Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn
pISSN: 2588-1191; eISSN: 2615-9708
Tập 132, Số 3B, 2023, Tr. 31–44, DOI: 10.26459/hueunijard.v132i3B.7070

KHẢ NĂNG KHÁNG NẤM CỦA DỊCH CHIẾT TỪ CÂY LÔ HỘI (*Aloe vera* L.) KẾT HỢP VỚI NANO CHITOSAN ĐỐI VỚI *Aspergillus niger* A2 TRÊN CỦ HÀNH TÍM

Lê Thanh Long[1,*], Lê Đức Tố Uyên[2]

[1] Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế, 102 Phùng Hưng, Huế, Việt Nam
[2] Công ty Derivery K Việt Nam, 241 Xuân Thuỷ, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

* Tác giả liên hệ: Lê Thanh Long <lethanhlong@huaf.edu.vn>
(Ngày nhận bài: 28-12-2022; Ngày chấp nhận đăng: 13-3-2023)

Tóm tắt. Chúng tôi đã nghiên cứu tác dụng của dịch chiết của cây lô hội (*Aloe vera* L.) kết hợp với nano chitosan ở điều kiện *in vitro* và *in vivo* và nhận thấy hỗn hợp dịch chiết này có khả năng kháng nấm *Aspergillus niger* A2 cao hơn so với nano chitosan đơn lẻ. Nồng độ dịch chiết lô hội sử dụng càng cao thì khả năng kháng nấm càng cao. Ở điều kiện *in vitro*, dịch chiết lô hội với nồng độ 10% kết hợp với 0,1% nano chitosan ức chế hoàn toàn sự sinh trưởng của nấm *A. niger* A2 trên môi trường PDA và PDB. Hiệu lực ức chế 50 và 90% đối với đường kính tản nấm và sinh khối khô đạt được tương ứng với các nồng độ dịch chiết lô hội kết hợp với 0,1% nano chitosan là 4,64 và 10,27% trên môi trường PDA và 1,97 và 7,51% trên môi trường PDB. Ở điều kiện *in vivo*, dung dịch 20% dịch chiết lô hội kết hợp với 0,1% nano chitosan có khả năng ức chế 100% sự phát triển của *A. niger* A2 trên củ hành tím sau 15 ngày ở 28 °C. Trong khi, dung dịch 10% dịch chiết lô hội kết hợp với 0,1% nano chitosan có khả năng khống chế đến 89,19% tỷ lệ hư hỏng do bệnh mốc thối đen trên củ hành tím với giá trị MIC_{50} và MIC_{90} tương ứng là 3,19 và 10,64%.

Từ khoá: *Aspergillus niger*, bệnh thối mốc đen, hành tím, dịch chiết lô hội (*Aloe vera* L.), nano chitosan

Antifungal ability of *Aloe vera* L. extract combined with nano chitosan against *Aspergillus niger* A2 in purple onion bulbs

Le Thanh Long[1,*], Le Duc To Uyen[2]

[1] University of Agriculture and Forestry, Hue University, 102 Phung Hung St., Hue, Vietnam
[2] Derivery K, Co., 241 Xuan Thuy St., Cau Giay, Ha Noi, Vietnam

* Correspondence to Le Thanh Long <lethanhlong@huaf.edu.vn >
(Submitted: December 28, 2022; Accepted: March 13, 2023)

Abstract. We examine the antifungal effect of the *Aloe vera* L. extract with nano chitosan on *Aspergillus niger* A2 infecting purple onion bulbs in *in vitro* and *in vivo*. The combination of *Aloe vera* L. extract and 0.1% nano

chitosan exhibits higher inhibition on the fungus than nano chitosan alone. The higher the concentration of *Aloe vera* L. extract in the mixture, the higher the inhibition of the fungi. *In vitro*, the *Aloe vera* L. extract with a concentration of 10% in the mixture completely inhibits the growth of *A. niger* A2 on the PDA and PDB media. The inhibitory effect on the mycelial diameter and dry biomass is 50 and 90% for the 4.64 and 10.27% *Aloe vera* L. extract on the PDA media and 1.97 and 7.51% on the PDB media. *In vivo*, the concentration of 20% *Aloe vera* L. extract completely inhibits the growth of *A. niger* A2 on purple onion bulbs after 15 days at 28 °C. Meanwhile, the concentration of 10% *Aloe vera* L. extract inhibits 89.19% of the decay of purple onion bulbs with MIC_{50} and MIC_{90} at 3.19 and 10.64% *Aloe vera* L. extract.

Keywords: *Aspergillus niger*, black rot disease, purple onion, *Aloe vera* L. extract, nano chitosan

1 Đặt vấn đề

Hành tím (*Allium ascalonicum*) là một trong những loại rau gia vị có giá trị dược liệu và kinh tế cao, nhưng củ hành tím sau thu hoạch chủ yếu được bảo quản bằng phương pháp truyền thống (phơi khô, đựng trong bao lưới thành chùm và bảo quản ở nhiệt độ thường) và chưa hạn chế được hư hỏng do nấm bệnh gây ra. Trong đó, bệnh thối mốc đen (thối củ) do nấm *Aspergillus niger* là bệnh thường gặp và gây tổn thất lớn trên củ hành tím sau thu hoạch [1].

Bệnh thối mốc đen sau thu hoạch thường xâm nhiễm qua phần cổ của củ hành tím hay qua mô bị tổn thương lúc ngọn rụng và phát triển mạnh khi bảo quản ở nhiệt độ trên 25 °C với độ ẩm trên 80%. Để khống chế bệnh thối mốc đen phát triển trên củ hành tím sau thu hoạch, ngoài việc làm sạch bề mặt, hạn chế tổn thương, duy trì nhiệt độ dưới 15 °C và độ ẩm thấp, thì việc xử lý bằng các loại hoá chất diệt nấm như SO_2 và Benomyl thường được áp dụng [2]. Mặc dù việc sử dụng hoá chất rất có hiệu quả và dễ áp dụng, nhưng việc lạm dụng chúng đã gây ra tình trạng ô nhiễm môi trường. Thêm vào đó, yêu cầu ngày càng cao về chất lượng vệ sinh an toàn thực phẩm với các quy định khắt khe về dư lượng thuốc hoá học khiến phương pháp kiểm soát bệnh sau thu hoạch bằng hoá chất không được khuyến khích áp dụng.

Cây lô hội (*Aloe vera* L.) từ lâu đã được nhiều nền văn hoá sử dụng như một loại cây thuốc do đặc tính chữa bệnh. Hiện nay, gel thu được từ các tế bào nhu mô của lá lô hội đang được quan tâm sử dụng trong công nghiệp thực phẩm như là nguồn thực phẩm chức năng ở dạng đồ uống, nước giải khát và kem [3]. Dịch chiết từ lá cây lô hội bằng các dung môi khác nhau chứa nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học như anthraquinone, saponin, sterol, salicylic acid và aloe-emodin đã thể hiện hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm đáng kể [1, 4]. Xử lý trước thu hoạch bằng dịch chiết lá lô hội đã hạn chế hư hỏng do nấm bệnh gây ra trên quả nho sau thu hoạch [3]. Chitosan, một polymer tự nhiên không độc hại, dễ phân huỷ với những hoạt tính sinh học hữu ích trong bảo vệ thực vật như kháng khuẩn và kháng nấm nhưng chỉ hoà tan trong acid tạo dung dịch có

độ nhớt cao nên khả năng ứng dụng còn nhiều hạn chế [5]. Khác với chitosan, chitosan ở dạng nano (nanochitosan) có kích thước nanomet, được tạo ra bằng các phương pháp khác nhau, phân tán tốt trong nước, có diện tích và điện tích bề mặt lớn hơn nên có hoạt tính kháng nấm vượt trội hơn nhiều so với chitosan [6]. Kết quả bước đầu của chúng tôi cho thấy nanochitosan tạo ra bằng phương pháp gel ionic cho hiệu quả đáng kể trong kháng nấm thán thư gây thối quả trên ớt và cà chua [7–9]. Khi kết hợp sóng siêu âm, nanochitosan được tạo ra với kích thước ổn định và có khả năng kháng nấm cao đối với *Aspergillus niger* gây bệnh mốc đen trên hành tăm [10]. Đặc biệt, khi kết hợp với chitosan, dịch chiết từ cây lô hội cũng đã cho hiệu quả đáng kể trong ức chế nhiễm bệnh và kéo dài thời hạn sử dụng của quả dưa chuột [11].

Mặc dù cả nanochitosan và dịch chiết từ lá lô hội có hoạt tính sinh học mạnh và có khả năng kháng nấm và kháng khuẩn, nhưng việc sử dụng nanochitosan kết hợp với dịch chiết từ cây lô hội trong kháng bệnh thối mốc đen trên củ hành tím là khá mới và chưa được công bố. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả khảo sát khả năng kháng nấm *A. niger* gây bệnh thối mốc đen trên củ hành tím sau thu hoạch của dịch chiết từ cây lô hội kết hợp với nanochitosan ở điều kiện *in vitro* và *in vivo*.

2 Vật liệu và phương pháp

2.1 Vật liệu

Củ hành tím được thu thập từ huyện Bình Sơn, tỉnh Quảng Ngãi, có độ đồng nhất về màu sắc, kích thước và độ cứng. Lá lô hội (*Aloe vera* L.) giống bản địa tươi được thu mua từ siêu thị Big C Huế.

Chitosan thương mại đạt chất lượng sử dụng cho thực phẩm do Công ty TNHH Hùng Tiến, Tp. Cần Thơ, cung cấp với độ deacetyl (DD): 85–90%, cặn tro không tan trong HCl: 0,1%.

2.2 Phương pháp

Chuẩn bị chế phẩm nanochitosan

Nanochitosan được điều chế từ chitosan theo phương pháp gel ionic của Lê Thanh Long và cs. [9]. Dung dịch chitosan pha trong acetic acid 0,1% khuấy từ trong hai ngày ở nhiệt độ phòng. Sau khi hoà tan, điều chỉnh pH của dung dịch đến pH = 4 bằng dung dịch NaOH 5 N. Sau đó bổ sung sodium tripolyphostphate (STPP) 0,25% (w/v) pha trong nước khử ion vào dung dịch trên trong điều kiện khuấy từ với tốc độ 1500 vòng/phút ở nhiệt độ phòng, với tỷ lệ chitosan/ STPP là 6:1. Tiếp tục khuấy đến khi thu được hỗn hợp đồng nhất thì kết thúc.

Chuẩn bị dịch chiết lô hội

Lá lô hội tươi với chiều dài khoảng 40 cm, được rửa sạch bằng nước cất và gọt sạch vỏ; sau đó được xay nhuyễn. Tiếp theo, cho dung môi trích ly (ethanol 50%) vào với tỷ lệ nguyên liệu và dung môi là 1:2 (tính theo thể tích). Sau đó, hỗn hợp được đảo trộn trong một phút, lọc lấy dịch trích ly và giữ ở 4 °C để sử dụng.

Phân lập, định danh loài nấm *A. niger* gây bệnh thối mốc đen trên củ hành tím

Môi trường PDA được sử dụng để phân lập nấm mốc từ hành tím. Dựa vào hình thái, màu sắc khuẩn lạc và đặc điểm bào tử khi soi dưới kính hiển vi so với chủng đối chứng, sơ bộ chúng tôi tuyển chọn ra loài nấm mốc nghi ngờ là *A. niger*. Chủng này được định danh ở cấp độ loài bằng phương pháp khuếch đại, giải trình tự gene mã hoá 28S rRNA và tra cứu bằng công cụ BLAST (NCBI).

Ảnh hưởng của dịch chiết lô hội kết hợp với nanochitosan đến sự phát triển của *A. niger* trên môi trường đặc PDA

Sau khi tiệt trùng, môi trường PDA chứa nanochitosan (NC) bổ sung dịch chiết lô hội (LH) với các nồng độ khác nhau được để nguội đến 40–50 °C và tiến hành đổ vào đĩa Petri (đường kính 6 cm) với cùng một thể tích (10 mL). Tản nấm với đường kính 2 mm cắt từ rìa đĩa khuẩn lạc nấm *A. niger* thuần chủng (nuôi bảy ngày ở 28 °C) được đặt vào tâm các đĩa môi trường đã chuẩn bị sẵn và nuôi ở 28 °C. Thí nghiệm (TN) thực hiện với sáu công thức (hai đối chứng (ĐC)): ĐC1 (0% NC + 0% LH), ĐC2 (0,1% NC + 0% LH) và bốn công thức TN (0,1% NC + 2,5% LH; 0,1% NC + 5% LH; 0,1% NC + 10% LH; 0,1% NC + 20% LH). Mỗi công thức là một đĩa và lặp lại ba lần. Theo dõi và đo đường kính tản nấm (ĐKTN) hai ngày/lần.

Hiệu lực ức chế được tính theo tỷ lệ phần trăm ức chế sự phát triển của đường kính tản nấm, PIRG (%) (Percentage Inhibition of Radial Growth). Hiệu lực ức chế tối thiểu 50 và 90% (MIC – Minimum Inhibitory Concentration) được tính theo phương trình tương quan giữa nồng độ dịch chiết LH kết hợp NC và hiệu lực ức chế trong khoảng nồng độ LH khảo sát [12].

Ảnh hưởng của nanochitosan kết hợp với dịch chiết lô hội đến sự phát triển của nấm *A. niger* trên môi trường lỏng PDB

Môi trường PDB chứa NC bổ sung dịch chiết LH với các nồng độ khác nhau sau khi tiệt trùng được cho vào các đĩa Petri (đường kính 6 cm) với cùng một thể tích (4 mL). Cắt miếng nấm có đường kính 2 mm từ mép rìa của khuẩn lạc nấm *A. niger* đặt vào giữa các đĩa Petri. Thí nghiệm được thực hiện với sáu công thức (hai ĐC): ĐC1 (0% NC + 0% LH), ĐC2 (0,1% NC + 0% LH) và

và công thức TN (0,1% NC + 2,5% LH; 0,1% NC + 5% LH; 0,1% NC + 10% LH; 0,1% NC + 20% LH). Mỗi công thức là một đĩa và lặp lại ba lần. Sinh khối khô của sợi nấm được xác định sau khi nuôi ở 28 °C trong bảy ngày bằng cách lọc qua giấy lọc và sấy ở 55 °C sau 24 h. Hiệu lực ức chế, IC (Inhibition Concentration) của chế phẩm lên *A. niger* được tính theo công thức [13]:

IC = [(Sinh khối ở công thức ĐC – Sinh khối ở công thức TN)/Sinh khối ở công thức ĐC] × 100

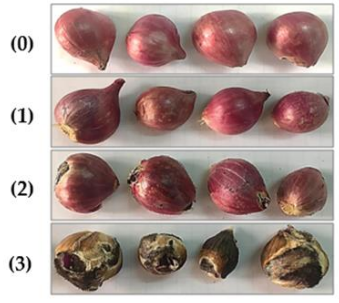
Đánh giá khả năng kháng nấm *A. niger* của dịch chiết lô hội kết hợp với nanochitosan ở điều kiện in vivo

Mẫu củ hành tím sạch bệnh được rửa bằng nước sạch, khử trùng bằng cồn 70% trong 3 min, rửa lại bằng nước cất vô trùng và để khô ở nhiệt độ phòng. Mẫu củ hành tím đã khử trùng được lây bệnh bằng cách nhúng vào huyền phù bào tử *A. niger* với nồng độ 105 bào tử/mL. Để khô tự nhiên trong hai giờ và nhúng vào sáu dung dịch TN trong hai phút gồm: ĐC1 (0% NC + 0% LH), ĐC2 (0,1% NC + 0% LH) và bốn công thức TN (0,1% NC + 2,5% LH; 0,1% NC + 5% LH; 0,1% NC + 10% LH; 0,1% NC + 20% LH), lặp lại ba lần ở mỗi công thức TN. Cho củ hành tím đã lây bệnh và xử lý với NC kết hợp với dịch chiết LH vào đĩa Petri dã lót giấy giữ ẩm vô trùng, bọc bằng túi PE (có đục lỗ) và ủ ở 28 °C. Sau 2–3 ngày, bệnh xuất hiện. Tỷ lệ hư hỏng DI (%) (Decay Index) được xác định ba ngày/lần theo công thức của Zhansheng và cs.[14].

$$DI = (1 \times N_1 + 2 \times N_2 + 3 \times N_3) \times 100/(3 \times N)$$

trong đó N_1, N_2 và N_3 lần lượt là số củ hư hỏng theo mức độ 1, 2 và 3 (mức 1: hư hỏng ¼ củ; mức 2: hư hỏng ¼–½ củ; mức 3: hư hỏng ½–¾ củ); N là tổng số củ (Hình 1).

Hiệu lực ức chế được tính theo phần trăm ức chế hư hỏng do nấm, PIFD (%) (Percentage Inhibition of Fungal Decay); hiệu lực ức chế 50 và 90% (MIC – Minimum Inhibitory Concentration) được tính theo phương trình tương quan giữa nồng độ dịch chiết LH kết hợp NC và hiệu lực ức chế trong khoảng nồng độ khảo sát.



Hình 1. Các mức hư hỏng do thối mốc đen trên hành tím

2.3 Xử lý số liệu

Kết quả TN được phân tích phương sai một nhân tố ANOVA (*Anova single factor*) và so sánh các giá trị trung bình bằng phương pháp DUNCAN (*Duncan's Multiple Range Test*) trên phần mềm thống kê SPSS, phiên bản 20.

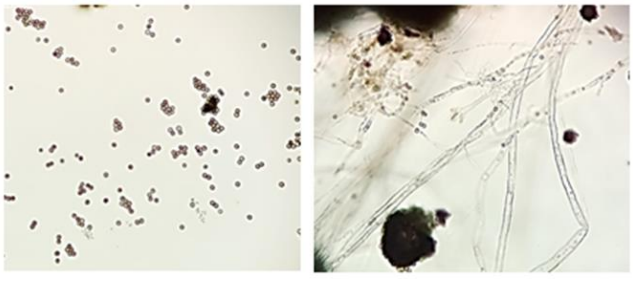
3 Kết quả và thảo luận

3.1 Kết quả phân lập, định danh nấm *A. niger* gây bệnh thối mốc đen trên củ hành tím

Sau bảy ngày ủ, các mẫu củ hành tím có vết bệnh mốc đen điển hình ở 25 °C. Qua phân lập bước đầu, chúng tôi thu được hai chủng nấm và ký hiệu là A1 và A2. So sánh qua quan sát đại thể và vi thể trên môi trường PDA và tế bào trên kính hiển vi, chúng tôi nhận thấy chủng A2 tương đồng cao hơn về hình thái, màu sắc khuẩn lạc cũng như đặc điểm sinh bào tử với nấm *A. niger* theo quan sát của Gautam và Bhadauria [15]. Tản nấm xốp, sợi nấm phân nhánh mỏng dần về phía rìa tản nấm, có màu nâu đen tới đen. Bào tử phân sinh có dạng hình cầu có vách ngăn, dính lại, cành bào tử trong suốt không màu (Hình 2).

Chủng nấm mốc A16 được định danh bằng phương pháp giải trình tự một phần gen mã hoá cho tiểu phần ribosome 28S (28S rRNA). Kết quả tra cứu qua BLAST SEARCH trên ngân hàng dữ liệu gen của NCBI được trình bày trên Hình 3.

Kết quả so sánh trình tự gen rRNA 28S của mẫu nấm A2 bằng chương trình BLAST trên NCBI cho thấy trình tự gen tương đồng 100% với mẫu *A. niger* ATCC16888. Kết quả này cho phép kết luận rằng mẫu nấm A2 là một chủng thuộc loài *A. niger* và được ký hiệu là *A. niger* A2.



Hình 2. Đặc điểm vi thể của chủng nấm A2

AACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGCGGGT
CCTTTGGGCCCAACCTCCCATCCGTGTCTATTGTACCCTGTTGCTTCGGCGGG
CCCGCCGCTTGTCGGCCGCCGGGGGGGCGCCTCTGCCCCCCGGGCCCGTGC
CCGCCGGAGACCCCAACACGAACACTGTCTGAAAGCGTGCAGTCTGAGTTG
ATTGAATGCAATCAGTTAAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCAT
CGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCA
GTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGG
CATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTC
GCCGTCCCCCTCTCCGGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGC
GTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACATGCTCTGTA

Hình 3. Kết quả giải trình tự gen 28S của chủng nấm chủng *A. niger* A2

3.2 Ảnh hưởng của dịch chiết lô hội kết hợp với nanochitosan đến sự sinh trưởng của *A. niger* A2 trên môi trường PDA

Ảnh hưởng của dịch chiết LH kết hợp với NC đến sự phát triển của *A. niger* A2 trên môi trường PDA được trình bày trong Bảng 1.

Kết quả từ Bảng 1 cho thấy dịch chiết LH kết hợp với 0,1% NC ảnh hưởng đáng kể đến sự phát triển của tản nấm *A. niger* A2 ở tất cả các nồng độ khảo sát. So với mẫu không bổ sung 0,1% NC (ĐC1) hoặc có 0,1% NC (ĐC2), đường kính tản nấm giảm dần khi tăng nồng độ dịch chiết LH trong môi trường nuôi cấy. Nấm mới bắt đầu phát triển ở các công thức có bổ sung 2,5 và 5% LH tương ứng sau hơn hai và bốn ngày theo dõi, trong khi ĐKTN ở công thức ĐC2 đã đạt 1,33

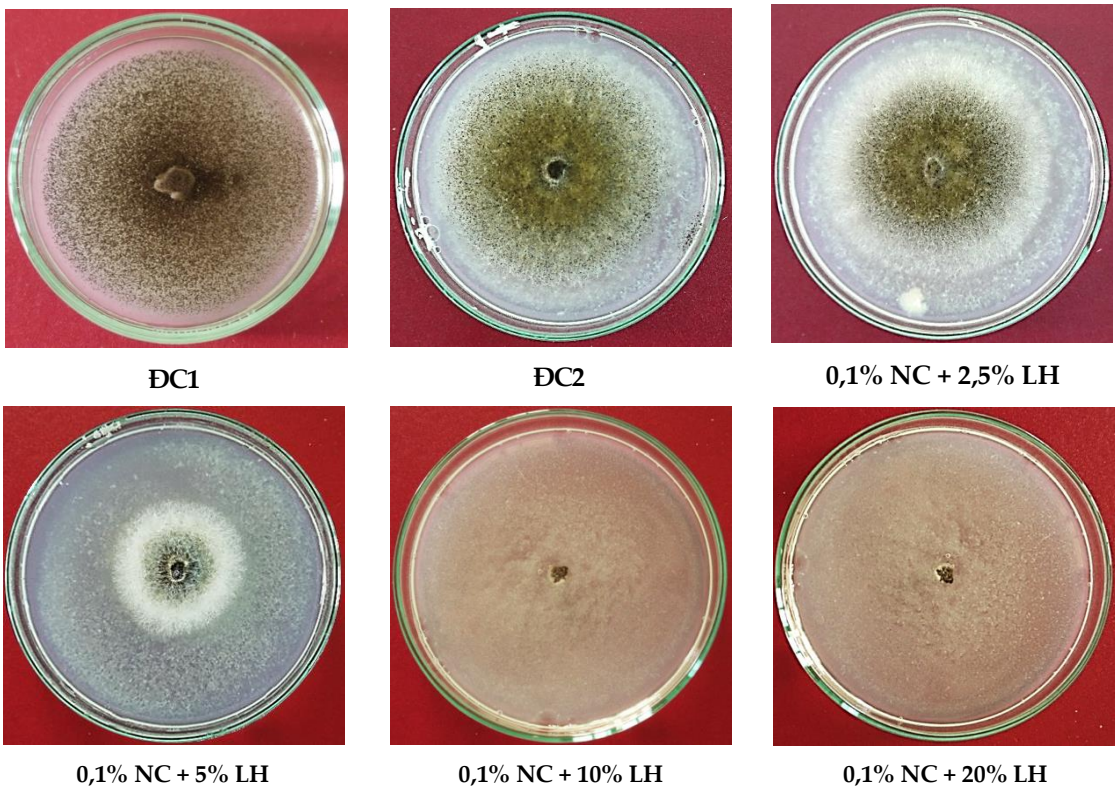
Bảng 1. Ảnh hưởng của dịch chiết lô hội kết hợp nanochitosan đến sự sinh trưởng của *A. niger* A2 trên môi trường PDA

Công thức TN	Đường kính tản nấm (cm)					PIRG (%) 10 ngày
	2 ngày	*4 ngày*	*6 ngày*	*8 ngày*	*10 ngày*	
ĐC1	2,47^{a}	3,71^{a}	5,08^{a}	6,02^{a}	7,11^{a}	0
ĐC2	1,33^{b}	2,94^{b}	4,55^{b}	4,95^{b}	6,41^{b}	9,85
0,1% NC + 2,5% LH	0,93^{c}	2,71^{b}	4,25^{b}	4,39^{c}	6,03^{c}	15,19
0,1% NC + 5% LH	0^{d}	1,45^{c}	2,42^{c}	3,21^{d}	3,80^{d}	46,55
0,1% NC + 10% LH	0^{d}	0^{d}	0^{d}	0^{e}	0^{e}	100
0,1% NC + 20% LH	0^{d}	0^{d}	0^{d}	0^{e}	0^{e}	100

Ghi chú: Các giá trị trung bình đường kính tản nấm theo cột có cùng chữ cái là không sai khác ở mức ý nghĩa $p < 0,05$.

và 2,94 cm. Sau 10 ngày, ĐKTN từ 7,11 cm (ĐC1) và 6,41 cm (ĐC2) giảm xuống còn 3,8 cm (ở công thức 5% LH kết hợp 0,1% NC), nấm bị ức chế hoàn toàn ở công thức có bổ sung 10% LH (Hình 4).

Hiệu lực ức chế sự phát triển của nấm *A. niger* A2 tăng theo chiều tăng nồng độ LH khi kết hợp với 0,1% NC. Hiệu lực ức chế cao nhất là ở nồng độ 10% LH và thấp nhất ở nồng độ 2,5% LH tương ứng với giá trị PIRG là 100 và 15,19%. Nồng độ LH khi kết hợp với 0,1% NC ức chế tối thiểu 50% (MIC_{50}) và 90% (MIC_{90}) sự phát triển nấm *A. niger* A2 trong môi trường PDA tương ứng là 4,64 và 10,27% ($y = -0,39 \times x^2 + 12,91 \times x - 1,43$; $R^2 = 0,94$).



Hình 4. Nấm *A. niger* A2 sau 10 ngày nuôi cấy trên môi trường PDA ở các nồng độ dịch chiết lô hội khác nhau kết hợp với nanochitosan ở 28 °C

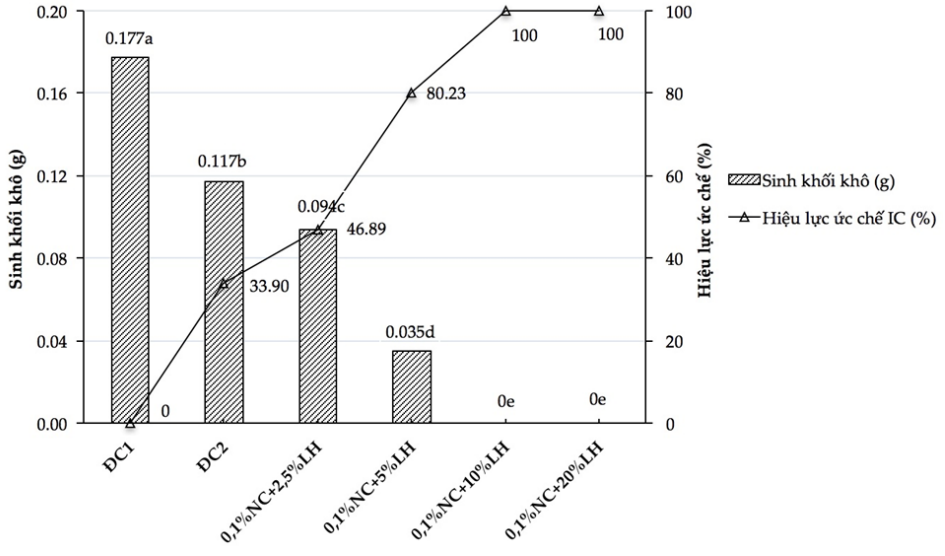
3.3 Ảnh hưởng của dịch chiết lô hội kết hợp với nanochitosan đến phát triển sinh khối của *A. niger* A2 trên môi trường PDB

Ảnh hưởng của dịch chiết LH kết hợp với 0,1% NC đến sự phát triển của A. *niger* A2 sau bảy ngày nuôi cấy trong môi trường PDB được trình bày trên Hình 5.

Kết quả khảo sát cho thấy việc bổ sung dịch chiết LH kết hợp với 0,1% NC vào môi trường nuôi cấy lỏng PDB gây ức chế rõ rệt đến sự phát triển của sợi nấm A. *niger* A2 và tác dụng mạnh hơn so với môi trường nuôi cấy đặc (PDA). Sau bảy ngày nuôi, khối lượng sinh khối khô giảm (hiệu lực ức chế (IC) tăng) khi tăng nồng độ dịch chiết LH bổ sung trong môi trường, giảm gần một nửa ở công thức 2,5% LH và hơn năm lần ở công thức 5% LH so với công thức ĐC1. Nấm A. *niger* A2 bị ức chế hoàn toàn trong môi trường PDB có bổ sung 10% LH kết hợp 0,1% NC, hiệu lực ức chế là 100%. Nồng độ LH khi kết hợp 0,1% NC ức chế tối thiểu 50% (IC_{50}) và 90% (IC_{90}) sự phát triển nấm *A. niger* A2 trong môi trường PDB tương ứng là 1,97 và 7,51% ($y = -0,33 \times x^2 + 10,35 \times x + 30,96$; $R^2 = 0,96$).

3.4 Ảnh hưởng của dịch chiết lô hội kết hợp với nanochitosan đến tỷ lệ hư hỏng của củ hành tím do *A. niger* A2 trong điều kiện *in vivo*

Khả năng ức chế nấm *A. niger* A2 gây bệnh thối mốc đen của dịch chiết LH kết hợp với 0,1% NC trên củ hành tím được thể hiện thông qua tỷ lệ hư hỏng (DI) (Bảng 2). Kết quả cho thấy



Hình 5. Ảnh hưởng của dịch chiết lô hội kết hợp nanochitosan đến sinh khối nấm *A. niger* A2 sau bảy ngày nuôi cấy trên môi trường PDB ở 28 °C

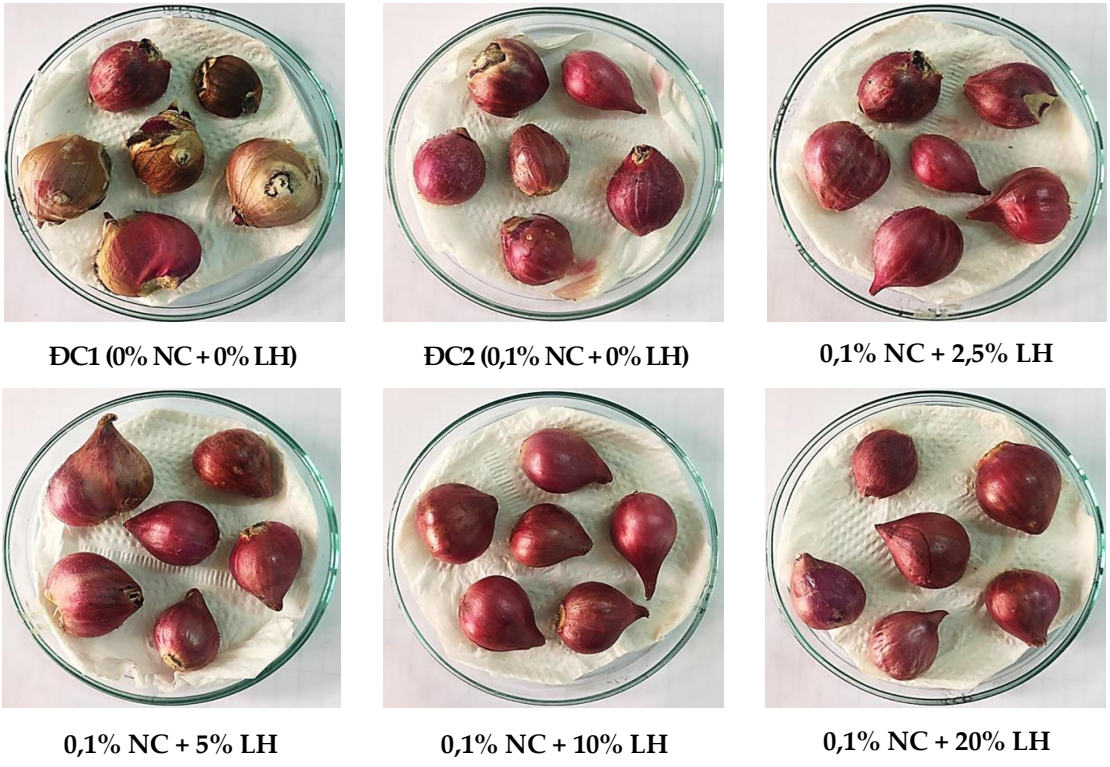
Bảng 2. Ảnh hưởng của dịch chiết lô hội kết hợp với nanochitosan đến tỷ lệ hư hỏng của củ hành tím do *A. niger* A2 trong điều kiện *in vivo*

Công thức TN	Tỷ lệ hư hỏng, DI (%)					PIFD (%) 15 ngày
	3 ngày	*6 ngày*	*9 ngày*	*12 ngày*	*15 ngày*	
ĐC1 (0% NC + 0% LH)	11,11[a]	33,33[a]	51,85[a]	62,97[a]	68,52[a]	0
ĐC2 (0,1% NC + 0% LH)	7,41[b]	14,82[b]	24,07[b]	37,03[b]	48,15[b]	29,73
0,1% NC + 2,5% LH	5,56[b]	12,97[b]	20,37[b]	31,48[c]	45,59[b]	33,46
0,1% NC + 5% LH	1,85[c]	7,41[c]	12,96[c]	20,37[d]	22,22[c]	67,57
0,1% NC + 10% LH	0[c]	0[d]	0[d]	5,56[e]	7,41[d]	89,19
0,1% NC + 20% LH	0[c]	0[d]	0[d]	0[f]	0[e]	100

Ghi chú: Các giá trị trung bình DI theo cột có cùng chữ cái là không sai khác ở mức ý nghĩa $p < 0,05$.

tỷ lệ hư hỏng bằng lây nhiễm nhân tạo trên củ hành tím chịu ảnh hưởng đáng kể của xử lý tạo màng bằng dung dịch LH kết hợp với NC ở các nồng độ khác nhau. Tỷ lệ hư hỏng do nấm *A. niger* A2 trên củ hành tím giảm dần theo chiều tăng của nồng độ LH trong dịch xử lý. Sau 15 ngày quan sát, tỷ lệ hư hỏng ở mẫu ĐC1 là 68,52%, cao gấp 9,25 lần so với công thức 10% LH. Trong khi đó, bệnh không xuất hiện ở nồng độ xử lý 20% LH kết hợp với 0,1% NC (Hình 6). Giá trị MIC_{50} và MIC_{90} tương ứng là 3,19 và 10,64% ($y = -0,26 \times x^2 + 8,96 \times x + 24,12$; $R^2 = 0,95$).

Hiệu quả ức chế của chitosan với cấu trúc nano được tạo ra bằng phương pháp gel ionic đến sự sinh trưởng và phát triển sinh khối của nấm gây bệnh thán thư sau thu hoạch ở điều kiện *in vitro* trên chuối, thanh long và đu đủ đã được công bố [6]. Trên môi trường nhân tạo PDA và PDB, chế phẩm NC được tạo ra bằng phương pháp tạo gel ionic của chúng tôi cũng đã thể hiện hiệu quả rõ rệt trong kháng nấm *Collectotrichum gloeosporiodes* gây bệnh thán thư trên ớt [7], *Collectotrichum acutatum* gây bệnh thán thư trên cà chua [9] và *Fusarium solani* gây thối quả cà chua [8]. Các nghiên cứu trên cho thấy NC đều có tác dụng ức chế phát triển đáng kể các đối tượng nấm bệnh khác nhau trong khoảng nồng độ 0,2–0,8%. Trên đối tượng *A. niger* gây bệnh thối mốc đen ở hành tăm, NC được tạo ra bằng phương pháp gel ionic với tương tác của sóng siêu âm có kích thước và trạng thái nano ổn định cho hiệu quả ức chế phát triển hoàn toàn ở ngưỡng nồng độ 0,2–0,4%. Đồng thời, trong môi trường PDB, do tác nhân ức chế phân tán và tiếp xúc dễ dàng hơn với nấm nên hiệu lực ức chế cao hơn trong môi trường đặc (PDA) [10]. Tác dụng của NC đến các loại nấm bệnh chủ yếu theo cơ chế tương tác trực tiếp của các nhóm NH_3^+ có trong cấu trúc chitosan lên bề mặt màng tế bào nấm có trong cấu trúc chitosan lên bề mặt màng tế bào nấm (hình thành các phức polyelectrolyte giữa chitosan với nhóm mang điện tích âm trên bề mặt tế bào) gây rò rỉ, thay đổi vật bên trong tế bào (tính thấm thay đổi, co rút nguyên sinh chất). Bên



Hình 6. Ảnh hưởng của dịch chiết lô hội kết hợp nanochitosan đến sự phát triển bệnh thối đen do *A. niger* A2 trên củ hành tím sau 15 ngày bảo quản ở 28 °C

cạnh đó, chitosan có thể gây tổn thương trực tiếp màng tế bào, ảnh hưởng đến tính toàn vẹn của tế bào gây ức chế phát triển nấm [16, 17, 6].

Hoạt tính kháng nấm của dịch chiết từ lá LH ở điều kiện *in vitro* đã được một số tác giả công bố. Chế phẩm từ dịch chiết CH có tác dụng ức chế khác nhau đến sự phát triển nấm bệnh *Botrytis gladiolorum*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli*, *Heterosporium pruneti* và *Penicillium gladioli* trong môi trường đặc Czapek [18], *Penicillium digitatum* và *Botrytis cinerea* ở môi trường PDA [3] và *A. niger* và *Candida albicans* ở môi trường đặc Sabouraud (SDA) [4]. Những khác biệt về khả năng kháng nấm của dịch chiết từ lá LH có thể là do thành phần và hoạt tính của một số hoạt chất có tính kháng nấm trực tiếp và gián tiếp như anthraquinone, saponin, salicylic acid, acemannan và aloe-emodin, có trong dịch chiết phụ thuộc vào phương pháp chiết xuất, loại dung môi và loài LH được sử dụng [19]. Như vậy, với khả năng phân tán tốt của NC trong các môi trường khác nhau, kết quả TN kháng nấm *A. niger* A2 của chúng tôi bằng chế phẩm dịch chiết LH kết hợp với NC thu được ở điều kiện *in vitro* hoàn toàn tương đồng với các nghiên cứu khả năng kháng nấm riêng rẽ của các tác giả đã công bố ở trên.

Ở điều kiện *in vivo*, khả năng kháng các loại nấm bệnh khác nhau duy trì chất lượng rau quả sau thu hoạch của nanochitosan và dịch chiết LH cũng đã được khảo sát [3, 10, 6]. Với đặc tính tạo màng cao trên bề mặt rau quả, dịch chiết LH khi kết hợp với chitosan không chỉ tạo ra một lớp màng bán thấm, có tác dụng điều hoà trao đổi khí và hơi nước, làm chậm quá trình chín mà còn ức chế phát triển nấm bệnh trên rau quả, giúp kéo dài thời gian bảo quản [11]. Kết quả nghiên cứu chứng tỏ xử lý tạo màng bằng dịch chiết LH kết hợp với NC có tác dụng ức chế rõ rệt lên sự phát triển bệnh thối mốc đen do nấm *A. niger* A2 trên củ hành tím thông qua tỷ lệ hư hỏng do nhiễm nấm bệnh. Tuy nhiên, khác với sự sinh trưởng và phát triển bệnh do nấm được lây nhân tạo từ các vết tổn thương trên một số loại quả, tác dụng ức chế phát triển bào tử nấm *A. niger* A2 trên bề mặt củ hành tím ở điều kiện *in vivo* của dịch chiết LH kết hợp với NC yếu hơn so với ở điều kiện *in vitro*. Hiệu quả kháng nấm của dịch chiết LH kết hợp với NC ở điều kiện *in vivo* có thể tác dụng trực tiếp lên bề mặt tế bào nấm của NC hay tác dụng ức chế phát triển của một số thành phần có tính kháng nấm trong dịch chiết LH. Bên cạnh đó, NC còn có tác dụng như một chất kích kháng ngoại bào, tạo ra sức đề kháng ở vật chủ (củ hành tím) bằng cơ chế kích thích tăng cường sinh tổng hợp một số enzyme phòng vệ như chitinase, β-1,3-glucanase và phenylalanine ammonia-lyase (PAL) [20]. Tuy vậy, do tiếp xúc với môi trường dinh dưỡng tối thích ở củ hành tím sau thu hoạch khi lây bệnh nhân tạo, nấm *A. niger* A2 phát triển nhanh hơn trên bề mặt củ, tác dụng ức chế của dịch chiết LH kết hợp NC kém hơn so với điều kiện *in vitro* có thể được lý giải.

4 Kết luận

Những kết quả đạt được trong nghiên cứu này cho thấy dịch chiết lô hội kết hợp với nanochitosan đóng vai trò như là một chất ức chế hiệu quả nấm bệnh thối mốc đen trên củ hành tím sau thu hoạch. Dịch chiết lô hội với nồng độ 20 và 10% kết hợp với 0,1% nanochitosan có khả năng ức chế hoàn toàn sự phát triển của nấm *A. niger* A2 tương ứng với điều kiện *in vitro* và *in vivo*. Có thể hạn chế 50% tỷ lệ hư hỏng do nhiễm bệnh trên củ hành tím sau thu hoạch trong trường hợp bị mốc đen xâm nhập khi xử lý củ hành tím với dịch chiết 3,19% lô hội kết hợp với 0,1% nanochitosan.

Tài liệu tham khảo

1. Brewster, J. B. (2008), Onions and other vegetable alliums, 2nd edition, *Crop Production Science in Horticulture 15*, CABI Publishing.
2. Rabinowitch, H. D., Currah, L. (2002), *Allium crop science: recent advances*, CABI Publishing.

3. Castillo, S., Navarro, D. D., Zapata, P. J., Guillén, F., Valero, D., Serrano, M., Martínez-Romero, D. (2010), Antifungal efficacy of Aloe vera in vitro and its use as a preharvest treatment to maintain postharvest table grape quality, *Postharvest Biology and Technology*, 57, 183–188.

4. Saniasiaya, J., Salim, R., Irfan, M. I., Harun, A. (2017), Antifungal effect of Malaysian Aloe vera leaf extract on selected fungal species of pathogenic otomycosis species in in vitro culture medium, *Oman Medical Journal*, 32(1), 41–46.

5. Badawy, M. E. I., Rabea, E. I. (2011), A biopolymer chitosan and Its derivatives as promising antimicrobial agents against plant pathogens and their applications in crop protection, *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, 1–29.

6. Zahid, N., Ali, A., Manickam, S., Siddiqui, Y., Maqbool, M. (2012), Potential of chitosan-loaded nanoemulsions to control different Colletotrichum spp. and maintain quality of tropical fruits during cold storage, *Journal of Applied Microbiology*, 113, 925–939.

7. Nguyễn Cao Cường, Lê Thanh Long, Nguyễn Thị Thuỷ Tiên, Trần Bích Lam (2014), Nghiên cứu ứng dụng nanochitosan trong phòng trừ bệnh thán thư hại ớt sau thu hoạch, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ, ĐH Bách Khoa HCM*, 52(5C), 222–228.

8. Nguyễn Thị Thuỷ Tiên, Lê Thanh Long, Nguyễn Hiền Trang, Trần Thị Thu Hà, Nguyễn Cao Cường (2017), Khả năng kháng nấm Fusarium solani gây thối quả cà chua sau thu hoạch của nanochitosan, *Tạp chí Nông nghiệp & Phát triển Nông thôn*, 3 + 4, 65–72.

9. Lê Thanh Long, Nguyễn Thị Nga, Nguyễn Cao Cường, Trần Ngọc Khiêm, Nguyễn Thị Thuỷ Tiên (2015), Khả năng ức chế của nanochitosan đối với Colletotrichum acutatum L2 gây hại quả cà chua sau thu hoạch, *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, Học viện Nông nghiệp VN, 13(8), 1481–1487.

10. Lê Thanh Long, Nguyễn Thị Kim Uyên, Nguyễn Thị Thuỷ Tiên, Lê Đại Vương (2019), Khả năng kháng nấm Aspergillus niger N2 trên hành tăm sau thu hoạch của nanochitosan được tạo ra bằng phương pháp gel ionic kết hợp sóng siêu âm, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp*, 3(2), 1349–1359.

11. Adetunji, C. O., Fadiji, A. E., Aboyeji, O. O. (2014), Effect of chitosan coating combined Aloe vera gel on cucumber (Cucumis sativa L.) post-harvest quality during ambient storage, *Journal of Emerging Trends in Engineering and Applied Sciences*, 5(6), 391–397.

12. Chookhongkha, N., Sopondilok, T., Photchanachai, S. (2013), Effect of chitosan and chitosan nanoparticles on fungal growth and chilli seed quality, *International Society for Horticultural Science*, Acta Horticulturae, 973, 231–238.

13. Al-Hetar, M. Y., Abidin, M. A. Z., Sariah, M., Wong, M. Y. (2011), Antifungal activity of chitosan against Fusarium oxysporum f. sp. Cubense, *Journal of Applied Polymer Science,* (120), 2434–2439.

14. Zhansheng, D., Shiping, T., Yousheng, W., Boqiang, L., Yong, X. (2006), Physiological response of loquat fruit to different storage conditions and its storability, *Postharvest Biology and Technology*, 41(2), 143–150.

15. Gautam, A. K., Bhadauria, R. (2012), Characterization of Aspergillus associated with commercially stored triphala powder, *African Journal of Biotechnology*, 11(104), 16814–16823.

16. Hernández, L. A., Valle, M. G., Guerra-Sánchez, M. G. (2011), Current status of action mode and effect of chitosan against phytopathogens fungi, *Microbiology Research*, 5 (25), 4243–4247.

17. Lê Thanh Long, Nguyễn Cao Cường, Nguyễn Thụ Đan Huyền (2016), Ảnh hưởng của nanochitosan đến nấm E. ampelina T2 gây bệnh thán thư trên nho sau thu hoạch ở điều kiện in vitro, *Tạp chí Khoa học Đại học Huế, Kỹ thuật và Công nghệ*, 121(7), 77–87.

18. Rosca-Casian, O., Parvu, M., Vlase, L., Tamas, M. (2007), *Antifungal activity of Aloe vera leaves*, Fitoterapia, 78, 219–222.

19. Qasem, J., Aau-Blan, H. A. (1996), Fungicidal activity of some common weed extracts against different plant pathogenic fungi, *Journal of Phytopathology*, 144(3), 157–161.

20. Asgar, A., Mahmud, T. M., Yasmeen, S. (2012), Control of anthracnose by chitosan through stimulation of defence-related enzymes in Eksotika II papaya (Carica papaya L.) fruit, *Journal of Biology and Life Science*, 3 (1), 1–12.