

DOI:10.22144/ctu.jvn.2021.014

KHẢO SÁT HOẠT TÍNH KHÁNG NẤM GÂY BỆNH THỐI TRÁI CỦA TINH DẦU QUẾ (*Cinnamomum verum*)

Thái Bảo¹ và Đỗ Tấn Khang^{2*}

¹Học viên Cao học, Ngành Vi sinh vật học, Khóa 27, Trường Đại học Cần Thơ

²Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Đỗ Tấn Khang (email: dtkhang@ctu.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 03/08/2020

Ngày nhận bài sửa: 21/11/2020

Ngày duyệt đăng: 27/02/2021

Title:

Evaluating inhibitory activity of cinnamon essential oil (*Cinnamomum verum*) on fruit-rotting fungi

Từ khóa:

Cinnamomum verum, kháng nấm, nấm gây thối trái, tinh dầu quế

Keywords:

Antifungal, cinnamon essential oil, *Cinnamomum verum*, fungi causing fruit rot

ABSTRACT

This study was conducted to assess the inhibitory activity of cinnamon essential oil (*Cinnamomum verum*) on rotten pathogenic moulds isolated from strawberries, papaya, plums, and mangoes. Fungal strains were isolated on PDA and identified through colonial morphology, mycelia, spores, and ITS sequence. The antifungal activity of cinnamon essential oil was observed by agar disk diffusion method and dilution microbroth. The results revealed that four pathogenic fungi causing fruit rot include two fungal strains of *Fusarium* sp., one strain of *Lasiodiplodia* sp., and a strain of *Diaporthe* sp. Cinnamon essential oil completely inhibited the growth of mycelium of four fungal strains at the concentration of 0.4 μ L/mL by diffusing the essential oil in agar and completely prevent the germination of spores two strain *Fusarium* sp. by the dilution microbroth method. The MIC of essential oil with four isolated by diffusion method is 0.3 - 0.4 μ L/mL and by dilution microbroth method is 0.4 μ L/mL for TB1 and 0.2 μ L/mL for the TB2. The MFC of essential oils is 0.3 - 0.6 μ L/mL.

TÓM TẮT

Nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu đánh giá hoạt tính ức chế của tinh dầu quế (*Cinnamomum verum*) đối với các dòng nấm mốc gây thối được phân lập từ trái dâu tây, đu đủ, mận và xoài. Các dòng nấm được phân lập trên môi trường PDA, định danh thông qua hình thái khuẩn lạc, sợi nấm, bào tử và trình tự ITS. Hoạt tính kháng nấm của tinh dầu quế được đánh giá bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch và phương pháp vi lỏng. Kết quả cho thấy bốn dòng nấm mốc gây thối trái bao gồm hai dòng nấm *Fusarium* sp., một dòng nấm *Lasiodiplodia* sp. và một dòng nấm *Diaporthe* sp. Tinh dầu quế ức chế hoàn toàn sự tăng sinh sợi nấm của bốn dòng nấm ở nồng độ 0,4 μ L/mL bằng phương pháp khuếch tán môi trường thạch và ngăn chặn hoàn toàn bào tử nấm này mầm của hai dòng *Fusarium* sp. bằng phương pháp vi lỏng với cùng nồng độ. Giá trị MIC của tinh dầu đối với 4 dòng nấm bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch là 0,3 - 0,4 μ L/mL và bằng phương pháp vi lỏng là 0,4 μ L/mL với dòng TB1 và 0,2 μ L/mL với dòng TB2. Giá trị MFC của tinh dầu là 0,3 - 0,6 μ L/mL đối với các dòng nấm thông qua phương pháp khuếch tán đĩa thạch và bằng phương pháp vi lỏng là 0,2 - 0,4 μ L/mL.

1. GIỚI THIỆU

Việt Nam là nước có nền nông nghiệp phát triển trong đó sản xuất cây ăn quả đang có những bước phát triển đáng kể. Theo thống kê của Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn (2016), nước ta có khoảng 863.000 ha trồng cây ăn trái các loại, trong đó các tỉnh, thành phía Nam chiếm trên dưới 50% khoảng 466.700 ha, riêng khu vực Đồng bằng sông Cửu Long có 288.500 ha là vùng chiếm diện tích lớn và là vựa trái cây lớn của cả nước, tuy nhiên, sản phẩm trái cây được tiêu thụ ở dạng tươi là chủ yếu ở tại địa phương và trong nước. Do trái cây có độ pH thấp, độ ẩm và chất dinh dưỡng cao rất dễ bị tấn công bởi nấm gây bệnh thối trái làm cho trái cây không sử dụng được và không thể bảo quản được lâu (Tripathi *et al.*, 2008). Nấm mốc làm thối rữa các sản phẩm nông nghiệp là các loại hoa quả, điển hình như: *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.*, *Monilinia spp.*... không chỉ gây thối trái trong quá trình bảo quản sau thu hoạch mà nấm mốc còn sản xuất các độc tố như mycotoxin, aflatoxin... gây bệnh cho người và động vật sử dụng (Chalutz and Wilson, 1990; Leong *et al.*, 2004).

Hiện nay các biện pháp chủ yếu để kiểm soát sự phát triển, sinh tổng hợp độc tố và gây hư hỏng thực phẩm do nấm mốc được sử dụng là phương pháp vật lý, sinh học và hóa học. Tuy nhiên, việc phòng chống các loại nấm mốc gây hại chủ yếu là sử dụng các chất kháng nấm hóa học hoặc tổng hợp. Việc sử dụng quá nhiều các chất kháng nấm hóa học sẽ dẫn đến việc kháng thuốc của một số loại nấm, gây độc với con người và các loài sinh vật khác, làm ô nhiễm môi trường (Paster and Barkai, 2008; Raja, 2014). Từ đó, cần tìm một giải pháp mới an toàn, thân thiện với môi trường để giải quyết vấn đề nấm gây bệnh.

Trong những năm gần đây, việc sử dụng các hợp chất thiên nhiên đặc biệt được quan tâm. Một số nước đã dùng hợp chất được chiết xuất từ quế, đinh hương, cỏ xạ hương,... dùng xử lý nông sản trước khi bảo quản cũng có tác dụng ức chế quá trình phát triển của nấm mốc và độc tố của nấm (Fратиanni *et al.*, 2010). Một loạt các chất chiết xuất từ thực vật và các chất chuyển hóa thứ cấp như tinh dầu, tannin, alkaloids và flavonoid đã được báo cáo là có hoạt động chống lại một loạt các loại nấm *in vitro* (Simić *et al.*, 2004; Wilson *et al.*, 1999). Trong đó, tinh dầu là chất được sử dụng rộng rãi và lâu đời, một số lượng lớn các loại tinh dầu và thành phần của tinh dầu đã được nghiên cứu về đặc tính chống lại một số nấm.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Tinh dầu quế (*Cinnamomum verum*) được cung cấp từ Trung tâm Bảo tồn Giống dược liệu Hòa An, xã Xuân Hòa, huyện Kế Sách, tỉnh Sóc Trăng. Mẫu trái cây (dâu tây, đu đủ, mận và xoài) bị thối được thu trên địa bàn Thành phố Cần Thơ. Các thí nghiệm được tiến hành tại Phòng thí nghiệm Sinh học phân tử, Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Phân lập và định danh các dòng nấm gây thối trái

Mẫu trái thu về sau khi làm sạch bề mặt và được tiến hành phân lập nấm trên môi trường PDA và được ủ trong 48 - 72 giờ ở trong bóng tối nhiệt độ $28^{\circ}\text{C} \pm 2$. Kiểm tra bằng quan sát mắt thường và kính hiển vi về độ đồng nhất màu sắc và bề mặt khuẩn lạc nấm, hình dạng khuẩn ty.

Sau khi phân lập, các mẫu nấm được quan sát bằng mắt thường và kính hiển vi (Klich, 2002; Nguyễn Lê Anh Đào, 2012) về hình dạng tán nấm, hình dạng khuẩn ty, màu sắc khuẩn ty, màu sắc bào tử, hình dạng bào tử để tiến hành nhận diện sơ bộ. Nấm được nuôi cấy trên môi trường PDA trong 3 ngày ở điều kiện nhiệt độ phòng. Sau đó, thu to nấm và ly trích DNA theo Trần Nhân Dũng và *ctv.* (2012). Các mẫu nấm được khuếch đại với cặp mồi ITS1 và ITS4 (tác giả). Trình tự của ITS1 (mũi xuôi): 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'; ITS4 (mũi ngược): 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'. Sản phẩm PCR của các dòng nấm được giải trình tự theo phương pháp Sanger, sau đó so sánh trình tự thu được với trình tự trên ngân hàng gene NCBI để so sánh trình tự bộ gene và định danh nấm phân lập.

2.2.2. Xác định hoạt tính kháng nấm của tinh dầu quế bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch

Đánh giá hoạt tính kháng nấm của tinh dầu quế được thực hiện bằng phương pháp khuếch tán trong môi trường thạch theo mô tả của Euloge *et al.* (2012). Nồng độ tinh dầu trong môi trường (0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 và 0,6 $\mu\text{L}/\text{mL}$) đã được điều chỉnh bằng cách thêm lượng tinh dầu *C. verum* thích hợp được điều chỉnh bằng 0,5% (v/v) Tween 80 vào môi trường PDA nóng chảy (45°C), lắc đều để phân tán tinh dầu trong môi trường, tiến hành chia môi trường vào các đĩa Petri vô trùng (đường kính 80 mm). Các khoanh nấm (đường kính 5 mm) được cắt từ vùng rìa đang phát triển của đĩa nấm thuần đang

nuôi cấy (sau 3 ngày) được chuyển vào trung tâm của đĩa Petri chứa môi trường có tinh dầu, các đĩa đối chứng (không có tinh dầu) được cấy theo cùng một quy trình. Sau đó các đĩa nấm được ủ ở bóng tối, nhiệt độ 28°C ± 2. Thí nghiệm lặp lại 3 lần. Đường kính khuẩn lạc nấm được đo sau 6 giờ/lần, kéo dài đến 120 giờ. Tỷ lệ phần trăm sự ức chế tăng trưởng sợi nấm bằng tinh dầu được tính theo công thức của Philippe *et al.* (2012):

$$\text{Ức chế tăng trưởng sợi nấm (\%)} = \frac{dc-dt}{dc} \times 100$$

Trong đó:

dc: đường kính của khuẩn lạc mẫu đối chứng

dt: đường kính của khuẩn lạc trong mẫu chứa tinh dầu.

Nồng độ diệt nấm tối thiểu (MFC) của tinh dầu được xác định bằng cách cấy các đĩa nấm bị ức chế bởi tinh dầu không có sự sinh trưởng, phát triển khuẩn ty vào môi trường PDA (glucose 20g/L, khoai tây 200g/L, agar 20g/L, pH = 7). Quan sát sự phát triển, sinh trưởng của các mẫu nấm sau khi ủ 72 giờ ở nhiệt độ 28°C ± 2. Nồng độ diệt nấm tối thiểu được xác định là nồng độ thấp nhất của tinh dầu mà tại nồng độ đó không có sự tăng trưởng xảy ra trên các đĩa sau khi cấy.

2.2.3. Xác định hoạt tính kháng nấm của tinh dầu quế bằng phương pháp vi lỏng và mật độ quang (OD)

Thí nghiệm đánh giá khả năng kháng nấm bằng tinh dầu được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên bằng các mẫu nấm gây thối trái được phân lập (Gakuubi *et al.*, 2017). Chuẩn bị huyền phù bào tử nấm bằng cách cấy nấm trên môi trường PDA và ủ ở nhiệt độ phòng từ 5 -7 ngày để nấm sinh bào tử. Cho dung dịch 0,85% NaCl vào ngập bề mặt nấm và khuấy nhẹ sau đó lọc dung dịch để thu nhận bào tử nấm và đếm mật số bào tử bằng buồng đếm hồng cầu và pha loãng về mật số 10⁵ bào tử/mL. Chuẩn bị môi trường nuôi lỏng: cho vào mỗi ống nghiệm 3,75 mL môi trường CZB (saccharose 30 g/L, sodium nitrate 3 g/L,

dipotassium phosphate 1 g/L, magnesium sulphate 0,5 g/L, potassium chloride 0,5 g/L, Ferrous sulphate 0,01 g/L) và được khử trùng ở 121°C, 1 atm trong 25 phút. Thêm vào ống nghiệm 0,75 mL tinh dầu được điều chỉnh bằng dung dịch Tween 80 nồng độ 0,5% (v/v) để nồng độ tinh dầu trong môi trường lần lượt 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 và 1,0 µL/mL. Các ống đối chứng âm lần lượt được cho 0,75 mL Tween 80 nồng độ 0,5%; 0,75 mL nước cất và đối chứng dương thêm 0,75 mL acid gallic 500 µg/mL (Seo *et al.*, 2013). Sau đó, chủng 3 mL dung dịch huyền phù bào tử nấm vào các ống nghiệm chứa môi trường đã được chuẩn bị và lắc ở nhiệt độ 28°C. Giá trị quang được thu bằng cách hút 1000 µL dung dịch ở mỗi bình đem đo OD ở bước sóng λ = 405 nm bằng máy đo quang phổ UV-Vis Evolution (Thermo, Mỹ) sau 12 giờ lắc (Rongai *et al.*, 2012). Đo lần lượt dung dịch sau 12 giờ/lần và kéo dài trong 72 giờ. Mỗi lần đo lặp lại 3 lần.

Sau 72 giờ lắc, rút khoảng 50 µL dịch nuôi cấy từ các ống nghiệm nuôi lỏng bào tử nấm và trải lên đĩa môi trường PDA và được ủ ở nhiệt độ 28°C ± 2 trong 3 ngày. Giá trị MFC được xác định là nồng độ tinh dầu thấp nhất cho thấy không có sự tăng trưởng hoặc ít hơn ba khuẩn lạc nấm (hoạt động tiêu diệt khoảng 99% đến 99,5%) khi cấy trên môi trường đĩa thạch.

2.2.4. Xử lý số liệu

Các số liệu được phân tích ANOVA bằng phần mềm Minitab 16, các giá trị trung bình được kiểm định bằng phép thử Tukey ở mức ý nghĩa 95%.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập và định danh các dòng nấm gây thối trái

Từ bốn mẫu trái cây bị thối, tiến hành phân lập được bốn dòng nấm mốc trên môi trường PDA. Sau ba ngày ủ, các đặc điểm về hình thái bên ngoài của các mẫu nấm được ghi nhận trong Bảng 1 và Bảng 2.

Bảng 1. Đặc điểm đại thể của khuẩn lạc nấm mốc trên môi trường PDA sau ba ngày

Tên dòng nấm	Mẫu trái	Hình dạng	Đặc điểm bề mặt	Màu sắc	Đường kính (mm)
TB1	Dâu tây	Tròn	Tơ nấm mọc dày, phân rìa tơ nấm mọc xoắn, có các vòng đồng tâm, khó thấm nước	Màu trắng, tím nhạt	29 – 32
TB2	Đu đủ	Tròn	Tơ nấm mịn, mọc xốp, nhô cao	Màu trắng, vàng cam	28 – 32
TB3	Mận	Tròn	Khuẩn ty mịn, mọc dày và nhô cao	Màu trắng	80 – 85
TB4	Xoài	Không đều	Khuẩn ty mọc lan	Màu trắng	45 – 50

Theo quan sát hình thái đại thể và vi thể dưới kính hiển vi của dòng nấm TB1 và TB2 phân lập từ mẫu dâu tây và đu đủ phát triển trên môi trường PDA sau ba ngày, tần nấm phát triển hình dạng tròn có đường kính khoảng 30 mm, hệ sợi nấm có vách ngăn, dạng sợi đa bào và tạo ra bào tử dài, có vách ngăn, hình liềm, thân cong, hai đầu thuôn nhọn (Hình 1 và Hình 2). Kết hợp với kết quả giải trình tự vùng ITS và so sánh với trình tự của các dòng nấm trong cơ sở dữ liệu Genebank của NCBI bằng công cụ Blast có độ tương đồng cao nhất là trên 98% đối với dòng TB1 và 91,75% đối với dòng nấm TB2 với

các trình tự của các loài nấm thuộc chi *Fusarium*. Theo Summerell *et al.* (2003) và Hafizi *et al.* (2013) từ các kết quả về hình thái của bào tử, sợi nấm và tần nấm cũng như kết quả giải trình tự có sự tương đồng cao, có thể kết luận được dòng nấm TB1 và TB2 là *Fusarium sp.* Mehmood *et al.* (2017) đã báo cáo xác định mầm bệnh gây thối trái dâu tây ở Pakistan là *Fusarium solani* thông qua hình thái và sinh học phân tử. Zakaria *et al.* (2012) đã công bố *Fusarium semitectum* và *F. solani* là nguyên nhân chính gây nên thối trái đu đủ ở Malaysia.

Bảng 2. Đặc điểm vi thể của nấm mốc trên môi trường PDA sau ba ngày

Tên dòng	Khuẩn ty	Hình dạng bào tử
TB1	Phân nhánh, có vách ngăn	Bào tử có vách ngăn, hình liềm
TB2	Phân nhánh, có vách ngăn	Bào tử vách ngăn, lưỡi liềm
TB3	Phân nhánh, có vách ngăn	Bào tử hình tròn hoặc hình trứng, có vỏ dày, có vách ngăn
TB4	Phân nhánh, có vách ngăn	Bào tử hình oval

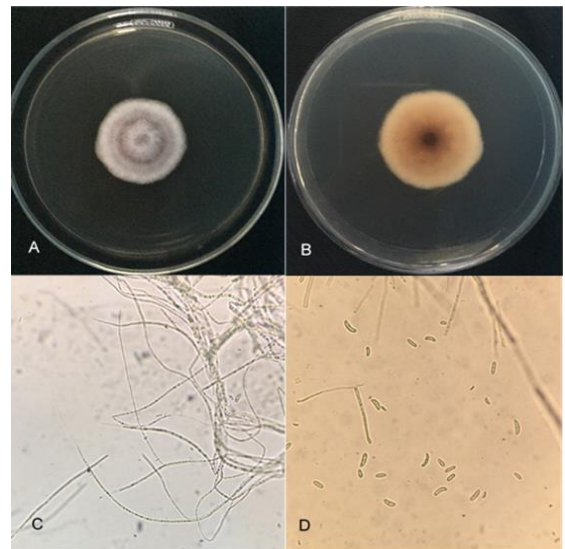


Hình 1. Hình dạng của dòng nấm TB1

(A: mặt trên khuẩn lạc, B: mặt dưới khuẩn lạc, C: khuẩn ty ở vật kính 40X, D: bào tử ở vật kính 40X)

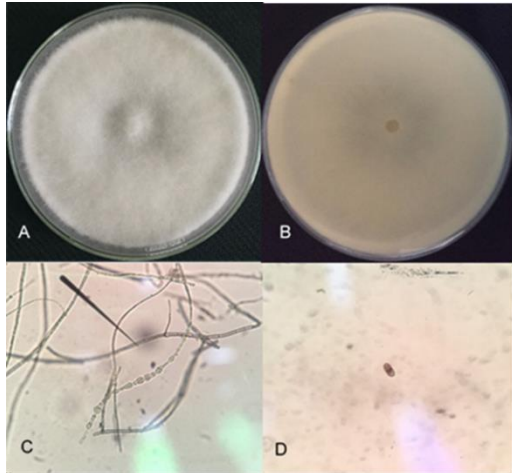
Dòng nấm TB3 được phân lập từ mẫu mận có hệ sợi nấm phát triển rất nhanh, chỉ sau hai ngày nuôi cấy trên môi trường thạch PDA tơ nấm đã tràn khắp đĩa môi trường, không quan sát được hình dạng khuẩn lạc. Sợi nấm ban đầu màu trắng sau khoảng 14 ngày nuôi cấy chuyển sang màu nâu đen, có vách ngăn, phân nhánh. Bào tử của dòng nấm TB3 hình thành rất lâu trong quá trình nuôi cấy (khoảng sau 21 ngày); bào tử ban đầu chưa trưởng thành chưa hình thành vách ngăn còn bào tử trưởng thành có vách dày và có vách ngăn ngang (Hình 3). Kết quả

giải trình tự vùng ITS của TB3 cho thấy có độ tương đồng cao nhất khi so sánh là 97,41% với loài nấm *Lasiodiplodia thebromae* và 97,2% với hai loài *Lasiodiplodia brasiliensis*, *Lasiodiplodia parva* đều thuộc chi *Lasiodiplodia* phù hợp với các đặc điểm hình thái đã quan sát và kết hợp với nghiên cứu về hình thái của Phillips *et al.* (2005) và theo Damm *et al.* (2007), *Lasiodiplodia plurivora* là nguyên nhân gây bệnh thối trái nghiêm trọng đã làm mất sản lượng và chất lượng sau thu hoạch của mận, đào và cây xuân đào ở Nam Phi. Từ đó các kết quả trên có thể xác định dòng nấm TB3 là *Lasiodiplodia sp.*



Hình 2. Hình dạng của dòng nấm TB2

(A: mặt trên khuẩn lạc, B: mặt dưới khuẩn lạc, C: khuẩn ty ở vật kính 40X, D: bào tử ở vật kính 40X)

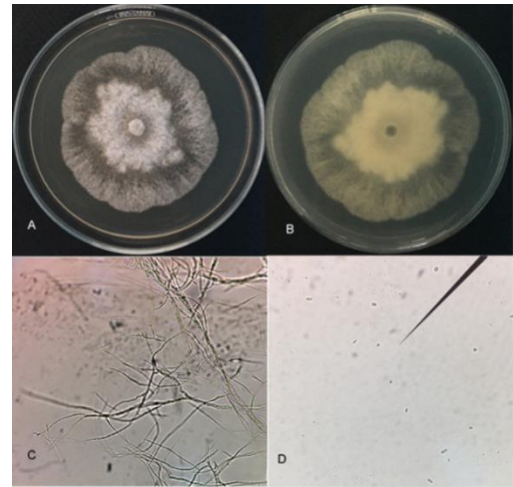


Hình 3. Hình dạng của dòng nấm TB3

(A: mặt trên khuôn lặc, B: mặt dưới khuôn lặc, C: khuẩn ty ở vật kính 40X, D: bào tử ở vật kính 40X)

Dòng nấm TB4 có hình dạng khuôn lặc không đều, khuẩn ty có màu trắng, phần giữa mọc dày hơn, phần bìu mọc phẳng mặt môi trường, tơ nấm ngắn, không mịn, phát triển ra môi trường theo từng lớp tạo nên các khoảng sinh trưởng rõ rệt. Sợi nấm khi quan sát dưới kính hiển vi có vách ngăn, phân nhánh, sợi đa bào và bào tử hình elip đến oval, trong suốt và không có vách ngăn (Hình 4). So sánh trình tự vùng ITS của TB4 cho kết quả tương đồng cao nhất là 95,38% với *Diaporthe* spp. và theo Serrato-

Diaz *et al.* (2014), *Diaporthe pseudomangiferae* là nấm bệnh gây thối trái và hư hại hoa ở xoài nên có thể xác định dòng nấm TB4 là *Diaporthe* sp.



Hình 4. Hình dạng của dòng nấm TB4

(A: mặt trên khuôn lặc, B: mặt dưới khuôn lặc,

C: khuẩn ty ở vật kính 40X, D: bào tử ở vật kính 40X)

3.2. Hoạt tính kháng nấm của tinh dầu quế bằng phương pháp khuếch tán môi trường

Kết quả khảo sát khả năng ức chế sinh trưởng sợi nấm của tinh dầu quế với bốn dòng nấm phân lập sau 48 giờ được ghi nhận kết quả trong Bảng 3.

Bảng 3. Phần trăm ức chế sinh trưởng sợi nấm của tinh dầu quế tại thời điểm 48 giờ

Nồng độ tinh dầu	Phần trăm ức chế sinh trưởng			
	TB1	TB2	TB3	TB4
0,05 µL/mL	-6,67 ± 3,33 ^c	21,86 ± 1,44 ^c	0,00 ± 0,00 ^d	5,34 ± 2,17 ^d
0,1 µL/mL	22,42 ± 2,42 ^b	26,62 ± 3,37 ^c	5,00 ± 0,00 ^d	14,92 ± 2,22 ^c
0,2 µL/mL	25,61 ± 5,86 ^b	46,90 ± 2,84 ^b	20,42 ± 0,42 ^c	67,04 ± 3,45 ^b
0,3 µL/mL	100 ^{a*}	100 ^{a*}	64,58 ± 4,10 ^b	100 ^{a*}
0,4 µL/mL	100 ^a	100 ^a	100 ^{a*}	100 ^a

Giá trị là trung bình ± sai số chuẩn của ba lần lặp lại. Các chữ cái theo sau giống nhau trong cùng một hàng thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê với kiểm định Tukey, mức ý nghĩa 95%.

(-): Phần trăm kích thích tăng trưởng của tinh dầu đối với sinh trưởng của nấm

(*): Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) đối với các dòng nấm

Hoạt tính kháng nấm trên cả bốn dòng nấm cho thấy có đến ba dòng (TB1, TB2 và TB4) ngừng sinh trưởng hoàn toàn ở nồng độ 0,3 µL/mL và ổn định đến hết thời gian khảo sát. Riêng dòng nấm TB3 bị ức chế 64,58% ở nồng độ 0,3 µL/mL, còn ở nồng độ 0,4 µL/mL ức chế hoàn toàn trong 48 giờ. Đặc biệt, ở nồng độ tinh dầu 0,05 µL/mL, nấm TB1 có sự phát triển mạnh và vượt trội với phần trăm tăng trưởng từ 6,67% khi so sánh với nghiệm thức đối chứng và theo Pernak *et al.* (2013), các hoạt chất lỏng chứa

ion như: 2-chloroethyltrimethylammonium và trimethylvinylammonium (2,4-dichlorophenoxy) acetates cho thấy hoạt động ức chế sự phát triển và diệt cỏ rất tốt khi sử dụng 440 g/ha nhưng khi sử dụng hoạt chất trên với nồng độ 0,005 M đến 0,01 M thì lại cho kết quả tăng khả năng sinh trưởng như một chất kích thích, điều hòa sinh trưởng thực vật. Vì vậy, ở nồng độ tinh dầu thấp (0,05 µL/mL) thì có khả năng là chất kích thích cho quá trình tăng trưởng sợi nấm của dòng nấm TB1.

Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của tinh dầu có sự tương đồng giữa dòng nấm TB1 (*Fusarium* sp.), TB2 (*Fusarium* sp.) và TB4 (*Diaporthe* sp.) đều là 0,3 µL/mL. Giá trị MIC này cũng tương đương với MIC là 0,25 µL/mL khi thử nghiệm khả năng kháng nấm của các loại tinh dầu từ cây thuộc họ Lauraceae với các dòng nấm gây bệnh. Còn đối với dòng nấm TB3 (*Lasiodiplodia* sp.), MIC là 0,4 µL/mL, thấp hơn MIC của tinh dầu trầm hương là 2 mg/mL khi đối kháng với nấm *Lasiodiplodia theobromae* (Zhang *et al.*, 2014). Nghiên cứu kháng nấm của tinh dầu quế (*Cinnamomum verum*) đối với dòng nấm mốc *Aspergillus fumigatus* có giá trị MIC từ ≤ 0,04 – 0,31 µL/mL và với một số loài nấm men (*Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. Tropicalis* và *Cryptococcus neoformans*) là 0,31 – 0,63 µL/mL (Jantan *et al.*, 2008). Nồng độ diệt nấm

tối thiểu (MFC) của tinh dầu với các dòng nấm như dòng TB1 có giá trị MFC là 0,3 µL/mL, dòng TB2 là 0,4 µL/mL, dòng TB3 và TB4 là 0,6 µL/mL.

3.3. Hoạt tính kháng nấm của tinh dầu quế bằng phương pháp vi lỏng và mật độ quang (OD)

Do hai dòng nấm TB3 và TB4 là những loài nấm tạo bào tử sau thời gian dài (khoảng 21 ngày) và số lượng bào tử được sinh ra ít nên chỉ hai dòng nấm TB1 và TB2 được sử dụng để tiến hành khảo sát bằng phương pháp nuôi lỏng.

Kết quả khảo sát khả năng ngăn sự nảy mầm của bào tử từ hai dòng nấm TB1 (*Fusarium* sp.) và TB2 (*Fusarium* sp.) của tinh dầu quế bằng phương pháp vi lỏng được đánh giá qua chỉ số mật độ quang ở bước sóng λ = 405 nm (Bảng 4).

Bảng 4. Giá trị mật độ quang (λ = 405 nm) của hai dòng nấm TB1 và TB2

Thí nghiệm	Giá trị mật độ quang phổ (λ=405nm)	
	TB1	TB2
ĐC dương (Gallic acid 500 µg/mL)	0,55 ± 0,04 ^a	0,54 ± 0,01 ^{ab}
ĐC âm (Nước cất khử trùng)	1,19 ± 0,22 ^b	1,55 ± 0,25 ^c
ĐC âm (Tween 80 – 0,5%)	1,05 ± 0,06 ^b	0,81 ± 0,02 ^b
0,1 µL/mL	1,20 ± 0,06 ^b	0,56 ± 0,10 ^{ab}
0,2 µL/mL	1,04 ± 0,07 ^b	0,22 ± 0,00 ^{a*}
0,4 µL/mL	0,32 ± 0,01 ^{a*}	0,22 ± 0,00 ^a
0,6 µL/mL	0,29 ± 0,01 ^a	0,24 ± 0,02 ^a
0,8 µL/mL	0,30 ± 0,02 ^a	0,26 ± 0,02 ^a
1,0 µL/mL	0,34 ± 0,01 ^{abc}	0,23 ± 0,00 ^a

Giá trị là trung bình ± sai số chuẩn của ba lần lặp lại. Các chữ cái theo sau giống nhau trong cùng một hàng thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê với kiểm định Tukey, mức ý nghĩa 95%.

(*): Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) đối với các dòng nấm

Tinh dầu quế có hoạt tính ngăn hoàn toàn bào tử nấm nảy mầm đối với hai dòng nấm TB1 và TB2 ở nồng độ tinh dầu khá thấp: 0,4 µL/mL với bào tử của dòng TB1 và 0,2 µL/mL đối với bào tử của dòng nấm TB2 ở trong suốt khoảng thời gian 72 giờ khảo sát. Tuy nhiên khi có tinh dầu với nồng độ 0,1 µL/mL và 0,2 µL/mL trong môi trường thì đối với dòng TB1 là những chất kích thích, hỗ trợ quá trình nảy mầm và phát triển còn đối với dòng TB2 không có tác dụng mà có tác dụng ức chế. Từ đây có thể thấy dòng nấm TB2 nhạy cảm với tinh dầu quế hơn dòng nấm TB1 trong thí nghiệm môi trường lỏng. Giá trị MIC của hai dòng nấm TB1 và TB2 đối với tinh dầu cũng khác nhau lần lượt là 0,4 µL/mL và 0,2 µL/mL. Kết quả này gần bằng với khảo sát của Simić *et al.* (2004) có giá trị MIC của tinh dầu quế (*Cinnamomum* sp.) là 0,25 µL/mL đối với nấm *Fusarium* spp. và thấp hơn giá trị MIC là 7 - 8 µL/mL khi sử dụng tinh dầu bạch đàn (*Eucalyptus camaldulensis*) trên nấm *Fusarium* spp. (Gakuubi *et*

al., 2017). Còn đối với nồng độ diệt nấm tối thiểu (MFC) của phương pháp vi lỏng đối dòng nấm TB1 và TB2 lần lượt là 0,4 µL/mL và 0,2 µL/mL. Giá trị MIC của tinh dầu các cây thuộc chi quế (*Cinnamomum* spp.) là 0,25 µL/mL đối với nấm *Fusarium* spp. (Simić *et al.*, 2004) và MIC là 7-8 µL/mL khi sử dụng tinh dầu bạch đàn (*Eucalyptus camaldulensis*) trên nấm *Fusarium* spp. (Gakuubi *et al.*, 2017); tinh dầu kinh giới (*Origanum syriacum* L.) có hoạt tính kháng nấm chống lại *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* và *Penicillium* spp. với MIC là 0,1 µL/mL (Castro *et al.*, 1995), tất cả các giá trị MIC của các nghiên cứu này tương đương hoặc cao hơn khi so với kết quả MIC được khảo sát.

Qua kết quả khảo sát hoạt tính kháng nấm của tinh dầu quế với 4 dòng nấm được phân lập, cho thấy tinh dầu có khả năng ức chế sự sinh trưởng sợi nấm và sự nảy mầm của bào tử nấm hiệu quả với nồng độ rất thấp (0,2 – 0,4 µL/mL). Từ đây cho thấy tiềm

năng của việc áp dụng tinh dầu như một loại thuốc chống nấm sinh học rất cao để xử lý các bệnh liên quan với nấm gây bệnh trên trái sầu thu hoạch.

4. KẾT LUẬN

Đề tài phân lập được bốn dòng trong đó hai dòng nấm *Fusarium* sp. (dâu tây, đu đủ), một dòng nấm *Lasiodiplodia* sp. (mận), một dòng nấm *Diaporthe* sp. (xoài) thuần chủng gây hại từ bốn mẫu trái cây thối gồm dâu tây, đu đủ, mận và xoài trên địa bàn Thành phố Cần Thơ.

Qua khảo sát khả năng ức chế tăng trưởng sợi nấm của tinh dầu quế, thu được kết quả tinh dầu quế ức chế hoàn toàn 100% sự tăng trưởng với hai dòng nấm *Fusarium* sp. (TB1 và TB2) và một dòng nấm *Diaporthe* sp. (TB4) ở nồng độ 0,3 µL/mL; với dòng nấm *Lasiodiplodia* sp. (TB3) ở nồng độ 0,4 µL/mL sau 48 giờ. Tinh dầu quế có nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) là 0,3 – 0,4 µL/mL và nồng độ diệt nấm tối thiểu (MFC) là 0,3 – 0,6 µL/mL khi khảo sát với bốn dòng nấm thử nghiệm bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch.

Thử nghiệm hoạt tính ức chế khả năng nảy mầm của bào tử hai dòng nấm *Fusarium* sp. (TB1 và TB2) kết quả thu được tinh dầu quế ức chế hiệu quả khả năng nảy mầm của bào tử thuộc hai dòng nấm *Fusarium* sp. với nồng độ từ 0,4 – 1,0 µL/mL kéo dài trong 72 giờ. Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của tinh dầu quế đối với 2 dòng nấm là 0,4 µL/mL và nồng độ diệt nấm tối thiểu (MFC) được xác định là 0,4 µL/mL bằng phương pháp nuôi cấy vi lồng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn (2016). Báo cáo kết quả thực hiện kế hoạch tháng 12 năm 2016 ngành Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn. https://www.mard.gov.vn/ThongKe/Lists/BaoCaoThongKe/Attachments/120/Baocao_T12_2016.pdf.

Castro, L. M. D. (2014). *Atividade ovicida de Ocimum basilicum em nematódeos gastrintestinais de ovinos* (Master's thesis). Universidade Federal de Pelotas.

Chalutz, E., & Wilson, C. L. (1990). Postharvest biocontrol of green and blue mold and sour rot of citrus fruit by *Debaryomyces hansenii*. *Plant disease*, 74(2), 134-137.

Damm, U., Crous, P. W., & Fourie, P. H. (2007). *Botryosphaeriaceae* as potential pathogens of Prunus species in South Africa, with descriptions of *Diplodia africana* and *Lasiodiplodia plurivora* sp. nov. *Mycologia*, 99(5), 664-680.

Euloge, S. A., Kouton, S., Dahouenon-Ahoussi, E., Sohounhloue, D. C. K., & Soumanou, M. M. (2012). Antifungal activity of *Ocimum canum*

essential oil against toxinogenic fungi isolated from peanut seeds in post-harvest in Benin. *International Research Journal of Biological Sciences*, 1(7), 20-26.

Fратиани, F., De Martino, L., Melone, A., De Feo, V., Coppola, R., & Nazzaro, F. (2010). Preservation of chicken breast meat treated with thyme and balm essential oils. *Journal of food science*, 75(8), 528-535.

Gakuubi, M. M., Maina, A. W., & Wagacha, J. M. (2017). Antifungal activity of essential oil of *Eucalyptus camaldulensis* dehn. against selected *Fusarium* spp. *International journal of microbiology*, 2017.

Hafizi, R., Salleh, B., & Latiffah, Z. (2013). Morphological and molecular characterization of *Fusarium solani* and *F. oxysporum* associated with crown disease of oil palm. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(3), 959-968.

Jantan, I. B., Karim Moharam, B. A., Santhanam, J., & Jamal, J. A. (2008). Correlation between chemical composition and antifungal activity of the essential oils of eight cinnamomum. *Species. Pharmaceutical Biology*, 46(6), 406-412.

Klich, M. A. (2002). Identification of common *Aspergillus* species. The Netherlands.

Leong, S. L., Hocking, A. D., & Pitt, J. I. (2004). Occurrence of fruit rot fungi (*Aspergillus* section *Nigri*) on some drying varieties of irrigated grapes. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 10(1), 83-88.

Mehmood, N., Riaz, A., Jabeen, N., Anwaar, S., Hussain, S. Z., Abbas, M. F., ... & Gleason, M. L. (2017). First report of *Fusarium solani* causing fruit rot of strawberry in Pakistan. *Plant Disease*, 101(9), 1681-1681.

Nguyễn Lê Anh Đào (2012). *Tuyển chọn các dòng nấm mốc Aspergillus spp. có khả năng phân hủy bã mía sau trồng nấm* (Luận văn thạc sĩ). Trường Đại học Cần Thơ.

Paster, N., & Barkai-Golan, R. (2008). Mouldy fruits and vegetables as a source of mycotoxins: part 2. *World Mycotoxin Journal*, 1(4), 385-396.

Pernak, J., Niemczak, M., Materna, K., Marcinkowska, K., & Praczyk, T. (2013). Ionic liquids as herbicides and plant growth regulators. *Tetrahedron*, 69(23), 4665-4669.

Philippe, S., Souaïbou, F., Guy, A., Sébastien, D. T., Boniface, Y., Paulin, A., ... & Dominique, S. (2012). Chemical Composition and Antifungal activity of Essential oil of Fresh leaves of *Ocimum gratissimum* from Benin against six Mycotoxigenic Fungi isolated from traditional cheese wagashi. *Research Journal of Biological Sciences*, 1, 22-27.

- Phillips, A., Alves, A., Correia, A., & Luque, J. (2005). Two new species of *Botryosphaeria* with brown, 1-septate ascospores and *Dothiorella* anamorphs. *Mycologia*, 97(2), 513-529.
- Raja, N. (2014). Botanicals: sources for eco-friendly biopesticides. *Journal of Biofertilizers and Biopesticides*, 5(1), 1.
- Rongai, D., Milano, F., & Sciò, E. (2012). Inhibitory effect of plant extracts on conidial germination of the phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum*.
- Seo, D. J., Lee, H. B., Kim, I. S., Kim, K. Y., Park, R. D., & Jung, W. J. (2013). Antifungal activity of gallic acid purified from *Terminalia nigrovenulosa* bark against *Fusarium solani*. *Microbial pathogenesis*, 56, 8-15.
- Serrato-Diaz, L. M., Rivera-Vargas, L. I., & French-Monar, R. D. (2014). First report of *Diaporthe pseudomangiferae* causing inflorescence rot, rachis canker, and flower abortion of mango. *Plant disease*, 98(7), 1004-1004.
- Simić, A., Soković, M. D., Ristić, M., Grujić-Jovanović, S., Vukojević, J., & Marin, P. D. (2004). The chemical composition of some Lauraceae essential oils and their antifungal activities. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 18(9), 713-717.
- Summerell, B. A., Salleh, B., & Leslie, J. F. (2003). A utilitarian approach to *Fusarium* identification. *Plant disease*, 87(2), 117-128.
- Trần Nhân Dũng, Nguyễn Thị Pha & Đỗ Tấn Khang (2012). *Công nghệ Di truyền*. Nxb. Đại học Cần Thơ.
- Tripathi, P., Dubey, N. K., & Shukla, A. K. (2008). Use of some essential oils as post-harvest botanical fungicides in the management of grey mould of grapes caused by *Botrytis cinerea*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(1), 39-46.
- Wilson, C. L., Solar, J. M., El Ghaouth, A., & Wisniewski, M. E. 1997. Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. *Plant Disease*. 81: 204-210.
- Zakaria, L., Chik, M. W., Heng, K. W., & Salleh, B. (2012). *Fusarium* species associated with fruit rot of banana (*Musa* spp.), papaya (*Carica papaya*) and guava (*Psidium guajava*). *Malaysian Journal of Microbiology*, 8(2), 127-130.
- Zhang, Z., Han, X. M., Wei, J. H., Xue, J., Yang, Y., Liang, L., ... & Gao, Z. H. (2014). Compositions and antifungal activities of essential oils from agarwood of *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg induced by *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon. & Maubl. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 25(1), 20-26.