

ĐÁNH GIÁ HIỆU QUẢ SINH HỌC CỦA VI KHUẨN *Bacillus* TRONG PHÒNG TRỪ NẤM *Aspergillus niger* Van Tieghem GÂY BỆNH HÉO RŨ GỐC MỐC ĐEN TRÊN CÂY LẠC

Bioefficacy of *Bacillus* Isolates Against *Aspergillus niger* Van Tieghem Inciting Collar Rot in Groundnut

Nguyễn Xuân Hiếu^{1,2}, Nguyễn Thị Minh Nga², Hoàng Văn Quốc³, Trần Văn Giang³,
Nguyễn Đức Huy², Trần Hữu Danh⁴, Nguyễn Thị Thu Thủy⁵

Ngày nhận bài: 20.02.2023

Ngày chấp nhận: 15.03.2023

Abstract

The objective of this research was to select the actibacterial isolates capable of antifungal effect toward *Aspergillus niger* causing collar rot disease of groundnut. Antagonistic ability of 10 actibacterial isolates against *A. niger* was conducted in laboratory condition with 5 replications. The results found that isolate of TH1 had highest antagonistic ability with radius of inhibition zones reaches 37.12mm and percent inhibition reaches 53.03% at 6 days after co-inoculation. Sequence analysis of the 16S region indicated that bacteria isolate was *Bacillus* sp. Beside, the effectiveness of *Bacillus* sp. TH1 in controlling collar rot disease of groundnut was also tested under the net house condition with 3 replicates. The results indicated that strain of *Bacillus* sp. TH1 exhibited the most pathogenic inhibitory effects and remained effectively for up to 45 days after pathogenic inoculation. The disease rate in treatment with *Bacillus* sp. TH1 reached 3.70% and was lower than that in the chemical fungicide spray treatment.

Keywords: *Aspergillus niger*, antagonistic bacteria, *Bacillus*, Groundnut

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ở Việt Nam, cây lạc được trồng từ lâu đời và được sử dụng rộng rãi trong đời sống hàng ngày của người dân. Năm 2020, diện tích lạc của nước ta có khoảng 169,7 nghìn ha, năng suất bình quân đạt 2,51 tấn/ha, sản lượng đạt 425,5 nghìn tấn (Niên giám thống kê, 2021). Tuy nhiên do điều kiện khí hậu nóng ẩm kết hợp với sự gia tăng về diện tích trồng và việc áp dụng các biện pháp kỹ thuật thâm canh trên cây lạc làm phát sinh ngày càng nhiều các đối tượng bệnh hại, mức độ gây hại nhiều hơn làm giảm năng suất và sản lượng của cây lạc. Trong đó, chiếm đa số và gây thiệt hại nghiêm trọng nhất là bệnh do nấm, đặc biệt là các loài nấm có nguồn gốc trong đất và truyền qua hạt giống như *Aspergillus spp.*, *Sclerotium rolfsii*,... chúng gây thiệt hại về năng suất, làm chết cây con trên đồng ruộng và thậm chí tiết độc tố trên sản phẩm gây bệnh nguy hiểm cho con người và vật nuôi.

Theo Đỗ Tấn Dũng, bệnh héo rũ gốc mốc đen lạc do nấm *Aspergillus niger* Tiegh, là một trong ba tác nhân gây bệnh héo rũ chết cây rất phổ biến và có tác hại nghiêm trọng ở những vùng trồng lạc tại Việt Nam. Trong số 10 loại bệnh được xác định gây hại phổ biến và nghiêm trọng trên cây lạc tại miền Bắc Việt Nam, bệnh héo rũ gốc mốc đen do nấm *Aspergillus niger* gây ra là một trong số đó (Nguyễn Thị Ly và cs, 1993). Bệnh thối đen cổ rễ do nấm *A. niger* gây ra là một trong những bệnh gây hại phổ biến nhất ở các vùng trồng lạc tại Thừa Thiên Huế và Quảng Bình (Trần Văn Minh và cs, 2004; Trần Thị Thu Hà và cs, 2011).

Ngày nay, việc áp dụng các hướng tiếp cận mới trong việc sản xuất thuốc bảo vệ thực vật an toàn và hiệu quả đang được đẩy mạnh nghiên cứu. Trong đó, công nghệ sản xuất chế phẩm vi sinh đã đạt được nhiều thành tựu trong nông nghiệp nói chung và ngành bảo vệ thực vật nói riêng, tạo ra các sản phẩm hiệu quả, an toàn và kinh tế. Để phòng trừ bệnh héo rũ lạc đã có nhiều chế phẩm vi sinh được nghiên cứu thành công và đưa vào sử dụng trong thực tế. Một số kết quả cho thấy sử dụng chế phẩm kết hợp *Trichoderma* và *Pseudomonas* có khả năng hạn chế bệnh hại và kích thích sinh trưởng lạc (Nguyễn Đình Thi và cs, 2014). Nghiên cứu của Nguyễn Văn Viên và cs (2012) cũng cho thấy

1. Sở giáo dục và đào tạo tỉnh Quảng Trị
2. Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế
3. Trường Đại học sư phạm, Đại học Huế
4. Trung tâm dịch vụ Nông nghiệp huyện Phú Vang, Tỉnh Thừa Thiên Huế
5. Trường Đại học Nông lâm, Đại học Huế
Corresponding author: nguyenthithuthuy@huaf.edu.vn

một số chế phẩm sinh học từ nấm *Trichoderma viride* (CP2, CP3, CP4) có khả năng hạn chế bệnh héo rũ lác.

Do đó việc tiếp tục tiến hành nghiên cứu tìm ra các chủng vi sinh vật đối kháng nấm *Aspegillus niger* gây bệnh héo rũ gốc mốc đen trên cây lác là cần thiết và có ý nghĩa quan trọng trong định hướng phát triển nông nghiệp an toàn.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu nghiên cứu

- Nguồn nấm: Chủng nấm *Aspegillus niger* do phòng thí nghiệm công nghệ enzyme và protein, Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế cung cấp. Đây là chủng nấm được phân lập từ cây lác bị bệnh héo rũ gốc mốc đen trên giống L14 tại huyện Triệu Phong, tỉnh Quảng Trị và đã được định danh bằng đặc điểm hình thái, quy tắc Koch và sinh học phân tử.

- Giống lác sử dụng trong thí nghiệm nhà lưới: Giống L14 được cung cấp bởi Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập vi khuẩn có khả năng đối kháng nấm gây bệnh héo rũ gốc mốc đen

Phân lập vi khuẩn: Các mẫu đất được thu từ các ruộng lác đang phát triển mạnh (giai đoạn khoảng 30 ngày tuổi) tại các huyện Triệu Phong, Cam Lộ, tỉnh Quảng Trị, đất được thu cách lớp đất mặt từ 3-5 cm. Mỗi mẫu đất được thu ở 5 vị trí trên 2 đường chéo của ruộng lác. Để phân lập vi khuẩn, mỗi mẫu đất cân 10g mẫu đất ngâm trong 100ml dung dịch MgSO₄ (1,2%) và lắc trong 20 phút. Sau đó áp dụng biện pháp pha loãng và đổ ra đĩa với môi trường King' B và ủ từ 18 đến 24 giờ để các khuẩn lạc phát triển. Các dạng khuẩn lạc được nuôi cấy riêng lẻ trên môi trường King' B.

Khảo sát khả năng đối kháng: Tiến hành thực hiện phương pháp cấy kép (Anith và cs, 2021): Ở đĩa thí nghiệm, đặt một khối agar có đường kính 0,6cm chứa hệ sợi của dòng nấm *Aspegillus niger* đang phát triển tốt vào vị trí chính giữa đĩa chứa môi trường PDA (Potato: 200g, Dextrose: 20g, agar: 20g). Sau đó, tiến hành cấy vi khuẩn ở hai vị trí đối xứng nhau tương ứng với 1 dòng vi khuẩn lên bề mặt đĩa nấm. Ở đĩa đối chứng cấy nấm tương tự, nhưng không cấy vi khuẩn. Sau 6 ngày quan sát sự hình thành vùng kháng nấm và tính hiệu suất đối kháng của vi khuẩn được tính theo công thức (Moayed et al., 2009):

$$HSDK (\%) = (D-d) \times 100$$

Trong đó: HSDK: Hiệu suất đối kháng; D: Đường kính của tảo nấm gây bệnh ở đĩa đối chứng (mm);

d: Đường kính của tảo nấm gây bệnh ở đĩa cấy vi khuẩn đối kháng (mm).

2.2.2. Định danh chủng vi khuẩn đối kháng mạnh

Vi khuẩn đối kháng: Nuôi cấy tăng sinh các chủng vi khuẩn đối kháng trên môi trường LB, tốc độ lắc 200rpm/p ở nhiệt độ 37°C. Sau 24h, ly tâm 5000rpm/p, thu dịch huyền phù và tiến hành tách chiết DNA bằng kit tách chiết DNA cột Silica của công ty TNHH Giải pháp Y Sinh ABT.

Phương pháp định danh phân tử bằng kỹ thuật PCR bằng cách khuếch đại với cặp mồi 27F (forward): (5'-AGATTTGATCCTGGCTCAG-3') và 1492R (reverse): (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'). Thành phần phản ứng PCR: 50 ng DNA tổng số, 10 pmol của mỗi mồi, 15 µL 2× Go Taq® Green Master Mix (M7502, Promega, USA) và nước cất vô trùng (tổng thể tích 30 µL). Phản ứng PCR được thực hiện trong máy gia nhiệt MJ Mini™ (Bio-Rad, Hoa Kỳ) như sau: 95°C trong 10 phút; 30 chu kỳ ở 95°C trong 30 giây, 53°C trong 30 giây và 72°C trong 1 phút; 72°C trong 10 phút. Các sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 0,8% và được nhuộm bằng SafeView™ Classic Nucleic Acid Stain (Applied Biological Materials Inc., Canada). Hình ảnh điện di được thu nhận bằng hệ thống Ultra Slim LED Illuminator. Sản phẩm PCR được xác nhận bằng điện di trên gel agarose 1%, tinh sạch và tiến hành giải trình tự tại công ty Firstbase (Malaysia). Các trình tự sau đó được xử lý bằng phần mềm BioEdit và so sánh với các trình tự tương ứng của các chủng đã được đăng ký trên GenBank bằng công cụ BLAST trên NCBI - National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov).

2.2.3. Thử nghiệm khả năng đối kháng trong điều kiện nhà lưới

Chuẩn bị cây lác khỏe: Đất thịt nhẹ được xử lý với vôi, trộn đều với phân hữu cơ vi sinh, phân NPK, sau đó cho lượng đất bằng nhau (5kg) vào các chậu nhựa có kích thước 35x30x30cm. Hạt giống lác L14 được gieo trong các chậu nhựa, mỗi chậu gieo 3 hạt giống. Các chậu được đặt trong nhà lưới, cùng điều kiện và được tưới lượng nước như nhau.

Nguồn vi khuẩn đối kháng: Vi khuẩn đối kháng được tuyển chọn được tăng sinh bằng môi trường LB broth (NaCl 10g; Tryptone 10g và YE 5g) trên máy lắc tròn với tốc độ 120 vòng/phút

trong 48 giờ. Tiến hành hiệu chỉnh mật số vi khuẩn về 10^8 cfu/mL bằng nước cất tiệt trùng để thực hiện thí nghiệm đánh giá khả năng phòng trị bệnh héo rũ gốc mốc đen lác của bốn dòng vi khuẩn ở điều kiện nhà lưới thông qua việc kiểm tra mật số vi khuẩn bằng phương pháp đếm sống nhỏ giọt (Hoben and Somasegaran, 1982).

Nấm *Aspegillus niger*. Được nuôi cấy trên môi trường PDA trong 10 ngày để tạo bào tử. Thu bào tử nấm bằng cách cho 10 mL nước cất vô trùng vào đĩa petri chứa nguồn nấm đang phát triển, thu lấy bào tử nấm và cho qua vải lọc 2 lớp vô trùng nhằm loại bỏ sợi nấm, xác định mật số nấm bằng lam đếm hồng cầu và hiệu chỉnh mật số đạt $2,5 \times 10^6$ bào tử/mL. Huyền phù sau khi chuẩn bị xong được thêm vào 1% Tween 80 theo thể tích trước khi sử dụng để chủng bệnh nhân tạo.

Công thức thí nghiệm: Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 4 công thức, 3 lần lặp lại, mỗi lặp lại được thực hiện trên 1 chậu có 3 cây lác khỏe, sinh trưởng đồng đều, các công thức gồm:

Công thức 1(CT1): Không xử lí, không lây nhiễm bệnh (đối chứng dương)

Công thức 2(CT2): Không xử lí, lây nhiễm bệnh (đối chứng âm)

Công thức 3(CT3): Xử lí hạt giống và tưới chế phẩm vi khuẩn TH1 ở 1 ngày trước lây nhiễm bệnh

Công thức 4(CT4): Xử lí hạt giống và tưới thuốc hóa học Ridomil Gold 68WG (Metalaxyl M + Mancozeb) ở 1 ngày trước lây nhiễm bệnh.

Phương pháp thực hiện: Sử dụng 15 gam hạt giống lác ngâm trong 2mL dịch vi khuẩn (mật độ 10^8 CFU/mL) trong thời gian 9h, sau đó gieo hạt vào chậu thí nghiệm. 15 ngày sau gieo (cây lác có 2-3 lá), tưới 20mL dung dịch vi khuẩn ở mật số 10^8 cfu/mL cho một chậu thí nghiệm vào gốc lác và vùng đất xung quanh gốc theo từng công thức tương ứng. Tiếp tục lây nhiễm nấm bệnh lên cây lác bằng cách sử dụng bình phun vi sinh vật (hand sprayer) phun 20 mL huyền phù bào tử nấm/chậu với mật số $2,5 \times 10^6$ bào tử/mL vào gốc lác và vùng đất xung quanh gốc. Tương tự, thực hiện với công thức sử dụng thuốc hóa học. Sau đó, đặt các chậu thí nghiệm trong nhà lưới và theo dõi tỷ lệ cây chết trong mỗi công thức.

Chỉ tiêu theo dõi: Theo dõi tỷ lệ cây chết do nhiễm bệnh héo rũ gốc mốc đen (%) tại thời điểm 7, 15, 30 ngày sau nhiễm nấm bệnh.

2.2.4. Xử lý số liệu

Số liệu thí nghiệm được xử lý trên phần mềm MS Excel và kiểm định thống kê ANOVA bằng phần mềm Statistix 10.0

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1 Kết quả phân lập vi khuẩn đối kháng nấm bệnh *A. niger*

Kết quả phân lập được 10 chủng vi khuẩn từ các mẫu đất được thu thập từ các vị trí khác nhau trên các ruộng lác ở huyện Triệu Phong và Cam Lộ, tỉnh Quảng Trị (bảng 1).

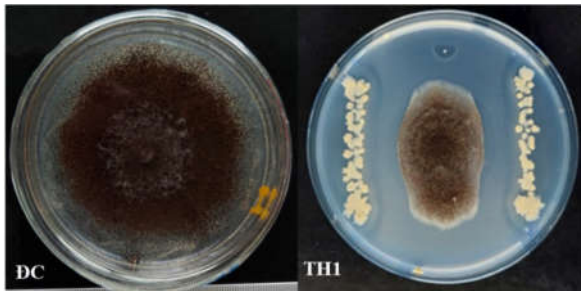
Bảng 1. Hiệu suất đối kháng của các chủng vi khuẩn đối với nấm *A. niger*

STT	Kí hiệu chủng vi khuẩn	Đường kính vòng vô khuẩn (D-d, mm)	Hiệu suất đối kháng (%)
1	TH1	37,12a	53,03a
2	TH4	19,41c	27,73c
3	TH10	20,13c	28,76c
4	TH14	20,65c	29,50c
5	TH16	26,12b	37,31b
6	TH23	18,31c	26,16c
7	TH31	27,19b	38,84b
8	TH35	15,23d	21,76d
9	TH41	26,23b	37,47b
10	TH44	15,01d	21,44d

Ghi chú: Các giá trị trung bình theo cột có các chữ cái in thường khác nhau sai khác ở $P \leq 0,05$

Kết quả bảng 1 cho thấy 10 chủng vi khuẩn đều có khả năng đối kháng với chủng nấm *Aspegillus niger* thu thập tại tỉnh Quảng Trị, hiệu suất đối kháng giao động từ 21,44 - 53,03%. Trong đó, chủng vi khuẩn TH1 có khả năng đối kháng cao nhất đối với nấm *A. niger* với hiệu suất đối kháng đạt 53,03%, cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các chủng vi khuẩn thí nghiệm còn lại. Tiếp đến là 3 chủng vi khuẩn TH31, TH41 và TH16 có khả năng đối kháng khá cao với chủng nấm *A. niger*, với hiệu suất đối kháng lần lượt là 38,84%, 37,47% và 37,31%. Các chủng vi khuẩn TH35 và TH44 có khả năng đối kháng thấp với hiệu suất đối kháng lần lượt là 21,76% và 21,44%. Tóm lại, chủng vi khuẩn TH1 có khả năng đối kháng cao với nấm *A. niger* ở thời điểm 6 ngày sau khi bố trí thí nghiệm và có thể là tác nhân sinh học có triển vọng để ức chế sự phát triển của nấm *A. niger* gây héo rũ gốc mốc đen trên cây lác. Một số kết quả nghiên cứu trước đây cho rằng vi khuẩn có khả năng ức chế nấm *Fusarium solani* gây bệnh héo vàng trên cây ớt (Rajkumar et al., 2018) và có khả năng ức chế cao nấm *Fusarium solani* gây bệnh vàng lá thối rễ trên cây cam sành (Đặng Thị Yến Nhung và cs,

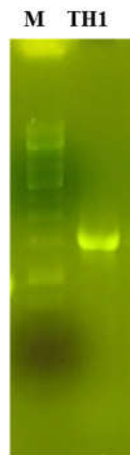
2021). Ngoài ra, vi khuẩn có khả năng đối kháng với nấm *Colletotrichum* sp. gây bệnh thán thư trên cây ớt (Nguyễn Hữu Thiện và cs., 2021). Như vậy, trong nghiên cứu này chủng vi khuẩn TH1 được chọn để sử dụng cho những thí nghiệm tiếp theo.



Hình 1. Khả năng đối kháng của chủng vi khuẩn TH1 đối với nấm *Aspegillus niger* ở thời điểm 6 ngày sau khi bố trí thí nghiệm (Bên trái: đối chứng; Bên phải: đĩa có cấy nấm *A. niger* và vi khuẩn TH1)

3.2 Định danh vi khuẩn TH1

ADN của chủng vi khuẩn TH1 đã được ly trích và khuếch đại bằng phản ứng PCR với cặp mồi 27F và 1492R. Kết quả điện di sản phẩm PCR của mẫu ADN xuất hiện băng ở vị trí khoảng 1400bp so với thang chuẩn (Hình 2).



Hình 2. Kết quả điện di sản phẩm PCR của chủng vi khuẩn TH1 (M: 1kb DNA ladder).

Trình tự nucleotide vùng 16S rRNA của chủng vi khuẩn TH1 (Hình 3) sau khi được hiệu chỉnh loại bỏ các đoạn chất lượng thấp được sử dụng để truy cập Ngân hàng Gen (BLAST: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Trên cơ sở kết quả tương đồng với các trình tự có sẵn trong Ngân hàng Gen, loài của mẫu khảo sát được xác định. Kết quả cho thấy chủng vi khuẩn TH1 có độ tương đồng 100% với vi khuẩn *Bacillus* sp. (mã số: MT138565.1).

```
AAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGG
GTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTCTGAAC
CGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCT
AGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCAC
ACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGAC
GAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAG
GGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCCAGAAAGCCACGGCTAA
CTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGG
GCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCCGGGAGGGGTCATTGGAAA
CTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATG
TGGAGGAACACCAGTGCGGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTG
GGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGG
GTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGAC
TGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAAC
GCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCTTCGGGGG
CAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTGCTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAA
CGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACA
AACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCT
ACAATGGACAGAACAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTT
CGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCG
CGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACC GCCCGTACACCACGAGAGTTTGTAAACCCCGAA
GTCGGTGAGGTAACCTT TAGGAGCCAGCCG
```

Hình 3. Trình tự vùng 16S rRNA của chủng vi khuẩn TH1

Trong nhóm vi sinh vật có lợi, vi khuẩn *Bacillus* spp. là một trong những tác nhân kiểm soát sinh học được nghiên cứu và ứng dụng rộng rãi trong canh tác nông nghiệp bền vững. (Pal và Gardener, 2006). Vi khuẩn *Bacillus* sp. đã được ghi nhận có khả năng ức chế sự phát triển của các nấm bệnh thực vật như *Fusarium graminearum*, *Alternaria alternata*, *Rhizoctonia solani*, *Cryphonectria parasitica* và *Phytophthora capsici* (Zhao et al., 2010).

3.3 Khả năng hạn chế bệnh héo rũ gốc mốc đen trên cây lạc của dòng vi khuẩn *Bacillus* sp. TH1 trong điều kiện nhà lưới

Kết quả khảo sát khả năng phòng trừ nấm *Aspegillus niger* gây bệnh héo rũ gốc mốc đen hại lạc của dòng vi khuẩn *Bacillus* sp. TH1 trong điều kiện nhà lưới thông qua tỷ lệ bệnh được trình bày ở bảng 2. Kết quả cho thấy dòng vi khuẩn *Bacillus* sp. TH1 thể hiện khả năng kiểm soát tốt mầm bệnh khi so sánh với công thức sử dụng thuốc hóa học.

Bảng 2. Tỷ lệ bệnh héo rũ gốc mốc đen lạc ghi nhận qua các thời điểm điều tra

Công thức TN	Tỷ lệ bệnh qua các thời điểm điều tra (%)			
	7 NSNB	15 NSNB	30 NSNB	45 NSNB
CT1	0,00b	0,00d	0,00d	0,00d
CT2	37,04a	88,89a	100,00a	100,00a
CT3	0,00b	3,70c	3,70c	3,70c
CT4	0,00b	18,52b	29,63b	29,63b

Ghi chú: NSNB: Ngày sau nhiễm bệnh; * Các giá trị trung bình tỷ lệ bệnh theo cột có các chữ cái in thường khác nhau sai khác ở $P \leq 0,05$

Cụ thể, ở thời điểm 7 NSNB, các công thức 1 (đối chứng dương), công thức 3 (ngâm hạt và tưới chế phẩm vi khuẩn) và công thức 4 (ngâm hạt và tưới thuốc hóa học) đều ức chế tốt nấm bệnh, tỷ lệ bệnh bằng không, nhỏ hơn và khác biệt ý nghĩa thống kê khi so với công thức đối chứng âm (37,04%). Đến thời điểm 15 NSNB, công thức ngâm hạt giống và tưới chế phẩm vi khuẩn có tỷ lệ bệnh (3,7%) thấp hơn các công thức 2 và 4. Công thức xử lí thuốc hóa học không còn duy trì tốt khả năng kiểm soát bệnh khi tỷ lệ bệnh tăng từ 0% (thời điểm 7 NSNB) lên 18,52%. Công thức đối chứng có tỷ lệ bệnh tăng đột biến từ 37,04% (7 NSNB) lên 88,89%.

Đến thời điểm 30 NSNB, tỷ lệ bệnh ở công thức đối chứng đạt 100%, cao nhất và khác biệt ý nghĩa thống kê ở mức 5% so với các công thức còn lại. Trong khi công thức sử dụng dòng vi khuẩn *Bacillus* sp. TH1 cho hiệu quả cao khi vẫn giữ nguyên tỷ lệ bệnh (3,7%). Công thức sử dụng thuốc hóa học có tỷ lệ bệnh tăng lên đạt 29,63% (Hình 4). Đến thời điểm 45 NSNB, tỷ lệ bệnh ở các công thức tương đương với thời điểm 30 NSNB.

Tóm lại, qua kết quả khảo sát cho thấy công thức phun chế phẩm vi khuẩn *Bacillus* sp. TH1 thể hiện khả năng kiểm soát tốt bệnh héo rũ gốc mốc đen hại lạc và duy trì hiệu quả ổn định hơn so với thuốc hóa học. Qua đó cho thấy, chế phẩm vi khuẩn *Bacillus* sp. TH1 thể hiện hiệu quả kiểm soát tốt bệnh héo rũ gốc mốc đen do nấm *Aspegillus niger* gây ra trong điều kiện nhà lưới thông qua khả năng khống chế sự tiến triển tỷ lệ bệnh qua các thời điểm thu thập chỉ tiêu.



Hình 4. Các công thức thí nghiệm ở 30 ngày sau nhiễm bệnh

4. KẾT LUẬN

Trong số 10 chủng vi khuẩn có khả năng đối kháng với nấm *A. niger* đã xác định được chủng TH1 có đường kính vòng vô khuẩn cao nhất (37,12mm) tương ứng với hiệu suất đối kháng mạnh nhất (53,03%). Phân tích trình tự 16S-rRNA và so sánh trình tự trên NCBI-Blast cho thấy chủng TH1 là *Bacillus* sp. Thử nghiệm lây nhiễm nhân tạo trong điều kiện nhà lưới, cho thấy vi khuẩn *Bacillus* sp. TH1 thể hiện khả năng kiểm soát tốt bệnh héo rũ gốc mốc đen trên cây lạc do nấm *Aspegillus niger* gây ra khi xử lý hạt giống trước khi gieo và phun chế phẩm vào thời điểm trước khi nhiễm nấm 1 ngày.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được hỗ trợ bởi Bộ Giáo dục và Đào tạo Việt Nam (Mã số đề tài: CT-2022-09-DHH-04).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đỗ Tấn Dũng, 2002. *Bệnh héo rũ cây trồng cạn và biện pháp phòng chống*. NXB Nông nghiệp, Hà Nội.
2. Trần Thị Thu Hà, Trương Thị Diệu Hạnh và Trần Thị Nga, 2011. Ảnh hưởng của chất hoạt hóa bề mặt từ các chủng vi khuẩn *Pseudomonas* đến nấm gây bệnh héo rũ lạc ở điều kiện in vitro, *Tạp chí Bảo vệ thực vật*, 2, tr. 30 – 34.
3. Nguyễn Thị Ly và Phan Bích Thu, 1993, Nguyên nhân gây bệnh chết héo lạc ở miền Bắc Việt Nam, *Hội nghị khoa học BVTV*, tháng 3/1993, tr. 15 - 16.
4. Trần Văn Minh, Nguyễn Thị Thanh, Nguyễn Thị Nguyệt, Lê Như Cương, 2004. Kết quả nghiên cứu nhóm bệnh héo rũ hại lạc và một số biện pháp phòng trừ tại Quảng Bình. *Tạp chí Nông nghiệp phát triển nông thôn* 4, tr. 1537 – 1538.
5. Đặng Thị Yến Nhung, Nguyễn Thị Mùi, Nguyễn Khởi Nghĩa, 2021. Khảo sát khả năng đối kháng của hai dòng vi khuẩn phân lập M5.1 và M6 từ hạt mè lên men với nấm *Fusarium solani* gây bệnh vàng lá thối rễ trên cây cam sành trong điều kiện invitro. *Hội thảo quốc gia bệnh hại thực vật Việt Nam*, ISBN: 978-604-60-3373-8. Nhà xuất bản Nông nghiệp.
6. Nguyễn Đình Thi, Lê Đình Hường, Trần Thị Thu Hà và Đỗ Vũ Quốc 2014. Nghiên cứu ảnh hưởng của chế phẩm *Trichoderma* và *Pseudomonas* trên các nền phân bón đến lạc hè thu tại Thừa Thiên Huế, *Tạp chí Khoa học Đại học Huế*, 98, tr. 177 - 187.
7. Nguyễn Hữu Thiện, Trần Thị Cẩm Nhung, Nguyễn Khởi Nghĩa, 2021. Đánh giá khả năng kiểm soát bệnh thán thư trên ớt do nấm *Collectotrichum* sp. của hai dòng vi khuẩn *Bacillus* sp. M3 và *Bacillus* sp. G5 ở điều kiện nhà lưới.
8. Nguyễn Văn Viên, Nguyễn Thị Tú và Bùi Văn Công, 2012. Nghiên cứu sản xuất và sử dụng chế phẩm nấm đối kháng *Trichoderma viride* phòng trừ một số bệnh nấm hại vùng rễ cây khoai tây, lạc, đậu tương, *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, 10, tr. 95 - 102.
9. Tổng cục thống kê Việt Nam, 2021. *Niên giám thống kê tóm tắt năm, 2020*. Nhà xuất bản thống kê.
10. H. J. Hoben and P. Somasegaran, 1982. Comparison of the Pour, Spread, and Drop Plate Methods for Enumeration of *Rhizobium* spp. in Inoculants Made from Presterilized Peat. *Appl Environ Microbiol*. 1982 Nov; 44(5): 1246–1247.
11. K.N. Anith, N.S. Nysanth and C. Natarajan., 2021. Novel and rapid agar plate methods for in vitro assessment of bacterial biocontrol isolates antagonism against multiple fungal phytopathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 2021 Aug; 73 (2): 229-236. Doi: 10.1111/lam.13495.
12. Pal, K. K., and Mc Spadden Gardener, B. 2006. *Biological Control of Plant Pathogens*. The Plant Health Instructor.
13. Rajkumar K, Naik MK, Chennappa G, Amaresh YS, Gururaj Sunkad, Ravikiran and Mahadevaswamy, 2018. Bioefficacy of *Bacillus subtilis* isolates against *Fusarium solani*, the causal agent of wilt of chilli. *International Journal of Chemical Studies* 2018; 6(3): 3389-3392.
14. Sun Pingping, Cui Jianchao, Jia Xiaohui, and Wang Wenhui., 2017. Isolation and Characterization of *Bacillus amyloliquefaciens* L-1 for Biocontrol of Pear Ring Rot. *Horticultural Plant Journal*, 3 (5): 183–189.
15. Zhao Z., Wang Q., Wang K., Brian K., Liu C., Gu Y, 2010. Study of the antifungal activity of *Bacillus vallismortis* ZZ185 in vitro and identification of its antifungal components. *Bioresource Technology*, Volume 101, Issue 1, January 2010, Pages 292-297.

Phản biện: GS.TS. Nguyễn Văn Tuất