

# XÁC ĐỊNH NẤM GÂY BỆNH THỐI ĐEN ĐẦU TRÁI BƠ VÀ KHẢ NĂNG KIỂM SOÁT BỆNH CỦA VẬT LIỆU CHITOSAN

Hà Thị Mỹ Ngân<sup>1</sup>, Nguyễn Thành Luân<sup>1</sup>, Nguyễn Lộc An<sup>2</sup>, Chu Trung Kiên<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Công nghệ thành phố Hồ Chí Minh

<sup>2</sup>Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp miền Nam

\*Email: kienias2003@gmail.com

## TÓM TẮT

Bệnh thối đen đầu trái bơ là một trong những nguyên nhân chính dẫn đến thất thoát sản lượng trái bơ tươi sau thu hoạch. Nghiên cứu được thực hiện nhằm xác định tác nhân gây bệnh thối đen đầu quả bơ và thử nghiệm sử dụng các vật liệu chitosan để kiểm soát mầm bệnh trong điều kiện phòng thí nghiệm. Nội dung nghiên cứu gồm: Phân lập, định danh, lây nhiễm nhân tạo nấm gây bệnh và đánh giá hiệu lực ức chế, diệt trừ nấm bệnh của các vật liệu chitosan khác nhau. Kết quả nghiên cứu đã xác định được loài *Lasiodiplodia theobromae* gây bệnh thối đen đầu trái bơ sau thu hoạch với các triệu chứng điển hình là phần vỏ ở đầu cuống trái bị nâu đen với rìa vết bệnh gồ ghề, các mạch dẫn bị hóa nâu, thịt trái bị mềm và có màu nâu. Phức chitosan I<sub>2</sub> với nồng độ 1.500 ppm có khả năng ức chế, diệt trừ được nấm bệnh *L. theobromae*, hiệu lực đạt 100% đối với nấm bệnh nuôi cấy trên môi trường PDA và đạt 81,94% đối với bệnh thối đen đầu trái bơ khi lây nhiễm nhân tạo.

**Từ khóa:** Quả bơ, bệnh thối đen đầu trái, *Lasiodiplodia theobromae*, vật liệu chitosan, hiệu lực kiểm soát.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sản lượng trái cây và rau thất thoát sau thu hoạch trên toàn cầu là rất lớn (28 - 55%) [1]. Trong đó, lượng bơ thất thoát sau thu hoạch chiếm 43% tổng sản lượng bơ toàn cầu, tương ứng gần 750 tỷ USD [2]. Các nước phát triển có mức thất thoát thấp từ 5 - 35%. Trong khi đó, các nước chưa phát triển có mức thất thoát rất lớn, khoảng 20 - 50% [3]. Mức thất thoát này rất khác nhau trong cả chuỗi tiêu thụ bơ và phụ thuộc nhiều vào điều kiện cụ thể của mỗi quốc gia. Ở các nước kém phát triển, mức thất thoát sản lượng bơ trong quá trình vận chuyển từ vườn đến chợ là 17%, bốc xếp nông sản là 8% và tại các chợ là 10% [4]. Điều này cho thấy, sản lượng bơ bị thất thoát ở các nước kém phát triển trong phân khúc tiêu thụ tại chợ nội địa là rất lớn. Ở các nước đang và phát triển mức thất thoát đã giảm đáng kể nhưng vẫn ở mức cao [4].

Nấm bệnh là nguyên nhân chính gây ra thất thoát trái bơ ở các chợ, mức thiệt hại từ 18 - 100% đã được Geremu và cs (2022) [5] báo cáo. Trong đó, chi *Lasiodiplodia* là một trong số những mầm bệnh chính gây thất thoát sản lượng bơ sau thu hoạch và gây ảnh hưởng nghiêm trọng tới chất lượng và tuổi đời trái bơ tươi [6, 7].

Thành phố Hồ Chí Minh là thị trường tiêu thụ trái bơ tươi chính của cả nước và chợ đầu mối Thủ Đức là một trong ba điểm phân phối bơ chính của thành phố. Đây cũng là nguồn phân phối trái bơ chính yếu ra các chợ bán lẻ tại khu vực thành phố Thủ Đức. Đến nay, trái bơ bị thối ở các chợ bán lẻ tại thành phố Thủ Đức đã được các tiểu thương đề cập. Tuy vậy, mức thiệt hại cụ thể do bệnh gây ra còn chưa được báo cáo.

Chitosan là một polyme sinh học tự nhiên có khả năng phòng trừ nấm và rất an toàn, thân

thiện với môi trường nên ngày càng được áp dụng rất phổ biến trong xử lý trái cây tươi để thay thế các giải pháp kém hiệu quả hơn ở trên thế giới [8, 9]. Nghiên cứu ở trong nước đã cho thấy áo trái nhãn tiêu da bò bằng chitosan ở nồng độ 2000 ppm đã giảm được 87,46% số trái nhãn bị thối trái tới 22 ngày trong điều kiện 5°C và ẩm độ 80 - 90% [10]. Điều này cho thấy, ứng dụng chitosan để quản bệnh thối đen đầu trái bơ do nấm *Lasiodiplodia* gây ra là rất triển vọng. Do đó, nghiên cứu này được thực hiện nhằm xác định loài nấm gây bệnh thối đen đầu quả bơ, vật liệu chitosan có khả năng kiểm soát hiệu quả mầm bệnh này trong điều kiện phòng thí nghiệm.

## **2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

### **2.1. Vật liệu nghiên cứu**

#### *2.1.1. Mẫu nấm bệnh: L. theobromae.*

Mẫu trái bơ bị bệnh với triệu chứng nâu đen đến đen đầu trái được thu từ chợ đầu mối Thủ Đức.

#### *2.1.2. Vật liệu chitosan*

Chitosan (CTS), phức chitosan-Cu (CTS + Cu), phức chitosan-I<sub>2</sub> (CTS + I<sub>2</sub>) được sản xuất từ vỏ tôm do Viện Khoa học Vật liệu ứng dụng cung cấp.

### **2.2. Phương pháp nghiên cứu**

#### *2.2.1. Phân lập định danh tác nhân gây bệnh thối đen đầu trái bơ*

*Phân lập mầm bệnh:* Các mẫu trái bơ bị bệnh sau khi thu thập, bảo quản trong tủ mát ở nhiệt độ 4°C, được rửa sạch dưới vòi nước chảy trước khi các miếng mẫu bệnh có kích thước 2 x 2 mm ở vùng tiếp giáp giữa mô khỏe và mô bệnh được cắt ra và tiệt trùng bằng cồn 70% trong 15 giây. Sau đó, loại bỏ cồn trên các miếng mẫu bằng nước cất tiệt trùng trước khi cấy trên đĩa môi trường PDA (potato dextrose agar) đặc đã chuẩn bị trước và duy trì ở nhiệt độ 28 - 32°C trong thời gian 2 - 3 ngày. Các bước thực hiện từ cắt miếng mẫu bệnh đến hoàn thành việc cấy mẫu được thực hiện trong tủ cấy sinh học cấp II.

*Định danh sơ bộ nấm bệnh:* Hệ sợi nấm mọc ra từ các mẫu bệnh trên môi trường PDA được cấy truyền trên cùng môi trường để làm thuần và duy trì ở nhiệt độ 28 - 32°C cho đến khi xuất hiện các quả thể màu đen ở trên mặt thạch. Quan sát, ghi nhận các đặc điểm hình thái, sự phát triển của hệ sợi và hình thái bào tử trong các quả thể theo mô tả của Phillips và cs (2013) [11].

*Định danh loài mầm bệnh bằng kỹ thuật sinh học phân tử:* Chi *Lasiodiplodia* sp. đã xác định từ kết quả định danh hình thái được định danh đến loài bằng kỹ thuật sinh học phân tử theo Aidoo và cs (2024) [12] với các bước sau:

*Tách chiết ADN nấm:* Mỗi mẫu nấm lấy 20 g hệ sợi tươi ở trên mặt thạch PDA tại thời điểm 2 ngày sau cấy, cho vào một eppendorf 1,5 mL. Sau đó, 50 µL dung dịch Lysis Buffer được thêm vào và nghiền trong 5 phút. Mẫu nghiền được ủ ở nhiệt độ phòng trong 30 phút trước khi ly tâm với tốc độ 12.000 vòng/phút trong 10 phút để thu lấy phần dịch chiết bên trên. Thêm ethanol để kết tủa ADN, sau đó rửa ADN bằng cồn 70% và sấy khô chân không ở nhiệt độ 60°C trong 8 - 10 phút. Sản phẩm ADN được bảo quản ở nhiệt độ -20°C với dung dịch đệm TE 0.1X cho đến khi thực hiện PCR.

*Thực hiện phản ứng PCR:* Phản ứng PCR được thực hiện tại Bộ môn Công nghệ sinh học, Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp miền Nam với cặp mồi ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTG CGG-3') và ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATA TGC-3') [13]. Mỗi phản ứng được thực hiện với tổng thể tích 50 µL, gồm 25 µL Master mix, 2 µL ITS1, 2 µL ITS4, 2 µL ADN và 19 µL H<sub>2</sub>O với chu kỳ luân nhiệt như sau: Tiền biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 3 phút, tiếp theo là 35 chu trình (biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 30 giây, gắn mồi ở nhiệt độ 58°C trong 30 giây và bắt cặp ở nhiệt độ 72°C trong 1 phút). Phản ứng được kết thúc với 10 phút ở nhiệt độ 72°C.

Sản phẩm PCR được nhuộm bằng phẩm nhuộm loading dye và kiểm tra trên gel agarose 2%. Điện di ở điều kiện 200 V, 100 A, trong 60

phút. Sau đó, gel được mang đi chụp dưới tia UV. Sản phẩm đạt yêu cầu là khi chỉ xuất hiện một băng (band) duy nhất, băng sáng, rõ nét và đúng kích thước vùng ITS.

**Giải trình tự gen:** Các sản phẩm PCR được gửi đến Công ty TNHH Dịch vụ và Thương mại Nam Khoa để giải trình tự. Trình tự mẫu được so sánh với các chuỗi đã công bố trên ngân hàng gen với sự hỗ trợ của công cụ tìm kiếm BLAST tại NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) để xác định loài dựa trên mức độ tương đồng.

**Xây dựng cây phả hệ:** Cây Maximum Likelihood được phân tích và vẽ bằng phần mềm MEGA phiên bản 10.2.6.

### **2.2.2. Lây nhiễm bệnh nhân tạo kiểm chứng tác nhân gây bệnh theo quy trình Koch [12]**

Mầm bệnh *Lasiodiplodia* sau khi đã xác định loài được nhiễm trên 3 trái bơ khỏe ở giai đoạn thu hoạch và đã vô trùng. Các trái bơ được đặt trong hộp nhựa có kích thước 40 x 25 x 20 cm. Mỗi trái được nhiễm vào hốc cuống 100  $\mu$ l dung dịch bào tử *L. theobromae* với mật số  $1,5 \times 10^4$  bào tử/mL. Sau đó, đặt nắp hộp và ủ ở điều kiện phòng thí nghiệm với nhiệt độ 28 - 32°C. Quan sát, ghi nhận đặc điểm vết bệnh trên trái bơ ở thời điểm 24, 48 và 72 giờ sau ủ. Trái bơ bị bệnh ở thời điểm 72 giờ sau ủ được tái phân lập và giám định hình thái để xác nhận mầm bệnh *L. theobromae* là nguyên nhân gây ra triệu chứng thối đen đầu trái và mầm bệnh này được nhân nuôi duy trì để làm nguồn bệnh cho các thí nghiệm tiếp theo.

### **2.2.3. Đánh giá khả năng ức chế nấm bệnh của vật liệu chitosan**

**Đánh giá khả năng ức chế nấm bệnh trên môi trường PDA:** Hiệu lực ức chế, diệt trừ nấm bệnh của vật liệu chitosan trên đĩa thạch chứa môi trường PDA được xác định bằng phương pháp đầu độc môi trường theo quy trình của Sathiyabama & Muthukumar (2020) [14]. Mỗi loại vật liệu CTS được trộn với môi trường PDA với nồng độ 500, 1.000, 1.500, 2.000 ppm và đối chứng không chứa CTS. Mỗi nghiệm thức 5 lần

nhắc lại, tương ứng với 5 đĩa petri đường kính 9 cm. Các chỉ tiêu theo dõi gồm đường kính tán nấm (cm) và hiệu lực ức chế (%). Hiệu lực ức chế được tính theo công thức Abbott (1925) [15].

**Đánh giá hiệu lực kiểm soát bệnh trên trái bơ lây nhiễm bệnh nhân tạo:** Trái bơ ở giai đoạn thu hoạch, đồng đều về kích thước và độ chín được vô trùng bằng natri hypoclorit (NaOCl) (0,1% w/v) trong 5 phút, sau đó rửa sạch lại bằng nước cất tiệt trùng và được ngâm ngập trong dung dịch chứa CTS ở các nồng độ 0, 500, 1.000, 1.500, 2.000 ppm trong 5 phút trước khi vớt ra xếp trong hộp nhựa có kích thước 40 x 25 x 20 cm. Ngay khi các trái bơ ráo nước, dung dịch bào tử nấm bệnh được nhỏ vào hố cuống trái như ở quy trình Koch. Các hộp đựng trái bơ sau nhiễm nấm được đặt kín nắp và ủ ở điều kiện phòng thí nghiệm. Mỗi nồng độ CTS sử dụng 3 trái bơ/hộp tương ứng với 1 lần nhắc. Mỗi nghiệm thức 3 lần nhắc lại. Chỉ tiêu theo dõi gồm: Tỷ lệ trái bơ nhiễm bệnh (%), chỉ số bệnh/trái (%) và hiệu lực phòng trị bệnh (%).

## **2.3. Xử lý số liệu**

Số liệu được xử lý bằng phần mềm Excel và phân tích ANOVA, phân hạng LSD bằng phần mềm SAS 9.1. Cây phát sinh loài được vẽ bằng phần mềm Mega X.

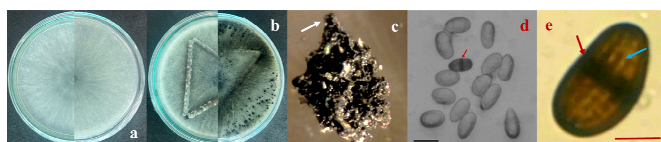
## **3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN**

### **3.1. Phân lập, định danh đến loài nấm gây bệnh thối đen đầu trái bơ**

Mẫu trái bơ bị bệnh thu thập từ chợ đầu mối Thủ Đức, thành phố Hồ Chí Minh có triệu chứng vỏ bị thối nâu đen khởi phát từ phần núm cuống lan xuống phía dưới với rìa vết bệnh gồ ghề, mô thịt trái ở vùng bệnh mềm và sẫm màu hơn ở phần mô khỏe, các bó mạch bị hóa đen rất dễ nhận thấy khi cắt ngang trái ở phần mô bệnh (Hình 3a-c).

Trên môi trường PDA, hệ sợi có màu trắng xám, mọc nổi trên mặt thạch và tiến tới mép đĩa petri 9 cm ở khoảng  $47 \pm 1$  giờ sau cấy truyền (Hình 1a). Đến thời điểm 14 ngày sau cấy, các quả thể nấm hình thành trên cuống bông cây cỏ

tranh (*Imperata cylindrica*) và trên PDA được bao phủ kín bởi các sợi nấm màu xám đen, các đốm màu đen là vị trí của các quả thể được nhìn thấy rất rõ từ mặt sau của thạch (Hình 1b). Quả thể hình cầu, màu đen sậm với núp phóng bào tử kéo dài ra từ đỉnh (Hình 1c). Các bào tử có hình elip đến oval. Bào tử non có màu trong suốt, không có vách ngăn, khi đã phát triển đủ kích thước có chiều dài khoảng  $23,79 \pm 3,63 \mu\text{m}$  và chiều rộng khoảng  $13,46 \pm 1,88 \mu\text{m}$ , tỷ lệ dài/rộng là 1,8 lần (Hình 1d và bảng 1). Bào tử già có chiều dài  $24,79 \pm 2,18 \mu\text{m}$  và chiều rộng  $14,04 \pm 1,38 \mu\text{m}$ , màu nâu đen, 1 vách ngăn ở giữa và có các sọc dọc kéo dài tới 2 đầu, tỷ lệ dài/rộng là 1,78 lần (Hình 1e và bảng 1).



**Hình 1. Đặc điểm hình thái chủng nấm phân lập từ mẫu bệnh thối đen đầu trái bơ**

*Ghi chú:* a. Tàn nấm bệnh ở mặt trước (bên trái) và sau (bên phải) trên thạch PDA sau 2 ngày sau nuôi cấy; b. Các quả thể hình thành trên cuống bông cỏ tranh (bên trái) và trên thạch (các

chấm đen) ở mặt sau (bên trái) sau 14 ngày nuôi cấy; c. Quả thể với núp phóng bào tử (mũi tên sáng màu); d. Bào tử non và già (mũi tên tối màu); e. Bào tử già (mũi tên tối màu là vách ngăn, sáng màu là sọc dọc). Thước ở hình d là  $20 \mu\text{m}$  (độ phóng đại 100 lần) và e là  $10 \mu\text{m}$  (độ phóng đại 400 lần).

Các nghiên cứu trên thế giới đã báo cáo rằng, sợi nấm mọc nổi trên mặt thạch PDA ban đầu có màu trắng, sau đó chuyển sang màu xám và xám đen đến đen. Các quả thể màu xám hình thành rời rạc hoặc liên kết. Bào tử hình elip đến hơi hình trứng, khi bào tử non có màu trong suốt và không vách ngăn. Bào tử già có 1 vách ngăn ở giữa và màu nâu đen, chiều dài khoảng  $17,35 - 29,31 \mu\text{m}$  và chiều rộng  $11,23 - 14,91 \mu\text{m}$ . Những đặc điểm hình thái này đã được Wanjiku và cs (2020) [13] xác định là loài *Lasiodiplodia theobromae* và rất tương đồng với loài được báo cáo trước đó [11, 16]. Phillips và cs (2013) [11] đã mô tả chi *Lasiodiplodia* với những đặc trưng như: Bào tử được hình thành trong quả thể, bào tử non có màu trong suốt trước khi chuyển sang màu nâu (bào tử già), không có khe ống mầm và bào tử non không có các sọc dọc.

**Bảng 1. Đặc điểm hình thái bào tử nấm gây bệnh thối đen đầu trái bơ**

| Mẫu                                    | Chiều dài ( $\mu\text{m}$ ) | Chiều rộng ( $\mu\text{m}$ ) | Tỷ lệ dài/rộng (lần) | Số vách ngăn | Hình dạng   | Màu sắc    |
|----------------------------------------|-----------------------------|------------------------------|----------------------|--------------|-------------|------------|
| Bào tử non đã phát triển đủ kích thước |                             |                              |                      |              |             |            |
| MauB                                   | $23,79 \pm 3,63$            | $13,46 \pm 1,88$             | 1,80                 | 0            | Elip - oval | Trong suốt |
| Bào tử ở giai đoạn trưởng thành        |                             |                              |                      |              |             |            |
| MauB                                   | $24,79 \pm 2,18$            | $14,04 \pm 1,38$             | 1,78                 | 1            | Elip - oval | Nâu đen    |

*Ghi chú:* Giá trị chiều dài và rộng là trung bình  $\pm$  độ lệch chuẩn (SD). Số bào tử quan sát và ghi nhận kích thước của mỗi loại là 30.

Kết quả giải trình tự gen vùng ITS1-5.8S-ITS2 với cặp mồi ITS1/ITS4 được so sánh với cơ

sở dữ liệu vùng ITS trên ngân hàng gen tại NCBI với sự hỗ trợ của công cụ tìm kiếm BLAST cho



thấy, nấm bệnh ở mẫu MauB có mức tương đồng cao nhất với loài *L. theobromae* gây bệnh loét thân cây gỗ tểch (*Tectona grandis* L.) tại

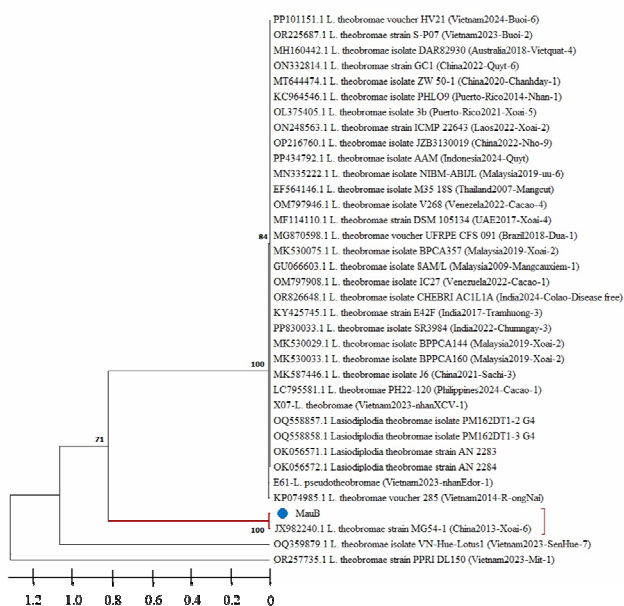
Ecuador [14] với mức đồng nhất trình tự trên 99% (Bảng 2).

**Bảng 2. Kết quả tìm kiếm BLAST dựa trên trình tự vùng ITS của mẫu MauB**

| Tên mẫu | Loài                 | Chủng chuẩn | Phần trăm đoạn so sánh (%) | Mức đồng nhất trình tự (%) | Mã ngân hàng gen |
|---------|----------------------|-------------|----------------------------|----------------------------|------------------|
| MauB    | <i>L. theobromae</i> | AN2284      | 99                         | 99,64                      | OK056572.1       |
|         | <i>L. theobromae</i> | AN2283      | 99                         | 99,64                      | OK056571.1       |
|         | <i>M. theicola</i>   | UPA-62      | 97                         | 99,63                      | KP179222.1       |

Loài *L. theobromae* này được so sánh trình tự gen vùng ITS với các mẫu cùng loài gây bệnh trên các cây trồng khác ở các nước lân cận và trên thế giới dựa vào tham số khả năng tương đồng cực đại (Maximum Likelihood) với sự hỗ trợ của phần mềm Mega X. Kết quả cho thấy, loài *L. theobromae* MauB gây bệnh thối đen đầu quả bơ cùng phân nhánh và gần gũi nhất với mẫu loài *L. theobromae* MG51-1 gây bệnh chảy gom cây xoài tại Trung Quốc [17] (Hình 2).

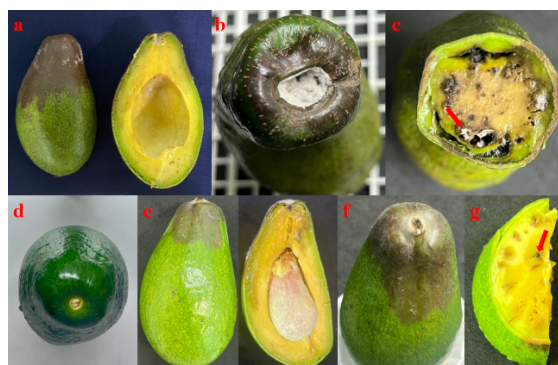
phần mô thịt trái bệnh mềm và chuyển sang màu nâu (Hình 3e). Vào ngày thứ 3 sau lây nhiễm, vết bệnh lan nhanh xuống phần cuối trái bơ, các sợi nấm màu trắng xám xuất hiện thưa thớt trên phần vỏ bị bệnh, cắt ngang trái bơ ở phần bị bệnh, các bó mạch dẫn bị nâu đen (Hình 3f-g). Kết quả này tương tự như triệu chứng ghi nhận được trên trái bơ bị thối đen đầu được thu thập và cũng tương đồng với triệu chứng thối trái bơ được mô tả bởi Guarnaccia và cs (2016) [18], Madhupani và Adikaram (2017) [19].



**Hình 2. Cây phả hệ của *L. theobromae* MauB phân lập từ trái bơ bị bệnh thối đầu**

### 3.2. Kết quả lây nhiễm bệnh nhân tạo trên trái bơ theo quy trình Koch

Kết quả lây nhiễm nhân tạo nấm bệnh trên trái bơ cho thấy, phần đầu trái bơ chuyển từ màu xanh (Hình 3d) sang màu nâu xám sau 2 ngày lây nhiễm, vết bệnh tiếp tục lan rộng quanh núm cuống xuống phía dưới với rìa vết bệnh gồ ghề.



**Hình 3. Triệu chứng bệnh thối đen đầu trái trên trái bơ bị lây nhiễm bệnh nhân tạo**

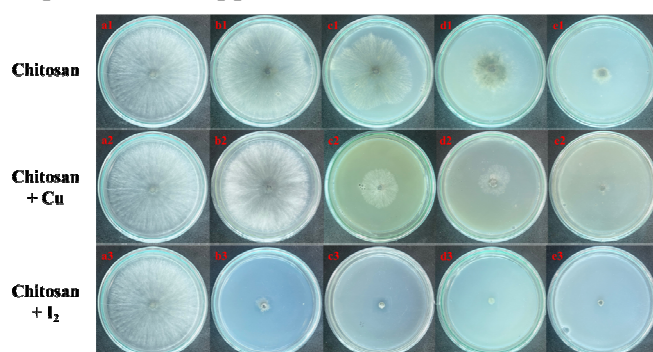
*Ghi chú: a-c. Triệu chứng thối đầu trái bơ của mẫu MauB khi thu thập; d-g. Hình ảnh trái bơ khỏe trước nhiễm bào tử Lasiodiplodia (d); e-g. Triệu chứng thối đầu đen đầu trái bơ ở ngoài và bên trong theo phương nằm ngang và thẳng đứng sau 60 giờ lây nhiễm nhân tạo.*

Nhiều nghiên cứu cho biết, *Lasiodiplodia* là nguyên nhân gây ra triệu chứng thối đầu cuống và thối đen đầu trái bơ ở Ai Cập [20], Kenya [13] Peru [21], Ghana [22] và Trung Quốc [23]. Bệnh khởi phát từ nướu cuống trái, làm đầu trái hơi tóp lại, vùng thịt trái bị bệnh mềm và có màu đen. Bệnh phát triển qua các bó mạch dẫn đến bó

mạch bị hóa nâu tới đen. Khi trái bơ chín, vết bệnh lan ra cả trái và trái bị thối hoàn toàn. Triệu chứng này tương tự như trên các mẫu bơ bị thối đen đầu cuống trái trong nghiên cứu này.

### 3.3. Khả năng ức chế, diệt trừ nấm bệnh của các vật liệu chitosan

Kết quả thử nghiệm khả năng ức chế, diệt trừ nấm bệnh của chitosan riêng lẻ (CTS), hoặc phức CTS + Cu, phức CTS +  $I_2$  với nồng độ từ 500 - 2.000 ppm trên môi trường PDA cho thấy, cả 3 loại vật liệu này đều có khả năng ức chế sự phát triển hệ sợi *L. theobromae*. trong đó CTS +  $I_2$  có khả năng ức chế tốt nhất, tiếp đến là CTS + Cu và thấp nhất là CTS ở cùng nồng độ thí nghiệm và trong cùng loại vật liệu, khả năng ức chế nấm bệnh cao nhất khi sử dụng nồng độ 2.000 ppm và thấp nhất là 500 ppm (Hình 4).



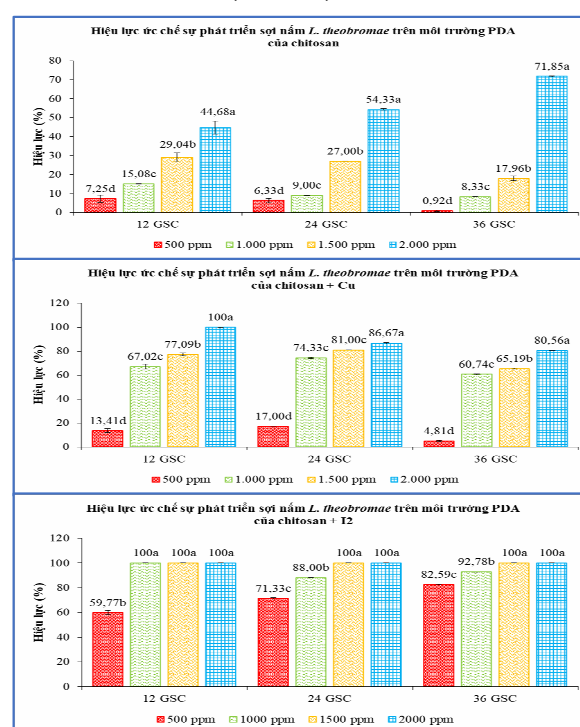
Hình 4. Đường kính tản nấm *L. theobromae* trên môi trường PDA với các nồng độ vật liệu chitosan khác nhau

Ghi chú: a1-3. Tản nấm *L. theobromae* trên PDA ở nghiệm thức đối chứng; b1-3, c1-3, d1-3 và e1-3. Tản nấm tương ứng của nghiệm thức sử dụng nồng độ 500, 1.000, 1.500, 2.000 ppm.

CTS có khả năng ức chế sự phát triển của hệ sợi mầm bệnh *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata* và *Pythium aphanidermatum* [24] do CTS đã gây độc trực tiếp đến nhân tế bào nấm [25]. Phức CTS + Cu với khả năng hoạt động của các ion Cu dẫn đến sự phá vỡ vách tế bào của nấm, từ đó cho hiệu quả ức chế nấm bệnh tốt hơn so với CTS hoặc muối kim loại tự do [26].  $I_2$  có khả năng ức chế nấm bệnh ngay cả khi ở nồng độ thấp do có  $I_2$  làm thay đổi các nucleotides, axit béo, các nhóm

cysteine và methionine của các protein trong nhân tế bào [27]. Điều này giải thích cho kết quả phức CTS +  $I_2$  có khả năng ức chế sự phát triển hệ sợi *L. theobromae* tốt hơn CTS + Cu và CTS trong nghiên cứu này.

Hiệu lực ức chế sự phát triển hệ sợi *L. theobromae* của CTS +  $I_2$  ở các nồng độ thí nghiệm cao hơn rất nhiều so với CTS + Cu và CTS, trong đó CTS +  $I_2$  ở nồng độ 1.500 ppm có khả năng ức chế 100% sự phát triển của nấm *L. theobromae* sau 36 giờ cấy nấm. Trong khi đó, hiệu lực ức chế của CTS + Cu cao nhất chỉ ở mức 81% và CTS là 27% (Hình 5).



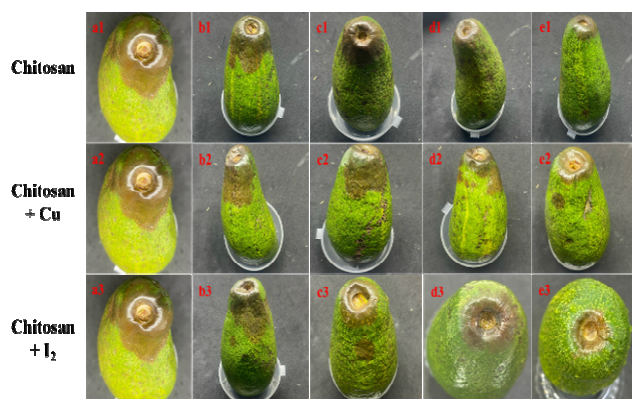
Hình 5. Hiệu lực ức chế, diệt trừ nấm *L. theobromae* của các vật liệu chitosan thí nghiệm.

Ghi chú: GSC là giờ sau cấy thạch *L. theobromae*; giá trị trên đỉnh mỗi cột là trung bình  $\pm$  sai số chuẩn (SE); ở mỗi thời điểm theo dõi, các giá trị của mỗi cột theo sau bởi cùng ký tự khác biệt không có ý nghĩa thống kê qua trắc nghiệm LSD ở mức ý nghĩa 99%.

Kết quả thử nghiệm hiệu lực ức chế, diệt trừ nấm bệnh trên trái bơ của các vật liệu chitosan (Hình 6) cho thấy, phức CTS +  $I_2$  thể hiện khả năng kiểm soát tốt hơn các vật liệu CTS khác ở

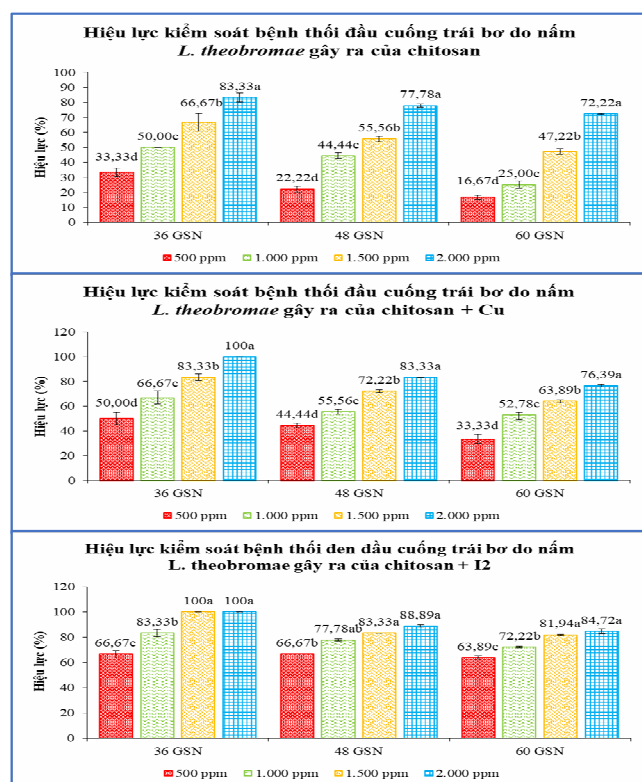


cùng nồng độ thí nghiệm. Ở nồng độ 2.000 ppm, CTS + I<sub>2</sub> đã kiểm soát bệnh thối đầu trái bơ tốt hơn so với chính nó ở các mức nồng độ thấp hơn.



**Hình 6. Hình ảnh bệnh thối đen đầu trái bơ ở các nghiệm thức xử lý vật liệu chitosan khác nhau sau 60 giờ lây nhiễm nhân tạo**

*Ghi chú: a1-3. Trái bơ ở nghiệm thức đối chứng; b1-3, c1-3, d1-3 và e1-3. Trái bơ ở nghiệm thức nhiễm 500, 1.000, 1.500 và 2.000 ppm.*



**Hình 7. Hiệu lực kiểm soát bệnh thối đen đầu trái bơ do *L. theobromae* gây ra của các vật liệu chitosan thí nghiệm**

*Ghi chú: GSN. Giờ sau lây nhiễm; giá trị trên đỉnh mỗi cột là trung bình ± sai số chuẩn*

(SE); ở mỗi thời điểm theo dõi, các giá trị của mỗi cột theo sau bởi cùng ký tự khác biệt không có ý nghĩa thống kê qua trắc nghiệm LSD ở mức ý nghĩa 99%.

Ở các nghiệm thức áo trái bơ với CTS + I<sub>2</sub> có hiệu lực phòng trừ bệnh thối đen đầu quả bơ cao hơn so với các nghiệm thức áo với CTS + Cu và CTS ở cùng thời điểm và nồng độ. Trong đó, phức CTS + I<sub>2</sub> ở nồng độ 1.500 ppm có hiệu lực phòng trừ bệnh tương đương với nồng độ 2.000 ppm ở các thời điểm theo dõi và cao hơn rất rõ ràng so với ở các nghiệm thức xử lý bằng phức CTS + Cu và CTS ở cùng nồng độ và trong cùng thời điểm theo dõi (Hình 7).

Nhiều nghiên cứu trên thế giới đã chứng minh, áo trái cây sau thu hoạch bằng CTS làm giảm tổn thất khối lượng và gia tăng chất lượng cho trái cây tươi. CTS đã tác động đến trái cây theo 3 cơ chế: (a) CTS làm gia tăng cơ chế kích kháng của trái cây để chống lại sự tấn công của mầm bệnh, cơ chế này chiếm 30 - 40% hiệu lực sinh học của CTS; (b) CTS ức chế trực tiếp nấm bệnh, cơ chế này chiếm 35 - 45% và (c) CTS tạo ra lớp màng bảo vệ trái cây, cơ chế này chiếm 20 - 30% [28].

Nghiên cứu của Wang và cs (2005) [26] cho thấy, CTS tạo phức với kim loại Cu làm tăng hoạt tính kháng nấm cao hơn so với chính nó. Trong khi đó, I<sub>2</sub> có tính diệt nấm rất mạnh thông qua cơ chế xâm nhập qua vách tế bào và liên kết với các thành phần proteins, axit béo,... dẫn đến tế bào bị tiêu diệt. Do đó, phức CTS + I<sub>2</sub> làm gia tăng mạnh mẽ tính diệt nấm hơn CTS đơn và phức CTS + Cu [29].

Ở các nghiệm thức áo trái bơ với CTS + I<sub>2</sub>, hiệu lực phòng trừ bệnh thối đen đầu quả bơ cao hơn so với các nghiệm thức áo với CTS + Cu và CTS ở cùng thời điểm và nồng độ, trong đó phức CTS + I<sub>2</sub> ở nồng độ 1.500 ppm có hiệu lực phòng trừ bệnh tương đương với nồng độ 2.000 ppm ở các thời điểm theo dõi và cao hơn có ý nghĩa so với ở các nghiệm thức xử lý bằng phức CTS + Cu và CTS ở cùng nồng độ và trong cùng thời điểm theo dõi.

Như vậy, có thể xác định CTS + I<sub>2</sub> có khả năng ức chế và kiểm soát tốt nấm *L. theobromae* gây bệnh thối đen đầu trái bơ ở nồng độ sử dụng 1.500 ppm.

#### **4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ**

##### **4.1. Kết luận**

Nấm *Lasiodiplodia theobromae* là tác nhân gây bệnh thối đen đầu trái bơ với triệu chứng điển hình là phần vỏ ở đầu cuống trái bị nâu đen với rìa vết bệnh gồ ghề, các mạch dẫn bị hóa nâu đen, thịt trái bị mềm và có màu nâu.

Sử dụng phức chitosan I<sub>2</sub> với nồng độ 1.500 ppm có thể kiểm soát được nấm bệnh *Lasiodiplodia theobromae*, hiệu lực đạt 100% đối với nấm bệnh nuôi cấy trên môi trường PDA và đạt 81,94% đối bệnh thối đen đầu trái bơ khi lây nhiễm nhân tạo.

##### **4.2. Kiến nghị**

Mầm bệnh *Lasiodiplodia theobromae* thường xâm nhiễm và nội sinh trong cuống trái bơ ngay từ trên vườn. Do đó, để nâng cao hiệu quả kiểm soát bệnh này sau thu hoạch, cần nghiên cứu khả năng kiểm soát bệnh của chitosan I<sub>2</sub> ở điều kiện sản xuất.

#### **LỜI CẢM ƠN**

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Trường Đại học Công nghệ thành phố Hồ Chí Minh theo mã số đề tài 2024.09.KHCN.

#### **TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Karoney, E., Molelekoa, T., Bill, M., Siyoum, N. & Korsten, L (2024). Global research network analysis of fresh produce post-harvest technology: Innovative trends for loss reduction. *Postharvest Biology and Technology*, 208, 1 - 11.
2. Yahia, E. M., Fonseca, J. M. & Kitinoja, L (2019). Postharvest losses and waste. *Postharvest technology of perishable horticultural commodities*, 43 - 69.
3. Hailu, G. & Derbew, B (2015). Extent, causes and reduction strategies of postharvest losses of fresh fruits and vegetables-A review.

*Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*, 5(5), 49 - 64.

4. Abebe, A., Kuma, B. & Zemedu, L (2022). Assessment of postharvest loss of Avocado at producer level (case of Wolaita and Kembata Tembaro zones). *Journal of Agriculture and Crops*, 8(4), 364 - 374.

5. Geremu, M. A., Welelaw, E., Tamirat, S. & Kidane, B (2022). Associated fungal pathogens and causes of postharvest losses in the avocado value chain in Hossana town market, Ethiopia. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development*, 22(6), 20646 - 20667.

6. Galsurker, O., Diskin, S., Maurer, D., Feygenberg, O. & Alkan, N (2018). Fruit stem-end rot. *Horticulturae*, 4 (50), 1 - 16.

7. Herrera-González, J. A., Bautista-Baños, S., Serrano, M., Romanazzi, G. & Gutiérrez-Martínez, P (2021). Non-chemical treatments for the pre-and post-harvest elicitation of defense mechanisms in the fungi-avocado pathosystem. *Molecules*, 26 (6819), 1 - 12.

8. Jiang, X., Lin, H., Lin, M., Chen, Y., Wang, H., Lin, Y., Shi, J. & Lin, Y (2018). A novel chitosan formulation treatment induces disease resistance of harvested litchi fruit to *Peronophythora litchii* in association with ROS metabolism. *Food Chemistry*, 266, 299 - 308.

9. Jiang, X., Lin, H., Shi, J., Neethirajan, S., Lin, Y., Chen, Y., Wang, H. & Lin, Y (2018). Effects of a novel chitosan formulation treatment on quality attributes and storage behavior of harvested litchi fruit. *Food Chemistry*, 252, 134 - 141.

10. Man, D. L., & Phong, N. V (2017). Effect of chitosan concentration and dipping time in acid-chitosan coating solution on quality of “Tieu da bo” longan fruits during cold storage. (in English). *Journal of Van Hien University*, 2, 128 - 140.

11. Phillips, A., Alves, A., Abdollahzadeh, J., Slippers, B., Wingfield, M. J., Groenewald, J. &

- Crous, P. W (2013). The Botryosphaeriaceae: Genera and species known from culture. *Studies in mycology*, 76(1), 51 - 67.
12. Aidoo, A., Dawood, A., Asamoah, J., Appiah-Kubi, Z., Ohene-Mensah, G., Agbetiamah, D., Frimpong, F., Lamptey, J., Kwodane, M. & Kaba, C (2024). *In vitro* efficacy of three potential bioagents against *Lasiodiplodia theobromae*, causal agent of postharvest fruit deterioration of avocado. *Journal of Horticultural Research*, 32(1), 25 - 32.
13. Wanjiku, E., Waceke, J., Wanjala, B. & Mbaka, J (2020). Identification and pathogenicity of fungal pathogens associated with stem end rots of avocado fruits in Kenya. *International Journal of Microbiology*, 2020, 1 - 8.
14. Sathiyabama, M. & Muthukumar, S (2020). Chitosan guar nanoparticle preparation and its *in vitro* antimicrobial activity towards phytopathogens of rice. *International Journal of Biological Macromolecules*, 153, 297 - 304.
15. Abbott W. S (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 18(2), 265 - 267.
16. Valencia, A. L., Gil, P. M., Latorre, B. A. & Rosales, I. M (2019). Characterization and pathogenicity of Botryosphaeriaceae species obtained from avocado trees with branch canker and dieback and from avocado fruit with stem end rot in Chile. *Plant Disease*, 103(5), 996 - 1005.
17. Li, Q.-L., Guo, T.-X., Pan, Z.-B., Huang, S.-P., Mo, J.-Y., Ning, P. & Hsiang, T. (2013). An outbreak of gummosis of mango trees caused by *Lasiodiplodia theobromae* in Guangxi, South China. *Plant Disease*, 97(5), 690 - 690.
18. Guarnaccia, V., Vitale, A., Cirvilleri, G., Aiello, D., Susca, A., Epifani, F., Perrone, G. & Polizzi, G (2016). Characterisation and pathogenicity of fungal species associated with branch cankers and stem-end rot of avocado in Italy. *European Journal of Plant Pathology*, 146, 963 - 976.
19. Madhupani, Y. & Adikaram, N (2017). Delayed incidence of stem-end rot and enhanced defences in *Aureobasidium pullulans*-treated avocado (*Persea americana* Mill.) fruit. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 124, 227 - 234.
20. Radwan, M. & Hassan, M (2016). Control of *Lasiodiplodia theobromae* on avocado in Egypt. *Menoufia Journal of Plant Protection*, 1(3), 173 - 188.
21. Melo, A. K. L. & Apaza-Tapia, W. E (2021). Distribution of stem-end rot on the canopy in 'Hass' avocado trees in two coastal areas in Peru. *Peruvian Journal of Agronomy*, 5(2), 60 - 70.
22. Aidoo, A. K., Dawood, A., Asamoah, J. F., Appiah-Kubi, Z., Ohene-Mensah, G., Agbetiamah, D., Frimpong, F., Lamptey, J. N., Kwodane, M. & Kaba, C. K (2024). Efficacy of three Potential bioagents against, causal agent of post-harvest fruit deterioration of Avocado. *Journal of Horticultural Research*, 32(1), 25 - 32.
23. Xu, L., Lan, X., Chen, Y., He, R., Wang, M., Zhang, Y., Liang, X. & Yang, Y (2024). Identity, pathogenicity and genetic diversity of *Lasiodiplodia* associated with stem-end rot of avocado in China. *Plant Disease*, 108(9), 2630 - 2644.
24. Leuba, J. & Stossel, P (1986). Chitosan and other polyamines: Antifungal activity and interaction with biological membranes. *In Chitin in nature and technology*. Springer, 215 - 222.
25. El Hassni, M., El Hadrami, A., Daayf, F., Barka, E. A. & El Hadrami, I (2004). Chitosan, antifungal product against *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* and elicitor of defence reactions in date palm roots. *Phytopathologia Mediterranea*, 43(2), 195 - 204.
26. Wang, X., Du, Y., Fan, L., Liu, H., & Hu, Y. (2005). Chitosan-metal complexes as antimicrobial agent: Synthesis, characterization,

and Structure-activity study. *Polymer Bulletin*, 55, 105 - 113.

27. McDonnell, G. & Russell, A. D (1999). Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. *Clinical microbiology reviews*, 12(1), 147 - 179.

28. Romanazzi, G., Feliziani, E. & Sivakumar, D (2018). Chitosan, a biopolymer with triple action on postharvest decay of fruit

and vegetables: Eliciting, antimicrobial and film-forming properties. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1 - 9.

29. Vasyukova, N., Chalenko, G., Gerasimova, N., Perekhod, E., Ozeretskovskaya, O., Il'ina, A., Varlamov, V. & Albulov, A. (2000). Chitin and chitosan derivatives as elicitors of potato resistance to late blight. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 36, 372 - 376.

## **DETERMINATION OF PATHOGEN CAUSES AVOCADO STEM-END BLACK ROT AND ANTIFUNGAL ACTIVITY OF CHITOSAN MATERIAL TO CONTROL DISEASE**

**Ha Thi My Ngan<sup>1</sup>, Nguyen Thanh Luan<sup>1</sup>, Nguyen Loc An<sup>2</sup>, Chu Trung Kien<sup>2\*</sup>**

<sup>1</sup>*Hutech University*

<sup>2</sup>*Institute of Agricultural sciences for Southern Vietnam*

### **Abstract**

Avocado stem-end black rot is one of the main causes of post-harvest losses of avocado fruit globally. The study was conducted to identify the cause of avocado stem-end black rot and using chitosan materials to control the pathogen in laboratory conditions. The research content includes isolation, identification, artificial infection of fungal pathogen and evaluation of the inhibitory and fungicidal effects of different chitosan materials. The research results identified the *Lasiodiplodia theobromae* as the agent causes post-harvest avocado stem-end black rot with typical symptoms of irregular dark brown discoloration, browning of xylem and phloem tissues, and softening of internal tissues. The chitosan-I<sub>2</sub> complex with a concentration of 1.500 ppm has the ability to inhibit the growth of *L. theobromae* with an effectiveness of 100% when the pathogenic fungus cultured on PDA medium and 81.94% when avocado fruit artificially infected.

**Keywords:** *Avocado fruit, chitosan materials, effectiveness, Lasiodiplodia theobromae, stem-end black rot.*

**Ngày nhận bài:** 6/12/2024

**Ngày gửi phản biện:** 5/2/2025

**Ngày thông qua phản biện:** 27/4/2025

**Ngày duyệt đăng:** 11/5/2025