

DOI:10.22144/ctu.jvn.2022.144

KHẢO SÁT KHẢ NĂNG KHÁNG NẤM *Neoscytalidium* sp. GÂY BỆNH ĐÓM NÂU TRÊN CÂY THANH LONG BẰNG HẠT NANO (Ag, ZnO) VÀ TINH DẦU (CAM, SẢ, BƯỞI)

Phù Gia Linh, Võ Hoàng Việt Quốc, Dương Thế Long và Nguyễn Phạm Anh Thi*

Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Nguyễn Phạm Anh Thi (email: npathi@ctu.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 17/05/2022

Ngày nhận bài sửa: 27/06/2022

Ngày duyệt đăng: 28/07/2022

Title:

Study on the inhibition ability *Neoscytalidium* sp. causing brown spot disease on *Hylocereus costaricensis* by nanoparticles (ZnO, Ag), and essential oils (orange, lemongrass, and grapefruit)

Từ khóa:

Bệnh đốm nâu, nano, *Neoscytalidium* sp., thanh long ruột đỏ, tinh dầu

Keywords:

Brown spot disease, essential oils, *Hylocereus costaricensis* nano, *Neoscytalidium* sp.

ABSTRACT

This study was conducted with the main purpose of investigating the inhibition ability of nanoparticles (Ag, ZnO) and essential oils (orange, grapefruit, and lemongrass) against *Neoscytalidium* sp. causing brown spot disease in Dragon fruit, which can serve as a foundation for researching biological products made from nanoparticles and essential oils. The fungus was isolated from the infected stem of *Hylocereus costaricensis*, collected from Long An province and treated with 12.5 ppm, 25 ppm, 50 ppm, and 100 ppm of nanoparticles (Ag, ZnO) and 12.5%, 25%, 50%, and 100% of essential oils (orange, grapefruit, and lemongrass). The results showed that the inhibitory effect value of silver nanoparticles was highest at 25 ppm concentration (59.61%), while zinc oxide nanoparticles gave the highest inhibitory effect at 100 ppm concentration (65.91%). By using 100% concentration of orange essential oil, the pathogenic fungus was strongly inhibited (77.69%). After three transplanting days, the mycelium of *Neoscytalidium* sp. was not grown under conditions of 100%, 50%, 25%, and 12.5% of grapefruit and lemongrass essential oils. Therefore, the concentrations evaluated could effectively control the fungus *Neoscytalidium* sp.

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện với mục tiêu chính là khảo sát khả năng ức chế nấm *Neoscytalidium* sp. gây bệnh đốm nâu trên cây thanh long ruột đỏ bằng hạt nano (Ag, ZnO) và tinh dầu (cam, bưởi, sả), tạo tiền đề cho các nghiên cứu chế phẩm sinh học từ vật liệu nano và tinh dầu. Việc khảo sát ức chế nấm gây bệnh đốm nâu phân lập được từ thân thanh long ruột đỏ nhiễm bệnh ở Long An với nồng độ nano Ag, ZnO lần lượt là 12,5 ppm, 25 ppm, 50 ppm và 100 ppm và nồng độ tinh dầu cam, bưởi, sả lần lượt là 12.5 %, 25%, 50% và 100%. Kết quả cho thấy, nano Ag cho hiệu quả ức chế cao nhất ở nồng độ 25 ppm (59,61 %) trong khi Nano ZnO cho hiệu quả ức chế cao nhất ở nồng độ 100 ppm (65,91 %). Ở nồng độ tinh dầu cam 100%, hiệu quả ức chế là cao nhất (77,69 %). Sau 3 ngày cấy và quan sát, trong điều kiện tinh dầu bưởi và tinh dầu sả ở nồng độ 100%, 50%, 25% và 12,5% thì tơ nấm không phát triển. Vì vậy, các nồng độ tinh dầu khảo sát trong nghiên cứu này đều có khả năng ức chế nấm *Neoscytalidium* sp.

2.2.1. Tách DNA tổng số

Các mẫu nấm phát triển tốt được chọn nuôi cấy trên môi trường PDA từ 3 đến 5 ngày ở nhiệt độ phòng 27 - 30°C. DNA của nấm được ly trích theo quy trình của CTAB có hiệu chỉnh. Sản phẩm DNA sau khi ly trích được kiểm tra bằng kỹ thuật điện di trên gel agarose 1% và đo OD ở bước sóng 260 nM bằng máy Nanodrop. Sản phẩm DNA đạt chất lượng sẽ được sử dụng ở các thí nghiệm sau.

2.2.2. Khuếch đại vùng trình tự ITS

Trình tự ITS (ITS1-5.8S-ITS2) được khuếch đại bằng cách sử dụng đoạn mồi ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA GCG G-3') và ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAGA TAT GC-3') (White et al., 1990). Phản ứng PCR được thực hiện với 95°C trong 5 phút; Sau đó, 35 chu kỳ lặp lại với 95°C trong 45 giây, 54°C trong 45 giây, 72°C trong 1 phút, 72°C trong 5 phút. Thể tích hỗn hợp phản ứng là 35 µL chứa 18 µL BiH₂O, 12 µL dung dịch Taq Mix 2X, 1 µL mỗi loại mồi ITS1, ITS4, và 3 µL DNA

Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,5 % với kích thước sản phẩm từ 600 bp đến 700 bp, sản phẩm là một băng DNA rõ nét, không có sản phẩm phụ. Sản phẩm PCR được gửi đến công ty Macrogen (Hàn Quốc) để giải trình tự DNA.

2.2.3. Phân tích kết quả giải trình tự DNA

Kết quả giải trình tự sẽ được kiểm tra bằng phần mềm Bioedit trước khi tiến hành so sánh và định danh dòng nấm bằng công cụ BLASTN trên ngân hàng dữ liệu của NCBI (National Center for Biotechnology Information).

2.3. Khảo sát khả năng ức chế nấm *Neoscytalidium* sp. của nano kẽm oxit (ZnO) và nano bạc (Ag)

Nano kẽm oxit (ZnO) và nano bạc (Ag) được sản xuất bởi Công ty Cổ phần Khoa học và công nghệ AMS (Hà Nội) với thông tin kích thước hạt như sau: kích thước hạt nano kẽm oxit 50 – 70 nM và kích thước hạt nano bạc 10 – 20 nM.

Thí nghiệm được tiến hành theo phương pháp của Châu và ctv. (2017) được hiệu chỉnh theo điều kiện của phòng thí nghiệm. Dung dịch nano được pha vào đĩa môi trường PDA để đạt các nồng độ 12,5; 25; 50 và 100 ppm. Mẫu nấm kích thước 1 cm × 1 cm được đặt vào chính giữa đĩa petri ở các nghiệm thức nano và nghiệm thức đối chứng âm (0 ppm nano). Sau đó, các đĩa petri được đặt trong tủ ủ, ổn định ở nhiệt độ 27 – 30°C. Thí nghiệm được bố trí 3 lần lặp lại.

Chỉ tiêu theo dõi: đường kính tán nấm sau 72 giờ và tính hiệu quả ức chế (%) sau 72 giờ cấy.

Hiệu quả ức chế (HQƯC) nấm của vật liệu nano (ZnO, Ag) được tính theo công thức:

$$HQƯC (\%) = \left(1 - \frac{d}{D}\right) \times 100$$

Trong đó:

d: Đường kính tán nấm ở đĩa có chứa nano (cm)

D: Đường kính tán nấm ở mẫu đối chứng âm (cm)

2.4. Khảo sát khả năng ức chế nấm *Neoscytalidium* sp. của tinh dầu cam, bưởi, sả

Tinh dầu cam, bưởi, sả sử dụng trong thí nghiệm được cung cấp bởi Cơ sở bảo tồn dược liệu Hòa An.

Thí nghiệm được tiến hành theo phương pháp Kirby-Bauer có hiệu chỉnh. Tinh dầu được pha loãng với dung dịch 1% DMSO (dimethyl sulfoxide) để được các nồng độ khảo sát. Các giếng nhỏ được tạo với đường kính 6 mm trên đĩa môi trường PDA. Ba mươi µL tinh dầu được cho theo dãy nồng độ 12,5%, 25%, 50%, 100% và nhỏ vào 4 giếng tương ứng của mỗi đĩa. Đối chứng âm là dung dịch 1% DMSO. Đĩa chứa nấm đã được làm thuần được cắt miếng thạch kích thước 1 cm × 1 cm có chứa nấm và đặt vào chính giữa đĩa petri có chứa tinh dầu ở các nồng độ 12,5%, 25%, 50% và 100%. Sau đó, các đĩa được đặt trong tủ ủ, ổn định ở nhiệt độ 27 – 30°C. Thí nghiệm được bố trí 3 lần lặp lại.

Chỉ tiêu theo dõi: đường kính tán nấm sau 72 giờ và tính HQƯC (%) sau 72 giờ cấy.

HQƯC nấm của vật liệu tinh dầu (cam, bưởi, sả) được tính theo công thức:

$$HQƯC (\%) = \left(1 - \frac{d}{D}\right) \times 100$$

Trong đó:

d: là đường kính tán nấm ở các nghiệm thức (cm)

D: là đường kính tán nấm ở mẫu đối chứng (cm)

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả phân lập các dòng nấm gây bệnh đốm nâu trên thân thanh long ruột đỏ

Mẫu thanh long có dấu hiệu bệnh (Hình 1) được thu thập và mang về phòng thí nghiệm để tiến hành phân lập nấm *Neoscytalidium* sp. Kết quả đã phân lập được sáu dòng nấm có đặc điểm hình thái giống với đặc điểm hình thái của nấm *Neoscytalidium* sp. được mô tả bởi Yi et al. (2015).



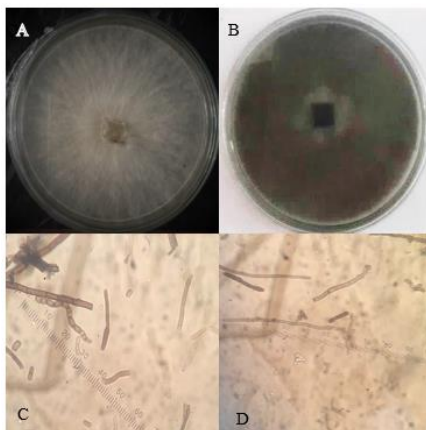
Hình 1. Mẫu thân thanh long bị bệnh

(A) Thân thanh long xuất hiện các đốm nhỏ li ti; (B) Các đốm bệnh lan khắp thân; (C) Đốm bệnh phát triển ăn sâu vào trong thân; (D) Thân cây bị thối, mục nát

Sáu dòng nấm được phân lập có khuẩn lạc hình tròn. Sau 3 ngày cấy, nấm phát triển hoàn toàn trên đĩa thạch, mặt trên màu trắng, bề mặt khuẩn ty dạng

Bảng 1. Đặc điểm sáu dòng nấm phân lập từ cây thanh long ruột đỏ nhiễm bệnh đốm nâu

Dòng	Màu sắc khuẩn lạc sau 3 ngày cấy	Đường kính khuẩn lạc sau 3 ngày cấy	Đặc điểm khuẩn ty	Bào tử
TL1	Trắng	8,0 cm	Mịn, phân nhánh	Đốt, hình trụ
TL2	Trắng	8,0 cm	Mịn, phân nhánh	Đốt, hình trụ
TL3	Trắng	7,8 cm	Mịn, phân nhánh	Đốt, hình trụ
TL4	Trắng	7,8 cm	Mịn, phân nhánh	Đốt, hình trụ
TL5	Trắng	7,4 cm	Mịn, phân nhánh	Đốt, hình trụ
TL6	Trắng	6,0 cm	Mịn, phân nhánh	Đốt, hình trụ



Hình 2. Khuẩn lạc, bào tử và khuẩn ty nấm gây bệnh đốm nâu

A. Khuẩn lạc nấm gây bệnh sau 3 ngày cấy; B. Khuẩn lạc nấm gây bệnh sau 7 ngày cấy; C. Bào tử nấm gây bệnh dưới kính hiển vi độ phóng đại 400X; D. Khuẩn ty nấm gây bệnh dưới kính hiển vi độ phóng đại 400X

sợi, to dài và mịn (Bảng 1, Hình 2A). Khuẩn lạc có bia sợi phẳng, không có vòng đồng tâm. Sau 5 - 6 ngày cấy, nấm bắt đầu hình thành bào tử, sợi nấm dần chuyển sang màu đen, mặt dưới đĩa nuôi cấy có màu đen (Hình 2B). Tốc độ mọc khuẩn ty khá nhanh trên môi trường PDA và đường kính khuẩn lạc đo được sau 3 ngày cấy là $7,50 \pm 0,77$ cm, kết quả này cũng tương đồng với báo cáo của Yi et al. (2015) là $7,2 \pm 0,5$ cm. Dưới kính hiển vi, có thể quan sát thấy, sợi nấm phân nhánh, có vách ngăn, hình thành bào tử đốt (Hình 2C, 2D). Kết quả phân lập cũng phù hợp với các báo cáo của Hiền và ctv. (2016), Mai và Liên (2018).

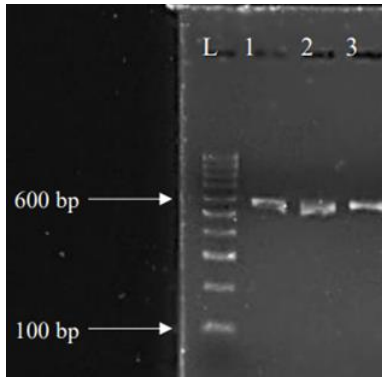
Từ đặc điểm sáu dòng nấm phân lập (Bảng 1), có thể thấy, đặc điểm hình thái của sáu dòng nấm không khác biệt, nhưng TL1 có sức sống mãnh liệt hơn. Vì vậy, chọn dòng nấm TL1 trong số sáu dòng nấm phân lập được để định danh bằng kỹ thuật sinh học phân tử và tiến hành các thí nghiệm khảo sát khả năng ức chế nấm gây bệnh đốm nâu trên thanh long ruột đỏ của hạt nano oxit kẽm (ZnO), nano bạc (Ag), tinh dầu cam, tinh dầu bưởi và tinh dầu sả.

3.2. Định danh nấm gây bệnh đốm nâu trên cây thanh long bằng kỹ thuật sinh học phân tử

3.2.1. Kết quả khuếch đại trình tự vùng ITS của dòng nấm TL1

Dòng nấm TL1 được chọn ly trích DNA và thực hiện phản ứng PCR khuếch đại vùng trình tự ITS. Kết quả phản ứng PCR khuếch đại được trình tự DNA có kích thước khoảng 600 bp được thể hiện bằng một băng sáng, rõ nét và không có sản phẩm phụ (Hình 3).

Theo Thành (2014), trình tự vùng ITS có độ dài từ 600 đến 700 bp là các vùng tiến hóa nhanh nên có thể thay đổi về độ dài cũng như trình tự. Bên cạnh đó, khi khảo sát độ dài trình tự vùng ITS của một số dòng nấm thuộc loài *Neoscytalidium dimidiatum* được công bố trên cơ sở dữ liệu NCBI, hầu hết các dòng nấm đều có độ dài xấp xỉ 600 bp. Do đó, kích thước vùng ITS được khuếch đại là phù hợp. Sản phẩm PCR trên có thể sử dụng cho giải trình tự.



Hình 3. Kết quả điện di sản phẩm PCR của mẫu nấm bệnh

(L: thang chuẩn 100 bp (Bioline); Giếng 1, 2, 3 là mẫu điện di sản phẩm PCR của mẫu TL1 ở ba lần lặp lại)

3.2.2. Kết quả giải trình tự vùng ITS và định danh loài

Trình tự vùng ITS của dòng nấm TL1 gây bệnh đốm nâu trên thanh long được giải trình tự có độ dài 556 nucleotide và được so sánh với trình tự trên ngân hàng gen NCBI bằng công cụ BLASTN; dựa vào chỉ số độ bao phủ (Query cover) và độ tương đồng (Per.Ident) để đánh giá mức độ tương đồng với các dữ liệu có trong ngân hàng gen. Độ bao phủ càng gần 100% chứng tỏ vùng gen mục tiêu được bao phủ càng nhiều bởi vùng gen của loài được gợi ý. Độ bao phủ, độ tương đồng càng cao thì độ chính xác càng có ý nghĩa.

Kết quả BLAST trình tự vùng ITS của dòng nấm TL1 trên cơ sở dữ liệu NCBI cho giá trị độ bao phủ (Query cover) là 100 % và độ tương đồng (Per.Ident) 100 % so với loài *Neoscytalidium dimidiatum* (mã số Genbank: MG865987). *Neoscytalidium dimidiatum* (MG865987) là loài nấm gây bệnh được phân lập từ cây thanh long có nguồn gốc ở Việt Nam.

Như vậy, từ kết quả đặc điểm hình thái khuẩn lạc, sợi nấm, bào tử và kết quả định danh bằng kỹ thuật sinh học phân tử chứng tỏ dòng nấm TL1 gây bệnh đốm trắng trên cây thanh long là loài *Neoscytalidium dimidiatum*.

3.3. Hiệu quả ức chế nấm của hạt nano

3.3.1. Hiệu quả ức chế nấm của nano bạc (Ag)

Kết quả quan sát đường kính tán nấm sau 3 ngày cho thấy ở tất cả các nồng độ khảo sát, tơ nấm phát triển chậm hơn so với đối chứng âm. Hầu hết các nồng độ dung dịch nano ức chế trên 50% nấm so với đối chứng. HQUC nấm dao động trong khoảng từ 43,35% đến 59,61%. Trong đó, nồng độ 12,5 ppm

cho tỉ lệ ức chế nấm ít hiệu quả hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê mức 5% so với ba nồng độ còn lại. Tại nồng độ 25 ppm cho tỉ lệ ức chế nấm cao nhất là 59,61% và khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với nồng độ 100 ppm (57,93%) (Bảng 2).

Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ dung dịch nano bạc (Ag) đến đường kính tán nấm và HQUC nấm *Neoscytalidium dimidiatum*

Nồng độ (ppm)	Đường kính (cm)	Hiệu quả ức chế (%)
12,5	4,39 ^a	43,35 ^b
25	3,13 ^b	59,61 ^a
50	3,38 ^b	56,39 ^a
100	3,26 ^b	57,94 ^a
Đối chứng	7,75	

Ghi chú: Giá trị đường kính, HQUC là giá trị trung bình với 5 lần lặp lại. Các giá trị trung bình trong cùng một cột có ít nhất 1 chữ cái theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa ở mức ý nghĩa 5 % qua kiểm định Tukey.

Kết quả này cao hơn so với nghiên cứu của Hạnh và ctv. (2020) khi sử dụng nano bạc để kháng nấm *H. teres*. Theo đó, hoạt tính kháng nấm của dung dịch nano bạc đến sự phát triển của nấm *H. teres* trên môi trường PDA ở các nồng độ 25, 50 và 100 ppm lần lượt là 40%, 53,3% và 53,3%.

Như vậy, có thể nghiên cứu sử dụng nano bạc với nồng độ 25 ppm trong các nghiên cứu ứng dụng tiếp theo để tính tục đánh giá hiệu quả của nano bạc lên khả năng ức chế nấm *Neoscytalidium dimidiatum* gây bệnh đốm nâu trên cây thanh long.

Nhìn chung, nano bạc có khả năng ức chế nấm *Neoscytalidium dimidiatum* gây bệnh trên thanh long. Kết quả một số nghiên cứu khác cũng chỉ ra rằng, nano bạc có khả năng kháng các loại nấm gây bệnh trên cây trồng. Hạnh và ctv. (2020) nghiên cứu thực hiện đánh giá trong điều kiện in-vitro trên môi trường PDA hoạt tính kháng nấm của dung dịch nano bạc đối với một số loài nấm gây bệnh phân lập được từ cây gừng (đốm lá - *Pythium zingiberis*, héo vàng - thối củ - *Fusarium oxysporum*), cây ớt (thán thư - *Colletotrichum* spp.), cây lúa mì, lúa mạch (đốm lá - *Alternaria* spp.). Kết quả nghiên cứu cho thấy, nano bạc ở các nồng độ khác nhau, đối với các loại nấm khác nhau có hoạt tính kháng nấm ở các mức độ khác nhau. Mendes et al. (2014) báo cáo khả năng ức chế trên 90% sự phát triển của nấm *Phomopsis* sp. trên hạt đậu tương của nano bạc dạng keo kích thước trung bình 52 nm ở nồng độ 180 ppm. Châu và ctv. (2017) báo cáo rằng vật liệu nano Ag/Chitosan/bentonite ở nồng độ bạc 400 ppm có

HQUC nấm *Rhizoctonia solani* đạt 92,82% và nấm *F. oxysporum* đạt 66,7%. Các chế phẩm nano bạc-chitosan chế tạo bằng phương pháp chiếu xạ có hiệu lực ức chế nấm *Phytophthora capsici* lên đến 100% tại nồng độ 40 ppm với kích thước hạt 5 nM (Luân và ctv., 2014).

Khả năng kháng nấm gây bệnh trên cây trồng của hạt nano bạc dựa trên cơ chế xâm nhập của hạt nano vào tế bào vi nấm. Cơ chế hoạt động chống nấm của nano bạc thực hiện bằng cách phá vỡ cấu trúc của màng tế bào và ức chế quá trình nảy chồi bình thường do phá hủy tính toàn vẹn của màng. Ion Ag⁺ tấn công tế bào vi sinh vật đồng thời ở nhiều vị trí, các tổ chức chức năng quan trọng trong tế bào bị vô hiệu hóa, làm quá trình tổng hợp thành tế bào, tổng hợp và dịch mã axit nucleic (RNA, DNA), tổng hợp protein, quá trình vận chuyển các chất qua màng cũng như vận chuyển điện tử qua màng đều bị ảnh hưởng (Hạnh và ctv., 2020; Kim et al., 2008). Nano bạc là một loại thuốc diệt nấm có hiệu quả nhanh chóng chống lại một loạt các loại nấm phổ biến bao gồm cả các chi như *Aspergillus*, *Candida* và *Saccharomyces*. Các hạt nano bạc có thể được sử dụng trong một số vật liệu như quần áo có vô trùng và do đó được sử dụng trong bệnh viện để ngăn ngừa hoặc giảm thiểu nhiễm trùng vi khuẩn gây bệnh như *Staphylococcus aureus* (Silpa, 2016).

3.3.2. Hiệu quả ức chế nấm của nano kẽm oxit (ZnO)

Kết quả quan sát tàn nấm sau 3 ngày nuôi cấy trên môi trường PDA bổ sung dung dịch nano ZnO ở các nồng độ 12,5 ppm, 25 ppm, 50 ppm và 100 ppm cho thấy đường kính tàn nấm ở các nghiệm thức này nhỏ hơn so với đối chứng. Chứng tỏ nano ZnO có khả năng ức chế sự phát triển của nấm *Neoscytalidium dimidiatum*. HQUC của dung dịch nano đối với nấm *Neoscytalidium dimidiatum* gây bệnh đốm nâu trên thanh long thể hiện mối quan hệ giữa đường kính tàn nấm ở nghiệm thức có bổ sung nano ZnO với đường kính tàn nấm ở nghiệm thức đối chứng.

Đường kính tàn nấm ở nghiệm thức có bổ sung nano càng nhỏ so với đối chứng thì HQUC càng cao. HQUC nấm dao động trong khoảng từ 12,73% đến 65,91%. Ở nồng độ 100 ppm cho HQUC nấm là cao nhất (65,91%) và khác biệt có ý nghĩa thống kê (mức 5%) so với các nghiệm thức còn lại. Các nồng độ 12,5 ppm, 25 ppm và 50 ppm cho HQUC lần lượt là 12,72%, 17,15% và 22,72%; Khác biệt không có ý nghĩa thống kê (p<0,05).

Khả năng kháng nấm của hạt nano ZnO là do sự tạo thành các gốc oxy hoạt động (Reactive oxygen species – ROS). Theo Lipovsky et al. (2009), hạt nano ZnO có khả năng tạo ra ROS khi hòa tan trong nước. ROS bao gồm các phân tử như superoxide, hydroxyl peroxide (H₂O₂), hydroxyl radical (OH•), singlet oxygen là sản phẩm phụ của quá trình chuyển hóa hiếu khí bình thường, được sản xuất chủ yếu bằng cách giảm một phần oxy trong quá trình hô hấp. Với sự hiện diện của các ion kim loại, superoxide có thể phản ứng với H₂O₂ và tạo ra nhiều oxy singlet. H₂O₂ có thể oxy hóa các trung tâm hoạt động FeS và cysteines trong một số protein hoặc phản ứng với các kim loại chuyển tiếp và tạo ra gốc hydroxyl (OH•), có thể oxy hóa hầu như bất kỳ phân tử tế bào nào, gây tổn thương DNA, gây bất hoạt protein, liên kết chéo protein và phân mảnh, và peroxy hóa lipid. Các tế bào có một số cơ chế để duy trì mức độ ROS nội bào thấp, tạo thành tập thể hóa phản ứng chống oxy hóa (Jesús et al., 2006).

Bảng 3. Ảnh hưởng của nồng độ dung dịch nano kẽm oxit (ZnO) đến đường kính tàn nấm và HQUC nấm *Neoscytalidium dimidiatum*

Nồng độ (ppm)	Đường kính (cm)	Hiệu quả ức chế (%)
12,5	7,68 ^a	12,73 ^b
25	7,29 ^a	17,15 ^b
50	6,80 ^a	22,73 ^b
100	3,00 ^b	65,91 ^a
Đối chứng	8,80	

Ghi chú: Giá trị đường kính, HQUC là giá trị trung bình với 5 lần lặp lại. Các giá trị trung bình trong cùng một cột có ít nhất 1 chữ cái theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa ở mức ý nghĩa 5% qua kiểm định Tukey. HQUC được chuyển đổi sang $(x+0,5)^{1/2}$ trước khi xử lý thống kê.

Theo cơ chế đó, Lipovsky et al. (2011) đã khảo sát khả năng kháng nấm *Candida albicans* bằng hạt nano ZnO. Theo đó, *Candida albicans* - loài thuộc ngành nấm Ascomycota (Bennett and Turgeon, 2017), cùng chung ngành nấm với loài *Neoscytalidium dimidiatum* đang được khảo sát – bị ức chế bởi dung dịch nano ZnO cho giá trị nồng độ diệt nấm tối thiểu (MFC) ở nồng độ 0,1 mg/mL (100 ppm). Susana et al. (2018) chứng minh rằng hạt nano ZnO với kích thước 50 – 70 nM (tương tự với kích thước hạt nano ZnO được sử dụng trong nghiên cứu này) cho hiệu quả kháng nấm *Colletotrichum gloeosporioides* gây bệnh thán thư trên trái bơ và trái đu đủ, ở nồng độ trong khoảng 0,156 - 0,625 mg/mL (156 ppm - 625 ppm) ức chế sự nảy mầm bào tử của *Colletotrichum gloeosporioides*.

Kích thước hạt nano cũng là một trong những yếu tố quan trọng quyết định khả năng xâm nhập qua màng tế bào của vật liệu nano cũng như tạo ra các đặc tính khác biệt của vật liệu so với dạng khối. Thông thường, theo cơ chế nhập bào, để được hấp thụ vật liệu nano cần phải liên kết đủ với các thụ thể và cơ quan thụ cảm bề mặt nhằm tạo ra sự giảm cục bộ mức năng lượng tự do Gibbs trên màng tế bào. Vì vậy, những hạt nano có kích thước nhỏ cần ít các thụ thể để liên kết hơn, do đó dễ dàng qua màng tế bào và tích tụ tại các bào quan nhiều hơn các vật liệu có kích thước lớn (Kiên và ctv., 2018).

3.4. Hiệu quả ức chế nấm của tinh dầu

3.4.1. Hiệu quả ức chế nấm của tinh dầu cam

Sau 3 ngày quan sát, tán nấm ở các nghiệm thức có bổ sung tinh dầu cam phát triển chậm hơn so với nghiệm thức đối chứng. Đường kính tán nấm ở các nghiệm thức có bổ sung tinh dầu dao động từ 1,74 cm đến 2,99 cm. Đường kính tán nấm càng nhỏ thì HQUC của tinh dầu càng cao. Tỷ lệ ức chế nấm ở dao động từ 61,67% đến 77,69%. Ở nghiệm thức bổ sung tinh dầu cam 100%, đường kính tán nấm là nhỏ nhất (1,74 cm) và HQUC là cao nhất (77,69%). Các nghiệm thức bổ sung tinh dầu 50%, 25% và 12,5% cho HQUC nấm khác biệt không có ý nghĩa thống kê (p<0,05).

Nhìn chung, tinh dầu cam có khả năng ức chế nấm *Neoscytalidium dimidiatum* gây bệnh trên thanh long trong các nghiệm thức được nghiên cứu là hơn 60%. Một số nghiên cứu khác cũng đã chỉ ra đặc tính chống nấm của tinh dầu cam. Theo Viuda-Martos et al. (2008), tinh dầu cam có hiệu quả nhất đối với *Aspergillus niger*.

Bảng 4. Ảnh hưởng của nồng độ tinh dầu cam đến đường kính tán nấm và HQUC nấm *Neoscytalidium dimidiatum*

Nồng độ (%)	Đường kính (cm)	Hiệu quả ức chế (%)
12,5	2,99 ^a	61,67 ^b
25	2,94 ^a	62,31 ^b
50	2,48 ^{ab}	68,21 ^{ab}
100	1,74 ^b	77,69 ^a
Đối chứng	7,80	

Ghi chú: Giá trị đường kính, HQUC là giá trị trung bình với 5 lần lặp lại. Các giá trị trung bình trong cùng một cột có ít nhất 1 chữ cái theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa ở mức ý nghĩa 5% qua kiểm định Tukey.

Khả năng kháng nấm của tinh dầu cam có được là do hoạt động ức chế tế bào của các thành phần có trong đó. Theo Maria et al. (2013), các hợp chất

chính trong tinh dầu vỏ cam được xác định bằng sắc ký khí kết hợp với khối phổ là limonene, β-Myrcene, β-Pinene, α-Pinene, cũng như Cital Z và E; trong đó, limonene chiếm 96,62%. Sawamura et al. (2004) cho rằng tinh dầu cam quýt là hỗn hợp dễ bay hơi các hợp chất chủ yếu bao gồm các hydrocarbon monoterpene có thể được tách thành ba phân đoạn: terpene hydrocarbon, hợp chất oxy và các hợp chất không bay hơi. Phần monoterpene có thể tạo thành từ 50 đến hơn 95% tinh dầu. Tuy nhiên, nó ít đóng góp cho hương vị và hương thơm của dầu (Chanthaphon et al., 2008). Tyagi and Malik (2011) đã báo cáo rằng nồng độ monoterpenes trong tinh dầu là các thành phần chính với hoạt động kháng khuẩn cao hơn trong pha hơi so với tiếp xúc trực tiếp và phụ thuộc vào sự hiện diện của chúng trong hình thức khí tạo điều kiện hòa tan của chúng trong màng tế bào. Carson et al. (2002) và Tyagi and Malik (2011) cho rằng tinh dầu gây ra những thay đổi khác nhau về các thuộc tính và chức năng của màng vi sinh vật bằng cách tăng tính linh hoạt màng và thay đổi tính thấm màng; nồng độ thấp làm thay đổi tính thấm của màng, nồng độ cao gây ra hư hỏng màng, mất cân bằng nội môi và gây ra sự chết tế bào. Nychas (1995) báo cáo rằng một số thành phần của tinh dầu có thể làm biến tính enzyme chịu trách nhiệm nảy mầm bào tử, sản xuất năng lượng và tổng hợp các hợp chất kết cấu hoặc can thiệp vào acid amin tham gia vào sự nảy mầm.

3.4.2. Hiệu quả ức chế nấm của tinh dầu bưởi:

Kết quả khảo sát khả năng ức chế nấm *Neoscytalidium dimidiatum* gây bệnh trên thanh long của tinh dầu bưởi nhận thấy rằng sau 3 ngày cây ở nghiệm thức đối chứng tơ nấm đã lan ra toàn bộ bề mặt đĩa thạch, trong khi đó ở các nghiệm thức có bổ sung tinh dầu 100%, 50%, 25% và 12,5% tơ nấm không phát triển. Điều này chứng minh rằng các nồng độ được khảo sát có khả năng ức chế mạnh nấm *Neoscytalidium dimidiatum*

Nhiều nghiên cứu cũng cho thấy tinh dầu bưởi cho kết quả kháng nấm mạnh. Theo Hung et al. (2013), tinh dầu bưởi cho hiệu quả kháng *Penicillium expansum* cao nhất trong số 3 tinh dầu được tác giả khảo sát. Theo Phong và ctv. (2021), nghiên cứu thành phần hóa học và hoạt tính kháng vi sinh vật gây bệnh của tinh dầu từ vỏ bưởi da xanh báo cáo rằng tinh dầu bưởi da xanh ở nồng độ 50% ức chế 65% sự phát triển của nấm mốc *Asperillus flavus*. Viuda-Martos et al. (2008) nghiên cứu ảnh hưởng ức chế của tinh dầu vỏ quýt, cam và bưởi đối với bốn loại nấm bệnh. Trong đó, *Penicillium verrucosum* và *P. chrysogenum* bị ức chế mạnh nhất

bởi tinh dầu bưởi. Các kết quả này cho thấy hoạt tính kháng nấm có thể được tạo ra bởi một hợp chất hoặc do tác dụng đồng thời hoặc đối kháng của các hợp chất khác nhau trong tinh dầu. Điều này đã được một số nghiên cứu trước đây chứng minh; các tác giả cho rằng khả năng kháng nấm của tinh dầu là do sự có mặt của các thành phần như limonene, linalool hoặc citral với các nồng độ khác nhau. Một số khác thì cho rằng nguyên nhân là do các hợp chất phenol tác động lên màng tế bào của nấm (Phong và ctv., 2021).

3.4.3. HQUC nấm của tinh dầu sả:

Cũng như tinh dầu bưởi, tinh dầu sả ức chế mạnh sự phát triển của nấm ở tất cả các nồng độ khảo sát (12,5%, 25%, 50%, 100%). Sau 3 ngày cấy, ở các nghiệm thức có bổ sung tinh dầu sả nấm không phát triển.

Sả (*Cymbopogon citratus* L.) là một loại cây họ Cỏ có chứa 1 đến 2% tinh dầu với sự đa dạng của thành phần hóa học như một hàm của. Tinh dầu sả được đặc trưng bởi một hàm lượng cao của Citral, được sử dụng như là một nguyên liệu thô để sản xuất ionone, vitamin A và betacarotene (Paviani et al., 2006). Nhiều nghiên cứu đã báo cáo các hoạt động kháng khuẩn (ngay cả đối với nấm gây bệnh ở người) bằng dầu sả. Nikos and Cotas (2007) nghiên cứu hoạt động kháng lại các loài nấm *Collectotrichum coccodes*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium herbarum*, *Rhizopus stolonifer* và *Aspergillus niger* in vitro đã báo cáo rằng sự sản sinh bào tử nấm bị ức chế tới 70% ở mức 25 ppm

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bennett, R. J., & Turgeon, B. G. (2016). Fungal Sex: The Ascomycota. *Microbiology Spectrum*, 4(5), 115–145. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.funk-0005-2016>

Brayner, R., Ferrari-Iliou, R., Brivois, N., Djediat, S., Benedetti, M. F., & Fievet, F. (2006). Toxicological impact studies based on *Escherichia coli* bacteria in ultrafine ZnO nanoparticles colloidal medium. *Nano Lett*, 6, 866–870.

Carson, C. F., Mee, B. J., & Riley, T. V. (2002). Mechanism of Action of Melaleuca alternifolia (Tea Tree) Oil on *Staphylococcus aureus* Determined by Time-Kill, Lysis, Leakage, and Salt Tolerance Assays and Electron Microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(6), 1914–1920. <https://doi.org/10.1128/aac.46.6.1914-1920.2002>

Chanthaphon, S., Chanthachum, S., & Hongpattarakere, T. (2008). Antimicrobial

khí so sánh với các tấm tương đương được lưu trữ trong không khí xung quanh. Trong nồng độ tinh dầu cao nhất (500 ppm) được sử dụng, tơ nấm đã bị ức chế hoàn toàn. Dầu sả làm giảm bào tử nảy mầm và chiều dài ống mầm trong *C. coccodes*, *B. cinerea*, *C. Herbarum* và *R. Stolonifer* với các hiệu ứng phụ thuộc vào nồng độ dầu. Tuy nhiên, tinh dầu sả nồng độ 100 ppm làm tăng khả năng nảy mầm bào tử ở *A. Nigeria*.

Như vậy, tinh dầu bưởi và sả ức chế mạnh sự phát triển của nấm *Neoscytalidium dimidiatum* ngay cả ở nồng độ thấp nhất trong các nồng độ khảo sát.

4. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, sáu dòng nấm gây bệnh đốm nâu trên thanh long đã được phân lập và đã lựa chọn một dòng trong số sáu dòng nấm đó để khảo sát khả năng ức chế nấm của nano Ag, nano ZnO, tinh dầu cam, tinh dầu bưởi và tinh dầu sả. Cả nano Ag và nano ZnO đều cho HQUC nấm *Neoscytalidium dimidiatum* cao ở cả bốn nồng độ khảo sát 12,5; 25; 50; và 100 ppm với hiệu quả cao nhất ghi nhận được là 59,61% đối với nano bạc và 65,91% đối với nano oxit kẽm. Đối với tinh dầu, cả tinh dầu cam, tinh dầu bưởi và tinh dầu sả đều cho HQUC nấm *Neoscytalidium dimidiatum* cao ở cả bốn nồng độ khảo sát 12,5; 25; 50 và 100 ppm với hiệu quả cao nhất ghi nhận được là 77,69% đối với tinh dầu cam và ức chế mạnh nấm *Neoscytalidium dimidiatum* ngay cả ở nồng độ thấp nhất trong các nồng độ khảo sát.

activities of essential oils and crude extracts from tropical Citrus spp. against food-related microorganisms. *Songklanakarin Journal of Science and Technology (SJST)*, 30, 125-131.

Châu, N. H., Thúy, N. T., Hiền, Đ. T., Mai, H. T., Quang, N. V., Long, P. H., Ngọc, N. T. B., & Thiệu, T. T. P. (2017). Nghiên cứu khả năng ức chế nấm gây bệnh trên cây đậu tương của vật liệu nano ag/bentonite. *Tạp chí Công nghệ sinh học*, 15(2), 349-357.

Crous, P. W., Slippers, B., Wingfield, M. J., Rheeder, J., Marasas, W. F., Philips, A. J., Alves, A., Burgess, T., Barber, P., & Groenewald, J. Z. (2006). Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. *Studies in Mycology*, 55, 235–253. <https://doi.org/10.3114/sim.55.1.235>

Hà, N. N. N., Linh, L. T., Liên, P. T. K., Hà, T. T. M., Hương, N. T., & Đông, L. M. (2017). Khảo sát ảnh hưởng của tinh dầu quế, sả chanh, húng quế, bạc hà và tác dụng kết hợp của chúng tới *Saccharomyces cerevisiae* và *Aspergillus niger*.

- Kỷ Yếu Kỷ Niệm 35 Năm Thành Lập Trường ĐH Công Nghiệp Thực Phẩm Hồ Chí Minh (1982 - 2017) (trang 277–286). [https://jstf.hufi.edu.vn/uploads/files/so-tap-chi/nam-2017/ky-yeu/\(127–134\).pdf](https://jstf.hufi.edu.vn/uploads/files/so-tap-chi/nam-2017/ky-yeu/(127–134).pdf)
- Hành, H. C., Nhung, N. H., Hương, T. T., Chi, T. Q., Khánh, P. D., Son, H. A., Alexandrovna, K. L., & Petrovich, S. V. (2020). Hoạt tính kháng nấm của nano bạc đối với một số nấm gây bệnh trên cây trồng trong điều kiện in vitro. *Bản B của Tạp Chí Khoa học Và Công nghệ Việt Nam*, 62(9). https://b.vjst.vn/index.php/ban_b/article/view/811
- Hiền, Ô. T. M., Liên, N. T., Huyền, N. T. M., & Anh, T. Đ. (2016). Phân lập vi khuẩn đối kháng nấm *Neoscytalidium dimidiatum* (Penz.) gây bệnh đốm trắng trên thanh long từ đất vùng rễ cây thanh long (Báo cáo tổng kết đề tài nghiên cứu khoa học do sinh viên thực hiện). Trường Đại học Cần Thơ.
- Huang, S. K., Tangthirasunun, N., Phillips, A. J. L., Dai, D. Q., Wanasinghe, D. N., Wen, T. C., Bahkali, A. H., Hyde, K. D., & Kang, J. C. (2016). Morphology and Phylogeny of *Neoscytalidium orchidacearum* sp. nov. (Botryosphaeriaceae). *Mycobiology*, 44(2), 79–84.
- Hung, P. V., Chi, P. T. L., & Phi, N. T. L. (2013). Comparison of antifungal activities of Vietnamese Citrus essential oils. *Natural Product Research*, 27(4–5), 506–508. <https://doi.org/10.1080/14786419.2012.706293>
- Jesús, A., Wilhelm, H., & Rosa, N. (2006). Fungal responses to reactive oxygen species. *Medical Mycology*, 44(s1), 101–107. <https://doi.org/10.1080/13693780600900080>
- Kim, K. J., Sung, W. S., Suh, B. K., Moon, S. K., Choi, J. S., Kim, J. G., & Lee, D. G. (2008). Antifungal activity and mode of action of silver nano-particles on *Candida albicans*. *BioMetals*, 22(2), 235–242. <https://doi.org/10.1007/s10534-008-9159-2>
- Kiên, N. T., Hương, T. T. T., Châu, N. H., Kim, Đ. Đ., & Thùy, D. T. (2018). Ảnh hưởng của kích thước hạt nano đồng đến sự sinh trưởng của vi khuẩn lam *Microcystis aeruginosa*. *Tạp Chí Công Nghệ Sinh Học*, 16(2), 361–367.
- Luân, L. Q., Phương, N. H., & Uyên, P. H. G. (2014). Nghiên cứu hiệu ứng kháng nấm *Phytophthora capsici* gây bệnh chết nhanh ở cây hồ tiêu của chế phẩm nano bạc-chitosan chế tạo bằng phương pháp chiếu xạ. *Tạp Chí Sinh Học*, 36(1se), 152–157.
- Lipovsky, A., Nitzan, Y., Gedanken, A., & Lubart, R. (2011). Antifungal activity of ZnO nanoparticles the role of ROS mediated cell injury. *Nanotechnology*, 22(10), 105101. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/22/10/105101>
- Lipovsky, A., Tzitrinovich, Z., Friedmann, H., Applerot, G., Gedanken, A., & Lubart, R. (2009). EPR Study of Visible Light-Induced ROS Generation by Nanoparticles of ZnO. *The Journal of Physical Chemistry C*, 113(36), 15997–16001. <https://doi.org/10.1021/jp904864g>
- Mai, Đ. T. H., & Liên, N. T. (2018). Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn đối kháng nấm *Neoscytalidium* sp. gây bệnh đốm trắng trên cây lan Ngọc điểm. *Tạp Chí Khoa học Và công nghệ nông nghiệp Trường Đại học Nông Lâm Huế*, 2(1), 449–508. <https://doi.org/10.46826/luaf-jasat.v2n1y2018.120>
- Maria José, V. N., Avila-Sosa, R., Palou, E., & López-Malo, A. (2013). Antifungal activity of orange (*Citrus sinensis* var. Valencia) peel essential oil applied by direct addition or vapor contact. *Food Control*, 31(1), 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.09.029>
- Mendes, J. E., Abrunhosa, J. A., & de Camargo, T. E. R. (2014). Antifungal activity of silver colloidal nanoparticles against phytopathogenic fungus (*Phomopsis* sp.) in soybean seeds. *International Journal of Biological, Veterinary, Agriculture and Food Engineering*, 8(9), 928–933. <http://hdl.handle.net/1822/32579>
- Nikos, G. T., & Costas, D. E. (2007). Antifungal activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus* L.) essential oil against key postharvest pathogens. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8(2), 253–258. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2007.01.002>
- Nychas, G. J. E. (1995). Natural antimicrobials from plants. *New Methods of Food Preservation*, 58–89. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2105-1_4
- Oanh, V. T. T., Tuyển, B. C., Thành, N. P., Đôn, L. Đ., & Hiền, P. T. T. (2014). Xác định tác nhân gây bệnh đốm nâu (*Neoscytalidium dimidiatum*) trên cây thanh long dựa vào trình tự vùng ITS-RADN. *Tạp Chí Khoa học Công nghệ*, 2–6.
- Patra Shahi, M., K. Shahi, S., Kumar, M., & Choudhary, S. (2007). Evaluation of clove oil for the development of natural antifungal against onychomycosis. *Plant Archives*, 7(2), 753–757. https://www.researchgate.net/publication/295726913_Evaluation_of_clove_oil_for_the_development_of_natural_antifungal_against_onychomycosis
- Paviani, L., Pergher, S. B., & Dariva, C. (2006). Application of molecular sieves in the fractionation of lemongrass oil from high-pressure carbon dioxide extraction. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 23(2), 219–225. <https://doi.org/10.1590/s0104-66322006000200009>
- Phong, H. X., Châu, L. M., Nghi, T. T. X., Thanh, N. N., & Long, B. Đ. H. (2021). Thành phần hóa

- học và hoạt tính kháng vi sinh vật gây bệnh của tinh dầu từ vỏ bưởi da xanh (*Citrus maxima* (Burm.) Merr.). *Hue University Journal of Science: Natural Science*, 130(1C), 75–83. <https://doi.org/10.26459/hueunijns.v130i1c.6247>
- Sawamura, M., Son, U. S., Choi, H., Kim, M. L., Phi, N. T., Fears, M., & Kumagai, C. (2004). Compositional changes in commercial lemon essential oil for aromatherapy. *International Journal of Aromatherapy*, 14, 27–36.
- Seham, M. A. R., Saeed, E. E., Sham, A., Alblooshi, K., El-Tarabily, K. A., & AbuQamar, S. F. (2020). Molecular Characterization and Disease Control of Stem Canker on Royal Poinciana (*Delonix regia*) Caused by *Neoscytalidium dimidiatum* in the United Arab Emirates. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3), 1033. <https://doi.org/10.3390/ijms21031033>
- Silpa, S. (2016). Nanotechnology-Present Revolutionary Biotechnology. *International Journal of Pharma Research and Health Sciences*, 4(4), 1261–1267. <https://doi.org/10.21276/ijprhs.2016.04.03>
- Solanki, P., Bhargava, A., & Chhipa H. (2015). Nano-fertilizers and their smart delivery System. *Nanotechnology in food and agriculture*, 81-101. DOI:10.1007/978-3-319-14024-7_4
- Susana, C., De la R.G., S. C., Martínez-Torres, P., Gómez-Cornelio, S., Corral-Aguado, M. A., Quintana, P., & Gómez-Ortíz, N. M. (2018). Antifungal Activity of ZnO and MgO Nanomaterials and Their Mixtures against *Colletotrichum gloeosporioides* Strains from Tropical Fruit. *Journal of Nanomaterials*, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2018/3498527>
- Thành, N. Đ. (2014). Các kỹ thuật chi thị DNA trong nghiên cứu và chọn lọc thực vật. *Tạp chí Sinh học*, 36(3), 265-294.
- Tyagi, A. K., & Malik, A. (2011). Antimicrobial potential and chemical composition of *Mentha piperita* oil in liquid and vapour phase against food spoiling microorganisms. *Food Control*, 22(11), 1707–1714. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.04.002>
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., & Perez-Álvarez, j. (2008). Antibacterial activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) Essential oils. *Journal of food safety*, 28(4), 567–576. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.2008.00131.x>
- White, T., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal rna genes for phylogenetics. *Pcr Protocols*, 315–322. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-372180-8.50042-1>
- Yi, R. H., Ling Lin, Q., Mo, J. J., Wu, F. F., & Chen, J. (2015). Fruit internal brown rot caused by *Neoscytalidium dimidiatum* on pitahaya in Guangdong province, China. *Australasian Plant Disease Notes*, 10(1), 10–13. <https://doi.org/10.1007/s13314-015-0166-1>