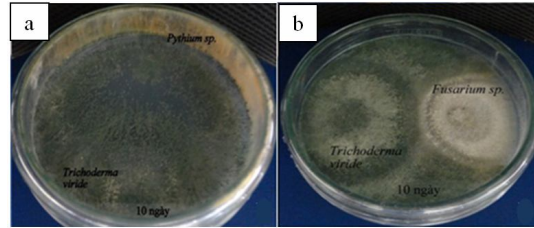
Từ 60 chủng *Bacillus* và nấm *T. viride*, *T. longi*, qua thí nghiệm nuôi cấy kép trên đĩa, chúng tôi tuyển chọn được 6 chủng *Bacillus* sp. F₃, F₅, F₆, F₉, F₁₁, F₂₂ và chủng nấm *T. viride* có khả năng kháng mạnh với 2 chủng nấm *Fusarium* sp. và *Pythium* sp.. Trong đó, các chủng *Bacillus* có độ lớn vòng kháng khuẩn >1,5 cm, và *T. viride* cho khả năng ức chế nấm bệnh với đường kính nấm bệnh <4,5 cm. Hình 1, 2 cho thấy khả năng kháng nấm của một số chủng thử nghiệm, hình 3 cho thấy hình ảnh nấm *Pythium* sp., *Fusarium* sp. đối chứng.

Hoạt tính ức chế nấm bệnh của những chủng được tuyển chọn

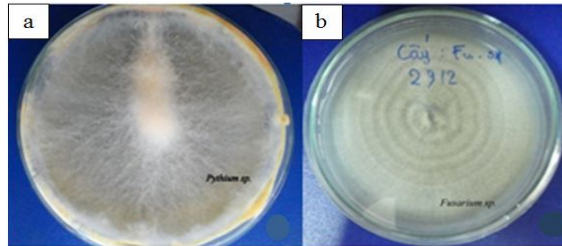
Hoạt tính ức chế nấm *Fusarium* sp. và *Pythium* sp. của các chủng thử nghiệm được xác định sau 72 giờ thử nghiệm. Kết quả được trình bày ở bảng 1.



Hình 1. Khả năng kháng nấm *Pythium* sp.
a. *Fusarium* sp.; b. *Bacillus* sp. F₆



Hình 2. Khả năng kháng nấm *Pythium* sp.
a. *Fusarium* sp.; b. *T. viride*



Hình 3. Nấm *Pythium* sp. (a) và *Fusarium* sp. (b) đối chứng trên môi trường PDA

Bảng 1. Kết quả khảo sát hoạt tính kháng nấm của các chủng thử nghiệm

Công thức	Hoạt lực ức chế nấm bệnh (%)	
	<i>Pythium</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.
<i>Bacillus</i> sp.F9	64,81±0,98 a	70,92±1,88 a
<i>Bacillus</i> sp. F ₃	54,07±0,37 bc	54,61±0,71 bc
<i>Bacillus</i> sp. F ₆	50,74±0,98 c	56,03±0,71 bc
<i>Bacillus</i> sp. F ₅	39,63±1,61 d	50,35±0,71 cd
<i>Bacillus</i> sp. F ₁₁	59,26±0,37 ab	59,57±3,25 b
<i>Bacillus</i> sp. F ₂₂	35,19±0,98 de	47,52±1,88 d
<i>T. viride</i>	88,89±1,28	81,11±1,70

Trên cùng một cột, các giá trị trung bình theo sau cùng một chữ thì không khác biệt ở mức ý nghĩa 5%.

Từ kết quả bảng 1, chúng tôi nhận thấy khả năng ức chế nấm *Pythium* sp. và *Fusarium* sp. của nấm *T. viride* cao nhất (88,89±1,28% và 81,11±1,70%). Chủng vi khuẩn *Bacillus* sp.F9 có khả năng ức chế mạnh với cả 2 chủng nấm bệnh (64,81±0,98% và 70,92±1,88%) và có ý nghĩa thống kê so với các chủng còn lại. Tiếp theo là các chủng *Bacillus* sp. F₁₁, F₃, F₆, F₅ và F₂₂. Kết quả kháng nấm trong nghiên cứu của chúng tôi cao hơn so với kết quả của Morsy et al. (2009) [8], khả năng kháng nấm *F. solani* của *T. viride* và *Bacillus* lần lượt là 57,8% và 34,4% và kết quả của Wang et al. (2009) [14], khả năng kháng nấm *F. oxysporum* của chủng *B. licheniformis* CHM1 là 51,61%.

Khả năng kết hợp của những chủng được tuyển chọn

Những chủng thử nghiệm được kiểm tra khả năng kết hợp bằng phương pháp nuôi cấy kép. Sau 3 ngày, khoảng cách giữa nấm *T. viride* và các chủng *Bacillus* thử nghiệm được trình bày ở bảng 2.

Theo kết quả bảng 2, đường kính giữa *T. viride* và chủng *Bacillus* sp.F₉ thấp nhất so với các chủng còn lại, đồng thời, chủng *Bacillus* sp.F₉ có kết quả kháng nấm cao đối với 2 chủng nấm bệnh (bảng 1). Chúng tôi tuyển chọn chủng *Bacillus* sp.F₉ để kết hợp với *T. viride* trên cùng 1 lô thử nghiệm trong các thí nghiệm tiếp theo.

Bảng 2. Kết quả kháng nấm *T. viride* của các chủng *Bacillus* thử nghiệm

Chủng	<i>T. viride</i> (đường kính vòng kháng-cm)
<i>Bacillus</i> sp. F ₂₂	1,5 c
<i>Bacillus</i> sp. F ₁₁	1,8 b
<i>Bacillus</i> sp.F ₉	1,3 d
<i>Bacillus</i> sp. F ₆	2,0 a
<i>Bacillus</i> sp. F ₅	1,7 b
<i>Bacillus</i> sp. F ₃	1,7 b

Trên cùng một cột các giá trị trung bình theo sau cùng một chữ thì không khác biệt ở mức ý nghĩa 5%.

Khả năng nảy mầm của cây lạc trên mô hình thực nghiệm

Sau 12 ngày thử nghiệm, khả năng nảy mầm của hạt lạc ở các thí nghiệm trên mô hình trồng lạc được trình bày ở bảng 3(A-D).

Từ bảng 3A, chúng tôi nhận thấy, khả năng nảy mầm của cây lạc ở các công thức khá cao.

Trong đó, công thức bổ sung *T. viride* và *T. viride* trước *Bacillus* sp.F₉ 6 ngày có kết quả cao nhất (93,3±0,5%) và có khác biệt thống kê so với các công thức còn lại (90%).

Theo bảng 3B, công thức gây nhiễm nấm *Pythium* sp. có khả năng nảy mầm thấp nhất (30,0±1,6%). Ở các công thức 7-10 được bổ sung nhân tố kiểm soát, khả năng nảy mầm cao hơn (76,7-90,0%). Trong đó, khả năng nảy mầm của công thức 9, 10 bổ sung kết hợp 2 nhân tố *T. viride* và *Bacillus* sp.F₉ cao hơn và có khác biệt thống kê so với công thức bổ sung riêng rẽ.

Theo bảng 3C, công thức gây nhiễm nấm *Fusarium* sp. có khả năng nảy mầm thấp nhất (46,7±0,7%). Ở các công thức 12-15 được bổ sung nhân tố kiểm soát, khả năng nảy mầm cao hơn (80,0-90,0%). Trong đó, khả năng nảy mầm của lạc tại công thức 14, 15 bổ sung kết hợp 2 tác nhân *T. viride* và *Bacillus* sp.F₉ cao hơn và có khác biệt thống kê so với công thức bổ sung riêng rẽ.

Bảng 3. Khả năng nảy mầm của hạt lạc

Công thức	Các lô thí nghiệm và đối chứng	Khả năng nảy mầm (%)
A	Tại các lô thí nghiệm và đối chứng	
1	Đối chứng	90,0 b
2	<i>T. viride</i>	93,3 a
3	<i>Bacillus</i> sp.F ₉	90,0 b
4	<i>T. viride</i> trước <i>Bacillus</i> sp.F ₉ 6 ngày	93,3 a
5	<i>T. viride</i> + <i>Bacillus</i> sp.F ₉	90,0 b
B	Tại lô đối chứng và gây nhiễm <i>Pythium</i> sp.	
1	Đối chứng	90,0 a
6	<i>Pythium</i> sp.	30,0 d
7	<i>Pythium</i> sp. + <i>T. viride</i>	80,0 b
8	<i>Pythium</i> sp. + <i>Bacillus</i> sp.F ₉	76,7 c
9	<i>Pythium</i> sp. + <i>T. viride</i> trước <i>Bacillus</i> sp.F ₉ 6 ngày	90,0 a
10	<i>Pythium</i> sp. + <i>T. viride</i> + <i>Bacillus</i> sp.F ₉	90,0 a
C	Tại lô đối chứng và gây nhiễm <i>Fusarium</i> sp.	
1	Đối chứng	90,0 a
11	<i>Fusarium</i> sp.	46,7 e
12	<i>Fusarium</i> sp. + <i>T. viride</i>	83,3 b
13	<i>Fusarium</i> sp. + <i>Bacillus</i> sp.F ₉	80,0 c
14	<i>Fusarium</i> sp. + <i>T. viride</i> trước <i>Bacillus</i> sp.F ₉ 6 ngày	90,0 a
15	<i>Fusarium</i> sp. + <i>T. viride</i> + <i>Bacillus</i> sp.F ₉	90,0 a
D	Tại lô đối chứng và gây nhiễm cả <i>Pythium</i> sp. và <i>Fusarium</i> sp.	
1	Đối chứng	90,0 a
16	<i>Pythium</i> sp. + <i>Fusarium</i> sp.	16,7 f

17	<i>Pythium</i> sp. + <i>Fusarium</i> sp. + <i>T. viride</i>	76,7 d
18	<i>Pythium</i> sp. + <i>Fusarium</i> sp. + <i>Bacillus</i> sp.F9	73,3 e
19	<i>Pythium</i> sp. + <i>Fusarium</i> sp. + <i>T. viride</i> trước <i>Bacillus</i> sp.F9 6 ngày	83,3 b
20	<i>Pythium</i> sp.+ <i>Fusarium</i> sp. + <i>T. viride</i> + <i>Bacillus</i> sp.F9	80,0 c

Trên cùng một cột, các giá trị trung bình theo sau cùng một chữ thì không khác biệt ở mức ý nghĩa 5%.

Theo bảng 3D, công thức gây nhiễm đồng thời 2 chủng nấm *Pythium* sp. và *Fusarium* sp. cho khả năng nảy mầm thấp nhất (16,7±1,2%). Ở các công thức 17-20 được bổ sung tác nhân kiểm soát, khả năng nảy mầm cao hơn (73,3-83,3%). Trong đó, khả năng nảy mầm của công thức 19, 20 bổ sung kết hợp 2 chủng *T. viride* và *Bacillus* sp.F9 cao hơn và có khác biệt thống kê so với công thức bổ sung riêng rẽ.

Từ số liệu ở bảng 3(B, C, D), chúng tôi nhận thấy ở các công thức gây nhiễm nấm bệnh có khả năng hạt nảy mầm thấp nhất (từ 16-46%), trong đó, công thức 16, gây nhiễm cả hai loại nấm là 16,7±1,2% (bảng 3D) thấp nhất trong các công thức. Ở các công thức bổ sung vi sinh vật đối kháng, tỷ lệ nảy mầm khá cao từ 73,3-90%. Những công thức kết hợp *T. viride* trước *Bacillus* sp.F9 6 ngày và đồng thời, tỷ lệ nảy mầm cao hơn so với công thức bổ sung riêng rẽ.

Khả năng kích thích tăng trưởng lạc trên mô hình thực nghiệm

Khả năng kích thích tăng trưởng của chủng *T. viride* và *Bacillus* sp.F9 trên mô hình trồng lạc được khảo sát qua các chỉ tiêu: chiều cao

thân, trọng lượng tươi, trọng lượng khô của rễ và thân. Mã công thức tương ứng với các công thức trình bày ở bảng 3. Kết quả thử nghiệm sau 6 tuần khảo sát được trình bày ở bảng 4(A-D).

Theo bảng 4A, chúng tôi nhận thấy ở công thức 4, kết hợp *T. viride* trước *Bacillus* sp.F9 6 ngày có khả năng kích thích tăng trưởng cao nhất (chiều cao: 28,73 cm, trọng lượng rễ tươi: 3,71 g, trọng lượng rễ khô: 0,39 g, trọng lượng thân tươi: 16,66 g, trọng lượng thân khô: 2,08 g, GPE 23,71%), tiếp theo là công thức 5, phối hợp đồng thời *T. viride* và *Bacillus* sp.F9.

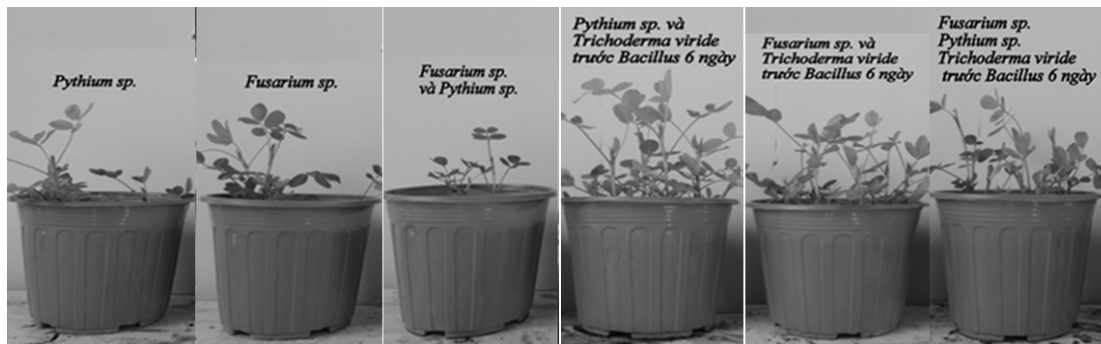
Theo bảng 4B, chúng tôi nhận thấy, ở công thức 6 gây nhiễm nấm *Pythium* sp., các chỉ tiêu tăng trưởng có kết quả thấp nhất so với các công thức được bổ sung vi sinh vật đối kháng, trong đó, các công thức bổ sung kết hợp 2 nhân tố *T. viride* và *Bacillus* sp.F9 có hiệu quả cao hơn so với công thức bổ sung riêng rẽ. Công thức 9, gây nhiễm *Pythium* sp. và xử lý kết hợp *T. viride* trước *Bacillus* sp.F9 6 ngày có chiều cao cây, trọng lượng rễ tươi, rễ khô, trọng lượng thân tươi, thân khô, GPE lần lượt tăng 38,15%, 33,92%, 57,14%, 29,31%, 36,84%, 46,27% so với công thức 6 chỉ gây nhiễm nấm.

Bảng 4. Khả năng kích thích tăng trưởng cây lạc

Công thức	Chiều cao (cm)	Trọng lượng rễ (g)		Trọng lượng thân (g)		GPE (%)
		Tươi	Khô	Tươi	Khô	
A	Ở các công thức đối chứng					
1	21,00 d	2,81 e	0,29 c	12,73 d	1,46 c	0,00 e
2	23,00 c	2,99 c	0,31 b	13,47 c	1,69 b	5,57 c
3	22,83 c	2,88 d	0,30 b	13,08 cd	1,63 b	3,40 d
4	28,73 a	3,71 a	0,39 a	16,66 a	2,08 a	23,71 a
5	23,80 b	3,65 b	0,36 a	14,47 b	2,07 a	14,22 b
B	Ở các công thức đối chứng và gây nhiễm <i>Pythium</i> sp.					
1	21,00 a	2,81 a	0,29 a	12,73 a	1,46 a	0,00 a
6	12,37 d	1,87 d	0,12 c	8,32 e	0,84 d	-52,50 e
7	17,33 c	2,45 c	0,26 b	9,90 d	1,08 c	-25,87 d
8	16,67 c	2,44 c	0,26 b	9,92 d	1,06 c	-25,84 d
9	20,00 b	2,83 a	0,28 ab	11,77 b	1,33 b	-6,23 b
10	19,93 b	2,68 b	0,27 ab	11,51 c	1,25 b	-9,55 c

C						
Ở các công thức đối chứng và gây nhiễm <i>Fusarium</i> sp.						
1	21,00 a	2,81 a	0,29 a	12,73 a	1,46 a	0,00 a
11	13,67 c	1,47 e	0,12 f	7,96 e	0,87 d	-64,78 e
12	18,33 b	2,02 d	0,16 e	9,65d	1,04 c	-32,51 d
13	17,70 b	2,06 cd	0,17 de	9,76 d	1,02 c	-31,47 d
14	20,93 a	2,28 b	0,23 b	11,96 b	1,37 ab	-9,14 b
15	20,43 a	2,20 bc	0,19 c	11,71 c	1,29 b	-11,75 c
D						
Ở các công thức đối chứng và gây nhiễm <i>Pythium</i> sp. và <i>Fusarium</i> sp.						
1	21,00 a	2,81 a	0,29 a	12,73 a	1,46 a	0,00 a
16	11,83 e	1,35 d	0,10 c	6,22 e	0,63 e	-105,19 d
17	14,97 cd	1,86 c	0,14 b	8,98 cd	0,84 cd	-43,46 c
18	14,57 d	1,82 c	0,13 b	8,82 d	0,81 d	-46,00 c
19	16,67 b	2,06 b	0,15 b	9,59 b	0,95 b	-33,56 b
20	15,67 e	2,03 b	0,15 b	9,57 b	0,95 b	-34,06 b

Trên cùng một cột các giá trị trung bình theo sau cùng một chữ thì không khác biệt ở mức ý nghĩa 5%.



Hình 4. Cây lạc ở một số công thức sau 6 tuần thử nghiệm

Theo bảng 4C, chúng tôi nhận thấy, ở công thức 11 gây nhiễm nấm *Fusarium* sp., các chỉ tiêu tăng trưởng có kết quả thấp nhất so với các công thức được bổ sung vi sinh vật đối kháng, trong đó, các công thức bổ sung kết hợp 2 nhân tố *T. viride* và *Bacillus* sp.F9 có hiệu quả cao hơn so với công thức bổ sung riêng rẽ. Công thức 14, gây nhiễm *Pythium* sp. và xử lý kết hợp *T. viride* trước *Bacillus* sp.F9 6 ngày có chiều cao cây, trọng lượng rễ tươi, rễ khô, trọng lượng thân tươi, thân khô, GPE lần lượt tăng 34,69%, 35,53%, 47,83%, 33,44%, 36,5% và 55,64% so với công thức 11 chỉ gây nhiễm nấm.

Theo bảng 4D, chúng tôi nhận thấy, ở công thức 16 gây nhiễm cả 2 nấm *Pythium* sp. và *Fusarium* sp., các chỉ tiêu tăng trưởng có kết quả thấp nhất so với các công thức được bổ sung vi sinh vật đối kháng, trong đó, các công thức bổ sung kết hợp 2 nhân tố *T. viride* và

Bacillus sp.F9 có hiệu quả cao hơn so với công thức bổ sung riêng rẽ. Công thức 19, gây nhiễm *Pythium* sp. và xử lý kết hợp *T. viride* trước *Bacillus* sp.F96 ngày có chiều cao cây, trọng lượng rễ tươi, rễ khô, trọng lượng thân tươi, thân khô, GPE lần lượt tăng 9,03%, 34,47%, 33,33%, 35,14%, 33,68%, 71,63% so với công thức 16 chỉ gây nhiễm 2 nấm. Hình 4 chỉ rõ hình ảnh của một số công thức sau 6 tuần thử nghiệm.

Theo kết quả ở bảng 4, chúng tôi nhận thấy, các công thức gây nhiễm nấm bệnh có chiều cao cây (11,83-13,67 cm), trọng lượng rễ tươi (1,35-1,87 g), rễ khô (0,10-0,12 g), trọng lượng thân tươi (6,22-8,32 g), thân khô (0,63-0,87 g) thấp hơn so với các công thức còn lại. Ở công thức gây nhiễm *Pythium* sp. và/hoặc *Fusarium* sp. có bổ sung các chủng đối kháng, các chỉ tiêu khảo sát đều cao hơn so với các công thức gây nhiễm

trương ứng, trong đó, công thức bổ sung kết hợp *T. viride* trước *Bacillus* sp.F9 6 ngày mang lại kết quả tốt nhất, tiếp theo là công thức bổ sung đồng thời. Kết quả này có thể được giải thích do khi bổ sung cùng lúc, *Bacillus* sp.F9 sẽ ức chế nấm bệnh, đồng thời cũng ức chế một phần *T. viride*. Còn khi bổ sung *T. viride* trước 6 ngày, hoạt tính kháng nấm của *T. viride* được biểu hiện trước, sau đó bổ sung *Bacillus* vào, *Bacillus* sẽ ức chế phần nấm bệnh còn lại và lúc này việc ức chế *T. viride* không còn ảnh hưởng đến hoạt tính kháng nấm. Kết quả này cho thấy 2 nhân tố hoàn toàn có thể được kết hợp trong cùng một chế phẩm để gia tăng hoạt tính hoặc kết hợp xen kẽ. Kết hợp xen kẽ cho thấy có sự bất tiện trong sử dụng thực tế, tuy nhiên sẽ là giải pháp hữu hiệu trong trường hợp canh tác theo hướng nông nghiệp hữu cơ, một khi sử dụng công cụ sinh học trong kích thích tăng trưởng và kiểm soát sinh học là giải pháp hiệu quả nhất. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi tương tự với nhóm tác giả Morsy et al. (2009) và Yobo et al. (2011), kết quả cho thấy sự kết hợp *Trichoderma* và *Bacillus* cho hiệu quả điều trị nấm bệnh và kích thích tăng trưởng lạc tốt hơn so với một nhân tố [8, 15].

KẾT QUẢ ĐỊNH DANH CHỦNG *Bacillus* sp.F9

Dựa theo mô tả của Barrow et al. (1993) [2], chủng *Bacillus* sp.F9 có đặc điểm tương tự như *Bacillus subtilis* (hệ số tương đồng 90%). Do đó chủng *Bacillus* sp.F9 được định danh là *Bacillus subtilis* F9. Khả năng kháng nấm gây bệnh ở cây trồng và kích thích tăng trưởng cây trồng của loài *B. subtilis* đã được nhiều tác giả nghiên cứu như Rytter et al. (1989) [10].

KẾT LUẬN

Sự kết hợp với 2 tác nhân *T. viride* và *B. subtilis* F9 nhằm kích thích tăng trưởng và kiểm soát sinh học nấm *Pythium* sp. và *Fusarium* sp. trên cây lạc cho hiệu quả cao hơn một tác nhân. Sự kết hợp xen kẽ, *T. viride* trước *B. subtilis* F9 6 ngày cho hiệu quả cao nhất.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ahmad F., Ahmad I., Khan M. S., 2006. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research*, 163: 173-181.
- Barrow G. I., Feltham R. K. A., 1993. Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria. The press syndicate of The University of Cambridge, 3: 87-89.
- Bell D. K., Minton, N. A., 1973. Postemergence damping-off of peanut plants caused by *Pythium myriotylum*. *Phytopathology*, 63(12): 1544-1545.
- Chang W. T., Chen Y. C., Jao C. L., 2007. Antifungal activity and enhancement of plant growth by *Bacillus cereus* grown on shellfish chitin wastes. *Science Direct, Bioresource Technology*, 98: 1224-1230.
- John R. P., Tyagi R. D., Prévost D., Satinder K. B., Pouleur S., Surampalli R.Y., 2010. Mycoparasitic *Trichoderma viride* as a biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* sp. adzuki and *Pythium arrhenomanes* and as a growth promoter of soybean. *Crop Protection*, 29: 1452-1459.
- Mahmoud E. Y., Eetmad-Draz E. I., Abolela M. F., 2006. Evaluation of some peanut cultivars for the susceptibility of infection by damping-off, root and pod rot diseases and occurrence of aflatoxigenic. *J. Agric Sci. Mansoura Univ.*, 31(12): 7589-7604.
- Mahmoud E. Y., Ibrahim M. M., Essa T. A. A., 2013. Efficacy Of Plant Essential Oils In Controlling Damping-Off And Root Rots Diseases Of Peanut As Fungicides Alternative. *Journal of Applied Science Research*, 9(3): 1612-1622.
- Morsy E. M., Abdel-Kawi K. A., Khalil M. N. A., 2009. Efficiency of *Trichoderma viride* and *Bacillus subtilis* as Biocontrol Agents gainst *Fusarium solani* on Tomato Plants. *Egypt. J. Phytopathol.*, 37(1): 47-57.
- Radja C. R., Nandakumar R., Kandan A., Suresh S., Bharathi M., 2002. *Pseudomonas fluorescences* based bioformulation for the management of sheathblight disease and leafhopper insect in rice. *Crop Prot.*, 21: 671-677.

10. Rytter J. L., Lukezic F. L., Craig R., Moorman G. W., 1989. Biological control of geranium rust by *Bacillus subtilis*. *Phytopathology*, 79: 367-370.
11. Savazzini F., Longa C. M. O., Pertot I., 2009. Impact of the biocontrol agent *Trichoderma atroviride* SC1 on soil microbial communities of a vineyard in northern Italy. *Soil Biol. Biochem.*, 41: 1457-1465.
12. Toure Y., Ongena M., Jacques P., Guiro A., Thonart P., 2004. Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. *J. App. Microb.*, 96: 1151-1160.
13. Verma M., Brar S. K., Tyagi R. D., Sahai V., Prévost D., Valéro J. R., Surampalli, R. Y., 2007. Bench-scale fermentation of *Trichoderma viride* on wastewater sludge: rheology, lytic enzymes and biocontrol activity. *Enzyme Microb. Technol.*, 41: 764-771.
14. Wang H., Wen K., Zhao X., Wang X., Li A., Hong H., 2009. The inhibitory activity of endophytic *Bacillus* sp. strain CHM1 against plant pathogenic fungi and its plant growth-promoting effect. *Crop Protection*, 28: 634-639.
15. Yobo K. S., Laing M. D., Hunter C. H., 2011. Effects of single and combined inoculations of selected *Trichoderma* and *Bacillus* isolates on growth of dry bean and biological control of *Rhizoctonia solani* damping-off. *Afr. J. Biotech.*, 10(44): 8746-8756.

EFFECTS OF SINGLE AND COMBINED INOCULATIONS OF *Trichoderma viride* AND *Bacillus* STRAINS ON GROWTH OF PEANUT AND BIOLOGICAL CONTROL OF *Fusarium* sp. AND *Pythium* sp.

**Nguyen Van Minh, Nguyen Long Ho, Pham Thi Thuy Nhung,
Vo Ngoc Yen Nhi, Dan Duy Phap, Duong Nhat Linh**

Open University, Ho Chi Minh city

SUMMARY

Trichoderma and *Bacillus* genera are the most feasible biocontrol microorganisms that suppress several fungal pathogens. We screened 25 strains *Bacillus* for suppressing *Fusarium* sp. and *Pythium* sp., which cause stem rot, root rot, young death of peanuts. The result showed that strain *Bacillus* sp.F9 could suppress *Fusarium* sp. and *Pythium* sp. at the rates of 70.92±1.88% and 64.81±0.98%, respectively. Strains *T.viride* and *Bacillus* sp.F9 were tested the ability to control *Fusarium* sp. and *Pythium* sp., as well as the ability to stimulate growth of peanuts. The dual treatment (*T. viride* and *Bacillus* sp.F9) was more efficient than the individual one; the treatment in which *T. viride* was added 6 days earlier than *Bacillus* sp.F9 and the treatment in which *T. viride* and *Bacillus* sp.F9 were added at the same time had the higher sprouting seed, survival rate as well as the greater stem length and weight than the other treatments. Strain *Bacillus* sp.F9 was identified as *B. subtilis* F9.

Keywords: *Bacillus*, *Fusarium*, *Pythium*, *Trichoderma*, biological control, peanut.

Ngày nhận bài: 15-7-2013