

## ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG ỨC CHẾ NẤM *Colletotrichum gloeosporioides* GÂY BỆNH THÁN THƯ TRÊN TRÁI XOÀI CỦA MỘT SỐ CHỦNG NẤM MEN

Trần Thị Thu Hà<sup>2\*</sup>, Trương Quang Toàn<sup>2</sup>, Nguyễn Thị Vân Khanh<sup>2</sup>,  
Vũ Ngọc Khánh Như<sup>2</sup>, Lê Ngọc Tường An<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Thu Ngân<sup>1</sup>,  
Bành Hữu Tinh<sup>1</sup>, Trương Phước Thiên Hoàng<sup>2</sup>, Đào Uyên Trân Đa<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Khoa Khoa học sinh học – Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh

<sup>2</sup>Viện Nghiên cứu Công nghệ Sinh học và Môi trường – Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh

\*Giáo viên hướng dẫn

### TÓM TẮT

Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm thu thập, phân lập và định danh một số dòng nấm men có trên vỏ xoài Cát Hòa Lộc có khả năng ức chế nấm *Colletotrichum gloeosporioides* gây bệnh thán thư trên trái xoài ở giai đoạn sau khi thu hoạch. Trong nghiên cứu này, các chủng nấm men phân lập từ vỏ trái xoài được định danh dựa vào nhiều phương pháp khác nhau bao gồm đặc điểm hình thái, đặc điểm sinh hóa và phân tích trình tự 26S rDNA. Kết quả xác định được ba loài nấm men bao gồm *Hanseniaspora thailandica*, *Hanseniaspora opustiae* và *Pichia barkeri*. Sau đó khả năng ức chế của các chủng nấm men này đối với nấm *Colletotrichum gloeosporioides* được thực hiện bằng phương pháp đồng nuôi cấy trong điều kiện *in vitro*, kết quả cho thấy có tỷ lệ đối kháng cao trên 50% sau 10 ngày nuôi cấy. Nghiên cứu này bước đầu cho thấy sử dụng nấm men để kiểm soát sinh học là phương pháp tiềm năng để kiểm soát các tác gây bệnh trên trái xoài sau thu hoạch.

Từ khóa: *Colletotrichum gloeosporioides*, nấm men, xoài Cát Hòa Lộc.

### ĐẶT VẤN ĐỀ

Xoài (*Mangifera indica* L.) là loại trái cây nhiệt đới có giá trị kinh tế quan trọng ở các quốc gia trên toàn thế giới. Đây là loại trái cây chứa nhiều chất xơ, vitamin, carotenoids và nhiều chất có hoạt tính chống oxy hóa. Tuy nhiên, xoài sau khi thu hoạch dễ bị bệnh và hư hỏng. Bệnh thán thư (anthracnose) do nấm *Colletotrichum* spp. là nguyên nhân chính dẫn đến sự hư hỏng của trái xoài sau thu hoạch, bệnh gây ra các đốm hoại tử trên vỏ, tiến triển thành vết bệnh trũng. Những thiệt hại này làm ảnh hưởng đến chất lượng của trái cây và do đó hạn chế cơ hội bán hàng cả trong nước và quốc tế.

Việc quản lý nấm *Colletotrichum* gây bệnh thán thư trên trái cây bằng cách sử dụng thuốc diệt nấm như mancozeb, carbendazim, prochloraz và Tecto 60 (Chechi *et al.*, 2019; Sengupta *et al.*, 2020) có hiệu quả nhanh, tuy nhiên dẫn đến sự tích tụ các chất độc hại có khả năng gây nguy hiểm cho sức khỏe con người, ô nhiễm môi trường (Singh *et al.*, 2016), cùng với sự xuất hiện của các chủng kháng thuốc diệt nấm (Tian *et al.*, 2016) nhu cầu cấp thiết phải phát triển chiến lược kiểm soát sinh học mới thân thiện với môi trường (Carmona-Hernandez *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2018). Một biện pháp khác được áp dụng là xử lý hơi nước nóng nhưng việc kiểm soát đồng nhất nhiệt độ gặp khó khăn nên xoài thường bị tổn thương do nhiệt (Arauz, 2000). Vi khuẩn, nấm men và nấm sợi được coi là tác nhân kiểm soát sinh học tiềm năng với hoạt tính kháng nấm phổ rộng (Konsue *et al.*, 2020). Kiểm soát sinh học bằng cách sử dụng nấm men là một trong các phương pháp thay thế đầy hứa hẹn trong kiểm soát bệnh thối trên trái và rau sau thu hoạch. Với ưu điểm nấm men phát triển nhanh, chịu được khô hạn, không sản sinh ra các loại độc tố và phần gây dị ứng (Droby, Chalutz, 1994). Các loài nấm men *Pichia guilliermondii*, *Candida musae*, *Issatchenkia orientalis* và *Candida quercitrusa* đã được sử dụng để ức chế sự phát triển của nấm *C. capsici* trên cây ớt (*Capsicum annum* L.) ở Thái Lan (Chanchaichaovivat *et al.*, 2007), *Torulaspota globosa* được dùng để ức chế *C. sublineolum* trên cây bo bo (sorghum: *Sorghum bicolor* (L) Moench) ở Brazil (Rosa *et al.*, 2010) và *Candida membranifaciens* được sử dụng đối kháng với nấm *C. gloeosporioides* trên xoài (*Mangifera indica* L.) trồng ở Ethiopia (Kefialew, Ayalew, 2008).

Để góp phần tăng cường hiệu quả và mức độ an toàn trong phòng trị nấm *C. gloeosporioides* cũng như làm cơ sở cho việc sử dụng nấm men để kiểm soát sinh học bệnh gây hại trên trái xoài sau thu hoạch và phục vụ cho những nghiên cứu sâu hơn, đề tài này được thực hiện nhằm phân lập và định danh được các dòng nấm men trên trái xoài sau thu hoạch, khả năng ức chế đối với nấm *C. gloeosporioides* gây bệnh thán thư trên trái xoài.

### VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

#### Vật liệu

Nguồn nấm *C. gloeosporioides* được cung cấp bởi Phòng Thí nghiệm Vi sinh ứng dụng – Viện Nghiên cứu Công

nghe Sinh học và Môi trường- Trường Đại học Nông Lâm Tp.HCM. Tổng cộng 50 mẫu xoài Cát Hòa Lộc đã thu hoạch và hoàn toàn sạch bệnh được thu thập ở các huyện của tỉnh Đồng Tháp. Môi trường nuôi cấy và thử nghiệm đặc tính sinh hóa của nấm men gồm: YPD (yeast extract 0,5%, peptone 0,5%, glucose 2,0%) và môi trường YPD agar (môi trường YPD bổ sung 1,5% agar); môi trường Christensen (urea 20 g/L; yeast extract 0,1 g/L; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 9,5 g/L; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 9,1 g/L; phenol red 0,01 g/L; pH 6,7) (Christensen, 1946).

### Phân lập và định danh nấm men dựa vào đặc điểm hình thái và các phản ứng sinh hóa

#### Định danh nấm men dựa vào đặc điểm hình thái

Quả xoài sau khi thu về loại bỏ những quả hư hỏng, rửa bằng nước sạch loại bỏ bụi bẩn. Phân lập theo phương pháp tạo khuẩn lạc đơn (Nguyễn Văn Minh, Dương Nhật Linh, 2008): cân 10 g mẫu vỏ quả (không bao gồm thịt quả) cho vào bình tam giác có chứa 100 ml môi trường YPG (đã được khử trùng ở 121°C trong 15 phút) tăng sinh ở nhiệt độ phòng trong 48 giờ. Pha loãng dịch tăng sinh vỏ xoài với 9 mL nước cất và cấy trang lần lượt ở các nồng độ 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup> trên môi trường YPGA và ủ mẫu trong 2 ngày. Chọn khuẩn lạc riêng lẻ, cấy chuyển đến khi thu được khuẩn lạc nấm men thuần. Định danh các dòng nấm men phân lập được dựa vào các đặc điểm hình thái: khuẩn lạc, hình thái và kích thước tế bào, hình thức sinh sản của Nguyễn Đức Lượng và đồng tác giả (2006), Lương Đức Phẩm (2009), Kurtzman và đồng tác giả (2011).

#### Định danh nấm men dựa vào các phản ứng sinh hóa: phản ứng lên men đường, hoạt tính phân giải nitrate và urea

Khảo sát khả năng lên men đường glucose, sucrose và lactose: Với các dòng nấm phân lập được, nuôi sinh khối nấm men trong môi trường YPG đã khử trùng ở 121°C trong 15 phút ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ. Tiến hành hút 1 ml dung dịch sinh khối nấm men đã đạt 10<sup>8</sup> tế bào/mL cho vào các ống nghiệm có chứa 9ml dung dịch đường lần lượt là: glucose 2% (w/v), sucrose 2% (w/v) và lactose 2% (w/v) và ống Durham đã được khử trùng ở 115°C trong 15 phút và ủ lên men. Quan sát và đo chiều cao cột khí CO<sub>2</sub> trong ống Durham bắt đầu từ sau 2 giờ cho đến thấy cột khí đầy ống Durham (chiều cao tối đa là 30mm). Phản ứng Citrate lấy khuẩn lạc đơn của các dòng nấm men cấy vào ống nghiệm chứa môi trường Simmon citrate theo đường ziczac, quan sát kết quả trong 48 giờ. Đánh giá khả năng phân giải urê: Các dòng nấm men phân lập được tăng sinh trong môi trường YPG trên máy lắc ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ. Cho 0,5 mL dịch tăng sinh nấm men đạt 10<sup>8</sup> tế bào/mL vào ống nghiệm có chứa sẵn 4,5 mL môi trường Christensen (đã được khử trùng ở 115°C trong 15 phút) và ủ ở 30°C trong 1 tuần. Kết quả dương tính khi môi trường chuyển sang màu đỏ sẫm

#### Định danh nấm men bằng kỹ thuật sinh học phân tử

Các dòng nấm men sau khi được cấy rìa làm thuần trên môi trường YPGA, tách chiết DNA theo phương pháp ly trích SDS - Phenol - Chloroform method (Lee và Taylor, 1998), có cải tiến. Thực hiện phản ứng PCR khuếch đại vùng D1/D2 26S rDNA với cặp mồi NL1 (5' GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG 3') và NL4 (5' GGTCCTGT TTCAAGACGG 3') (Ochoa et al., 2007). Chu trình nhiệt được thực hiện cho phản ứng PCR: Tiền biến tính: 95°C trong 5 phút; Biến tính: 95°C trong 30 giây; Bắt cặp: 52°C trong 1 phút; Kéo dài: 72°C trong 10 phút; Hậu kéo dài: 4°C. Chương trình Nucleotide BLAST được sử dụng để xác định mức độ tương đồng của trình tự được giải trình tự của các dòng nấm men trong ngân hàng gen NCBI với các thông số mặc định.

### Đánh giá khả năng ức chế của các dòng nấm men và nấm *Colletotrichum gloeosporioides* gây bệnh thán thư trên trái xoài

Việc đánh giá tính đối kháng được thực hiện đồng nuôi cấy trên đĩa petri chứa môi trường nuôi cấy PGA. Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, đơn yếu tố, mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần. Các chủng nấm men phân lập được sử dụng trên các đĩa, 10 µl huyền phù nấm men thu được như mô tả ở trên được cấy rìa thành hai đường thẳng đối xứng nhau, cách thành đĩa 1,5 cm ở 25°C trong 48 h, sau đó đặt khuẩn lạc *C. gloeosporioides* vào giữa hai đường rìa nấm men được ủ ở nhiệt độ 25°C. Nghiệm thức đối chứng, các đĩa PGA chỉ có khuẩn lạc *C. gloeosporioides*.

Đo bán kính tấn nấm *C. gloeosporioides* ở các thời điểm 2, 4, 6, 8, 10 ngày sau nuôi cấy và tính hiệu suất đối kháng theo công thức. HSDK (%) = [(R<sub>1</sub>-R<sub>2</sub>)/R<sub>1</sub>] x 100 R<sub>1</sub>: Bán kính nấm *C. gloeosporioides* trên đĩa đối chứng (cm). R<sub>2</sub>: Bán kính nấm *C. gloeosporioides* trên đĩa đối kháng với nấm men (cm).

#### Phân tích và xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft office excel và phân tích bằng phần mềm Statgraphics Centurion XVI (Stapoint technologies inc, Hoa Kỳ).

### KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### Đặc điểm hình thái, sinh hóa của các dòng nấm men phân lập được từ vỏ xoài cát Hòa Lộc

##### Đặc điểm hình thái của các dòng nấm men phân lập

Kết quả phân lập được 13 dòng nấm men thuần, quan sát trên kính soi nổi hình thái khuẩn lạc đa dạng về hình

dạng của các dòng nấm men: hình tròn, màu trắng hoặc trắng kem, lồi hoặc dẹp, khuẩn lạc trơn hoặc xù xì và có các kích thước được thể hiện trong Bảng 1. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Lương Đức Phẩm (2009), tế bào nấm men có hình dạng phổ biến như hình cầu, hình oval, hình elip, hình trụ hoặc đôi khi kéo dài thành hình sợi. Nấm men có thể thay đổi hình dạng và kích thước trong các giai đoạn phát triển và điều kiện môi trường xung quanh

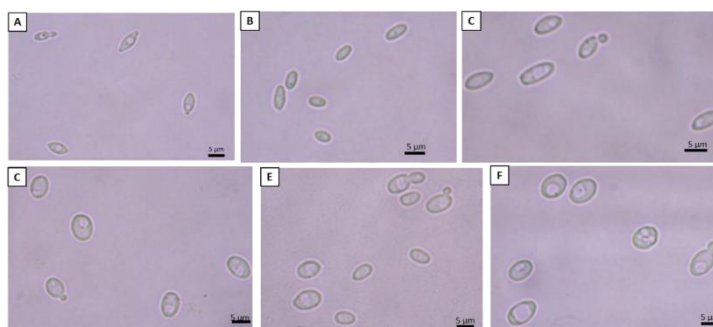


Hình 1. Hình thái khuẩn lạc của nấm men ở độ phóng đại 40X

Khi quan sát trên kính hiển vi, tế bào nấm men có hình elip hoặc hình oval, nảy chồi một hướng hoặc nhiều hướng. Những đặc điểm này đều giống những đặc điểm mô tả về hình thái nấm men của Fell và đồng tác giả (1998), được phân làm 6 nhóm (Bảng 2). Kết quả quan sát hình thức nảy chồi của tế bào nấm men cho thấy có hai hình thức là nảy chồi nhiều hướng và nảy chồi 1 hướng. Trong đó, các nhóm 1 có hình thức nảy chồi nhiều hướng, còn tế bào thuộc các nhóm 2,3,4,5,6 có hình thức nảy chồi một hướng

Bảng 1. Đặc điểm hình thái của 6 nhóm nấm men

Nhóm	Dòng nấm men	Hình thái khuẩn lạc	Hình thái tế bào	Hình thức nảy chồi
1	C01, C03	Trắng, dẹp	Hình elip ngắn	Nhiều hướng
2	C02	Trắng, lồi	Hình elip ngắn	Một hướng
3	C05	Trắng, trơn, lồi	Hình elip dài	Một hướng
4	C07	Trắng, dẹp	Hình oval nhỏ	Một hướng
5	C04, C08, C09	Trắng, lồi	Hình oval nhỏ	Một hướng
6	C06, C10, C11, C12, C13	Trắng, lồi	Hình oval lớn	Một hướng



Hình 2. Hình thái tế bào của các nhóm nấm men

(A) Nhóm 1, (B) Nhóm 2, (C) Nhóm 3, (D) Nhóm 4, (E) Nhóm 5, (F) nhóm 6

### Đặc điểm sinh hóa của các dòng nấm men

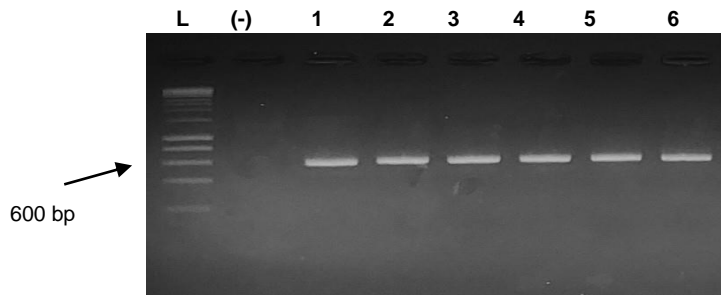
Đánh giá khả năng lên men dung dịch đường: glucose 2%, sucrose 2% và lactose 2% của các dòng nấm men bằng phương pháp lên men trong ống Durham. Theo Kurtzman và Fell (1998): khi nấm men lên men đường sẽ làm đục dung dịch trong ống nghiệm và sinh khí trong ống Durham. Kết quả ghi nhận được, 13 dòng nấm men phân lập được đều có khả năng chuyển hóa đường Glucose thành nguồn carbon để sử dụng, đa số các dòng nấm men phân lập đều chuyển hóa được đường Sucrose trừ dòng nấm men C01, C02, C03 và C05. Tất cả các dòng nấm men phân lập được đều không có khả năng chuyển hóa đường Lactose. Theo Kurtzman và đồng tác giả (2011), một số nấm men có khả năng sử dụng muối amonium làm nguồn Nitơ và sinh NH<sub>3</sub> làm môi trường trở nên kiềm, có màu xanh dương, kết quả cho thấy các dòng nấm men khả năng phân giải citrate trừ mẫu C01, C02, C03 và C05. Màu sắc của môi trường Christensen có sự thay đổi là do nấm men có khả năng sinh enzyme urease để phân giải urea thành CO<sub>2</sub> và NH<sub>3</sub>, lượng NH<sub>3</sub> tăng lên làm pH tăng khiến môi trường chuyển sang màu ánh tím thông qua chất chỉ thị màu phenol red, kết quả ghi nhận các dòng nấm men thu được đều không có khả năng phân giải ure trừ mẫu C07. Từ kết quả đặc điểm hình thái (bảng 1) và đặc điểm sinh hóa (bảng 2), bước đầu phân loại sơ bộ: dòng nấm men C01, C03, C05 có đặc điểm phù hợp với chi nấm men *Hanseniaspora*, dòng nấm men C02 thuộc chi nấm men *Pichia*, dòng nấm men C07 thuộc chi nấm men *Meyerozyma*, và các dòng nấm men C04, C08, C09, C06, C10, C11, C12, C13 thuộc chi nấm men *Candida*.

**Bảng 2. Kết quả đặc điểm sinh hóa và phân loại các dòng nấm men đã phân lập**

Mẫu nấm men	Đặc điểm sinh hóa					Phân loại sơ bộ
	Khả năng lên men đường				Phân giải ure	
	Glucose	Sucrose	Lactose	Citrate		
C01, C03	+	-	-	-	-	<i>Hanseniaspora</i>
C02	+	-	-	-	-	<i>Pichia</i>
C05	+	-	-	-	-	<i>Hanseniaspora</i>
C07	+	+	-	+	+	<i>Meyerozyma</i>
C04, C08, C09	+	+	-	+	-	<i>Candida</i>
C06, C10, C11, C12, C13	+	+	-	+	-	<i>Candida</i>

**Định danh nấm men bằng kỹ thuật sinh học phân tử**

Các nhóm nấm men được chọn đại diện mẫu, được làm thuần dùng để ly trích ADN và thực hiện phản ứng PCR gồm C01, C02, C04, C05, C07, C11. Theo Kurtzman và Robnett (1998) đã phân tích quan hệ phát sinh gen giữa các loại nấm men *Ascomycetous* từ sự phân kỳ trình tự *D1/D2* và mức độ khác biệt trong miền *D1/D2* của ADN ribosome tiểu đơn vị lớn (26S). Bên cạnh đó vào năm 2003, Cadez đã khuếch đại vùng gen *D1/D2* của 26S rDNA bằng cách sử dụng đoạn primer NL1 (5' GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG 3') và NL4 (5' GGTCCTGTTTCAAGACGG 3'). Chứng tỏ rằng cặp primer NL1/NL4 sử dụng trong nghiên cứu này là thích hợp và hiệu quả.



**Hình 3. Kết quả PCR của 6 dòng nấm men với cặp mồi NL1/NL4**

L: Thang 1 Kbp; (-): Đối Chứng âm; Từ 1 đến 6 là các mẫu C01, C02, C04, C05, C07, C11.

Dựa vào Hình 3 cho thấy cặp mồi NL1/NL4 có khả năng bắt cặp với ADN các dòng nấm men ở kích thước khoảng 600 bp phù hợp với nghiên cứu của Kurtzman và Robnett (1998), mẫu PCR được gửi giải trình tự, so sánh với dữ liệu trên ngân hàng gen NCBI. Năm mẫu C01, C02, C04, C05 và C11 khuếch đại thành công vùng gen *D1/D2* (28S) với cặp primer NL1/NL4, kết quả giải trình tự có các peak tín hiệu huỳnh quang rõ và có độ tương đồng cao (lớn hơn 97%), khi so sánh với các nguồn nấm men được công bố trên ngân hàng gen NCBI và điều này cũng chứng minh rằng nghiên cứu của Kurtzman và Robnett (1998) về việc sử dụng cặp primer NL1/NL4 để khuếch đại vùng gen *D1/D2* (26S) là hoàn toàn chính xác, kết quả so sánh sự tương đồng của các dòng nấm men với dữ liệu trên NCBI được thể hiện ở Bảng 3.

**Bảng 3. So sánh độ tương đồng các dòng nấm men với dữ liệu trên NCBI**

Mẫu nấm	Mã số trên Genbank	Tên Loài	Mức độ bao phủ	Giá trị E	Độ tương đồng
C01	MN203645.1	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	100%	0,0	99,81%
C02	U75735.1	<i>Pichia barkeri</i>	93%	2e - 176	97,85%
C05	DQ404527.1	<i>Hanseniaspra thailandica</i>	100%	0,0	100%
C04	KY928444.1	<i>Candida tropicalis</i>	100%	0,0	100%
C11	MK409681.1	<i>Candida tropicalis</i>	100%	0,0	100%

Kết quả giải trình tự gen và so sánh độ tương đồng trên NCBI, ta nhận thấy dòng nấm men C01 tương đồng 99,81% với trình tự loài *Hanseniaspora opuntiae*, mẫu C02 tương đồng 97,85% với trình tự loài *Pichia barkeri*, mẫu C05 tương đồng 100% với trình tự loài *Hanseniaspra thailandica*, mẫu C04, C11 tương đồng 100% với loài *Candida tropicalis*.

Dựa vào các kết quả về đặc điểm hình thái và phân tử cho thấy: Dòng nấm men C01, C03 và C05 đã được phân lập trên môi trường YPGA khuẩn lạc có hình elip ngắn hoặc dài, kích thước tế bào khoảng 3,2 - 9,1 x 2,1 - 7,3  $\mu\text{m}$ , sinh sản bằng hình thức nảy chồi một hướng hoặc nhiều hướng, có khả năng lên men đường glucose nhưng không lên men sucrose và lactose, không có khả năng phân giải ure và citrate, những mô tả trên theo Lương Đức Phẩm (2009) và các nghiên cứu về nấm men của Sasitorn Jindamorakot và đồng tác giả (2009) thuộc chi nấm men *Hanseniaspora*. Kết quả giải trình tự đã xác định được mẫu C01, C05 thuộc chi nấm men *Hanseniaspora*, mẫu C01 tương đồng 99,81% với trình tự loài *Hanseniaspora opuntiae*, mẫu C05 tương đồng 100% với trình tự loài *Hanseniaspora thailandica*.

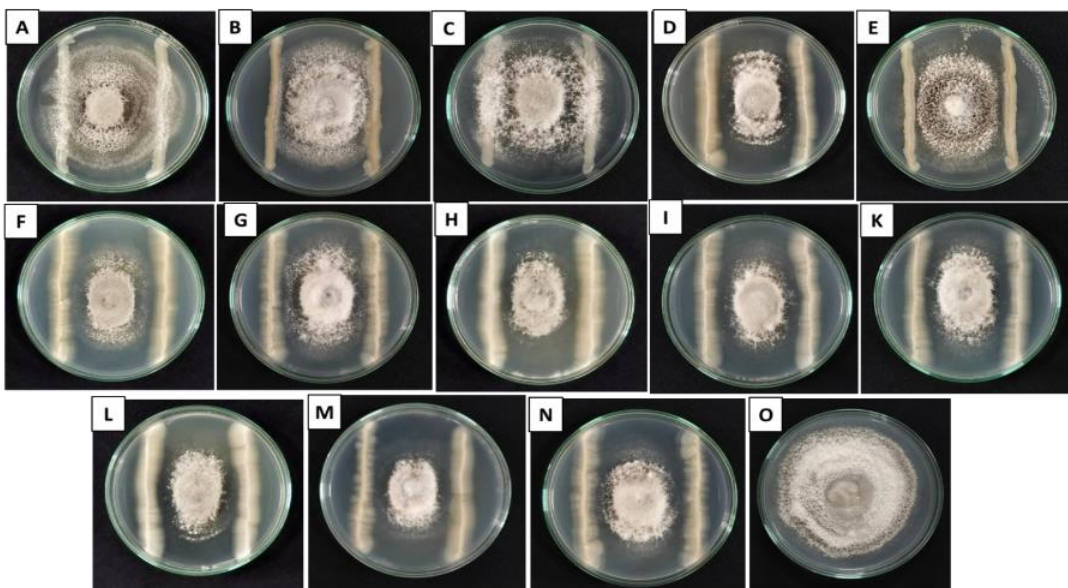
Dòng nấm men C02 khuẩn lạc có hình elip ngắn hoặc dài, kích thước khoảng 2,5 - 10 x 2 - 6  $\mu\text{m}$ , sinh sản bằng cách nảy chồi một hướng, khuẩn lạc có màu trắng, bề mặt xù xì, có khả năng lên men đường glucose, nhưng không thể lên men đường sucrose và lactose, tùy vào từng loài thuộc chi *Pichia* có khả năng phân giải ure và citrate hoặc không thể, kết quả này phù hợp với mô tả về chi nấm men *Pichia* của Kutzman và đồng tác giả (2011). Mẫu C02 sau khi giải trình tự và so sánh độ tương đồng trên NCBI, có độ tương đồng 97,85% với trình tự loài *Pichia barker*. Mẫu C02 là loài *Pichia barker*

Mẫu C07 có hình oval nhỏ (5,33 – 5,00  $\mu\text{m}$ ), sinh sản bằng hình thức nảy chồi một hướng, có khả năng lên men đường glucose và đường sucrose, có thể phân giải ure và citrate, tuy nhiên lại không thể lên men đường lactose. Những mô tả trên phù hợp với mô tả về dòng nấm men *Meyerozyma* của Kutzman và đồng tác giả (2011) đã được tái bản lần thứ 5 đó là nấm men thuộc chi *Meyerozyma* có hình oval hay hình dài, kích thước từ 2 - 6 x 1,5 - 5  $\mu\text{m}$ , sinh sản bằng hình thức nảy chồi một hướng, khuẩn lạc có màu trắng hoặc trắng ngà, trơn hoặc xù xì, có khả năng lên men đường glucose và đường sucrose và có khả năng phân giải ure.

Chi nấm men *Candida* ban đầu được biết đến là loài nấm men gây hại cho con người, tuy nhiên, những năm gần đây, nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng một số loài nấm men thuộc chi *Candida* vẫn đem lại lợi ích cho con người, chủ yếu là những dạng trong việc lên men. Theo Kutzman và đồng tác giả (2011), Lương Đức Phẩm (2009) khuẩn lạc nấm men thuộc chi *Candida* có hình oval nhỏ hoặc lớn, kích thước khoảng 5,8 - 10,8 x 4,3 - 7,2  $\mu\text{m}$ , sinh sản bằng hình thức nảy chồi một hướng, có khả năng lên men đường glucose và sucrose nên được ứng dụng nhiều vào lên men rượu, có khả năng sử dụng citrate hoặc không, không có khả năng lên men đường lactose và phân giải ure, các mô tả trên phù hợp với những đặc điểm hình thái và sinh hóa của các dòng nấm men C04, C06, C08, C09, C10, C11, C12, C13 đã phân lập. Kết quả giải trình tự xác định được dòng nấm men C04 và C10 là loài *Candida tropicalis*.

#### Khả năng đối kháng giữa nấm men và nấm *Colletotrichum gloeosporioides* gây bệnh thán thư trên trái xoài

Trên môi trường PGA, nấm men và nấm *Colletotrichum gloeosporioides* đều sử dụng nguồn dinh dưỡng có trong môi trường làm nguồn năng lượng nuôi sống cơ thể, dẫn đến sự cạnh tranh dinh dưỡng (Rosa và đồng tác giả, 2010). Quan sát kết quả trên đĩa petri cho thấy tất cả các dòng nấm men đều có khả năng ức chế sự phát triển của nấm *Colletotrichum gloeosporioides* được thể hiện dưới Hình 4.



Hình 4. Kết quả đối kháng giữa các dòng nấm men với nấm với nấm *Colletotrichum gloeosporioides* sau 10 ngày chủng

(A) – (N) Các dòng nấm men lần lượt từ C01 đến C13; (O) Đối chứng nấm *Colletotrichum gloeosporioides*.

**Bảng 4. Hiệu suất đối kháng của nấm men đối với nấm *Colletotrichum gloeosporioides* các giai đoạn (NSC: ngày sau chủng)**

Mẫu nấm men	Hiệu suất đối kháng (%)				
	2NSC	4NSC	6NSC	8NSC	10NSC
C01	27,9	28,4	12,2	18,4	27,6
C02	18,6	22,7	16,8	28,6	44,7
C03	30,2	25,0	15,0	28,6	27,2
C04	23,3	27,3	18,7	34,7	54,4
C05	25,6	25,0	12,2	25,9	36,8
C06	23,3	30,7	26,2	34,0	53,0
C07	20,9	28,4	18,7	32,0	50,0
C08	20,9	23,9	17,8	34,7	53,5
C09	18,6	29,6	18,7	33,3	50,0
C10	18,6	25,0	15,0	31,3	49,1
C11	20,9	23,9	15,0	25,9	54,4
C12	27,9	29,6	31,8	40,8	53,5
C13	30,2	28,4	22,4	34,0	54,0

Qua Bảng 4 cho thấy, các dòng nấm men phân lập được từ cỏ xoài cát Hòa Lộc có khả năng ức chế nấm *C. gloeosporioides* gây bệnh thán thư trên trái xoài trong *in-vitro* 10 ngày sau cấy dao động từ 27,6% đến 54,4%. Trong đó trong đó các mẫu C11, C04 đều có hiệu suất đối kháng cao nhất là 54,4%, mẫu C13 có hiệu suất đối kháng là 54%, mẫu C12 và C08 có hiệu suất đối kháng là 53,5%, mẫu C06 có hiệu suất đối kháng là 53%, mẫu C07 và C09 có hiệu suất đạt 50%, mẫu C09 có hiệu suất đối kháng 49,1%, mẫu C02 có hiệu suất đối kháng là 44,7%, mẫu C05 có hiệu suất đối kháng là 36,8% và mẫu C01 và C03 có hiệu suất đối kháng lần lượt là 27,6% và 27,2%. Quan sát trên đĩa cho thấy các dòng nấm men nếu có khả năng đối kháng càng cao với nấm *C. gloeosporioides* thì khi nấm *C. gloeosporioides* tiếp xúc càng gần với nấm men sợi nấm sẽ mọc chậm dần, thưa và không bung, ngược lại nếu nấm men đối kháng yếu, khi nấm *C. gloeosporioides* phát triển gần thì nấm vẫn mọc chậm nhưng sẽ phát triển sang phần nấm men.

## KẾT LUẬN

Từ mẫu trái xoài cát Hòa Lộc thu được sau khi thu hoạch đã phân lập được 13 dòng nấm men và định danh được ba loài nấm men *Hanseniaspora thailandica*, *Hanseniaspora opuntiae* và *Pichia barkeri*, bước đầu đánh giá được loài nấm *Pichia barkeri* (mẫu C02) có khả năng ức chế nấm *C. gloeosporioides* với hiệu suất đối kháng là 44,7%.

**Lời cảm ơn:** Nghiên cứu này được thực hiện với sự hỗ trợ về kinh phí của Trường Đại học Nông Lâm Tp. HCM từ đề tài “Đánh giá khả năng đối kháng của nấm men có trên vỏ xoài cát Hòa Lộc đối với nấm *Colletotrichum gloeosporioides* gây bệnh thán thư” mã số: CS-SV23-KHSH-09. Và sự hỗ trợ về máy móc, trang thiết bị, nhà lưới của Viện Nghiên cứu Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh Nhóm tác giả xin trân trọng cảm ơn.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Aguirre-Güitron L, Calderon-Santoyo M, Lagaron JM, Prieto C, Ragazzo-Sanchez JA (2019). Application of powder formulation of *Meyerozyma caribbica* for postharvest control of *Colletotrichum gloeosporioides* in mango (*Mangifera indica* L.). *LWT*. 113. 108271. 10.1016/j.lwt.2019.108271.
- Aguirre-Güitron L, Calderon-Santoyo M, Lagaron JM, Prieto C, Ragazzo-Sanchez JA (2022). Formulation of the biological control yeast *Meyerozyma caribbica* by electrospraying process: effect on postharvest control of anthracnose in mango (*Mangifera indica* L.) and papaya (*Carica papaya* L.). *J Sci Food Agric*, 102(2), 696-706. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11400>.
- Arauz FL (2000) "Mango anthracnose: Economic impact and current options for integrated management," *Plant disease*, vol. 84, no. 6, pp. 600-611, 2000.
- Chanchaichaovivat A, Panijpan B, Ruenwongsa P (2008). Putative modes of action of *Pichia guilliermondii* strain R13 in controlling chilli anthracnose after harvest. *Biol. Control* 47, 207–215.
- Kefialew Y, Ayalew A (2008). Postharvest biological control of anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) on mango (*Mangifera indica*). *Postharvest Biol. Technol.* 50, 8–11
- Konsue W, Dethoup T, Limtong S (2020). Biological control of fruit rot and anthracnose of postharvest mango by antagonistic yeasts from economic crops leaves. *Microorganisms*, 8(3). <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030317>
- Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T, Robert V (2011). Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts. In Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T (Eds.), *The yeasts: A taxonomic study* (pp. 87-110). *San Diego: Elsevier B.V.*

Lương Đức Phẩm (2009). *Nấm men công nghiệp*. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.

Litz R (1997). *The Mango: Botany, Production and Uses*. CAB International, Wallingford, UK, 1997, p. 7.

Rosa MM, Tauk-Tornisiello SM, Rampazzo PE, Ceccato-Antonini SR (2010). Evaluation of the biological control by the yeast *Torulasporea globosa* against *Colletotrichum sublineolum* in sorghum. *World J. Microb. Biot*, 26: 1491–1502.

## EVALUTION OF THE INHIBITORY ABILITY OF YEAST STRAINS AGAINST *Colletotrichum gloeosporioides* CAUSING ANTHRACNOSE DISEASE ON MANGOES

**Tran Thi Thu Ha<sup>2\*</sup>, Truong Quang Toan<sup>2</sup>, Nguyen Thi Van Khanh<sup>2</sup>, Vu Ngoc Khanh Nhu<sup>2</sup>, Le Ngoc Tuong An<sup>1</sup>, Nguyen Thi Thu Ngan<sup>1</sup>, Banh Huu Tinh<sup>1</sup>, Truong Phuoc Thien Hoang<sup>2</sup>, Dao Uyen Tran Đa<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Faculty of Biological Sciences – Nong Lam University – Ho Chi Minh City

<sup>2</sup> Research Institute for Biotechnology and Environment - Nong Lam University – Ho Chi Minh City

### SUMMARY

The objective of this study is to collect, isolate, and identify certain yeast strains on the Cat Hoa Loc mango peel that have the ability to inhibit the fungus *Colletotrichum gloeosporioides*, which causes anthracnose disease on mangoes post-harvest. In this research, yeast strains isolated from the mango peel were identified using various methods including morphological characteristics, biochemical characteristics, and 26S rDNA sequence analysis. The results identified three yeast species: *Hanseniaspora thailandica*, *Hanseniaspora opuntiae*, and *Pichia barkeri*. Subsequently, the inhibitory capability of these yeast strains against *Colletotrichum gloeosporioides* was tested using a co-culture method under in vitro conditions, showing a high antagonistic rate of over 50% after 10 days of culture. This study initially demonstrates that the use of yeast for biological control is a potential method for controlling pathogens on mangoes post-harvest.

**Keywords:** *Colletotrichum gloeosporioides*, yeast, Cat Hoa Loc mango.

---

\* Author for correspondence: Tel: +84-908913613; Email: tranthithuha@hcmuaf.edu.vn