

PHÂN LẬP VÀ NGHIÊN CỨU NẤM GÂY BỆNH TRÊN CHÔM CHÔM (*NEPHELIUM LAPPACEUM* L.) SAU THU HOẠCH TẠI BẾN TRE

● TRẦN THỤY ÁI TÂM

TÓM TẮT:

Ba loại nấm bệnh được phân lập từ trái chôm chôm nhiễm bệnh bao gồm *Lasiodiplodia* sp., *Fusarium* sp., *Lasmenia* sp.. Các triệu chứng biểu hiện có thể nhận dạng như thối mờ hay thối đen được gọi tắt như bệnh TM và bệnh TD. Tác nhân gây các bệnh thối này chịu ảnh hưởng lớn bởi điều kiện của pH của môi trường nuôi cấy và dòng vi khuẩn đối kháng được phân lập từ phòng thí nghiệm Vi sinh Trường Đại học Tiền Giang khi khảo sát trong điều kiện in vitro. Qua kết quả nghiên cứu cho thấy ở mức pH môi trường nuôi cấy là 4 và 4,5 có thể ức chế nấm gây thối trên chôm chôm. Giữa các dòng nấm gây bệnh và pH môi trường có sự tương tác ở mức ý nghĩa 1%. Kết quả khảo sát sự đối kháng của nấm với 2 dòng vi khuẩn lactic phân lập từ khóm và vi khuẩn *Bacillus subtilis* DG133 cho thấy tất cả các chủng nấm gây bệnh trên chôm chôm sau thu hoạch đều bị ức chế bởi hai dòng vi khuẩn này.

Từ khóa: chôm chôm, nấm gây bệnh sau thu hoạch, pH, vi khuẩn đối kháng.

1. Đặt vấn đề

Chôm chôm (*Nephelium lappaceum* L.) là một cây ăn quả nhiệt đới thơm ngon có giá trị dinh dưỡng cao, chứa các thành phần có lợi cho sức khỏe người tiêu dùng. Hoạt chất acid ellagic trong quả chôm chôm hoạt động như chất chống oxy hóa mạnh, giúp loại bỏ các gốc tự do gây hại cơ thể và phòng ngừa bệnh ung thư. Quả chôm chôm cũng chứa chất đồng và sắt, rất cần thiết để kích thích cơ thể sản sinh các tế bào hồng cầu và bạch cầu. Không chỉ vậy, hàm lượng canxi rất đáng kể trong quả chôm chôm kết hợp với photpho còn giúp củng cố răng và xương thêm chắc khỏe. Tại Tiền Giang, Bến Tre, chôm chôm được trồng nhiều và tập trung ở các xã cù lao trên đất phù sa bồi đắp hàng năm

thuộc huyện Cai Lậy, tỉnh Tiền Giang với tổng diện tích trên 440 ha, năng suất 19 tấn/ha, sản lượng ước tính 8.000 tấn/năm (Cổng thông tin điện tử Tiền Giang, 2019).

Hiện nay, nhu cầu tiêu thụ quả chôm chôm tươi đang tăng nhanh, tuy nhiên, việc kinh doanh tiêu thụ quả chôm chôm tươi luôn gặp nhiều trở ngại bởi nhiều vấn đề sau thu hoạch. Sự mất nước, héo rầu, hóa nâu vỏ quả và bệnh thối phát triển nhanh là những hiện tượng xảy ra phổ biến trên chôm chôm sau thu hoạch. Trong đó, bệnh thối là nguyên nhân chủ yếu ảnh hưởng nghiêm trọng năng suất, chất lượng của chôm chôm sau thu hoạch. Bệnh thối phát triển chỉ trong 2-3 ngày ở điều kiện thường, ngay sau khi thu hoạch và trong 7-10 ngày trong

điều kiện bảo quản lạnh (Kader, 2002; Đỗ Minh Hiền và Thái Thị Hòa, 2006). Do đó, đề tài được thực hiện nhằm kiểm soát bệnh thối sau thu hoạch, giúp hoàn thiện quy trình bảo quản sau thu hoạch cho chôm chôm, đáp ứng yêu cầu các thị trường tiêu thụ.

2. Nguyên liệu và phương pháp

2.1. Nguyên liệu

Chôm chôm Java đạt độ chín thương mại được thu tại xã Tân Phong, huyện Cai Lậy, tỉnh Bến Tre.

Các hóa chất dùng cho phân lập và xác định các chủng nấm gây bệnh trên quả chôm chôm: môi trường PDA (potato dextrose agar), cồn, acid HCl, NaOH.

Các dụng cụ nuôi cấy: que cấy, đèn cồn, đĩa petri, dao, ống nghiệm, ống đong, thước đo kỹ thuật, cân kỹ thuật, nồi Auto clave, tủ sấy, máy xử lý nước nóng, tủ cấy, bếp điện,... khay nhựa chuyên dùng để nuôi cấy kiểm chứng tác nhân gây bệnh theo nguyên lý Koch.

2.2. Phương pháp

- *Xác định bệnh và phân lập các tác nhân gây thối chủ yếu trên chôm chôm sau thu hoạch*

Xác định triệu chứng bệnh trên chôm chôm sau thu hoạch: Chôm chôm khi đạt đến độ chín thương mại, được thu hoạch từ các vườn mang về phòng thí nghiệm trữ ở điều kiện phòng và tiến hành quan sát, ghi nhận triệu chứng bệnh. Mẫu chôm chôm có triệu chứng bệnh đặc trưng sẽ được mang đi phân lập.

Phân lập: mẫu nấm bệnh được phân lập từ quả chôm chôm sau thu hoạch trên đĩa bần tỉnh Bến Tre và được nuôi cấy trên môi trường PDA ủ ở nhiệt độ phòng trong 7 ngày (Theo Burgess L.W. et al 2009).

Kiểm chứng tác nhân gây bệnh theo quy trình Koch.

Chôm chôm được rửa trong nước cất, sau đó xử lý với cồn để khử trùng trước khi chủng nấm. Các dụng cụ đựng mẫu đều được tiệt trùng, thao tác thí nghiệm được thực hiện trong tủ cấy vô trùng. Nấm phân lập được kiểm chứng có độ tuổi sinh trưởng 5 ngày trong môi trường nuôi cấy. Mẫu lây nhiễm (chôm chôm) sau đó được đặt trong hộp nhựa có độ ẩm cao 90-95% và ủ ở nhiệt độ phòng. Nấm

bệnh phát triển trên chôm chôm được quan sát định kỳ với triệu chứng bệnh được ghi nhận trước đó trên trái.

Định danh: các chủng nấm phân lập được sau khi được kiểm chứng qua quy trình Kock và khảo sát sự sinh trưởng và phát triển của những dòng vi sinh vật đặc trưng trong điều kiện môi trường khác nhau sẽ được gửi mẫu đi định danh bằng phương pháp sinh học phân tử (Santos, J.M. and Phillips, A.J.L. 2009) với các bước như sau: ly trích DNA, giải trình tự và sau đó sử dụng phần mềm Blast N để so sánh trình tự gene tại vị trí 28s rRNA trong NCBI (National Center for Biotechnology Information).

- *Đánh giá ảnh hưởng của pH môi trường và dòng vi khuẩn đối kháng đến sự phát triển của nấm gây thối trên trái chôm chôm trong điều kiện invitro*

Thí nghiệm 1: Đánh giá sự phát triển của các dòng nấm gây bệnh thối trên trái chôm chôm trong các điều kiện pH khác nhau. Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên 2 nhân tố. Nhân tố A các dòng nấm gây bệnh: nghiệm thức của nhân tố này được chọn từ nội dung 1: Xác định bệnh và phân lập các nấm gây bệnh chủ yếu trên chôm chôm sau thu hoạch. Nhân tố B (pH môi trường nuôi cấy: với 3 nghiệm thức pH4; pH4,5; pH 5).

Thí nghiệm 2: Khảo sát khả năng ức chế của các vi khuẩn đã được phân lập và trữ giống tại Trường ĐH Tiền Giang lên sự phát triển của các dòng nấm gây bệnh thối trên trái chôm chôm trong điều kiện invitro. Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên 1 nhân tố dòng vi khuẩn đối kháng. Sử dụng 2 dòng vi khuẩn *Bacillus subtilis* DG133 và dòng vi khuẩn lactic được phân lập trên xoài tại phòng thí nghiệm vi sinh Trường Đại học Tiền Giang. Khi vi khuẩn trên khối thạch có khả năng hình thành hoạt chất đối kháng thì vi khuẩn sẽ ức chế sự phát triển của nấm và tạo vòng vô khuẩn xung quanh khối thạch.

- *Phân tích số liệu*

Các số liệu khảo sát thu thập được xử lý bằng phần mềm SPSS 20.0. Phân tích phương sai (ANOVA) để phát hiện sự khác biệt giữa các nghiệm thức và dùng kiểm định Tukey ở mức ý nghĩa 1% để so sánh các giá trị trung bình.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Xác định bệnh và phân lập các tác nhân gây thối chủ yếu trên chôm chôm sau thu hoạch

Hai triệu chứng thối đặc trưng được quan sát trên mẫu chôm chôm bệnh sau thu hoạch đó là thối mờ và thối đen (phân bố ở chân râu hay rải rác trên bề mặt vỏ trái), đã phân lập được 5 chủng nấm thể hiện 5 triệu chứng đặc trưng gây thối trên chôm chôm. Đặc điểm khuẩn ty, hình dạng khuẩn lạc, triệu chứng gây thối trên trái chôm chôm được quan sát và mô tả ở Bảng 1. Với thối đen có 2 nhóm nấm gây ra như *Fusarium sp.*, *Lasmenia sp.*, còn với thối mờ hầu như chỉ có nấm *Lasiodiplodia sp.* gây nên. Kết quả định danh cho thấy, các nấm gây bệnh thối trên chôm chôm là: *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, *Fusarium equiseti* và *Lasmenia sp.*. Đã có rất nhiều nghiên cứu trong và ngoài nước cho thấy rằng các tác nhân đã phân lập trong nghiên cứu này là nguyên nhân gây thối trên chôm chôm sau thu hoạch như Jeewon (2004), Phillips (2007), Abdollahzadeh et al. (2010), Lisa Keith et al. (2011) Serrato - Diazl et al. (2011, 2013), Lombard et al. (2014) và Thạch Thị Ngọc Yến và Nguyễn Văn Phong (2016). Điều này chứng tỏ mặc dù nguồn gốc chôm chôm thu thập cho thí nghiệm này thì khác với chôm chôm trong nghiên cứu của các tác giả

trên nhưng đa số các tác nhân gây bệnh thối sau thu hoạch trên chôm chôm là như nhau. (Bảng 1)






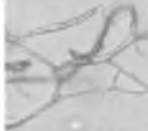



3.2. Ảnh hưởng của pH môi trường và dòng vi khuẩn đối kháng đến sự phát triển của nấm gây thối trên trái chôm chôm trong điều kiện invitro

Ảnh hưởng của pH môi trường lên sự phát triển của các dòng nấm gây bệnh thối trên trái chôm chôm.

Kết quả đánh giá ảnh hưởng của pH lên sự sinh trưởng và phát triển nấm gây bệnh trên trái chôm chôm sau thu hoạch sau 4 ngày nuôi cấy trong điều kiện invitro được thể hiện trong Bảng 2. Kết quả trong Bảng 2 cho thấy, sau 4 ngày nuôi cấy, trung bình đường kính khuẩn lạc nấm gây bệnh trên chôm chôm sau thu hoạch ở các giá trị pH khác nhau khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa 1%. Trong đó, trung bình đường kính khuẩn lạc của các dòng nấm ở pH đối chứng và pH5 là cao nhất (6,95cm), kế đến là pH4.5 (6,60cm) và thấp nhất là trung bình đường kính khuẩn lạc của các nấm gây bệnh ở pH4 (6,51cm). Kết quả ban đầu cho thấy, có thể dùng điều kiện pH môi trường để ức chế sự phát triển của nấm gây bệnh thối sau thu hoạch trên chôm chôm.

Kết quả trong Bảng 2 cũng cho thấy ở các pH khác nhau, trung bình đường kính của các khuẩn lạc nấm gây bệnh thối trên chôm chôm sau thu hoạch cũng khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 1%. Sau

Bảng 1. Triệu chứng bệnh thối trên trái, hình dạng khuẩn lạc, hình dạng tế bào và kết quả định danh của các dòng nấm gây bệnh thối sau thu hoạch trên chôm chôm

STT	Mô tả triệu chứng bệnh	Kết quả định danh	Triệu chứng trên trái	Khuẩn lạc nấm	Hình dạng tế bào
1	Vết bệnh màu đen, ướt, không có hình dạng nhất định	<i>Fusarium equiseti</i> (839, 100%)			
2	Vết bệnh không đồng nhất, màu đen, vết sau lan rộng và nhũn nước	<i>Lasmenia sp.</i> (233, 100%)			
3	Vết bệnh tròn đều, ban đầu màu nâu nhạt sau chuyển sang màu đen, khô	<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i> (869, 100%)			

Bảng 2. Ảnh hưởng của pH đến đường kính sinh trưởng của nấm (cm) gây thối quả chôm chôm sau 4 ngày

Chủng nấm	Ph				Trung bình (B)
	ĐC	5	4,5	4	
<i>Fusarium</i> sp.	3,47± 0,15	3,47± 0,15	2,57± 0,06	2,97± 0,15	2,96 ^c
<i>Lasmenia</i> sp.	4,27± 0,21	4,27± 0,30	3,43± 0,31	2,60± 0,17	3,58 ^b
<i>Lasiodiplodia</i> sp. (1)	9,00± 0,00	9,00± 0,00	9,00± 0,00	9,00± 0,00	9,00 ^a
<i>Lasiodiplodia</i> sp. (2)	9,00± 0,00	9,00± 0,00	9,00± 0,00	9,00± 0,00	9,00 ^a
<i>Lasiodiplodia</i> sp. (3)	9,00± 0,00	9,00± 0,00	9,00± 0,00	9,00± 0,00	9,00 ^a
Trung bình(A)	6,95 ^a	6,95 ^b	6,60 ^c	6,51 ^c	
F	F(A)**	F(B)**	F(A)*F(B)**		
CV(%)	1.94				

Ghi chú: Các giá trị trong bảng là giá trị trung bình và sai số chuẩn. Các giá trị trong cùng một cột có chứa các ký tự giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa ($p>0,01$). Các giá trị trong cùng một cột có chứa các ký tự khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa ($p<0,01$). **: khác biệt ý nghĩa 1%.

96 giờ nuôi cấy, đường kính trung bình của khuẩn lạc nấm gây bệnh thối lan mờ do chủng *Lasiodiplodia* sp. (1,2,3) là cao nhất (9,00cm) và thối đen theo vết do chủng *Lasmenia* sp. gây ra (3,58cm) phát triển ở mức trung bình và thấp nhất là bệnh thối đen theo vết do chủng *Fusarium* sp. gây ra (2,96cm).

Từ kết quả thí nghiệm cho thấy có sự tương tác giữa các dòng nấm gây bệnh thối trên chôm chôm ở mức ý nghĩa 1% với các mức pH môi trường nuôi cấy. Qua đó có thể chọn pH4, pH4.5 tiến hành các thí nghiệm tiếp theo để khảo sát khả năng ức chế nấm gây thối trên chôm chôm sau thu hoạch trong điều kiện thực tế bảo quản.

3.3. Khả năng ức chế của các vi khuẩn đã được phân lập và trừ giống tại Trường Đại học Tiền Giang lên sự phát triển của các dòng nấm gây bệnh thối trên trái chôm chôm trong điều kiện invitro

Kết quả quá trình khảo sát sự ức chế của vi khuẩn đối kháng ở Bảng 3 cho thấy, trong cùng một điều kiện nuôi cấy, môi trường nuôi cấy như nhau, sau 24 giờ nuôi cấy, những dòng nấm *Lasiodiplodia* sp. phát triển rất mạnh trên môi trường PDA. Khi cấy bổ sung vi khuẩn *Bacillus subtilis* DG133 và vi khuẩn Lactic được phân lập từ nhóm các khuẩn ty

nấm bị ức chế rõ rệt tạo (Bảng 3). Sau 72 giờ nuôi cấy, đây là thời điểm các dòng nấm bệnh phát triển vừa và mạnh trên môi trường PDA, tuy nhiên các nghiệm thức có chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* DG133 và vi khuẩn Lactic đều cho thấy nấm bệnh kém phát triển và tạo nên vòng kháng khuẩn. Mặc dù khả năng đối kháng chưa được khảo sát chi tiết nhưng dựa trên những ghi nhận trong thí nghiệm này có thể làm cơ sở cho các thí nghiệm tiếp theo.

Qua kết quả thí nghiệm cho thấy cả 2 nhóm *Bacillus subtilis* DG133 và vi khuẩn Lactic trên nhóm đều có khả năng ức chế các dòng nấm gây bệnh trên chôm chôm sau thu hoạch, đây là cơ sở để khảo sát sâu hơn sự đối kháng của vi khuẩn và nấm gây bệnh trên chôm chôm sau thu hoạch.

4. Kết luận

Tác nhân gây bệnh thối trên chôm chôm sau thu hoạch ở tỉnh Bến Tre là do các dòng nấm: *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, *Lasmenia* sp., và *Fusarium equiseti* gây ra.

Ở mức pH môi trường thấp 4; 4,5 nấm gây bệnh trên chôm chôm sau thu hoạch bị ức chế, riêng dòng *Lasiodiplodia pseudotheobromae* vẫn phát triển mạnh trong điều kiện pH thấp. Đây là cơ sở để nghiên cứu môi trường bảo quản chôm chôm sau thu hoạch.

Bảng 3. Khả năng ức chế của các dòng vi khuẩn lên sự phát triển của nấm gây thối trên chôm chôm sau thu hoạch

Chủng nấm	Vi khuẩn <i>Bacillus subtilis</i> DG133		Vi khuẩn Lactic trên xoài		Đôi chứng
	24h	72h	24h	72h	
<i>Fusarium</i> sp.					
<i>Lasmenia</i> sp.					
<i>Lasiodiplodia</i> sp. (1)					
<i>Lasiodiplodia</i> sp. (2)					
<i>Lasiodiplodia</i> sp. (3)					

Giữa có dòng nấm gây bệnh thối sau thu hoạch trên chôm chôm và pH môi trường nuôi cấy có sự tương tác có ý nghĩa ở mức 1%.

Hai dòng vi khuẩn *Bacillus subtilis* DG133 và vi khuẩn Lactic phân lập từ khóm có khả năng ức chế các dòng nấm gây bệnh thối sau thu hoạch trên chôm chôm tạo được vòng vô khuẩn. Trong đó,

dòng *Lasiodiplodia pseudotheobromae* phát triển tốt nhất.

Trong ba dòng nấm mộc phân lập được dòng *Lasiodiplodia pseudotheobromae* có sức sống mạnh nhất, có khả năng thích nghi với điều kiện pH thấp và điều kiện nuôi cấy có sự cạnh tranh và đối kháng của dòng vi sinh vật khác ■

TÀI LIỆU THAM KHẢO:

1. Abdollahzadeh J., A. Javadi, E. Mohammadi Goltapeh, R. Zare, A.J.L. Phillips. (2010). Phylogeny and morphology of four new species of *Lasiodiplodia* from Iran. *Persoonia*, 25, 1 - 10.
2. Cục Trồng trọt (2011). *Hiện trạng và giải pháp phát triển sản xuất, tiêu thụ cây ăn trái Nam Bộ trong thời gian tới*. Hội Nghị lần thứ hai. Hiện trạng sản xuất và tiêu thụ cây ăn trái ở Nam Bộ và giải pháp phát triển các vùng cây ăn trái tập trung theo VietGAP tại Tiền Giang 24/5/2011. Nhà xuất bản Nông nghiệp, trang 91 - 108.
3. Farungsang, U., N. Farungsang, and S. Sangchote. (1991). Postharvest diseases of rambutan during storage. 8th Australian Plant Pathological Society Conference (Abstract), p. 114. Jeewon, R., Liew, E.C.Y. and Hyde K.D. (2004). Phylogenetic evaluation of species nomenclature of *Pestalotiopsis* in relation to host association. *Fungal Diversity*, 17, 39 - 55.

4. Keith, L.M., Matsumoto Brower, T.K., Nishijima, K.A., Wall, M.M., Nagao, M. (2011). Field survey and fungicide screening of fungal pathogens of rambutan (*Nephelium lappaceum*) fruit rot in Hawaii. *HortScience*, 46, 730 - 735.
5. Nguyễn Thị Tuyền (2013). *Giám định bệnh sau thu hoạch do nấm trên trái thanh long*, Luận văn tốt nghiệp kỹ sư ngành Bảo vệ thực vật, Trường Đại học Cần Thơ.
6. Phillips, A. J. L. Key to the various lineages in “Botryosphaeria” Version 01 2007. Retrieved from http://www.crem.fct.unl.pt/botryosphaeria_site/key.htm, 26.
7. Thạch Thị Ngọc Yến, Nguyễn Văn Phong (2016). Nghiên cứu tác nhân gây bệnh thối quả chôm chôm (*Nephelium lappaceum* L.) sau thu hoạch ở đồng bằng sông Cửu Long. *Tạp chí KH Nông nghiệp Việt Nam* 2016, tập 14 số 12: 1868-1873.

Ngày nhận bài: 8/3/2022

Ngày phản biện đánh giá và sửa chữa: 8/4/2022

Ngày chấp nhận đăng bài: 16/4/2022

Thông tin tác giả:

ThS. TRẦN THUY ÁI TÂM

Trường Đại học Tiền Giang

ISOLATION AND STUDY ON POSTHARVEST ROT DISEASE CAUSING ON RAMBUTAN (*NEPHELIUM LAPPACEUM* L.) IN BEN TRE PROVINCE

● MSc. **TRAN THUY AI TAM**

Tien Giang University

ABSTRACT:

Three fungal pathogens were isolated from infected rambutan fruits, including *Lasiodiplodia* sp., *Fusarium* sp., *Lasmenia* sp. Identified symptoms are fuzzy rot and black rot which are also known as TM disease and TD disease, respectively. These diseases are greatly influenced by the pH conditions of the culture medium and the antagonistic bacteria strains which are isolated from the Microbiology laboratory of Tien Giang University when investigated in vitro. Research results show that when the pH level of culture medium is at 4 and 4.5, it can inhibit fungi causing rot on rambutan. There is an interaction between pathogenic fungal strains and environmental pH at 1% significance level. The results of the investigation of the antagonism of fungi with two strains of lactic acid bacteria isolated from pineapple and *Bacillus subtilis* DG133 show that all strains of fungi causing disease on rambutan after harvest were inhibited by these two strains.

Keywords: rambutan, post-harvest pathogenic fungi, pH, antagonistic bacteria.