

MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết của đề tài

Vi khuẩn nội sinh đang là một trong những nhóm vi sinh vật có lợi được quan tâm nghiên cứu nhiều hiện nay. Đây là những vi khuẩn sống trong mô thực vật, không gây hại hay cạnh tranh dinh dưỡng với cây chủ (Schulz, 2006, Wang *et al.*, 2009); trái lại, chúng còn kích thích sinh trưởng của cây chủ một cách trực tiếp hoặc/và gián tiếp thông qua nhiều cơ chế khác nhau (Bent & Chanway, 1997, Ryan *et al.*, 2008).

Cà phê là một trong những mặt hàng nông sản chiến lược, đóng góp hơn 3,5 tỷ USD cho ngân sách nhà nước (Nguyễn Thị Lại & Đỗ Thị Mỹ Hiền, 2019). Tuy nhiên, sản xuất cà phê Việt Nam nói chung hiện đang phải đối mặt với nhiều thách thức, trong đó có vấn đề lạm dụng phân bón hóa học (Trương Hồng và *cs.*, 2013). Điều này chẳng những làm gia tăng chi phí sản xuất mà còn đã và đang làm giảm khả năng chống chịu của cây cà phê dẫn đến bùng nổ dịch bệnh, ảnh hưởng không tốt đến chất lượng cà phê Việt Nam trên thị trường thế giới và cũng là nguyên nhân có thể dẫn đến thoái hóa đất canh tác, ô nhiễm nguồn nước và môi trường sống.

Những kết quả nghiên cứu ban đầu trên thế giới và ở Việt Nam cho thấy một số chủng vi khuẩn nội sinh cây cà phê có hoạt tính cố định đạm, phân giải lân, tổng hợp kích thích tố và đối kháng cao với một số tác nhân gây bệnh hại cây cà phê vối (Shiomi *et al.*, 2006; Mekete *et al.*, 2009; Nguyễn Ngọc Mỹ, 2012; Trương Vĩnh Thới, 2012; Ngô Văn Anh và *cs.*, 2017). Tuy nhiên, những nghiên cứu này mới chỉ dừng lại ở việc thu thập, phân lập và xác định một số hoạt tính sinh học của chúng trong điều kiện *in vitro* và trên cây con trong nhà lưới.

Xuất phát từ thực tế trên, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu đề tài “Nghiên cứu ảnh hưởng của một số chủng vi khuẩn nội sinh chọn lọc đến sinh trưởng, phát triển cây cà phê vối (*Coffea canephora* Pierre var. *robusta*)”.

2. Mục tiêu và phạm vi nghiên cứu của đề tài

a. Mục tiêu nghiên cứu

Đánh giá ảnh hưởng của một số chủng vi khuẩn nội sinh chọn lọc đến sinh trưởng, phát triển của cây cà phê vối trong điều kiện nhà lưới và trên đồng ruộng. Trên cơ sở đó, tuyển chọn các chủng có hiệu quả và xác định được hỗn hợp chủng và liều lượng áp dụng thích hợp nhằm giúp cây cà phê sinh trưởng, phát triển tốt.

b. Phạm vi nghiên cứu

Kế thừa kết quả phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn nội sinh trên cây cà phê chè và cà phê vối của Viện Công nghệ Sinh học và Môi trường, trường Đại học Tây Nguyên (Nguyễn Ngọc Mỹ, 2012), Trương Vĩnh Thới, 2012 và Ngô Văn Anh và cs., 2017), đề tài đã tuyển chọn một số chủng có hoạt tính sinh học cao để đưa vào đánh giá hoạt tính trên cây cà phê trong điều kiện nhà lưới và trên đồng ruộng. Đề tài không nghiên cứu phát triển chế phẩm mà tập trung vào đánh giá khả năng kích thích sinh trưởng, phát triển cây cà phê vối bằng dịch lọc của một số chủng vi khuẩn nội sinh cây cà phê trong điều kiện nhà lưới và trên đồng ruộng trên nền đất nâu đỏ bazan tại thành phố Buôn Ma Thuột.

3. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn

- ***Ý nghĩa khoa học:*** Kết quả nghiên cứu của đề tài làm sáng tỏ vai trò của một số chủng vi khuẩn nội sinh cây cà phê trong việc thúc đẩy sinh trưởng, phát triển cây cà phê vối; là tài liệu tham khảo cho những nghiên cứu sâu hơn về vi khuẩn nội sinh cây cà phê và nghiên cứu phát triển các loại chế phẩm sinh học từ vi khuẩn nội sinh cây cà phê vối.

- ***Ý nghĩa thực tiễn:*** Kết quả của đề tài là cơ sở cho việc lựa chọn các chủng vi khuẩn nội sinh trong rễ cây cà phê có khả năng thúc đẩy sinh trưởng, phát triển cây cà phê để nghiên cứu sản xuất phân sinh học có hiệu quả, ứng dụng trong canh tác cà phê vối nhằm giảm lượng phân hoá học nhưng vẫn đảm bảo sinh trưởng, phát triển và năng suất cây cà

phê, góp phần phát triển một nền nông nghiệp bền vững và thân thiện với môi trường.

4. Những điểm mới của đề tài

- Đề tài đề cập đến vấn đề mới là ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh đến sinh trưởng, phát triển của cây cà phê vối ở các giai đoạn vườn ươm, kiến thiết cơ bản và kinh doanh.

- Đề tài đã đánh giá ảnh hưởng của hỗn hợp các chủng vi khuẩn nội sinh đến mật độ và hiệu quả phòng trừ hai loại tuyến trùng kí sinh chính gây hại rễ cây cà phê vối trong điều kiện đồng ruộng.

- Đề tài đã nghiên cứu ảnh hưởng của các hỗn hợp chủng vi khuẩn nội sinh đến hàm lượng diệp lục, carotenoid, dinh dưỡng N và P trong lá là những minh chứng rõ ràng cho sự ảnh hưởng của vi khuẩn nội sinh đến sinh trưởng, phát triển, năng suất và chất lượng của cây cà phê vối.

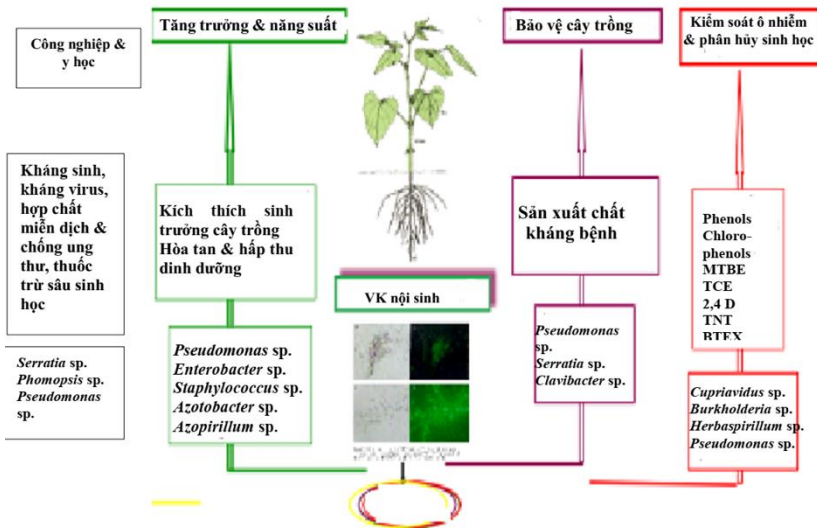
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

1.1. Khái niệm vi khuẩn nội sinh thực vật

Theo Bacon và White (2000): "*Vi khuẩn nội sinh thực vật là những vi khuẩn xâm chiếm các mô sống và cư trú ở bên trong thực vật mà không gây ra bất kỳ tác động tiêu cực tức thời rõ ràng nào*". Rễ được xem là vị trí ưa thích nhất, từ đó vi khuẩn xâm nhập vào bên trong cơ thể thực vật (Verma *et al.*, 2001). Sau khi xâm nhập được vào bên trong cây chủ, vi khuẩn nội sinh sẽ cư trú ở các ổ nội sinh (endophytic niche). Các ổ nội sinh sẽ bảo vệ vi khuẩn nội sinh khỏi các tác động xấu từ môi trường, đồng thời giúp chúng xâm chiếm và thiết lập bên trong tế bào, mô thực vật (Oliveira *et al.*, 2013).

1.2. Vai trò vi khuẩn nội sinh thực vật

Vai trò của vi khuẩn nội sinh thực vật đã được ghi nhận trong nhiều nghiên cứu của các tác giả trong và ngoài nước. Tác dụng và ứng dụng của vi khuẩn nội sinh thực vật được trình bày tóm tắt trong hình 1.1.



Hình 1.1. Tác dụng của vi khuẩn nội sinh thực vật và ứng dụng

Cơ chế của những tác động có lợi của vi khuẩn nội sinh đối với cây chủ tương tự như của các vi khuẩn vùng rễ có khả năng thúc đẩy sinh trưởng thực vật (Kloepper *et al.*, 1991). Điều này là do hầu hết các vi khuẩn nội sinh được phân lập từ nội mô các loài thực vật khỏe mạnh và có thể được xem như nội sinh không bắt buộc và có khả năng sống bên ngoài mô thực vật như những vi khuẩn vùng rễ (Di Fiori & Del Gallo, 1995, dẫn theo Lodewyckx *et al.*, 2002).

1.3. Ứng dụng vi khuẩn nội sinh thực vật trong nông nghiệp

Nhiều kết quả nghiên cứu cho thấy vi khuẩn nội sinh giữ vai trò quan trọng trong sản xuất lúa gạo, mía và lúa mì. Vi khuẩn nội sinh có vai trò cố định N, nhờ đó làm giảm lượng phân đạm sử dụng trong trồng trọt. Cụ thể như, bổ sung *Rhizobium* vào cây lúa đã tiết kiệm được 2/3 lượng đạm cần bón cho lúa, tương đương 96 kg N/ha (Yanni *et al.*, 1997), bổ sung *Burkholderia* MG43 cho cây mía đã tiết kiệm được hơn 50% lượng phân bón N cần thiết (140 kg N/ha). Bổ sung *H. seropedicae* cho

hạt ngô trồng trong nhà kính, sản lượng tăng 49 - 82% so với bón phân đạm hóa học (Baldani *et al.*, 2000).

Nhiều loài vi khuẩn có khả năng hòa tan lân khó tan đã được sử dụng trong sản xuất phân sinh học ứng dụng trong sản xuất nông nghiệp như: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aereobacter*, *Flavobacterium* và *Erwinia* (Goldstein, 1986). Kết quả thí nghiệm cho thấy khi bổ sung vi khuẩn hòa tan lân cho cây trồng đã làm tăng hiệu quả hấp thu P đối với cây đồng thời kích thích sự phát triển của cây (Muhammad *et al.*, 2013, Niazi *et al.*, 2015).

Việc bổ sung kết hợp nhiều dòng vi khuẩn nội sinh giúp làm tăng sự phát triển thực vật tốt hơn so với việc bổ sung riêng rẽ từng loài. Xử lý hỗn hợp *H. seropedicae*, *Azospirillum lipoferum*, *Gluconacetobacter* và *B. vietnamiensis* (10^8 CFU/ml) vào cây lúa 5 ngày tuổi đã giúp làm tăng năng suất 14,4% trong khi việc bổ sung riêng lẻ từng dòng chỉ tăng tối đa 6,2% (Govindarajan *et al.*, 2008).

1.4. Tình hình nghiên cứu vi khuẩn nội sinh cây cà phê

1.4.1. Tình hình nghiên cứu ngoài nước

Vi khuẩn nội sinh được tìm thấy ở hầu hết các bộ phận của cây cà phê ở khắp nơi trên thế giới với thành phần rất đa dạng (Mekete *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2012; Miguel *et al.*, 2013). Các dòng vi khuẩn nội sinh phân lập được từ cây cà phê chủ yếu thuộc các chi: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Agrobacterium*, *Stenotrophomonas* và *Enterobacter*, trong đó chủ yếu là các vi khuẩn Gram (-) (Mekete *et al.*, 2009).

Phần lớn các loài vi khuẩn nội sinh quả cà phê phân lập và tái thiết lập được quần thể bên trong cây cà phê với đều thuộc chi *Bacillus*, bao gồm: *B. megaterium*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. thuringiensis* và *B. cereus* (Miguel *et al.*, 2013). Khi nghiên cứu về vi khuẩn nội sinh rễ cây cà phê, Mekete *et al.* (2009) cho biết 33% số chủng vi khuẩn nội sinh phân lập được từ rễ cây cà phê có hoạt tính đối kháng với tuyến trùng nốt sần *M. incognita*, trong đó, đáng chú ý là các loài *Bacillus pumilus*

và *B. mycooides* có khả năng làm giảm 39% khả năng sinh sản của tuyến trùng và giảm 33% số bọ rầy gây ra bởi tuyến trùng *Meloidogyne incognita* (Mekete *et al.*, 2009).

Trong số các chủng vi khuẩn nội sinh cây cà phê phân lập được, chủng *Bacillus* spp. được coi là tác nhân sinh học tiềm năng để kiểm soát tuyến trùng nốt sùng *Meloidogyne* spp. vì chúng sản sinh nội bào tử có khả năng chịu được điều kiện nóng và khô (Kloepper *et al.*, 2004). Chủng *B. pumilus* và *B. mycooides* hiệu quả nhất trong việc làm giảm số lượng khối trứng và u sùng do tuyến trùng *M. incognita* gây ra trên cây cà chua trồng trong nhà lưới (33 và 39%, một cách tương ứng) (Mekete *et al.*, 2009). *B. cereus* làm giảm đến hơn 50% số lượng khối trứng và u sùng gây ra bởi *M. incognita*, *M. javanica* và *M. arenaria* (Mahdy *et al.*, 2000, dẫn theo Mekete *et al.*, 2009).

1.4.2. Tình hình nghiên cứu trong nước

Tại Việt Nam, Nguyễn Ngọc Mỹ (2012) đã phân lập được 30 chủng vi khuẩn cố định đạm nội sinh trong rễ và tuyển chọn được chủng M15 là chủng có hoạt tính cố định N và phân giải P cao nhất. Hàm lượng N và P trong lá cây con cà phê chè khi được xử lý với chủng này tăng 52% và 33,3% so với đối chứng. Kết quả nghiên cứu bước đầu khi chủng nhiễm chủng vi khuẩn này vào hạt cà phê rồi trồng trong nhà lưới cho thấy các chỉ tiêu sinh trưởng của cây cà phê chè giai đoạn vườn ươm như: chiều cao cây, đường kính gốc và diện tích lá cũng đều tăng so với đối chứng.

Từ rễ cây cà phê vối, Trương Vĩnh Thới (2012) đã phân lập được 37 chủng vi khuẩn nội sinh, trong đó, chủng *B. subtilis* EK17 và *Enterobacter cloace* EK19 được tuyển chọn có khả năng cố định đạm và phân giải lân cao nhất. Các chỉ tiêu sinh trưởng của cây cà phê giai đoạn vườn ươm như: chiều cao cây, đường kính gốc, chiều dài lá và diện tích lá cũng đều tăng so với đối chứng (Trương Vĩnh Thới, 2012). Ngô Văn Anh *và cs.* (2017) đã phân lập được 41 dòng vi khuẩn nội sinh trong rễ cây cà phê vối. Trong điều kiện invitro, các dòng *Bacillus* sp. BMT11 (1,574 µg/ml), *B. pumilus* BMT4 (1,493 µg/ml), *Bacillus* sp. BMT8 (1,474 µg/ml), *Delftia lacustris*

BH8 (1,434 µg/ml), *Bacillus cereus* BMT7 (1,399 µg/ml) và *Bacillus* sp. Cu8 (1,372 µg/ml) có hoạt tính cố định đạm cao nhất. Các dòng có hoạt tính phân giải lân cao nhất là *Bacillus* sp. BMT11 (12,25 µg/ml), *Bacillus* sp. Cu8 (11,46 µg/ml) và Cu2 (11,25 µg/ml). Ngoài ra, các chủng này còn có khả năng sinh tổng hợp IAA khá cao: *Bacillus* sp. BMT11 (9,048 µg/ml), *Delftia lacustris* BH8 (8,876 µg/ml), *Bacillus* sp. Cu8 (8,153 µg/ml), *B. pumilus* BMT4 (5,624 µg/ml).

Tóm lại, vi khuẩn nội sinh đóng vai trò quan trọng đối với sự sinh trưởng và phát triển của thực vật. Do đó, việc nghiên cứu chúng để sản xuất phân vi sinh ứng dụng trong sản xuất nông nghiệp bền vững là vấn đề đang được quan tâm hiện nay. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng việc bổ sung kết hợp nhiều chủng vi sinh vật vào cây trồng đem lại hiệu quả đối với sự sinh trưởng, phát triển và năng suất cây trồng tốt hơn so với bổ sung riêng lẻ từng chủng. Do vậy, cần chú trọng tới vấn đề nghiên cứu khả năng phối trộn của các chủng có tiềm năng.

Cà phê là một trong những loại cây trồng chủ lực tại Đắk Lắk. Các nghiên cứu bước đầu trên thế giới và trong nước đã chỉ ra rằng thành phần vi khuẩn nội sinh cây cà phê rất phong phú với nhiều hoạt tính tốt như cố định đạm, phân giải lân, đối kháng một số tác nhân gây bệnh. Tuy nhiên, các nghiên cứu này mới chỉ được tiến hành ở điều kiện trong phòng thí nghiệm và nhà lưới. Trong khi đó, thành phần và hoạt tính của vi khuẩn lại chịu ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố môi trường và biện pháp kỹ thuật canh tác. Do đó, rất cần tiến hành các nghiên cứu ở điều kiện đồng ruộng để đánh giá hiệu quả của chúng trong sản xuất cà phê bền vững.

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG, VẬT LIỆU, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

- Cây cà phê vối giống thực sinh, cà phê vối (*Coffea canephora* Pierre var. *robusta*) giai đoạn kiến thiết cơ bản và kinh doanh trồng trên đất nâu đỏ bazan tại thành phố Buôn Ma Thuột, tỉnh Đắk Lắk.

- Các chủng vi khuẩn nội sinh rễ cây cà phê: *Bacillus cereus* M15, *Bacillus pumilus* BMT4, *B. subtilis* EK17, *Enterobacter cloace* EK19, *Bacillus* sp. Cu8, *Delftia lacustris* BH8, *Bacillus cereus* BMT7, *Bacillus* sp. BMT8 và *Bacillus* sp. BMT11 đã được định danh và lưu giữ tại Viện Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Tây Nguyên. Các chủng này đều là các chủng vi khuẩn nội sinh rễ cây cà phê được tuyển chọn từ bộ sưu tập hơn 100 chủng nội sinh phân lập có hoạt tính cố định N, phân giải P khó tan và sinh tổng hợp IAA.

2.2. Vật liệu nghiên cứu

2.2.1. Các loại môi trường nuôi cấy vi khuẩn

- Môi trường pepton: 7 g Meat extract, 7 g Soya pepton, 5 g NaCl, 15 g Agar, nước cất vừa đủ 1 lít.

- Môi trường nhân nuôi sinh khối vi khuẩn M1: 2 g yeast extract powder, 6 g Beef extract, 3 g sacharose, 0,3 g $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 0,2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,2 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 3 g NaCl, nước cất vừa đủ 1L.

2.2.2. Hóa chất và vật tư khác

- Hóa chất khử trùng hạt cà phê: $KMnO_4$ 5%, cồn 70°, NaOCl 5%, Tween 80.

- Vật liệu đóng bầu: hạt cà phê vối lai TRS1, đất đỏ bazan, xơ dừa, túi nylon (17 x 25 cm).

- Phân bón: Urê Phú Mỹ (46% N), SA Phú Mỹ (21% N + 24% S), Kali Phú Mỹ (61% K_2O), Lân nung chảy Văn Điển (15 – 17% P_2O_5 , 28 – 34% CaO; 15 – 18% MgO, 24 – 30% SiO_2 , B, Mn, Zn, Cu, Co ...),

2.3. Địa điểm và thời gian nghiên cứu

- **Địa điểm nghiên cứu:** Các thí nghiệm trong phòng và nhà lưới được thực hiện tại trường Đại học Tây Nguyên. Thí nghiệm đồng ruộng được thực hiện tại thành phố Buôn Ma Thuột, tỉnh Đắk Lắk.

- **Thời gian nghiên cứu:** từ tháng 12/2015 tới tháng 03/2019.

2.4. Nội dung nghiên cứu

- Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh chọn lọc đến sinh trưởng của cây con cà phê vối trong điều kiện nhà lưới.

- Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh chọn lọc đến sinh trưởng cây cà phê với giai đoạn kiến thiết cơ bản trên đồng ruộng.

- Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh chọn lọc đến sinh trưởng, phát triển cây cà phê với giai đoạn kinh doanh trên đồng ruộng.

2.5. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Đánh giá ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh chọn lọc đến sinh trưởng cây con cà phê với trong điều kiện nhà lưới

Thí nghiệm gồm 11 công thức, được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, lặp lại 3 lần. Mỗi công thức là một chủng vi khuẩn, bao gồm: CT1: *Bacillus cereus* M15, CT2: *Bacillus subtilis* EK17, CT3: *Enterobacter cloace* EK19, CT4: *Bacillus* sp. Cu8, CT5: *Delftia lacustris* BH8, CT6: *B. cereus* BMT7, CT7: *Bacillus pumilus* BMT4, CT8: *Bacillus* sp. BMT8, CT9: *Bacillus* sp. BMT11, CT10: đối chứng ĐC (môi trường nhân nuôi vi khuẩn M1), CT11: đối chứng ĐC0 (nước lã). Theo dõi các chỉ tiêu: Chiều cao cây (cm), đường kính gốc thân (mm), khối lượng rễ tươi (g/bộ rễ), khối lượng cây tươi (g/cây), chiều dài lá (cm), chiều rộng lá (cm), diện tích lá (cm²/lá), hàm lượng N%, P%, *Chl_a*, *Chl_b*) và *C_{car}* trong lá.

Dựa vào kết quả thu được từ thí nghiệm 1, chọn 3 chủng có ảnh hưởng tốt nhất đến sinh trưởng cây cà phê với giai đoạn vườn ươm để đánh giá khả năng tương hợp của chúng phục vụ cho các thí nghiệm ngoài đồng ruộng. Thử khả năng tương thích giữa các chủng bằng phương pháp cây vạch vuông góc (Fukui *et al.*, 1994). Chỉ thực hiện phối trộn các chủng cho kết quả âm tính (tương thích và không đối kháng).

2.3.2. Phương pháp nghiên cứu ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh chọn lọc đến sinh trưởng của cà phê với giai đoạn kiến thiết cơ bản (KTCB) trên đồng ruộng

a. Thời gian: từ tháng 9/2017 đến tháng 3/2019.

b. Địa điểm: xã Hòa Thuận, thành phố Buôn Ma Thuột

c. Đối tượng nghiên cứu

- Vi khuẩn nội sinh: *B. cereus* M15, *B. subtilis* EK17 và *B. pumilus* BMT4.

- Cây cà phê với tái canh năm thứ nhất trồng trên nền đất đỏ bazan.

d. *Phương pháp bố trí thí nghiệm*: Thí nghiệm được bố trí theo kiểu khối đầy đủ ngẫu nhiên 2 yếu tố với 4 tổ hợp các chủng vi khuẩn và 3 mức liều lượng, gồm 12 công thức. Mỗi công thức thí nghiệm gồm 9 cây/lần lặp lại. Giữa các ô thí nghiệm được cách ly bởi 1 hàng cà phê. Thí nghiệm được nhắc lại 3 lần. Các công thức thí nghiệm như sau:

Hỗn hợp Liều lượng	B0 (Đối chứng)	B1 (<i>B. cereus</i> + <i>B. subtilis</i>)	B2 (<i>B. subtilis</i> + <i>B. pumilus</i>)	B3 (<i>B. cereus</i> + <i>B. pumilus</i>)
D1 (10ml/cây)	D1B0 (CT1)	D1B1 (CT4)	D1B2 (CT7)	D1B3 (CT10)
D2 (20ml/cây)	D2B0 (CT2)	D2B1 (CT5)	D2B2 (CT8)	D2B3 (CT11)
D3 (30ml/cây)	D3B0 (CT3)	D3B1 (CT6)	D3B2 (CT9)	D3B3 (CT12)

Ghi chú: D: các mức liều lượng hỗn hợp vi khuẩn; B: hỗn hợp các chủng vi khuẩn.

Cây cà phê trong thí nghiệm được chăm sóc dựa theo Quy trình tái canh cây cà phê với (Bộ NN và PTNT, 2016), với chế độ phân bón hóa học như sau: Các công thức đối chứng B0 (CT1, CT2 và CT3): bón phân hóa học theo quy trình tái canh cây cà phê với; Các công thức xử lý hỗn hợp vi khuẩn nội sinh (CT4 đến CT12): giảm 25% phân N và 25% P so với quy trình (150 kg ure + 75 kg SA + 412,5 kg lân nung chảy + 150 kg kali clorua).

f. *Các chỉ tiêu theo dõi*: Chiều cao cây (cm), đường kính gốc (mm), số cặp cành, số cặp lá, chiều dài cành cơ bản (cm), số đốt/cành cơ bản (đốt/cành), số quả/chùm, mật độ tuyến trùng *Pratylenchus* sp. và *Meloidogyne* sp. trong đất (con/50 g đất), hàm lượng N và P trong lá, hàm lượng diệp lục tổ trong lá.

2.3.4. Phương pháp nghiên cứu ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh chọn lọc đến sinh trưởng của cà phê với giai đoạn kinh doanh trên đồng ruộng

a. *Thời gian*: từ tháng 9/2017 đến tháng 3/2019.

b. *Địa điểm*: xã Hòa Xuân, thành phố Buôn Ma Thuột, tỉnh Đắk Lắk.

c. Đối tượng nghiên cứu

Vi khuẩn nội sinh: *B. cereus* M15, *B. subtilis* EK17 và *B. pumilus* B. *pumilus* BMT4; Cà phê vối 19 năm tuổi trồng trên nền đất đỏ bazan.

d. Phương pháp bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm được bố trí tương tự như đối với vườn cà phê vối giai đoạn kiến thiết cơ bản nhưng với lượng dịch huyền phù vi khuẩn xử lý nhiều hơn: D1 = 20ml/cây, D2 = 30ml/cây và D3 = 40ml/cây.

f. Các chỉ tiêu theo dõi: Hàm lượng N, P, diệp lục tố trong lá, chiều dài cành dự trữ, số đốt trên cành (đốt), số đốt mang quả trên cành (đốt), số quả/chùm (quả), tỉ lệ tươi: nhân, năng suất cà phê nhân, tỉ lệ hạt cà phê nhân trên sàng 16, mật độ tuyến trùng *Pratylenchus* sp. và *Meloidogyne* sp. trong đất (con/50 g đất) và trong rễ (con/5 g rễ).

2.4. Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu thu được trong các thí nghiệm được tổng hợp và xử lý thống kê theo phương pháp phân tích phương sai (ANOVA) 1 hoặc 2 nhân tố, dùng phép kiểm định Duncan và LSD test ở mức $P < 0,05$ và $P < 0,01$ để so sánh sự sai khác giữa các công thức thí nghiệm sử dụng phần mềm thống kê SAS 9.2. Các số liệu % được chuyển đổi sang dạng $\arcsin\sqrt{x}$ trước khi xử lý thống kê.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh chọn lọc đến sinh trưởng cây con cà phê vối giai đoạn vườn ươm

3.1.1. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh chọn lọc đến hàm lượng diệp lục tố và dinh dưỡng của cây cà phê vối giai đoạn vườn ươm

Bảng 3.1 cho thấy sau 4 tháng chủng nhiễm vi khuẩn nội sinh vào cây cà phê, hàm lượng các sắc tố quang hợp, N% và P% trong lá ở tất cả các công thức đều cao hơn so với ở hai công thức đối chứng ĐC và ĐC0. Đáng chú ý, hàm lượng đạm trong lá cao nhất ở các công thức được chủng các vi khuẩn *B. cereus* M15 (CT1), *B. pumilus* BMT4 (CT7) và *Bacillus* sp. BMT11 (CT9). Hàm lượng lân tích lũy trong lá cao nhất ở các công thức chủng các vi khuẩn *B. subtilis* EK17 (CT2), *B. cereus* M15 (CT1), BH8 (CT5), *Bacillus* sp. BMT11 (CT9) và *B.*

pumilus BMT4 (CT7), đạt 0,16 – 0,19% chất khô trong lá, khác biệt rất có ý nghĩa và cao hơn so với ở công thức đối chứng ĐC0 lần lượt là 50,0%, 58,3%, 50,0%, 33,3% và 41,7%.

Bảng 3.1. Ảnh hưởng của vi khuẩn nội sinh đến hàm lượng dinh dưỡng và sắc tố quang hợp trong lá cà phê với giai đoạn vườn ươm

Công thức	Chủng vi khuẩn	Hàm lượng dinh dưỡng trong lá (%) (chất khô)		Hàm lượng sắc tố trong lá (mg/g lá tươi)		
		N	P	<i>Chla</i>	<i>Chlb</i>	<i>Ccar</i>
CT1	<i>B. cereus</i> M15	3,18 ^a	0,18 ^{ab}	1,142 ^a	0,683 ^a	0,529 ^{bc}
CT2	<i>B. subtilis</i> EK17	2,90 ^b	0,19 ^a	1,097 ^{ab}	0,594 ^b	0,542 ^b
CT3	<i>E. cloacae</i> EK19	2,90 ^b	0,09 ^d	0,957 ^{bcd}	0,536 ^{cd}	0,457 ^{ef}
CT4	<i>Bacillus</i> sp. Cu8	2,70 ^d	0,10 ^d	0,811 ^{ef}	0,505 ^{def}	0,446 ^f
CT5	<i>D. lacustris</i> BH8	2,84 ^{bc}	0,18 ^{ab}	1,037 ^{abc}	0,519 ^{de}	0,510 ^{bcd}
CT6	<i>B. cereus</i> BMT7	2,73 ^{cd}	0,15 ^{bc}	1,045 ^{abc}	0,536 ^{cd}	0,495 ^{cd}
CT7	<i>B. pumilus</i> BMT4	3,15 ^a	0,16 ^{ab}	0,995 ^{bcd}	0,573 ^{bc}	0,546 ^b
CT8	<i>Bacillus</i> sp. BMT8	2,70 ^d	0,12 ^{cd}	0,931 ^{cde}	0,485 ^{ef}	0,498 ^{cd}
CT9	<i>Bacillus</i> sp. BMT11	3,15 ^a	0,17 ^{ab}	1,092 ^{ab}	0,592 ^b	0,584 ^a
CT10	ĐC	2,63 ^d	0,09 ^d	0,875 ^{def}	0,490 ^{def}	0,483 ^{de}
CT11	ĐC0	2,69 ^d	0,12 ^{cd}	0,791 ^f	0,464 ^f	0,402 ^g
p		**	**	**	**	**
CV%		2,34	13,35	7,59	4,71	4,07

Ghi chú: *Chla*: diệp lục a; *Chlb*: diệp lục b; *Car*: Carotenoids; **: Khác biệt có ý nghĩa ở mức $p < 0,01$; Các chữ cái giống nhau trên cùng một cột thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê theo trắc nghiệm phân hạng Duncan's Multiple Rang Test.

Kết quả phân tích hàm lượng các sắc tố quang hợp trong lá của cây cà phê với giai đoạn vườn ươm cho thấy hầu hết các chủng vi khuẩn nội sinh đã ảnh hưởng tích cực đến hàm lượng các sắc tố quang hợp, làm tăng hàm lượng diệp lục a (*Chla*), diệp lục b (*Chlb*) và carotenoid (*Ccar*) trong lá cây cà phê với giai đoạn vườn ươm so với 2 công thức đối chứng ĐC và ĐC0 (bảng 3.1). Hàm lượng diệp lục trong lá càng cao chứng tỏ khả

năng quang hợp của cây càng mạnh dẫn tới tăng hiệu suất quang hợp, tích lũy chất khô, sinh khối và sinh trưởng, phát triển của cây trồng.

Như vậy, với cùng chế độ chăm sóc, việc chủng nhiễm các chủng vi khuẩn nội sinh đã làm gia tăng khả năng hấp thu đạm và lân, tăng hàm lượng các sắc tố quang hợp trong lá của cây cà phê với giai đoạn vườn ươm. Kết quả này có được có thể là kết quả của việc các chủng vi khuẩn đã xâm chiếm bộ rễ cây cà phê và phát huy khả năng cố định đạm và phân giải lân khó tan.

3.1.2. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh chọn lọc đến hàm một số chỉ tiêu sinh trưởng của cây cà phê với giai đoạn vườn ươm

Bảng 3.2. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh đến các chỉ tiêu sinh trưởng của cây con cà phê với

Công thức	Chiều cao cây (cm)	Đường kính gốc (mm)	Số lá/cây	Diện tích lá (cm ² /lá)	Trọng lượng cây tươi (g)	Chiều dài rễ (cm)	Trọng lượng rễ tươi (g)
M15	31,18 ^a	5,61 ^{ab}	7,11 ^a	76,94 ^a	11,50 ^a	35,49 ^b	5,06 ^a
EK17	28,22 ^b	5,55 ^{ab}	6,83 ^{ab}	73,92 ^a	11,22 ^a	27,13 ^e	4,81 ^{ab}
EK19	24,20 ^c	5,39 ^{abc}	6,89 ^a	61,85 ^b	7,97 ^d	37,17 ^a	2,76 ^{de}
C8	21,97 ^{de}	4,67 ^{efg}	6,17 ^{cd}	55,36 ^{bc}	6,78 ^e	28,79 ^d	2,61 ^e
BH8	23,27 ^{cd}	5,15 ^{bcd}	6,50 ^{abc}	59,79 ^b	8,93 ^b	23,59 ^f	4,14 ^c
BMT7	24,64 ^c	4,79 ^{def}	6,22 ^{bcd}	54,71 ^{bc}	8,29 ^{cd}	28,04 ^{de}	3,33 ^d
BMT4	24,22 ^c	5,65 ^a	7,17 ^a	70,45 ^a	8,49 ^{bcd}	27,17 ^e	4,78 ^{ab}
BMT8	23,19 ^{cd}	4,98 ^{cde}	6,17 ^{cd}	57,52 ^{bc}	6,78 ^e	31,69 ^c	1,86 ^f
BMT11	29,69 ^{ab}	5,41 ^{abc}	7,00 ^a	71,64 ^a	8,71 ^{bc}	31,58 ^c	4,34 ^{bc}
ĐC	20,62 ^e	4,42 ^{fg}	6,05 ^{dc}	49,60 ^{cd}	5,29 ^f	28,48 ^{de}	1,51 ^f
ĐC0	17,89 ^f	4,28 ^g	5,72 ^d	42,14 ^d	4,78 ^g	21,96 ^g	1,38 ^f
ANOVA	**	**	**	**	**	**	**
CV%	3,63	4,85	5,42	7,26	3,65	2,90	10,52

Kết quả trình bày trong bảng 3.12 cho thấy sinh trưởng của cây cà phê với giai đoạn vườn ươm ở những công thức chủng các vi khuẩn *B. cereus*

M15, *B. subtilis* EK17 và *B. pumilus* BMT4 tốt hơn so với ở các công thức khác. So với ở công thức đối chứng ĐC, chiều cao cây tăng 17,5 – 51,2%; đường kính gốc tăng 25,6 – 27,8%, khối lượng thân tươi tăng 60,5 - 117,5%, chiều dài rễ tăng đến 24,6%, và khối lượng rễ tươi tăng đến 235,1%. Đây là kết quả của việc tăng khả năng tích lũy đạm và lân trong lá cũng như tăng hàm lượng diệp lục tố trong lá. Đây là những chủng vi khuẩn nội sinh tiềm năng trong việc nghiên cứu sản xuất phân sinh học ứng dụng trong canh tác cà phê bền vững. Do đó, những chủng vi khuẩn này được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo ở điều kiện đồng ruộng trên cây cà phê giai đoạn kiến thiết cơ bản và giai đoạn kinh doanh.

Đánh giá khả năng tương thích giữa các chủng được chọn lọc, bao gồm: *B. cereus* M15, *B. subtilis* EK17 và *B. pumilus* BMT4 bằng phương pháp cấy vạch vuông góc (Fukui R *et al.*, 1994). Kết quả cho thấy, các chủng vi khuẩn *B. cereus* M15, *B. subtilis* EK17 và *B. pumilus* BMT4 phát triển bình thường tại các điểm giao nhau của 2 vạch vi khuẩn vuông góc. Do đó, có thể phối trộn các chủng này để thử nghiệm ở điều kiện ngoài đồng ruộng.

3.3. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh chọn lọc đến sinh trưởng cây con cà phê với giai đoạn kiến thiết cơ bản

Bảng 3.6 cho thấy, hàm lượng N% trong lá ở tất cả các công thức, kể cả các công thức đối chứng khá cao, dao động trong khoảng 3,04 – 3,64% chất khô trong lá. Hàm lượng N% trong lá ở các công thức này đều nằm trong ngưỡng phù hợp cho sinh trưởng của cây cà phê với theo thang dinh dưỡng của Willson (1985) cũng như của Nguyễn Văn Sanh (2009). So với trước thí nghiệm, hàm lượng N% tích lũy trong lá cây cà phê đã gia tăng ở tất cả các công thức, kể cả các công thức đối chứng. Tuy nhiên, trong khi hàm lượng N% tích lũy trong lá ở các công thức đối chứng so với trước xử lý chỉ tăng từ 2,0 – 4,4%, mức độ tăng ở các công thức xử lý vi khuẩn nội sinh dao động từ 6 – 22%. Đáng chú ý, hàm lượng N% trong lá đạt cao nhất ở các tổ hợp công thức B1D3, B1D1, B2D3 và B2D2, lần lượt tăng 22,1%, 20,1%, 18,5% và 17,4% so với trước xử lý.

Bảng 3.6. Ảnh hưởng của vi khuẩn nội sinh đến hàm lượng dinh dưỡng tích lũy trong lá cà phê với giai đoạn kiến thiết cơ bản

Công thức	Tổ hợp	N (%)	P (%)
Trước xử lý (TXL)		2,98	0,11
CT 1	B0D1	3,04	0,10
CT2	B0D2	3,04	0,11
CT3	B0D3	3,11	0,11
CT 4	B1D1	3,58	0,14
CT 5	B1D2	3,50	0,14
CT 6	B1D3	3,64	0,12
CT 7	B2D1	3,35	0,11
CT 8	B2D2	3,16	0,10
CT 9	B2D3	3,53	0,13
CT 10	B3D1	3,16	0,10
CT 11	B3D2	3,39	0,11
CT 12	B3D3	3,39	0,13

Ở tất cả các công thức xử lý hỗn hợp huyền phù vi khuẩn nội sinh B1, hàm lượng P% đều cao hơn so với trước xử lý từ 9,1 – 27,3%, đạt 0,12 – 0,14% và đều nằm trong ngưỡng thích hợp cho cây cà phê với tại Tây Nguyên theo thang dinh dưỡng của Nguyễn Tri Chiêm (1993). Ở các công thức xử lý hai hỗn hợp còn lại là B2 và B3, hàm lượng P% trong lá chỉ tăng ở hai công thức xử lý hỗn hợp vi khuẩn với mức 30 ml/cây. Hàm lượng P% trong lá ở 2 tổ hợp công thức này (B2D3 và B3D3) đều đạt 0,13% và nằm trong ngưỡng thích hợp cho cây cà phê theo thang dinh dưỡng của nhiều tác giả.

Bảng 3.11 và 3.12 cho thấy trung bình số cặp và chiều dài cành cơ bản ở các công thức xử lý hỗn hợp các huyền phù vi khuẩn đều cao hơn có ý nghĩa so với ở công thức đối chứng ($p < 0,05$). Tuy số cặp cành cơ bản trung bình ở các công thức xử lý hỗn hợp B2 không khác biệt có ý nghĩa so với hỗn hợp B1 và B3 nhưng chiều dài cành cơ bản trung bình ở các

công thức xử lý hỗn hợp B2 lại cao hơn có ý nghĩa so với hỗn hợp B1. Số cặp và chiều dài cành cơ bản tỷ lệ thuận với mức huyền phù vi khuẩn xử lý. Tổ hợp B2D3 có trung bình số cặp và chiều dài cành cơ bản cao nhất, lần lượt cao hơn 18,4% và 21,3% so với ở công thức đối chứng tương ứng. Đây là kết quả của sự gia tăng hàm lượng diệp lục và tăng hấp thu N và P trong lá cây cà phê khi xử lý tổ hợp các chủng vi khuẩn nội sinh tuyển chọn. Sự gia tăng hàm lượng N, P và diệp lục sẽ làm gia tăng quá trình quang hợp, phân chia tế bào và kết quả làm tăng sinh trưởng của cây. Gia tăng số cặp và chiều dài cành cơ bản là cơ sở để cây cà phê phát triển bộ khung tán vững chắc và là tiền đề để đạt năng suất cao.

Bảng 3.11. Ảnh hưởng của vi khuẩn nội sinh đến số cặp cành cơ bản trên cây cà phê với giai đoạn kiến thiết cơ bản (18T SXL)

Lượng dịch khuẩn (ml/cây)	Số cặp cành cơ bản (cặp cành/cây)				
	Hỗn hợp vi khuẩn				Trung bình (D)
	Đ/C	B1	B2	B3	
D1 (10)	13,6 ^e	15,3 ^{abcd}	14,9 ^{bcde}	15,0 ^{bcde}	14,70^B
D2 (20)	14,7 ^{cde}	15,2 ^{abcd}	15,9 ^{abc}	16,0 ^{ab}	15,44^{AB}
D3 (30)	14,1 ^{de}	15,8 ^{abc}	16,7 ^a	15,3 ^{abcd}	15,47^A
Trung bình (B)	14,11^B	15,44^A	15,81^A	15,44^A	

Ghi chú: Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: $p < 0,05$; B: $p < 0,05$; tương tác D*B: $p > 0,05$; CV = 15,6%.

Bảng 3.12. Ảnh hưởng vi khuẩn nội sinh đến chiều dài cành cơ bản trên cây cà phê với giai đoạn kiến thiết cơ bản (18T SXL)

Lượng dịch khuẩn D (ml/cây)	Dài cành cơ bản (mm)				
	Hỗn hợp vi khuẩn (B)				Trung bình (D)
	Đ/C	B1	B2	B3	
D1 (10)	99,7 ^d	109,6 ^c	115,4 ^{bc}	108,8 ^c	108,4^B
D2 (20)	100,5 ^d	110,9 ^c	118,2 ^{ab}	110,2 ^c	109,9^{AB}
D3 (30)	101,3 ^d	115,4 ^{bc}	122,8 ^a	112,8 ^{bc}	113,0^A
Trung bình (B)	100,5^C	112,0^B	118,8^A	110,6^B	

Ghi chú: Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: $p < 0,05$; B: $p < 0,05$; tương tác D*B: $p > 0,05$; CV = 13,5%.

Bảng 3.14. Ảnh hưởng vi khuẩn nội sinh đến số quả/chùm của cây cà phê với giai đoạn kiến thiết cơ bản

Lượng huyền phù vi khuẩn D (ml/cây)	Số quả/chùm				
	Hỗn hợp vi khuẩn (B)				Trung bình (D)
	B0 (Đ/C)	B1	B2	B3	
D1 (10)	25,4 ^d	29,4 ^{bc}	31,7 ^{ab}	30,6 ^b	29,3
D2 (20)	25,6 ^{cd}	29,6 ^{bc}	32,4 ^{ab}	31,3 ^{ab}	29,7
D3 (30)	26,2 ^{cd}	30,2 ^b	35,1 ^a	32,7 ^{ab}	31,1
Trung bình (B)	25,7^C	29,7^B	33,1^A	31,6^{AB}	

Ghi chú: Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: $p > 0,05$; B: $p < 0,05$; tương tác D*B: $p > 0,05$; CV = 17,16%.

Bảng 3.14 cho thấy số quả/chùm trung bình ở các công thức xử lý hỗn hợp B2 cao nhất và khác biệt có ý nghĩa so với hỗn hợp B1 và đối chứng. Tuy tương tác giữa hỗn hợp và mức huyền phù vi khuẩn xử lý ảnh hưởng không có ý nghĩa đến số quả/chùm, các tổ hợp B2D3, B3D3, B2D2, B2D1 và B3D2 có số quả/chùm trung bình lớn nhất, khác biệt có ý nghĩa so với các công thức đối chứng ($p < 0,05$). Số quả/chùm trung bình ở các công thức này cao hơn so với ở các công thức đối chứng tương ứng lần lượt là: 34,3%, 25,1%, 26,4%, 24,9% và 22,3%.

3.4. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh đến sinh trưởng và phát triển của cà phê với giai đoạn kinh doanh (KD)

3.4.1. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh đến hàm lượng một số chất dinh dưỡng trong lá cây cà phê giai đoạn kinh doanh

Các kết ở bảng 3.18 khẳng định vai trò tăng khả năng hấp thu N và P của các chủng vi khuẩn *B. cereus* M15, *B. subtilis* EK17 và *B. pumilus* BMT4. Hàm lượng các chất dinh dưỡng trong cây tăng sau khi được xử lý bằng vi khuẩn được cho là bởi vi khuẩn đã giúp cây tăng cường sản sinh các chất kích thích sinh trưởng thực vật, kích thích sự phát triển của rễ dẫn đến sự hấp thụ nước và chất dinh dưỡng tốt hơn từ đất (Kloepper *et al.*, 1991). Kết quả này cũng thống nhất với kết quả nghiên cứu trong nhà lưới và cà phê giai đoạn kiến thiết cơ bản ngoài đồng ruộng.

Bảng 3.18. Ảnh hưởng của vi khuẩn nội sinh đến hàm lượng một số chất dinh dưỡng trong lá cà phê với giai đoạn kinh doanh

Tổ hợp	Hàm lượng N (%)			Hàm lượng P (%)		
	TXL	1 năm SXL	2 năm SXL	TXL	1 năm SXL	2 năm SXL
B0D1	3,26	3,25	3,37	0,11	0,11	0,12
B0D2	3,16	3,17	3,3	0,12	0,12	0,11
B0D3	3,20	3,21	3,34	0,12	0,12	0,12
B1D1	2,88	3,26	3,54	0,11	0,12	0,13
B1D2	3,12	3,4	3,65	0,12	0,13	0,15
B1D3	3,28	3,42	3,54	0,12	0,12	0,13
D2D1	2,90	3,42	3,58	0,12	0,12	0,15
B2D2	3,12	3,64	3,63	0,11	0,13	0,12
B2D3	3,37	3,35	3,61	0,12	0,13	0,13
B3D1	3,04	3,28	3,63	0,12	0,12	0,13
B3D2	3,15	3,25	3,64	0,11	0,12	0,14
B3D3	3,37	3,44	3,56	0,12	0,12	0,14

3.4.2. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh đến hiệu quả diệt tuyến trùng *Pratylenchus* sp. gây hại cây cà phê với giai đoạn KD

Bảng 3.22. Ảnh hưởng của vi khuẩn nội sinh đến hiệu quả diệt tuyến trùng *Pratylenchus* sp. trong đất trồng cây cà phê với giai đoạn KD

Lượng huyền phù vi khuẩn D (ml/cây)	Hiệu quả diệt <i>Pratylenchus</i> sp. trong đất (%)				
	Hỗn hợp vi khuẩn (B)				Trung bình (D)
	Đ/C	B1	B2	B3	
D1 (20)	0 ^b	62,2 ^a	65,5 ^a	69,1 ^a	49,2
D2 (30)	0 ^b	65,2 ^a	74,0 ^a	67,9 ^a	51,8
D3 (40)	0 ^b	67,9 ^a	74,5 ^a	71,7 ^a	53,5
Trung bình (B)	0^C	65,1^B	71,3^A	69,6^{AB}	

Ghi chú: Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: $p > 0,05$; B: $p < 0,05$; tương tác D*B: $p > 0,05$; CV = 9,3%.

Bảng 3.22 và 3.24 cho thấy hỗn hợp B2 (*B. subtilis* EK17+ *B. pumilus* BMT4) có trung bình hiệu quả diệt tuyến trùng *Pratylenchus* sp. cao nhất, khác biệt có ý nghĩa so với hỗn hợp B1 và đối chứng. Tương tác giữa hỗn hợp và lượng vi khuẩn xử lý không ảnh hưởng có ý nghĩa đến hiệu quả diệt tuyến trùng *Pratylenchus* sp. Tuy nhiên, các tổ hợp công thức B2D2 và B2D3 luôn có hiệu quả diệt tuyến trùng *Pratylenchus* sp. trong đất và trong rễ cao nhất, đều đạt trên 70% ở thời điểm 18T SXL.

Bảng 3.24. Ảnh hưởng của vi khuẩn nội sinh đến hiệu quả diệt tuyến trùng *Pratylenchus* sp. trong rễ cây cà phê với giai đoạn KD (năm 2018)

Lượng huyền phù vi khuẩn D (ml/cây)	Hiệu quả diệt <i>Pratylenchus</i> sp. trong rễ (%)				
	Hỗn hợp vi khuẩn (B)				Trung bình (D)
	B0 (Đ/C)	B1	B2	B3	
D1 (20)	0 ^c	69,9 ^b	78,7 ^a	70,7 ^b	54,8
D2 (30)	0 ^c	69,4 ^b	73,7 ^{ab}	71,7 ^b	53,7
D3 (40)	0 ^c	68,9 ^b	78,1 ^a	74,4 ^{ab}	55,4
Trung bình (B)	0^C	69,4^B	76,8^A	72,3^B	

Ghi chú: Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: $p < 0,05$; B: $p < 0,05$; tương tác D*B: $p > 0,05$; CV = 13,72%.

3.4.3. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh đến một số chỉ tiêu sinh trưởng, phát triển của cây cà phê với giai đoạn kinh doanh

Trung bình chiều dài đoạn cành dự trữ cao nhất ở các công thức xử lý hỗn hợp vi khuẩn B2 rồi đến B1, cao hơn so với trung bình ở các công thức đối chứng 24,3% và 19,7% (Bảng 3.29). Chiều dài đoạn cành dự trữ tỷ lệ thuận với mức huyền phù vi khuẩn xử lý. Tuy nhiên, mức tăng chiều dài cành không đáng kể khi tăng mức huyền phù xử lý. Tương tác giữa các hỗn hợp và các mức huyền phù vi khuẩn xử lý không có ý nghĩa thống kê, chiều dài đoạn cành dự trữ ở tổ hợp công thức B2D3 (CT9: 40 ml *B. subtilis* EK17+ *B. pumilus* BMT4) cao nhất và khác biệt có ý nghĩa so với ở tất cả các công thức khác. Chiều dài đoạn cành dự trữ ở tổ hợp B2D3 (CT9) cao hơn 26,8% so với ở tổ hợp công thức đối chứng tương ứng (CT3).

Bảng 3.29. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh đến dài đoạn cành dự trữ của cây cà phê vối giai đoạn KD (năm 2018)

Lượng huyền phù vi khuẩn D (ml/cây)	Dài đoạn cành dự trữ (cm)				
	Hỗn hợp vi khuẩn (B)				Trung bình (D)
	B0 (Đ/C)	B1	B2	B3	
D1 (20)	35,1 ^d	43,1 ^{bc}	43,6 ^{bc}	41,3 ^{bc}	40,8^B
D2 (30)	37,8 ^{cd}	44,5 ^{ab}	46,1 ^{ab}	43,1 ^{abc}	42,9^{AB}
D3 (40)	38,4 ^{cd}	45,5 ^{ab}	48,7 ^a	43,6 ^{abc}	44,1^A
Trung bình (B)	37,1^C	44,4^{AB}	46,1^A	42,7^B	

Ghi chú: Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: $p < 0,05$; B: $p < 0,05$; D*B: $p > 0,05$; CV = 7,2%.

Bảng 3.31. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh đến số quả trên chùm của cây cà phê vối giai đoạn kinh doanh (năm 2018)

Lượng huyền phù vi khuẩn D (ml/cây)	Số quả trên chùm (quả/chùm)				
	Hỗn hợp vi khuẩn (B)				Trung bình (D)
	B0 (Đ/C)	B1	B2	B3	
D1 (20)	16,84 ^b	21,23 ^a	21,62 ^a	20,62 ^a	20,08
D2 (30)	17,10 ^b	21,20 ^a	21,89 ^a	22,35 ^a	20,64
D3 (40)	17,67 ^b	22,05 ^a	22,39 ^a	22,67 ^a	21,19
Trung bình (B)	17,20^B	21,49^A	21,97^A	21,88^A	

Ghi chú: Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: $p > 0,05$; B: $p < 0,05$; D*B: $p > 0,05$; CV = 18,1%.

Bảng 3.31 cho thấy hỗn hợp các chủng vi khuẩn xử lý đã ảnh hưởng đến số quả/chùm, thể hiện ở số quả/chùm trung bình ở các công thức xử lý vi khuẩn đều cao hơn và khác biệt có ý nghĩa ($p < 0,05$) so với ở các công thức đối chứng. Tuy nhiên, không có sự sai khác có ý nghĩa giữa các hỗn hợp cũng như các mức huyền phù vi khuẩn xử lý. Số quả/chùm trung bình cao nhất lần lượt theo thứ tự là ở các tổ hợp công thức B3D3 (CT12), B2D3 (CT9), B3D2 (CT11), B1D3 (CT6), lần lượt cao hơn 28,3%, 26,7%, 30,7% và 24,8% so với ở các công thức đối chứng tương ứng. Tăng số quả trên chùm là tiền đề để tăng năng suất thu hoạch được.

**Bảng 3.32. Ảnh hưởng của vi khuẩn nội sinh đến tỷ lệ tươi : nhân
cà phê với giai đoạn kinh doanh (năm 2018)**

Lượng huyền phù vi khuẩn D (ml/cây)	Tỷ lệ tươi : nhân				Trung bình (D)
	Hỗn hợp vi khuẩn (B)				
	B0 (Đ/C)	B1	B2	B3	
D1 (20)	5,02 ^a	4,64 ^{cde}	4,78 ^{bc}	4,74 ^{cd}	4,79
D2 (30)	5,02 ^a	4,54 ^{de}	4,75 ^{bcd}	4,85 ^{abc}	4,79
D3 (40)	4,95 ^{ab}	4,73 ^{cde}	4,51 ^e	4,71 ^{cde}	4,73
Trung bình (B)	5,00	4,64	4,68	4,77	

Ghi chú: Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: $p > 0,05$; B: $p < 0,05$; tương tác D*B: $p > 0,05$; CV% = 12,2%.

Bảng 3.32 cho thấy mặc dù lượng phân đạm và lân đã giảm 25% so với quy trình (đối chứng), tỷ lệ tươi/nhân ở các công thức xử lý dịch vi khuẩn nội sinh đã giảm một cách có ý nghĩa ($p < 0,05$) so với ở các công thức đối chứng. Năm 2018, tỷ lệ tươi/nhân trung bình ở các công thức đối chứng đều trên 4,95 trong khi ở các công thức xử lý hỗn hợp huyền phù vi khuẩn nội sinh, tỷ lệ này cao nhất chỉ ở mức 4,85 (B3D2: CT11). Bảng 3.32 cũng cho thấy, các tổ hợp công thức B2D3 (CT9) và B1D2 (CT5) có tỷ lệ tươi: nhân thấp nhất, lần lượt đạt 4,51 và 4,54 và khác biệt có ý nghĩa so với ở các công thức đối chứng tương ứng.

Các vi khuẩn nội sinh đã làm tăng năng suất cà phê nhân, với năng suất cà phê nhân trung bình ở các công thức xử lý hỗn hợp B2 luôn cao nhất nhưng không khác biệt có ý nghĩa so với hỗn hợp vi khuẩn B1 (Bảng 3.33). Mặc dù lượng phân đạm và lân thấp hơn 25%, năng suất trung bình ở các công thức xử lý hỗn hợp vi khuẩn B2 cao hơn đến 21,2% so với ở các công thức đối chứng. Kết quả này cho thấy, việc xử lý các hỗn hợp huyền phù vi khuẩn nội sinh trong nghiên cứu này đã tiết kiệm được ít nhất 25% lượng phân N và 25% lượng phân P hóa học bón cho cây cà phê với giai đoạn kinh doanh.

Bảng 3.33. Ảnh hưởng của vi khuẩn nội sinh đến năng suất nhân cà phê với giai đoạn kinh doanh (năm 2018)

Lượng huyền phù vi khuẩn D (ml/cây)	Năng suất nhân (tấn/ha)				
	Hỗn hợp vi khuẩn (B)				Trung bình (D)
	B0 (Đ/C)	B1	B2	B3	
D1 (20)	2,76 ^b	3,21 ^a	3,25 ^a	3,10 ^a	3,08
D2 (30)	2,70 ^b	3,23 ^a	3,25 ^a	3,15 ^a	3,08
D3 (40)	2,77 ^b	3,18 ^a	3,35 ^a	3,12 ^a	3,10
Trung bình (B)	2,74^C	3,21^{AB}	3,28^A	3,12^B	

Ghi chú: Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: $p > 0,05$; B: $p < 0,05$; tương tác D*B: $p < 0,05$; CV% = 14,1%.

Bảng 3.34 cho thấy các mức vi khuẩn xử lý cũng đã có ảnh hưởng khác biệt đến tỷ lệ nhân trên sàng 16, với tỷ lệ nhân trên sàng 16 tỷ lệ thuận với mức vi khuẩn xử lý. Tuy nhiên, xử lý hỗn hợp huyền phù vi khuẩn ở mức 30 ml/cây cho hiệu quả tương đương khi xử lý ở mức 40 ml/cây. Tuy tương tác giữa các hỗn hợp và mức xử lý không có ý nghĩa thống kê, các tổ hợp công thức B1D2 (CT5: 30 ml *B. cereus* M15 + *B. subtilis* EK17) và B1D3 (CT6: 40 ml *B. cereus* M15 + *B. subtilis* EK17) luôn có tỷ lệ nhân trên sàng 16 cao nhất, dao động trong khoảng 38 - 39,5% ở vụ thu hoạch thứ 2 (năm 2017) và thứ 3 (năm 2018).

Bảng 3.34. Ảnh hưởng của vi khuẩn nội sinh đến tỷ lệ nhân trên sàng 16 của cà phê với giai đoạn kinh doanh (năm 2018)

Lượng huyền phù vi khuẩn D (ml/cây)	Tỷ lệ nhân trên sàng 16 (%)				
	Hỗn hợp vi khuẩn (B)				Trung bình (D)
	Đ/C	B1	B2	B3	
20	24,7 ^c	37,7 ^{ab}	34,1 ^b	36,3 ^{ab}	33,2^B
30	25,0 ^c	39,5 ^a	36,7 ^{ab}	39,1 ^a	35,0^A
40	27,2 ^c	39,0 ^a	37,2 ^{ab}	38,9 ^a	35,6^A
Trung bình (B)	25,6^B	38,7^A	36,0^A	38,1^A	

*Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: $p > 0,05$; B: $p < 0,05$; tương tác D*B: $p > 0,05$; CV% = 6,19.*

B. subtilis, *B. pumilus* và *B. cereus* là những vi khuẩn gram dương rất phổ biến, không độc và không gây hại cho người, động vật và môi trường (Janarthine, 2010; de-Bashan, 2010; Huang et al., 2011). Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng *B. subtilis*, *B. pumilus* và *B. cereus* có quan hệ mật thiết với thực vật, có khả năng kích thích sinh trưởng phát triển cây trồng nhờ sản sinh các kích thích tố thực vật, gia tăng khả năng hấp thu dinh dưỡng và bảo vệ cây khỏi một số tác nhân gây hại (Oka et al., 1993; Fabio and Gabriel, 2009; Murugappan, 2013). Ngoài ra, chúng là những vi khuẩn có khả năng hình thành bào tử nên dễ nhân sinh khối, dễ dàng được sản xuất dưới dạng bột, bột thấm nước trong khi vẫn giữ duy trì được khả năng sống vì chúng có thể sống tiềm sinh trong thời gian dài khi gặp điều kiện ngoại cảnh bất lợi (Turner and Backman, 1991).

Kết quả của nghiên cứu này khẳng định thêm rằng các chủng vi khuẩn *B. cereus* M15, *B. subtilis* EK17 và *B. pumilus* BMT4 sử dụng trong nghiên cứu này có khả năng hạn chế mật độ tuyến trùng *Pratylenchus* sp. cũng như thúc đẩy sinh trưởng, phát triển của cây cà phê với trồng trên đất đỏ bazan tại Buôn Ma Thuột.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Kết luận

1. Trong số 9 chủng vi khuẩn nội sinh rễ cây cà phê thí nghiệm, các chủng *Bacillus cereus* M15, *B. subtilis* EK17, *B. pumilus* BMT4 có khả năng kích thích sinh trưởng cây con cà phê với hiệu quả nhất trong điều kiện vườn ươm: tăng hàm lượng diệp lục tố trong lá từ 13,8 - 39,4%; hàm lượng N% trong lá tăng 10,3 - 20,9%; P% trong lá tăng 77,8 - 111,1%; chiều cao cây tăng từ 17,5 - 51,2%; đường kính gốc tăng 25,6 - 27,8%; khối lượng cây tươi tăng 60,5 - 117,4%; khối lượng rễ tươi tăng 218,5 - 235,1%; chiều dài rễ tăng đến 24,6% so với công thức đối chứng ĐC.

2. Hỗn hợp B1 (*B. cereus* M15 + *B. subtilis* EK17) và B2 (*B. subtilis* EK17 + *B. pumilus* BMT4) có ảnh hưởng tốt nhất đến khả năng hấp thu dinh dưỡng N, P trong lá cà phê: hàm lượng N tăng 9,1 - 27,7%, hàm

lượng P tăng đến 18,2%. Khả năng sinh trưởng của cây cà phê với tái canh giai đoạn kiến thiết cơ bản tốt nhất khi xử lý các hỗn hợp này ở mức 20 – 30 ml huyền phù vi khuẩn/cây (4 đợt/năm). Chiều cao cây tăng 11,9 – 19,9%; đường kính gốc tăng 20,2 – 33,0%; số cặp cành cơ bản tăng 3,4 – 18,4%.

3. Hỗn hợp B1 (*B. cereus* M15 + *B. subtilis* EK17) và B2 (*B. subtilis* EK17+ *B. pumilus* BMT4) đã ảnh hưởng tích cực đến hàm lượng các sắc tố quang hợp, khả năng hấp thu dinh dưỡng N, P trong lá; thúc đẩy sinh trưởng, phát triển của cây cà phê với giai đoạn kinh doanh. Kết quả đã làm tăng 14,8 – 20,9% năng suất cây cà phê so với đối chứng bốn phân hóa học 100% theo qui trình).

4. Hỗn hợp B2 (*B. subtilis* EK17+ *B. pumilus* BMT4) và B3 (*B. cereus* M15 + *B. pumilus* BMT4) khi xử lý ở mức 20 – 30 ml/cây có khả năng hạn chế đến hơn 80% mật độ tuyến trùng *Meloidogyne* sp. và *Pratylenchus* sp. trong vườn cà phê với giai đoạn kiến thiết cơ bản.

5. Hỗn hợp B2 (*B. subtilis* EK17+ *B. pumilus* BMT4) và B3 (*B. cereus* M15 + *B. pumilus* BMT4) khi xử lý ở mức 30 – 40 ml/cây có khả năng hạn chế đến khoảng 70% mật độ tuyến trùng *Meloidogyne* sp. và *Pratylenchus* sp. trong vườn cà phê với giai đoạn kinh doanh

Kiến nghị

1. Các chủng vi khuẩn *B. cereus* M15, *B. subtilis* EK17 và *B. pumilus* BMT4 rất có tiềm năng để ứng dụng trong sản xuất cà phê bền vững, giảm lượng phân bón cũng như thuốc bảo vệ thực vật. Do đó, cần nghiên cứu các điều kiện thích hợp để phát triển chế phẩm sinh học làm vật liệu để khảo nghiệm trên cây cà phê.

2. Nghiên cứu sâu hơn về cơ chế thúc đẩy sinh trưởng, phát triển cây cà phê và hạn chế tuyến trùng của các chủng vi khuẩn nghiên cứu.

3. Nghiên cứu thử nghiệm ảnh hưởng của các hỗn hợp huyền phù vi khuẩn đến khả năng thúc đẩy sinh trưởng, phát triển và hạn chế các tác nhân gây hại khác trên một số cây trồng quan trọng của vùng Tây Nguyên.