

KHẢ NĂNG KHÁNG NẤM *Fusarium solani* GÂY BỆNH TRÊN CÀ CHUA SAU THU HOẠCH CỦA DỊCH CHIẾT LÁ VÀ HẠT XOAN (*Melia azedarach*)

TÓM TẮT

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá khả năng ức chế sự sinh trưởng và phát triển của nấm mốc gây bệnh thối hồng trên cà chua của dịch chiết lá và hạt xoan (*Melia azedarach* L.). Chất kháng nấm từ lá và hạt xoan được chiết xuất bằng dung môi ethanol, bao gồm dịch chiết lá không tách dung môi (LEO), dịch chiết lá đã tách dung môi (LE) và dịch chiết nhân hạt xoan (NE). Dựa trên khả năng ức chế sự phát triển đường kính tàn nấm (ĐKTN) và sinh khối nấm của các loại dịch chiết ở các nồng độ khảo sát khác nhau (0 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 20 mg/ml, 40 mg/ml và 80 mg/ml), kết quả nhìn chung cho thấy dịch chiết NE có khả năng kháng nấm cao nhất, kế đến là dịch chiết LEO và cuối cùng là dịch chiết LE. Nồng độ ức chế hiệu quả 50% sự phát triển ĐKTN (Effective Concentration, EC₅₀) của các dịch chiết LEO, LE và NE đạt lần lượt là 15,55 mg/ml, 18,95 mg/ml và 14,15 mg/ml. Đối với sinh khối nấm, giá trị EC₅₀ của các dịch chiết LEO, LE và NE đạt lần lượt là 8,45 mg/ml, 11,25 mg/ml và 7,41 mg/ml. Nghiên cứu này mở ra triển vọng cho việc ứng dụng các hoạt chất kháng nấm có nguồn gốc tự nhiên trong sản xuất nông nghiệp.

Từ khóa: *Fusarium solani*, kháng nấm, lá xoan, *Melia azedarach*

1. MỞ ĐẦU

Trong các loài thuộc chi *Fusarium* gây thối quả cà chua sau thu hoạch, *F. solani* được ghi nhận là loài điển hình, chiếm 34%. Các sợi nấm *F. solani* có thể dễ dàng thâm nhập sâu vào trái cây thông qua các vết thương, hệ sợi nấm mở rộng vào trung tâm của quả, giảm nhanh độ cứng, các mô bị mục nát, sũng ướt và bị bao phủ bởi hệ sợi nấm màu trắng (Abu Bakar và cs., 2013). Trong sản xuất nông nghiệp, điều kiện môi trường nóng ẩm kết hợp với điều kiện bảo quản lạc hậu sẽ tạo điều kiện lý tưởng cho sự bùng phát của nấm mốc và sự sinh độc tố của nấm (Cotty và cs., 1994). Để phòng trừ bệnh thối trên cà chua do *F. solani* gây ra, cần có một phương thức phòng trừ bệnh sao cho vừa đạt hiệu quả kháng nấm cao, vừa đảm bảo được chất lượng vệ sinh an toàn thực phẩm và thân thiện với môi trường.

Melia azedarach (*M. azedarach*) L. thuộc họ Meliaceae, có tên địa phương là sấu đầu, sấu đông hoặc xoan. Nó khác một loại cây dược liệu giống *Azadirachta indica* (*A. indica*) A. juss (còn được gọi là Neem, Margose) cũng thuộc họ Meliaceae có nguồn gốc Ấn Độ. Mỗi phần của *M. azedarach* đều có các tính chất dược liệu tương tự *A. indica* và vì vậy chúng cũng được khai thác ứng dụng trong trị liệu (Khan và cs., 2011). Các bộ phận của cây neem đã được khoa học chứng minh về khả năng kháng bệnh ngoài da, kháng nấm, kháng côn trùng, giảm tính ăn của sâu bọ (Khan và cs., 2011; Asadujjaman và cs., 2013). Tuy nhiên, hoạt tính kháng nấm của cây xoan vẫn chưa được nghiên cứu nhiều. Do đó, nghiên cứu này nhằm đánh giá khả năng ức chế sự sinh trưởng và phát triển của nấm bệnh *F. solani* gây hại cà chua sau thu hoạch của dịch chiết lá và nhân hạt xoan dựa trên đường kính tàn nấm và sinh khối của chúng khi được nuôi cấy trên các môi trường có bổ sung các nồng độ dịch chiết khác nhau.

2. ĐỐI TƯỢNG, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

- Nấm *Fusarium solani*: được cung cấp bởi phòng thí nghiệm vi sinh, khoa Cơ khí – Công nghệ, trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế. Nấm đã được phân lập từ mẫu cà chua bị bệnh thối hồng. Nấm *F. solani* được nuôi cấy trên môi trường PDA (Potato Dextrose Agar) và PDB. Một lít môi trường có chứa 20 g dextrose, 20 g agar và nước luộc của 250 g khoai tây

trắng, bổ sung nước cất vừa đủ. Môi trường PDB (Potato Dextrose Broth) có thành phần tương tự môi trường PDA nhưng không có chứa agar.

- Lá và hạt xoan: Lá và hạt xoan tươi được thu hái từ cây xoan (*Melia azedarach*) tại thành Phố Huế, tỉnh Thừa Thiên Huế.

2.2. Nội dung nghiên cứu

Đánh giá khả năng kháng nấm *F. solani* ở điều kiện in vitro của dịch chiết lá xoan và hạt xoan trong dung môi ethanol ở các nồng độ khác nhau, bao gồm dịch chiết đã loại dung môi và dịch chiết chưa loại dung môi, dựa trên sự theo dõi của sự phát triển đường kính và hình thái tản nấm theo thời gian và sinh khối nấm *F. solani*.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Thu nhận dịch chiết lá và hạt xoan

Các hoạt chất kháng nấm của lá và hạt xoan được chiết xuất bằng dung môi ethanol. Đối với lá, dịch chiết có thể được loại bỏ hoặc không loại bỏ dung môi trước khi sử dụng để khảo sát khả năng kháng nấm của nó. Đối với dịch chiết hạt, dung môi được loại bỏ hoàn toàn.

- Dịch chiết lá xoan không loại dung môi: Lá xoan sau khi hái được rửa sạch, sau đó rửa lại bằng cồn và nước cất đã tiệt trùng, để ráo. Cho 50 g lá xoan đã rửa sạch, nghiền nhỏ trong cối vô trùng vào 100 ml dung môi ethanol hoặc methanol trong bình tam giác 250 ml. Ngâm, lắc kỹ hỗn hợp trong 12 giờ bằng máy lắc. Thu dịch chiết bằng cách ly tâm (4000 rpm/phút, nhiệt độ phòng). Dịch chiết lá xoan không loại dung môi ethanol (LEO) có nồng độ 50% (w/v) được bảo quản ở 4°C đến khi sử dụng (không quá 2 ngày) (Mondall và cs., 2009).

- Dịch chiết có loại dung môi: Các bước thực hiện tương tự như quy trình chiết lá xoan không loại dung môi. Tuy nhiên, quá trình ngâm lắc được lặp lại 3 lần, mỗi lần 12 giờ. Dịch chiết tổng số được đem loại dung môi bằng thiết bị cô quay chân không ở 50°C đến khối lượng không đổi, thu được dịch chiết lá xoan đã loại ethanol (LE), bảo quản ở 4°C đến khi sử dụng (không quá 2 ngày) (Vũ Đăng Khánh, 2003).

- Thu nhận dịch chiết hạt xoan: Hạt xoan sau khi thu hái về được rửa sạch, rửa lại bằng nước cất, sấy khô trong 2 giờ ở 60°C. Tách vỏ, rửa nhân hạt trong nước cất vô trùng và sấy khô ở 60°C trong 24 giờ đến khối lượng không đổi. Sau khi sấy khô, nghiền nhân hạt trong cối vô trùng, thu bột nhân hạt xoan. Cho 50 g bột nhân hạt xoan vào bình tam giác có chứa 100 ml dung môi hexan, ngâm và lắc hỗn hợp trong 12 giờ, 250 vòng/phút. Loại bỏ dịch chiết bằng cách lọc, lặp lại 3 lần, thu lấy bã. 100 ml dung môi ethanol được cho vào phần bã thu được, ngâm và lắc (250 vòng/phút) hỗn hợp trong 24 giờ, lọc lấy dịch chiết. Quá trình trên được lặp lại 3 lần. Dịch chiết tổng số được đem loại dung môi ethanol bằng thiết bị cô quay chân không ở nhiệt độ 50°C cho đến khối lượng không đổi, thu được dịch chiết nhân hạt xoan (NE), bảo quản ở 4°C đến khi sử dụng (không quá 2 ngày) (Vũ Đăng Khánh, 2003).

2.3.2. Đánh giá ảnh hưởng của các loại dịch chiết đến sự sinh trưởng và phát triển của nấm mốc *F. solani*

Pha loãng dịch chiết ban đầu (50% w/v) thành các dịch chiết có nồng độ thấp hơn bằng nước cất tiệt trùng đến các nồng độ khảo sát khác nhau: 0 mg/ml (đối chứng), 5 mg/ml, 10 mg/ml, 20 mg/ml, 40 mg/ml, 80 mg/ml được sử dụng để khảo sát khả năng ức chế sinh trưởng và phát triển của nấm *F. solani* dựa trên quá trình theo dõi sự phát triển ĐKTN và sinh khối nấm. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần cho mỗi loại dịch chiết khác nhau.

- Sự phát triển ĐKTN của nấm mốc *F. solani*

Cho 20 ml môi trường PDA có bổ sung các loại dịch chiết LEO, LE và NE ở các nồng độ nêu trên vào đĩa Petri đường kính 9 cm, mỗi nồng độ thực hiện trên 3 đĩa. Dùng dụng cụ đục lỗ kiểu nút chai lấy một tản nấm có đường kính 4 mm từ mép rìa của khuôn lạc nấm *F. solani* sau 7 ngày nuôi cấy ở 28°C đặt vào tâm đĩa. Ủ đĩa ở 28°C, đánh giá ảnh hưởng của dịch chiết đến sự phát triển của nấm *F. solani* dựa trên hình thái và ĐKTN (mm). Hiệu lực ức chế, được tính theo tỷ lệ ức chế tốc độ phát triển của ĐKTN sau 7 ngày nuôi cấy. $HLUC (\%) = [(\text{ĐKTN ở công thức đối chứng} - \text{ĐKTN ở công thức thí nghiệm}) / \text{ĐKTN ở công thức đối chứng}] \times 100$ (Al-Hetar và cs., 2010).

- Sự phát triển sinh khối của nấm mốc *F. solani*

Cho 20 µl huyền phù bào tử nấm *F. solani* vào các bình tam giác có chứa 30 ml môi trường PDB (Potato Dextrose Broth) có bổ sung các dịch chiết LEO, LE và NE ở các nồng độ khảo sát. Nuôi ở 28°C, lắc 180 vòng/phút trong 7 ngày, thu sinh khối nấm bằng cách lọc qua giấy lọc, sấy ở 55°C đến khối lượng không đổi. $HLUC (\%) = [(\text{Sinh khối nấm ở công thức đối chứng} - \text{Sinh khối nấm ở công thức thí nghiệm}) / \text{Sinh khối nấm ở công thức đối chứng}] \times 100$ (Al-Hetar và cs., 2010).

2.2.3. Phương pháp xử lý số liệu

Kết quả thí nghiệm được phân tích phương sai một nhân tố ANOVA (Anova single factor) và so sánh các giá trị trung bình bằng kiểm định DUNCAN (Duncan's Multiple Range Test) trên phần mềm thống kê SAS, phiên bản 9.13 chạy trên môi trường Windows.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

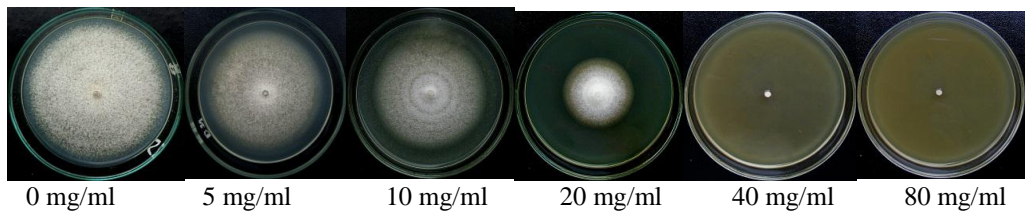
3.1. Khả năng ức chế sự phát triển ĐKTN *F. solani* của dịch chiết lá và hạt xoan

Qua thời gian quan sát sự phát triển ĐKTN của *F. solani* để xác định tính kháng nấm mốc của dịch chiết lá và hạt xoan, chúng tôi nhận thấy rằng, cả dịch chiết lá và hạt đều có ảnh hưởng tích cực trong việc làm giảm khả năng sinh trưởng và phát triển của nấm. Kết quả theo dõi ĐKTN và hình thái tản nấm liên tục trong 7 ngày được ghi nhận ở các bảng 1, bảng 2, bảng 3 và hình 1, hình 2, hình 3 tương ứng với dịch chiết LEO, LE và NE.

Bảng 1. Ảnh hưởng của dịch chiết LEO ở các nồng độ khác nhau đến sự phát triển ĐKTN *F. solani*

| Nồng độ dịch chiết LEO (mg/ml) | Đường kính tản nấm (mm) | | | | | | | HLUC sau 168 giờ, % |
|--------------------------------|-------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|
| | Ngày 1 | Ngày 2 | Ngày 3 | Ngày 4 | Ngày 5 | Ngày 6 | Ngày 7 | |
| 0 (ĐC) | 12,07 ^a | 23,99 ^a | 37,07 ^a | 51,18 ^a | 61,52 ^a | 77,55 ^a | 89,62 ^a | 0,00 ^a |
| 5 | 6,11 ^b | 16,80 ^b | 34,26 ^b | 42,72 ^b | 54,54 ^b | 66,54 ^b | 74,02 ^b | 17,41 ^b |
| 10 | 0,00 ^c | 12,51 ^c | 28,82 ^c | 38,70 ^c | 46,25 ^c | 61,43 ^c | 67,05 ^c | 25,18 ^c |
| 20 | 0,00 ^c | 9,43 ^d | 18,44 ^d | 23,03 ^d | 29,51 ^d | 38,14 ^d | 43,59 ^d | 51,36 ^d |
| 40 | 0,00 ^c | 0,00 ^e | 0,00 ^e | 0,00 ^e | 0,00 ^e | 0,00 ^e | 0,00 ^e | 100 ^e |
| 80 | 0,00 ^c | 0,00 ^e | 0,00 ^e | 0,00 ^e | 0,00 ^e | 0,00 ^e | 0,00 ^e | 100 ^e |

Ghi chú: Các giá trị trung bình ĐKTN theo cột có cùng chữ cái in thường là không sai khác ở mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$



Hình 1. Hình thái nấm *F. solani* sau 7 ngày nuôi cấy ở 28°C với sự có mặt của dịch chiết LEO trong môi trường PDA ở các nồng độ khác nhau

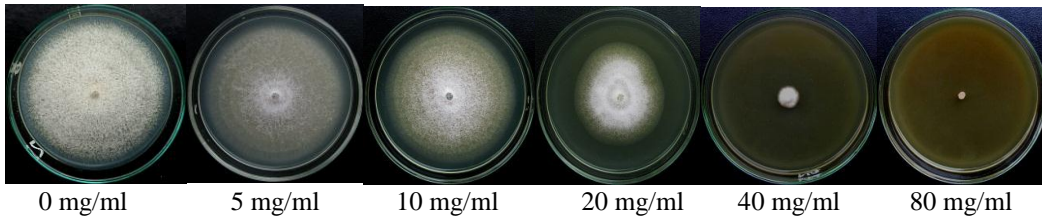
Dịch chiết LEO có ảnh hưởng mạnh đến ĐKTN *F. solani*. ĐKTN trung bình ở các nồng độ sau khi xử lý số liệu đều sai khác có ý nghĩa thống kê tại các thời điểm quan sát, ngoại trừ ở ngày 1. Tốc độ phát triển ĐKTN chậm hơn ở các đĩa có chất kháng nấm LEO, nồng độ càng cao, tốc độ phát triển càng chậm. Nấm bị ức chế hoàn toàn trong suốt quá trình theo dõi ở nồng độ 40 mg/ml và 80 mg/ml.

Với dịch chiết đã loại dung môi ethanol, LE, xu hướng ức chế sự phát triển của nấm *F. solani* tương tự với tác dụng của dịch chiết LEO. Tức là, nồng độ dịch chiết tỷ lệ thuận với khả năng kìm hãm sự phát triển của nấm. Tuy nhiên, nhìn chung, khả năng ức chế sự sinh trưởng lên nấm *F. solani* của dịch chiết LE yếu hơn so với dịch chiết LEO ở cùng nồng độ. Nấm chỉ bị đình chỉ sự sinh trưởng ở nồng độ khảo sát cao nhất, 80 mg/ml.

Bảng 2. Ảnh hưởng của dịch chiết LE ở các nồng độ khác nhau đến sự phát triển ĐKTN *F. solani*

| Nồng độ dịch chiết LE (mg/ml) | Đường kính tán nấm (mm) | | | | | | | HLUC sau 168 giờ, % |
|-------------------------------|-------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|
| | Ngày 1 | Ngày 2 | Ngày 3 | Ngày 4 | Ngày 5 | Ngày 6 | Ngày 7 | |
| 0 (ĐC) | 12,07 ^a | 23,99 ^a | 37,07 ^a | 51,18 ^a | 61,52 ^a | 77,55 ^a | 89,62 ^a | 0,00 ^a |
| 5 | 11,70 ^b | 23,35 ^b | 36,15 ^b | 50,60 ^b | 60,65 ^b | 73,69 ^b | 78,73 ^b | 12,15 ^b |
| 10 | 10,86 ^c | 22,56 ^c | 31,47 ^c | 45,61 ^c | 54,07 ^c | 64,02 ^c | 74,71 ^c | 16,63 ^c |
| 20 | 8,33 ^d | 15,79 ^d | 22,56 ^d | 28,95 ^d | 38,18 ^d | 46,77 ^d | 50,06 ^d | 44,14 ^d |
| 40 | 0,00 ^e | 0,00 ^e | 6,40 ^e | 7,91 ^e | 8,97 ^e | 10,45 ^e | 11,64 ^e | 87,01 ^e |
| 80 | 0,00 ^e | 0,00 ^e | 0,00 ^f | 0,00 ^f | 0,00 ^f | 0,00 ^f | 0,00 ^f | 100,00 ^f |

Ghi chú: Các giá trị trung bình ĐKTN theo cột có cùng chữ cái in thường là không sai khác ở mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$.



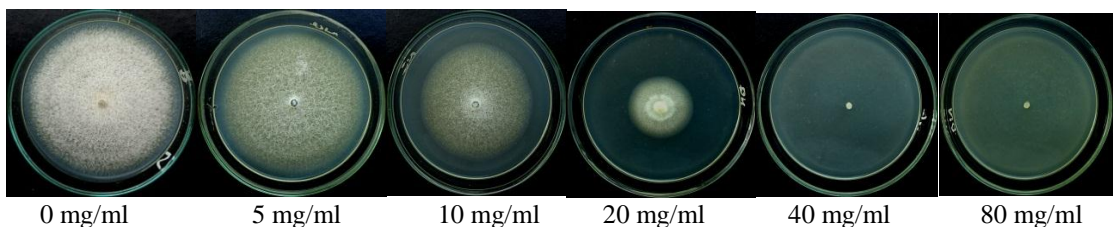
Hình 2. Hình thái nấm *F. solani* sau 7 ngày nuôi cấy ở 28°C với sự có mặt của dịch chiết LE trong môi trường PDA ở các nồng độ khác nhau

Đối với dịch chiết từ nhân hạt xoan, NE, khả năng ức chế sự phát triển ĐKTN *F. solani* nhìn chung cao hơn hai loại dịch chiết lá. Tốc độ phát triển ĐKTN càng chậm, ĐKTN càng nhỏ khi nồng độ dịch chiết NE càng cao. Nấm không thể phát triển trên các đĩa có nồng độ dịch chiết NE lớn hơn 40 mg/ml sau 2 ngày ở tất cả các nồng độ và sau 1 ngày ở nồng độ 20 mg/ml.

Bảng 3. Ảnh hưởng của dịch chiết NE ở các nồng độ khác nhau đến sự phát triển ĐKTN *F. solani*

| Nồng độ dịch chiết NE (mg/ml) | Đường kính tản nấm (mm) | | | | | | | HLUC sau 168 giờ, % |
|-------------------------------|-------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|
| | Ngày 1 | Ngày 2 | Ngày 3 | Ngày 4 | Ngày 5 | Ngày 6 | Ngày 7 | |
| 0 (ĐC) | 12,07 ^a | 24,00 ^a | 37,07 ^a | 51,18 ^a | 61,52 ^a | 77,55 ^a | 89,62 ^a | 0,00 ^a |
| 5 | 7,46 ^b | 16,14 ^b | 29,20 ^b | 43,52 ^b | 54,75 ^b | 64,26 ^b | 77,06 ^b | 14,01 ^b |
| 10 | 5,70 ^c | 12,21 ^c | 23,77 ^c | 34,27 ^c | 43,59 ^c | 50,02 ^c | 60,17 ^c | 32,86 ^c |
| 20 | 0,00 ^d | 6,15 ^d | 12,90 ^d | 17,97 ^d | 23,86 ^d | 28,18 ^d | 33,23 ^d | 62,92 ^d |
| 40 | 0,00 ^d | 0,00 ^e | 0,00 ^e | 0,00 ^e | 0,00 ^e | 0,00 ^e | 0,00 ^e | 100,00 ^e |
| 80 | 0,00 ^d | 0,00 ^e | 0,00 ^e | 0,00 ^e | 0,00 ^e | 0,00 ^e | 0,00 ^e | 100,00 ^e |

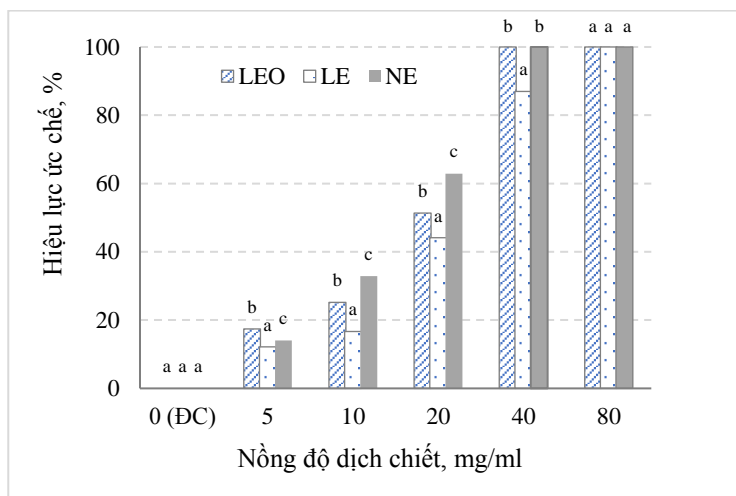
Ghi chú: Các giá trị trung bình ĐKTN theo cột có cùng chữ cái in thường là không sai khác ở mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$.



Hình 3. Hình thái nấm *F. solani* sau 7 ngày nuôi cấy ở 28°C với sự có mặt của dịch chiết NE trong môi trường PDA ở các nồng độ khác nhau

Nấm *F. solani* không những có đường kính giảm dần theo chiều tăng của nồng độ dịch chiết lá và hạt xoan mà hình thái của nó cũng có sự biến đổi rõ rệt dưới tác dụng của các chất kháng nấm này. Khi không có dịch chiết, tản nấm phát triển nhanh, sợi nấm thô, có màu trắng đục. Khuẩn lạc nấm trở nên đậm màu hơn ở các đĩa có sự hiện diện của dịch chiết, trong khi đĩa nấm đối chứng có màu trắng sáng hơn. Ngoài ra, sợi nấm không còn xốp và thô mà trở nên mảnh và mịn hơn khi có mặt các dịch chiết. Ví dụ, sự có mặt của dịch chiết LEO ở nồng độ 5

mg/ml và 10 mg/ml làm cho sợi nấm phát triển yếu hơn và có màu trắng kem. Với nồng độ dịch chiết lớn hơn, 20 mg/ml, khuẩn lạc có màu ngả vàng, sợi nấm mịn dần từ ngoài vào trong, viền ngoài cùng có màu vàng nhạt đều xung quanh.



Hình 4. HLUC sự phát triển ĐKTN *F. solani* trên môi trường PDA có bổ sung các dịch chiết ở các nồng độ khác nhau sau 7 ngày nuôi cấy ở 28°C

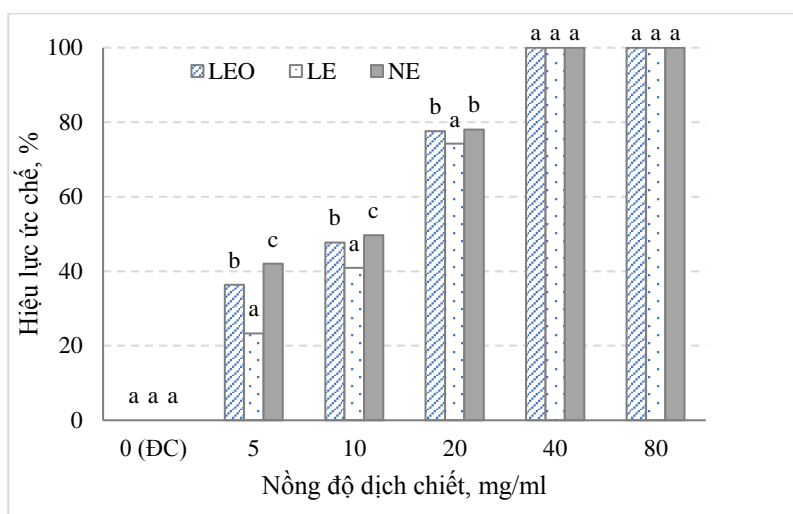
Ghi chú: Giá trị trung bình HLUC theo cột ở cùng nồng độ có cùng chữ cái in thường là không sai khác ở mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$.

Hiệu lực ức chế sự phát triển ĐKTN của các loại dịch chiết lá và hạt xoan sau 7 ngày nuôi cấy ở 28°C cũng được so sánh, thể hiện trên hình 4. Có thể thấy rằng, dịch chiết LEO và dịch chiết NE có khả năng đình chỉ hoàn toàn sự sinh trưởng của nấm trong môi trường PDB ở nồng độ 40 mg/ml trở lên. Dịch chiết NE, ở nồng độ 5 mg/ml, có HLUC thấp hơn dịch chiết LEO nhưng ở các nồng độ cao hơn, 10 mg/ml và 20 mg/ml, HLUC của nó lại cao hơn dịch chiết LEO. Dịch chiết LE có HLUC thấp nhất trong cả ba loại dịch chiết đem khảo sát nhưng vẫn đạt HLUC tối đa (100%) khả năng phát triển của nấm mốc *F. solani* ở nồng độ 80 mg/ml. Nồng độ ức chế hiệu quả 50% sự phát triển ĐKTN (Effective Concentration, EC₅₀) của các dịch chiết LEO, LE và NE đạt lần lượt là 15,55 mg/ml, 18,95 mg/ml và 14,15 mg/ml. Các giá trị được tính theo phương trình hồi quy: LEO: $y = 34,625\ln(x) - 44,936$, $R^2 = 0,915$; LE: $y = 35,502\ln(x) - 54,368$, $R^2 = 0,942$; NE: $y = 34,498\ln(x) - 41,388$, $R^2 = 0,946$. Trong khi đó, nồng độ ức chế tối thiểu 90% sự phát triển ĐKTN (Minimum Inhibitory Concentration, MIC₉₀) đạt 49,31 mg/ml, 58,50 mg/ml và 45,21 mg/ml tương ứng với dịch chiết LEO, LE và NE (cùng phương trình hồi quy như trên).

3.2. Khả năng ức chế sự phát triển sinh khối nấm *F. solani* của dịch chiết lá và hạt xoan

Các dịch chiết khác nhau có hiệu lực ức chế sự phát triển sinh khối nấm *F. solani* không giống nhau, thể hiện qua hình 5. Nhìn chung, cùng một loại dịch chiết, nồng độ càng cao, khả năng kìm hãm sự sinh trưởng của *F. solani* càng mạnh, sợi nấm phân tán trong môi trường càng ít, hiệu lực ức chế càng cao. Nồng độ 40 mg/ml và 80 mg/ml của tất cả các loại dịch chiết đã đình chỉ hoàn toàn sự phát triển của nấm bệnh. Ở các nồng độ nhỏ hơn, có thể thấy dịch chiết nhân hạt xoan NE có hiệu lực ức chế vượt trội hơn so với hai loại dịch chiết lá, LEO và LE. Trong khi đó, dịch chiết LE có hoạt tính kháng nấm yếu nhất trong ba loại. Với 5 mg/ml dịch chiết, dịch chiết LE chỉ ức chế 23,34% sự phát triển của nấm, hai dịch chiết còn lại LEO và NE đạt tương ứng 36,39% và 42,02%. Không có sự khác nhau có ý nghĩa ở nồng

độ 20 mg/ml của hai dịch chiết LEO và NE trong việc kháng nấm, đạt lần lượt 77,59% và 78,07%. Giá trị EC_{50} và MIC_{90} của các dịch chiết LEO, LE và NE đạt lần lượt là 8,45 mg/ml, 11,25 mg/ml và 7,41 mg/ml và 39,70 mg/ml, 41,50 mg/ml và 39,20 mg/ml. Các giá trị được tính dựa trên các phương trình hồi quy: LEO: $y = 25,898\ln(x) - 5,2449$, $R^2 = 0,932$; LE: $y = 30,637\ln(x) - 24,076$, $R^2 = 0,937$; và NE: $y = 23,995\ln(x) + 2,0637$, $R^2 = 0,927$.



Hình 5. HLUC sự phát triển sinh khối nấm *F. solani* trong môi trường PDB có bổ sung các dịch chiết ở các nồng độ khác nhau sau 7 ngày nuôi cấy ở 28°C

Ghi chú: Giá trị trung bình HLUC theo cột ở cùng nồng độ có cùng chữ cái in thường là không sai khác ở mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$.

Trong nghiên cứu này, nhìn chung dịch chiết NE có khả năng kháng nấm *F. solani* cao hơn so với dịch chiết LEO và LE, ngoại trừ ở các nồng độ có HLUC 0% và 100% của tất cả các loại dịch chiết. Tuy nhiên, khả năng kháng nấm của dịch chiết LEO và NE gần như tương đương nhau ở nồng độ 40 mg/ml trên môi trường PDA và 20 mg/ml trong môi trường PDB. Cơ chế kháng nấm của dịch chiết lá và hạt xoan có thể là nhờ vào các hợp chất kháng nấm được trích ly bằng dung môi ethanol như vanillin, 4-hydroxy-3-methoxycinnamaldehyde, and pinoselinol. Khả năng kháng nấm kháng nhau của các bộ phận cây xoan có thể là do hàm lượng chất kháng nấm trong mỗi bộ phận là không giống nhau, trong đó nhân hạt chứa nhiều chất kháng nấm hơn so với lá (Carpinella và cs., 2003).

Việc sử dụng cây xoan hay cây neem trong việc kháng nấm bệnh trong nông nghiệp đã được báo cáo trong một số nghiên cứu. Hoạt chất kháng nấm từ lá, vỏ và rễ của cây xoan đã được chiết xuất để khảo sát khả năng kháng nấm *Colletrichum gloeosporoides* gây bệnh thối mầm của trái măng cầu xiêm. Với các chất chiết xuất từ lá xoan, vào ngày thứ ba sau khi xử lý với nồng độ 100 mg/ml, 200 mg/ml và 300 mg/ml, nấm bắt đầu sinh trưởng và phát triển nhưng bị ức chế hoàn toàn ở nồng độ 400 mg/ml và 500 mg/ml. Đối với các chất chiết xuất từ vỏ và rễ cây xoan, nấm sinh trưởng và phát triển vào ngày thứ tư sau khi xử lý ở nồng độ 100 mg/ml, 200 mg/ml và cũng bị ức chế ở nồng độ 300, 400 và 500 mg/ml (Nweke & Ibiyam, 2012). Khả năng kháng nấm *F. solani* của dịch chiết nhân hạt xoan trong ethanol hiệu quả hơn so với dịch chiết của lá trong ethanol (Carpinella và cs., 2003). Theo Vũ Đăng Khánh và cộng

sự (2004), dịch chiết từ nhân hạt xoan trong ethanol có tác dụng ức chế hơn 50% sự sinh trưởng của nấm mốc *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium oxysporum* ở các nồng độ lần lượt là 2000 ppm, 1000 ppm và 4000 ppm. Khi khảo sát khả năng kháng các loại nấm khác nhau từ dịch chiết nhân hạt xoan thì thấy tác dụng ức chế nấm của các sản phẩm thể hiện rõ nhất ở nồng độ 4000 ppm. Trong đó, giá trị EC₅₀ của dịch chiết nhân hạt trong ethanol đối với nấm *Rhizoctonia solani* là 1513 ppm, đối với nấm *Sclerotium rolfsii* là 1570 ppm, đối với nấm *Fusarium oxysporum* là 3467 ppm (Vũ Đăng Khánh, 2003). Neycee và cộng sự (2012) đã chiết xuất các bộ phận khác nhau của cây xoan (lá, hoa và hạt) bằng methanol để đánh giá tác động của chúng đến 5 loài nấm mốc gây bệnh, bao gồm *Trichoderma* spp., *Sclerotium* spp., *Geotrichum* spp., *Fusarium oxysporum* và *Rhizoctonia solani*. Kết quả cho thấy, tùy thuộc vào loại nấm chỉ thị sử dụng mà các loại dịch chiết có khả năng kháng khác nhau. Ví dụ, ở nồng độ 75 mg/ml, dịch chiết nhân hạt có hoạt tính kháng nấm cao nhất đối với *F. oxysporum*, kể đến là dịch chiết hoa và cuối cùng là dịch chiết lá. Tuy nhiên, cũng ở nồng độ này, dịch chiết hạt không có tính kháng với bốn nấm bệnh còn lại, trong khi dịch chiết hoa có khả năng kháng mạnh tất cả các loại nấm và dịch chiết lá chỉ kháng được *Geotrichum* spp. và *Trichoderma* spp.

HLUC của các dịch chiết ở cùng nồng độ trên môi trường PDA nhìn chung thấp hơn trong môi trường PDB. Ở nồng độ 40 mg/ml, trên môi trường PDA, HLUC của dịch chiết LEO và NE là 100% trong khi HLUC của dịch chiết LE chỉ đạt 87,01%. Trong khi đó, HLUC đạt 100% đối với tất cả các loại dịch chiết ở nồng độ này. Điều này có thể là do môi trường lỏng PDB có thể tạo điều kiện để tác nhân kháng nấm phân tán tốt hơn, do đó, HLUC cao hơn.

Ngoài ra, HLUC của dịch chiết LEO cao hơn dịch chiết LE ở hầu hết các nồng độ khảo sát, ngoại trừ mẫu đối chứng và mẫu có nồng độ 80 mg/ml trên môi trường PDA. Trên môi trường PDB, HLUC của LEO cũng cao hơn LE ở các nồng độ khảo sát 5 mg/ml, 10 mg/ml và 20 mg/ml. Như vậy, có thể thấy phương pháp thu nhận dịch chiết lá có ảnh hưởng đến khả năng kháng nấm của lá xoan. Sự có mặt của ethanol trong dịch chiết LEO có lẽ đã góp phần vào việc nâng cao tính kháng nấm của dung dịch này. Ethanol có khả năng giết chết các vi sinh vật bằng cách biến tính protein và hòa tan lipid của chúng.

V. KẾT LUẬN

Nghiên cứu này đã chứng minh dịch chiết lá và nhân hạt xoan có khả năng kiểm soát nấm mốc *F. solani* gây bệnh trên rau quả sau thu hoạch. Kết quả này đưa ra khả năng phát triển phương pháp kiểm soát nấm bệnh trên rau quả sau thu hoạch với các hợp chất có nguồn gốc tự nhiên, đáp ứng nhu cầu tìm kiếm các hợp chất kháng nấm thân thiện với môi trường trong sản xuất nông nghiệp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Abu Bakar, A.I., Nur Ain Izzati, M.Z., & Umi Kalsom, Y. (2013). *Diversity of Fusarium species associated with post-harvest fruit rot disease of tomato. Sains Malaysiana*, 42(7), 911-920.

Al-Hetar, M. Y., Zainal, A. M. A., Sariah, M., & Wong, M. Y. (2010). Antifungal activity of chitosan against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Journal of Applied Polymer Science*, 120, 2434-2439.

Asadujjaman, Md., Abu, S., Hossain, A. & Karmakar, U.K. (2013). Assessment of bioactivities of ethanolic extract of *Melia azedarach* (Meliaceae) leaves. *Journal of Coastal Life Medicine*, 1(2), 118-122

Carpinella, M.C., Giorda, L.M., Ferrayoli, C. G. & Palacios, S. M. (2003). Antifungal effects of different organic extracts from *Melia azedarach* L. on phytopathogenic fungi and their isolated active components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(9), 2506-2511.

Cotty, P.J. & Bhatnagar, D. (1994). Variability among atoxigenic *Aspergillus flavus* strains in ability to prevent aflatoxin contamination and production of aflatoxin biosynthetic pathway enzymes. *Applied and Environmental Microbiology*, 60: 2248-2251.

Vũ Đăng Khánh (2003). *Khảo sát tính kháng nấm gây bệnh cây và nấm sinh độc tố aflatoxin của sản phẩm dịch chiết xuất từ xoan chịu hạn (Azadirachta Indica A.Juss) trồng tại Việt Nam*. Luận văn Thạc sĩ. Đại học Nông Lâm TP Hồ Chí Minh.

Neycee, M.A., Nematzadeh, G.A., Dehestani, A., & Alavi, M. (2012). *Assessment of antifungal effects of shoot extracts in chinaberry (Melia azedarach) against 5 phytopathogenic fungi*. Conference Proceedings.

Nweke, C.N & Ibiam, O.F.A. (2012). Effect of extracts from leaves, bark and root of *Azadirachta indica* L. on the vegetative growth of *Colletrichum gloeosporoides*: field soft rot pathogen of soursop (*Annona muricata* L.) fruit. *Agriculture and Biology Journal of North America*, 3(12): 481-485.

Mondall, N.K., Mojumdar, A., Chatterje, S.K., Banerjee, A., Datta, J.K. & Gupta, S. (2009). Antifungal activities and chemical characterization of Neem leaf extracts on the growth of some selected fungal species in vitro culture medium. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, 13(1), 49 – 53.

Khan, I. H. & Javaid, A. (2013), Antifungal activity of *Melia azedarach* L. fruit extract against *Sclerotium rolfsii*, the cause of collar rot disease of chickpea, *Mycopath* 11(1): 9-13.

ANTIFUNGAL ABILITIES OF NEEM (*Melia azedarach*) LEAF AND SEED EXTRACTS AGAINST PATHOGEN *Fusarium solani* ON POST HARVEST TOMATOES

ABSTRACT

This study was carried out to evaluate the antifungal ability of neem (*Melia azedarach* L.) extracts of leaves and seed kernels. *Fusarium solani* causing pink rot diseases on tomatoes was used in this research by inhibiting the growth and development of this strain. Antifungal agents from leaves and seed kernels were extracted with ethanol solvent, including leaf extract without ethanol removal (LEO), leaf extract with ethanol removal (LE) and seed kernel extract with ethanol removal (NE). Based on the ability to inhibit the development of fungal diameter and biomass of extracts at various concentrations (0 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 20 mg/ml, 40 mg/ml and 80 mg/ml), in generally, the results showed that the NE extract had the highest antifungal effect, followed by the LEO extract and finally the LE extract. The effective inhibitory concentration of 50% of the fungal diameters (Effective Concentration, EC₅₀) of LEO, LE and NE extracts were 15.55 mg/ml, 18.95 mg/ml and 14.15 mg/ml, respectively. Based on fungal biomass data, EC₅₀ values of LEO, LE and NE extracts were 8.45 mg/ml, 11.25 mg/ml and 7.41 mg/ml, respectively. This study suggests a prospect for the application of natural antifungal agents in agricultural production.

Keywords: antifungal, *Fusarium solani*, neem leaves, *Melia azedarach*