

# HOẠT TÍNH KHÁNG NẤM *Lasiodiplodia pseudotheobromae* GÂY BỆNH ĐỐM ĐEN TRÊN XOÀI CÁT HÒA LỘC CỦA CHITOSAN CẮT MẠCH BỨC XẠ

Nguyễn Thị Dung\*, Nguyễn Thanh Vũ, Đỗ Ngọc Anh Huy,  
Đoàn Thị Tám, Nguyễn Đăng Quân, Lê Quang Luân

Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh

## TÓM TẮT

Chitosan có khối lượng phân tử (Mw) khoảng 573,2 kDa được chiếu xạ tia gamma ở trạng thái trương trong dung dịch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2% để cắt mạch chế tạo chitosan có Mw thấp. Kết quả xác định bằng phương pháp sắc ký gel thẩm qua (GPC) cho thấy chế phẩm cắt mạch chitosan tạo thành có Mw từ ~ 52 đến 145 kDa. Khả năng kháng nấm của chế phẩm chitosan Mw thấp đối với *Lasiodiplodia pseudotheobromae* được thử nghiệm trong điều kiện *in vitro* trên môi trường PDA và *in vivo* trên quả xoài bằng phương pháp lây bệnh nhân tạo. Kết quả cho thấy hiệu lực kháng nấm của chitosan Mw ~ 145 kDa tỷ lệ thuận với nồng độ chitosan và hoạt tính kháng nấm gia tăng từ 56,1 lên 99,6% khi tăng nồng độ chitosan từ 0,05 lên 1,5%. Thêm vào đó, kết quả thử nghiệm trên quả xoài cho thấy việc xử lý chitosan phân tử thấp trước khi gây nhiễm *L. pseudotheobromae* làm giảm tỷ lệ bệnh, hiệu lực kháng nấm đạt lên tới 54,8% so với đối chứng. Có thể thấy rằng chế phẩm chitosan Mw thấp được chế tạo bằng phương pháp cắt mạch bức xạ tia gamma Co-60 có tiềm năng sử dụng như là một chế phẩm kháng nấm an toàn và hiệu quả, hướng tới ứng dụng trong bảo quản sau thu hoạch.

*Từ khóa:* Chiếu xạ, *L. pseudotheobromae*, chitosan cắt mạch, xoài.

## MỞ ĐẦU

Xoài là một trong những loại cây ăn quả được trồng phổ biến ở Việt Nam có giá trị xuất khẩu cao. Theo Cục Trồng trọt, Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn, Việt Nam có 92,746 ha trồng xoài và sản lượng 788.233 tấn. Trong đó, Đồng bằng sông Cửu Long là vùng sản xuất xoài lớn nhất, chiếm đến 46,1% diện tích và 64,4% sản lượng xoài của cả nước (2017). Tuy nhiên việc xuất khẩu cũng như tiêu thụ vẫn còn nhiều hạn chế, do tình trạng hư hỏng sau thu hoạch, đặc biệt là bệnh đốm đen gây thiệt hại nghiêm trọng và làm tổn thất kinh tế khá lớn.

Chitosan, sản phẩm deacetyl của chitin, là một polymer tự nhiên không độc hại với nhiều đặc tính sinh học quan trọng (kháng khuẩn, kháng nấm...) từ lâu đã được nghiên cứu ứng dụng trong nhiều lĩnh vực (thực phẩm, y dược, nông nghiệp, xử lý môi trường...) (Li *et al.*, 2008). Tuy nhiên, do khả năng hòa tan kém (chỉ tan trong môi trường acid), đồng thời khi tan tạo ra dung dịch có độ nhớt cao nên khả năng ứng dụng của chitosan còn hạn chế. Các nghiên cứu trong những năm gần đây cho thấy, oligochitosan có khả năng hòa tan trong nước do mạch phân tử ngắn và nhờ sự có mặt của các nhóm NH<sub>2</sub> tự do có trong các mắt xích D-glucosamine. Chính đặc điểm khác biệt này đã tạo ra nhiều hướng ứng dụng cho chitosan KLPT thấp như kích thích sinh trưởng, kích thích các phản ứng tự vệ trong tế bào mô thực vật (Luân *et al.*, 2006), đặc biệt trong lĩnh vực bảo quản thực phẩm và bảo quản sau thu hoạch như khả năng kháng khuẩn, kháng nấm (Baclayon, Calibo, 2013).

Nấm *Lasiodiplodia theobromae* còn có tên gọi khác *Diplodia natalensis* (Zhao *et al.*, 2015) là một trong nấm bệnh phổ biến nhất ở các nước nhiệt đới và cận nhiệt đới, nấm này thường gây bệnh đốm đen trên các loại quả như chuối, họ cây có múi, xoài (Assuah *et al.*, 1999). Theo khảo sát tại khu vực Tiền Giang của Viện Cây ăn quả miền Nam cho thấy chỉ xuất hiện chủng nấm *Lasiodiplodia theobromae* là 1 trong 3 chủng nấm gây bệnh phổ biến trên xoài cát Hòa Lộc, giống xoài chủ lực của Việt Nam hiện nay. Tuy nhiên, ở Việt Nam hiện tại hầu như chưa nghiên cứu về hoạt tính kháng nấm của chitosan trên chủng nấm này. Do đó, trong nghiên cứu này chúng tôi đã khảo sát hoạt tính kháng nấm *L. pseudotheobromae* của chitosan Mw thấp bằng phương pháp chiếu xạ Cobalt - 60, liều xạ 0 - 20 kGy kết hợp xử lý H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2% và đánh giá các phương pháp xử lý nấm bệnh trên xoài sau thu hoạch.

## NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Chitosan có Mw ~ 573 kDa, độ deacetyl hóa 80%, được cung cấp bởi Công ty Chitoworld (Việt Nam). Môi trường PDA dùng để nuôi cấy nấm được cung cấp từ Merck (Đức). Chủng nấm *Lasiodiplodia pseudotheobromae* do Viện Nghiên cứu cây ăn quả miền Nam cung cấp. Mẫu xoài dùng cho thí nghiệm thuộc giống xoài Cát Hòa Lộc (Cái Bè, Tiền Giang). Nguồn xạ tia gamma GC-5000, BRIT (Ấn Độ) tại Viện Nghiên cứu Hạt nhân Đà Lạt.

### Tạo chitosan Mw bằng phương pháp chiếu xạ Cobalt-60 kết hợp xử lý H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Các mẫu dung dịch chitosan được chuẩn bị theo tỉ lệ 1/5: hoà tan 2 g chitosan trong 10 ml dung dịch acid acetic 1%. Các mẫu không xử lý và được xử lý H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nồng độ 2% được chiếu xạ bởi tia gamma Co-60 với các liều 0, 5, 10,

15 và 20 kGy bằng nguồn SVST tại Viện Nghiên cứu Hạt nhân Đà Lạt. Các mẫu sau khi chiếu xạ cất mạch được đem sấy khô ở nhiệt độ 55°C trong tủ sấy có quạt. Sau đó được nghiền mịn bằng cối nghiền bi và rây qua rây 200 mesh để thu được dạng bột mịn.

**Xác định khối lượng phân tử (Mw) của chitosan sau chiếu xạ**

Chitosan sau khi chiếu xạ được xác định Mw bằng GPC trên máy LC - 20AB, Shimadzu, detector RID - 10A, sử dụng 2 cột Utrehydrogel 250 và 500 A (Waters, Mỹ), nhiệt độ cột là 40°C, dung môi CH<sub>3</sub>COOH 0,25 M/CH<sub>3</sub>COONa 0,25 M và chất chuẩn là pullulan (Sigma, Mỹ).

**Đánh giá hiệu lực kháng nấm *Lasiodiplodia pseudotheobromae* của các phân đoạn chitosan trên môi trường PDA**

Môi trường PDA có chứa dung dịch chitosan với các khối lượng phân tử và nồng độ khác nhau (dung dịch chitosan ở các Mw và nồng độ khác nhau được hòa tan trong acid acetic 1%, sau đó bổ sung vào môi trường PDA). Các khuẩn nấm *L. pseudotheobromae* 7 ngày tuổi có đường kính 6 mm được cấy vào trung tâm đĩa môi trường, sau đó ủ ở 25°C. Theo dõi sự phát triển và đo kích thước đường kính tán nấm cho đến khi nấm mọc đến mép đĩa ở nghiệm thức đối chứng (bổ sung acid acetic 1% vào môi trường PDA). Thí nghiệm lặp lại 3 lần và lấy kết quả trung bình. Hiệu lực kháng nấm được tính:  $HLK = (1 - \frac{Dt}{Dc}) \times 100$ . Trong đó: Dt, Dc lần lượt là đường kính tán nấm (mm) trên đĩa thạch ở các nghiệm thức có bổ sung chitosan Mw thấp và đối chứng.

**Đánh giá khả năng gây bệnh đốm đen của nấm *L. pseudotheobromae* trên xoài ở điều kiện *in vitro***

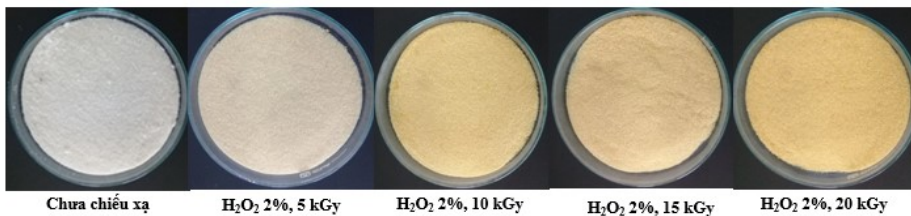
Khả năng gây bệnh (ngưỡng gây bệnh) của nấm *L. pseudotheobromae* trên quả xoài được thực hiện theo phương pháp của Duy và đồng tác giả (2014). Xoài được gây tổn thương bằng cách đục lỗ, mỗi quả 6 lỗ. Đặt khuẩn ty của nấm lên các vùng tổn thương, giữ ẩm cho vết thương bằng màng bao thực phẩm. Mẫu thí nghiệm đặt trong một buồng ẩm ở 24-30°C. Mẫu đối chứng được tiến hành như trên nhưng không đặt khuẩn ty nấm. Sau khi hoàn tất thì đặt xoài vào khay có lót bông đã thấm nước để giữ ẩm và đặt trong phòng, mỗi nghiệm thức được đặt vào khay riêng. Các nghiệm thức được lặp lại 3 lần. Sau mỗi 24h theo dõi sự phát triển của vết bệnh ở các chỉ tiêu: đặc điểm vết bệnh (màu nâu đen, lõm vào phần thịt, thịt quả bị chai sượng, vết bệnh có hình tròn...), đường kính vết bệnh (mm), diện tích vết bệnh (vùng oval) bằng cách đo chiều dài vùng tổn thương theo hai hướng vuông góc nhau (chiều dài L, chiều rộng W) trong vòng 72 giờ. Các dữ liệu này sẽ được sử dụng để tính toán kích thước vùng bệnh và khả năng gây bệnh của nấm. Diện tích vết bệnh (cm<sup>2</sup>) được tính theo công thức (Netto và *et al.*, 2014):  $A = \pi lw$ . Trong đó:  $\pi = 3,14$ ; l là nửa chiều dài (L/2), w là nửa chiều rộng (W/2).

**Đánh giá khả năng ức chế nấm *L. pseudotheobromae* của chitosan sau chiếu xạ trên xoài ở điều kiện *in vivo* (lây bệnh nhân tạo)**

Xoài được lựa chọn đồng đều ở các lô thí nghiệm theo các chỉ tiêu: đúng độ chín, không dập nát, trầy xước, sâu thối do bệnh lý, sinh lý. Độ chín của xoài được chọn theo phương pháp tỷ trọng (Hâu *et al.*, 2011). Sau đó được khử trùng sạch bề mặt và làm tổn thương nhân tạo bằng cách đục lỗ nhỏ, vết thương sâu 0,5 cm, số lượng 6 lỗ/trái. Tiến hành xử lý với CTS theo 2 phương pháp (PP). PP1: phủ 20µl mẫu CTS vào các vết thương sau đó sử dụng tấm bông vô trùng phân bố đều CTS trên bề mặt vết thương và để khô tự nhiên, tiếp theo đặt khuẩn ty nấm lên vùng tổn thương và để khô tự nhiên. PP2: Đặt khuẩn ty lên các vị trí đã gây tổn thương, sau đó phủ 20 µl mẫu CTS lên vết thương, sử dụng tấm bông vô trùng phân bố đều CTS trên bề mặt vết thương và để khô tự nhiên. Mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần. Sau khi hoàn tất, xoài được đặt vào khay có lót bông đã thấm nước để giữ ẩm, lấy màng bao thực phẩm bọc khay chứa xoài (có đục lỗ màng bao để thoáng khí) và để ở nhiệt độ phòng, đặt mẫu đối chứng vào khay riêng. Mẫu đối chứng sử dụng cho cả 2 phương pháp làm tương tự nhưng không bổ sung CTS. Sau mỗi 24h, đo đường kính vết thương bằng hai đường ngược hướng nhau, vuông góc ở tâm (nơi gây tổn thương) và tính giá trị đường kính vết bệnh bằng trung bình hai đường kính đo được (Peixinho *et al.*, 2017) từ đó xác định hiệu lực kháng nấm trên xoài (%).

**KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**Đánh giá sản phẩm chitosan sau khi chiếu xạ**

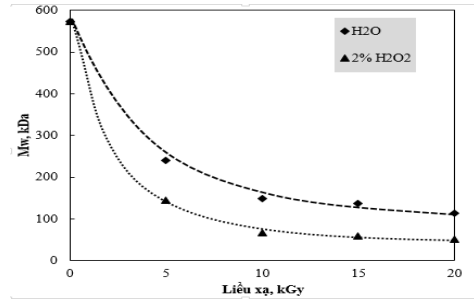


Hình 1. Mẫu CTS chiếu xạ ở các liều xạ khác nhau

Các mẫu bột chitosan trước và sau khi chiếu xạ có màu sắc thay đổi khác nhau tùy theo liều xạ. Chitosan chưa chiếu xạ có màu trắng, sau khi chiếu xạ chuyển sang màu vàng, với các cấp độ khác nhau từ vàng nhạt tới vàng đậm. Kết quả chiếu xạ cho thấy, liều xạ càng cao thì bột chitosan có màu càng đậm (Hình 1).

**Bảng 1. Ảnh hưởng của liều chiếu xạ đến Mw của CTS**

Liều xạ (kGy)	Mw (kDa)	
	H <sub>2</sub> O	2% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
0	573,2	573,2
5	241,3	145,5
10	149,8	67,8
15	137,2	60
20	114,5	52,3

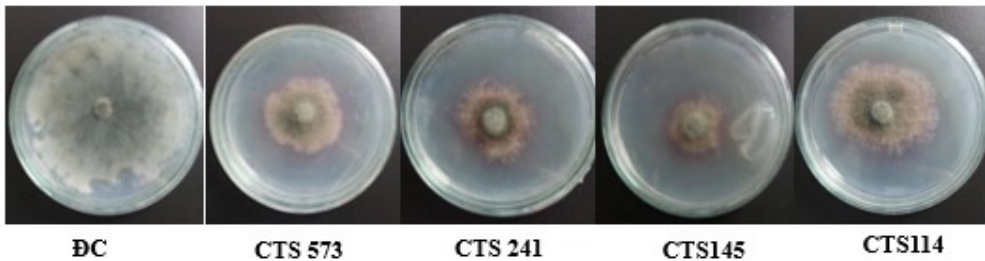


**Hình 2. Sự phụ thuộc Mw của CTS theo nồng độ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> và liều xạ**

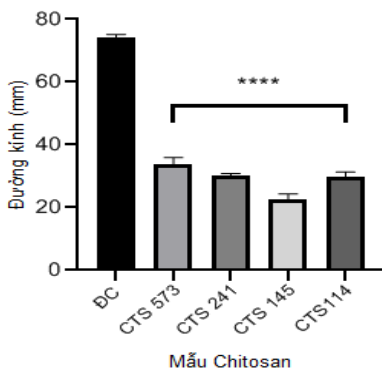
Khối lượng phân tử (Mw) trung bình của các mẫu chitosan sau khi chiếu xạ kết hợp xử lý với H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> thấp hơn nhiều so với chitosan chỉ chiếu xạ trong H<sub>2</sub>O. Cụ thể mẫu chitosan không chiếu xạ có khối lượng phân tử cao hơn 2,3 đến 10 lần so với chitosan ở các mẫu có chiếu xạ từ 5 - 20 kGy kết hợp xử lý H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2 %. Kết quả cũng cho thấy càng tăng liều xạ thì khối lượng phân tử chitosan ghi nhận được càng giảm (Bảng 1 và hình 2).

**Hiệu lực kháng nấm *L. pseudotheobromae* của các phân đoạn chitosan có khối lượng phân tử khác nhau trên môi trường PDA**

Sau khi xác định được Mw của chitosan, chúng tôi lựa chọn 4 mẫu chitosan để khảo sát hoạt tính kháng nấm đó là: CTS 573, CTS 241, CTS 145, CTS 114. Kết quả ở hình 3, 4 và bảng 2 cho thấy, sau 48h ở nghiệm thức không bổ sung chitosan (nghiệm thức đối chứng) tán nấm đã phát triển gần như đầy đĩa thạch, đường kính tán nấm đạt  $74,28 \pm 0,91$  mm. Các nghiệm thức có bổ sung chitosan sau chiếu xạ có khả năng ức chế nấm khá tốt. Trong đó CTS 145 kDa có khả năng ức chế nấm tốt nhất, đường kính tán nấm chỉ  $22,61 \pm 1,69$  mm, chiếm hiệu lực kháng nấm cao nhất đạt  $69,56 \pm 2,21\%$ . Hầu hết các nghiên cứu trước đây chưa đề cập đến khoảng Mw mà CTS cho hiệu quả ức chế tốt nhất với nấm *L. pseudotheobromae*, cơ chế ảnh hưởng của các phân đoạn Mw khác nhau cần được nghiên cứu chi tiết hơn.



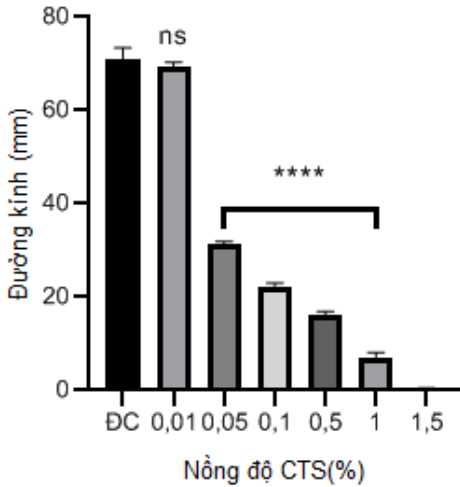
**Hình 3. Khả năng kháng nấm *L. pseudotheobromae* của chitosan sau chiếu xạ trên đĩa thạch**



**Hình 4. Biểu đồ hiệu lực kháng nấm của *L. pseudotheobromae* của CTS**

**Bảng 2. Tỷ lệ ức chế nấm *L. pseudotheobromae* của mẫu chitosan sau chiếu xạ**

Mẫu CTS	Tỷ lệ ức chế nấm <i>L. pseudotheobromae</i> sau 48h (%)
CTS 573	54,4 <sup>c</sup> ± 3,21
CTS 241	59,51 <sup>b</sup> ± 0,59
CTS 145	69,56 <sup>a</sup> ± 2,21
CTS 114	59,77 <sup>b</sup> ± 1,76



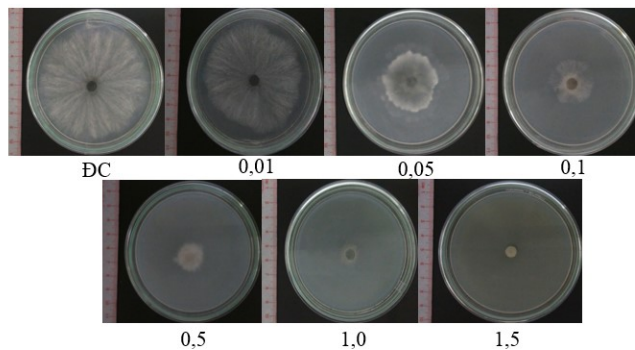
Hình 5. Biểu đồ hiệu lực kháng nấm của *L. pseudotheobromae* của CTS ở các nồng độ khác nhau

Bảng 3. Tỷ lệ ức chế nấm *L. pseudotheobromae* của chitosan trên đĩa thạch

Nồng độ CTS (%)	Tỷ lệ ức chế sau 48h (%)
0,01	0,65 <sup>f</sup> ± 0,04
0,05	56,07 <sup>e</sup> ± 1,29
0,1	68,59 <sup>d</sup> ± 0,94
0,5	77,06 <sup>c</sup> ± 0,82
1	89,92 <sup>b</sup> ± 1,46
1,5	99,58 <sup>a</sup> ± 0,22

**Hiệu lực kháng nấm *L. pseudotheobromae* của các phân đoạn chitosan có nồng độ khác nhau**

Kết quả cho thấy, trên môi trường không bổ sung chitosan Mw 145 kDa nấm *L. pseudotheobromae* phát triển nhanh, tản nấm đạt kích thước tối đa chỉ sau 48 giờ, đường kính tản nấm đạt 71,14 ± 2,26 mm. Ở nồng độ 0,01% nấm vẫn phát triển bình thường, không có sự khác biệt so với nghiệm thức đối chứng. Như vậy, ở nồng độ quá thấp CTS không có khả năng ức chế sự phát triển của nấm. Từ nồng độ 0,05% CTS mới phát huy hiệu quả ức chế nấm, HLK đạt 56,07 ± 1,29%. Ở nồng độ 1%, HLK khá cao, đạt 89,92 ± 1,46%. Tại nồng độ 1,5% nấm gần như hoàn toàn không phát triển, HLK đạt đến 99,58 ± 0,22%. Kết quả này cho thấy chitosan Mw 145 kDa ở nồng độ 1% đến 1,5% có khả năng ức chế tốt sự phát triển của nấm. Kết quả thí nghiệm phù hợp với nghiên cứu của Zhang và đồng tác giả (2003).



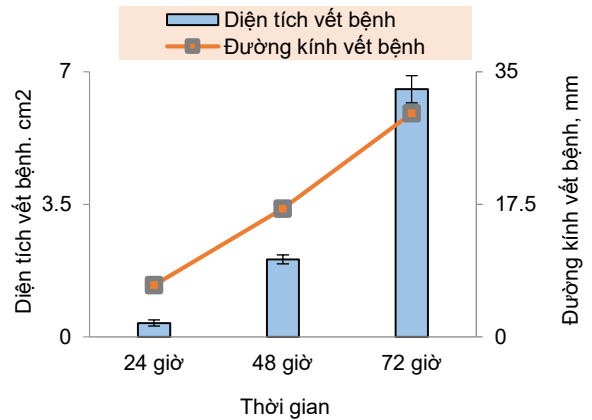
Hình 6. Khả năng kháng nấm *L. pseudotheobromae* của CTS nồng độ khác nhau trên môi trường thạch đĩa

**Khả năng gây bệnh đốm đen của nấm *L. pseudotheobromae* trên xoài điều kiện *in vivo***

Sau khi lây bệnh nhân tạo bằng nấm *L. pseudotheobromae* trên xoài, kết quả cho thấy tất cả nghiệm thức đều xuất hiện triệu chứng bệnh các vùng tổn thương sau 24 giờ. Kích thước vùng tổn thương tăng dần theo thời gian đến 72h (hình 8). Cụ thể, đường kính vết bệnh đã đạt 6,86 ± 0,76 mm sau 24h và ứng diện tích vết bệnh là 0,37 ± 0,08 cm<sup>2</sup>. Sau 72h, diện tích vết bệnh đạt tới 6,54 ± 0,36 cm<sup>2</sup> tương đương đường kính vết bệnh là 29,50 ± 0,5 mm. Các vết bệnh có màu nâu sậm, hình oval và hơi lõm, phần thịt mềm nhũn và ứ nước bên trong, có nhiều sợi khuẩn ty trắng, ít dần từ trong ra ngoài của vết bệnh. Đây là những triệu chứng bệnh thối trái trên xoài gây ra bởi nấm *L. pseudotheobromae*. Trong khi đó, nghiệm thức ĐC hoàn toàn không xuất hiện dấu hiệu bệnh. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Kwon và đồng tác giả (2017). Kết quả cho thấy nấm *L. pseudotheobromae* có khả năng gây bệnh thối trái nhanh trên bề mặt xoài bị tổn thương với thời gian gây bệnh tương đối ngắn.



Hình 7. Khả năng gây đốm đen của nấm *L. pseudotheobromae* trên xoài sau 72h



Hình 8. Đường kính và diện tích vết bệnh sau 72h gây bệnh nhân tạo

**Hiệu quả phòng ngừa nấm *L. pseudotheobromae* của chitosan trên xoài điều kiện *in vivo* (lây bệnh nhân tạo)**

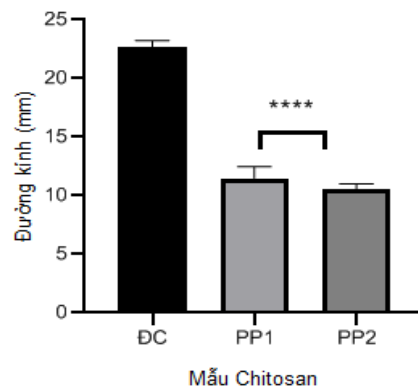
Từ những kết quả trên, chúng tôi sử dụng mẫu CTS có Mw 145 kDa và nồng độ 1,5% cho thí nghiệm này nhằm xác định ảnh hưởng của CTS đến bệnh thối trái trên xoài do nấm *L. pseudotheobromae* theo các phương pháp xử lý khác nhau. Kết quả thí nghiệm được thể hiện ở hình 9 và 10.

Theo thí nghiệm tạo màng CTS tự nhiên của Clasen và đồng tác giả (2006), CTS được cho vào dung dịch acid acetic 1% và khuấy ít nhất trong 3 giờ, sau đó dung dịch CTS được lọc qua phin lọc vô trùng 330 μm để loại các hạt CTS không thể tan, giúp khả năng tạo màng CTS tốt hơn. Thao tác chuẩn bị dung dịch CTS cho thí nghiệm này được thực hiện tương tự, tuy nhiên dung dịch CTS sau khi hòa tan không được lọc qua phin lọc để loại các hạt CTS không thể tan ra khỏi dung dịch, làm giảm hiệu quả tạo màng của CTS sau khi dung dịch acid acetic bay hơi. Điều này đã làm cho khả năng ức chế sự phát triển của nấm *L. pseudotheobromae* ở PP1 giảm xuống so với lý thuyết, từ đó tỉ lệ nhiễm bệnh ở cả 2 PP có sự khác biệt không có ý nghĩa khi phân tích ANOVA.



Hình 9. Mẫu xoài được xử lý với CTS sau 72h

(Ghi chú: PP1 là phun CTS lên xoài trước mới đặt khuẩn ty lên. PP 2 đặt khuẩn ty nấm lên xoài sau đó mới phun CTS.)



Hình 10. Hiệu lực kháng nấm và đường kính vết bệnh do nấm *L. pseudotheobromae* trên xoài đã gây bệnh nhân tạo được xử lý CTS bằng PP1 và PP2 sau 72 giờ

**Bảng 4. Tỉ lệ ức chế bệnh trên xoài do nấm *L. pseudotheobromae* của các phương pháp khác nhau**

Phương pháp xử lý	Tỉ lệ ức chế sau 48h (%)
PP1	49,4% ± 5,29%
PP2	54,8 ± 3,91%

Khi khảo sát trên môi trường đĩa thạch *L. pseudotheobromae* bị ức chế gần như hoàn toàn. Tuy nhiên, trên xoài sau khi gây bệnh nhân tạo được xử lý với CTS 145 kDa nồng độ 1,5% vẫn bị thối trái với tỉ lệ nhiễm bệnh ở 2 PP lần lượt là 62,79 ± 6,41% và 74,08 ± 6,41%. Từ kết quả cho thấy, hiệu quả ức chế nấm *L. pseudotheobromae* của CTS trên xoài đã gây bệnh nhân tạo yếu hơn so với trên môi trường đĩa thạch. Nấm *L. pseudotheobromae*

được phân lập từ xoài bị bệnh thối trái nên đã có khả năng thích nghi trên xoài cao do đó khả năng gây bệnh trên xoài mạnh hơn trên môi trường đĩa thạch. Bên cạnh đó, xoài sau thu hoạch cũng chứa môi trường dinh dưỡng thích hợp cho sự phát triển của nấm. Vì vậy nấm *L. pseudotheobromae* phát triển lợi bên trong vết bệnh nhân tạo, tác dụng ức chế của chitosan trên xoài kém hơn trên môi trường đĩa thạch.

## KẾT LUẬN

Kết quả thí nghiệm đã chứng minh chitosan cắt mạch thu nhận bằng phương pháp chiếu xạ kết hợp xử lý H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> có tiềm năng ứng dụng trong bảo quản xoài sau thu hoạch. Các kết quả thử nghiệm hiệu quả ức chế nấm *L. pseudotheobromae* gây bệnh đốm đen của chitosan Mw thấp trên xoài sẽ tạo tiền đề cho các nghiên cứu sâu hơn về việc ứng dụng tạo sản phẩm chitosan phòng bệnh đốm đen trên xoài sau thu hoạch giúp tăng giá trị xuất khẩu xoài.

**Lời cảm ơn:** Kinh phí thực hiện nghiên cứu này được cung cấp bởi Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

Lê Nguyễn Đoàn Duy, Nguyễn Thị Kim Tuyền, Lương Tố Lan, Nguyễn Công Hà (2014). Nghiên cứu ứng dụng chitosan để ức chế nấm *Colletotrichum gloeosporioides* phân lập từ xoài cát hòa lộc bị bệnh thán thư. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ* 4:154-16.

Trần Văn Hâu, Nguyễn Thị Phúc Nguyên, Trần Sỹ Hiếu (2011). Ảnh hưởng của ba loại bao quả lên màu sắc vỏ và phẩm chất quả xoài (*Mangifera indica* L.) tại huyện Cao Lãnh, tỉnh Đồng Tháp. *Hội thảo sản xuất cây ăn quả theo GAP Bộ NNPTNT - Trung tâm Khuyến nông Quốc gia*, 117- 125.

Assuah, MK, Oduro KA, Ofosu-Budu KG (1999). *Diplodia natalensis* Pole Evans, the causal agent of citrus gummosis disease in Ghana. *Ghana J Agric Sci* 32:11-18.

Baclayon DP, Calibo CL (2013). Effects of chitosan isolated from crab exoskeleton on postharvest stem-end rot disease and on the quality of mango fruit. *Annals of Tropical Research* 35(1): 23-34.

Clasen C, Wilhelms T, Kulicke WM (2006). Formation and characterization of chitosan membranes. *Biomacromolecules*, 7(11):3210-3222.

Kwon JH, Choi O, Kang B, Lee Y, Park J, Kang DW, Kim J (2017). Identification of *Lasiodiplodia pseudotheobromae* causing mango dieback in Korea. *Canadian J Plant Pathology* 39(2): 1-17.

Luan LQ, Nagasawa N, Tamada M, Nakanishi TM (2006). Enhancement of plant growth activity of irradiated chitosan by molecular weight fractionation. *Radioisotopes (Tokyo)* 55(1):23-29.

Netto MS, Assunção IP, Lima GS, Marques MW, Lima WG, Monteiro JH, Camara MP (2014). Species of *Lasiodiplodia* associated with papaya stem-end rot in Brazil. *Fungal Diversity* 67(1):127-141.

Peixinho DS, Ribeiro VG, Amorim PDR (2017). Control of dry rot (*Lasiodiplodia theobromae*) in bunches of grapevine cv. Itália using essential oil and chitosan. *Summa Phytopathol* 43(1): 26-31.

Li XF, Feng XQ, Yang S, Wang TP (2008). *Effects of Molecular Weight and Concentration of Chitosan on Antifungal Activity Against Aspergillus Niger*. *Iranian Polym J* 17(11): 843-852.

Zhang M, Tianwei T, Huizhu Y, Changhui R (2003). Insecticidal and Fungicidal Activities of Chitosan and Oligo-chitosan. *Bioact Comp Polym J* 18: 391-400.

Zhao W, Bai J, McCollum G, Baldwin E (2015). High incidence of preharvest colonization of Huanglongbing-Symptomatic *Citrus sinensis* fruit by *Lasiodiplodia theobromae* (*Diplodia natalensis*) and exacerbation of postharvest fruit decay by that fungus. *Appl Environ Microbiol* 81(1): 364-72.

## ANTIFUNGAL ACTIVITY OF CHITOSAN DEGRADED BY RADIATION AGAINST *Lasiodiplodia pseudotheobromae* CAUSING BLACK SPOT DISEASE ON HOÀ LOC CAT'S MANGOES

**Dung Nguyen Thi\*, Thanh Vu Nguyen, Anh Huy Do Ngoc, Tam Doan Thi, Dang Quan Nguyen, Luan Le Quang**

*Biotechnology center of Ho Chi Minh city*

## SUMMARY

Chitosan with molecular weight (Mw) approx. 573.2 kDa was irradiated by gamma rays at swollen state in hydrogen peroxide 2% for degradation to prepare low Mw product. The results by gel permeation chromatography method indicated that low Mw chitosan products with Mw from ~52 to 145 kDa. The inhibition

effects of low Mw chitosan products against *Lasiodiplodia pseudotheobromae* were also evaluated *in vitro* using PDA media and *in vivo* on mangoes by proactive infection method. The results showed that the fungal inhibition activities increased with the increase of the concentration of chitosan Mw ~ 145 kDa and the inhibition rate varied from 56.1 to 99.6% corresponded to the chitosan's concentration from 0.05 to 1.5%. In addition, the results of *in vivo* tests on mangoes also indicated that the treatment with low Mw chitosan before spraying with *L. pseudotheobromae* reduced the ratio of diseased on mangoes of 54.8% compared with control (untreated samples). It can be seen that the low Mw chitosan product prepared by gamma Co-60 irradiation method has a great potential in used as a safe and highly effective products for antifungal, towards the application in preserve postharvest technology.

*Keywords:* Irradiation, *L. pseudotheobromae*, low molecular weight chitosan, Hoa Loc cat's mangoes.