

KHẢ NĂNG ỨC CHẾ CỦA NANOCITOSAN ĐỐI VỚI *Colletotrichum acutatum* L2 GÂY HẠI QUẢ CÀ CHUA SAU THU HOẠCH

Lê Thanh Long*, Nguyễn Thị Nga, Nguyễn Cao Cường,
Trần Ngọc Khiêm, Nguyễn Thị Thủy Tiên

Đại học Nông Lâm, Đại học Huế

Email*: ltlongnl@gmail.com

Ngày gửi bài: 07.05.2015

Ngày chấp nhận: 02.12.2015

TÓM TẮT

Nghiên cứu đã khảo sát khả năng kháng nấm *Colletotrichum acutatum* L2 gây bệnh thán thư hại quả cà chua sau thu hoạch của nanochitosan ở cả điều kiện *in vitro* và *in vivo*. Kết quả nghiên cứu chứng minh rằng nanochitosan có khả năng ức chế sự nảy mầm của bào tử *C. acutatum* L2 và hạn chế sự sinh trưởng và phát triển của nấm. Hiệu lực ức chế 50% và 90% đường kính tản nấm, sinh khối khô đạt được tương ứng với các nồng độ nanochitosan 0,75 g/l và 1,53 g/l, 0,46 g/l và 1,1 g/l. Nồng độ nanochitosan 1,6 g/l ức chế hoàn toàn sự sinh trưởng, phát triển của *C. acutatum* L2. Ở điều kiện *in vivo*, nanochitosan có khả năng hạn chế sự phát triển gây bệnh của *C. acutatum* L2 trên quả cà chua, sau 10 ngày, nồng độ 4 g/l có khả năng ức chế 76% sự phát triển của đường kính vết bệnh, giá trị MIC₅₀ đạt được ở nồng độ nanochitosan 1,14 g/l.

Từ khóa: *Colletotrichum acutatum*, hiệu lực ức chế, nanochitosan, thán thư.

Antifungal Ability of Nanochitosan against *Colletotrichum acutatum* L2 in Post Harvest Tomato Fruit

ABSTRACT

This study examined the antifungal effect of nanochitosan on *Colletotrichum acutatum* L2 isolated from anthracnose infected tomato both *in vitro* and *in vivo*. The results demonstrated that nanochitosan inhibited the spore germination and the growth of *C. acutatum* L2. Inhibitory effect of 50% and 90% mycelial diameter and dry biomass was achieved at the nanochitosan concentration of 0.75 g/l and 1.53 g/l, 0.46 g/l and 1.1 g/l, respectively. Concentration of 1.6 g/l nanochitosan completely inhibited the growth of *C. acutatum* L2. In *in vivo*, nanochitosan could control the growth of *C. acutatum* L2 on tomato fruits. After 10 days, the nanochitosan concentration of 4 g/l inhibited 76% the development of lesion diameter and MIC₅₀ was achieved at concentration of 1.14 g/l.

Keywords: Anthracnose, *Colletotrichum acutatum*, inhibitory effect, nanochitosan.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cà chua (*Lycopersicon esculentum* Mill) là một trong những loại rau ăn quả có giá trị dinh dưỡng và giá trị kinh tế cao. Tuy nhiên cà chua thường gặp một số bệnh ảnh hưởng tới năng suất và phẩm chất của quả sau thu hoạch. Bệnh thán thư là một trong những bệnh thường gặp ở nhiều vùng trồng cà chua trên thế giới và gây hại nghiêm trọng đối với cà chua (Bailey et al., 1992).

Bệnh thán thư gây hại trên cà chua trước và sau thu hoạch chủ yếu do nấm *Colletotrichum* spp. gây ra. Nấm thường xâm nhiễm và gây hại từ khi quả còn non nhưng sẽ phát triển và gây hại mạnh trong thời gian thu hoạch, vận chuyển và tiêu thụ. Để hạn chế bệnh thán thư phát triển trên rau quả sau thu hoạch, ngoài việc hạn chế tổn thương trên quả thì việc xử lý bằng các loại hoá chất diệt nấm như Benomyl và Thiabendazole (TBZ) thường được

áp dụng (Bailey et al., 1992; Vũ Triệu Mân, 2007). Sử dụng các thuốc trừ nấm hóa học phòng trừ bệnh rất có hiệu quả và thuận lợi nhưng việc lạm dụng chúng quá mức đã ảnh hưởng đến an toàn vệ sinh thực phẩm, đến sức khỏe của con người cũng như gây ô nhiễm môi trường và nhanh chóng hình thành các dòng nấm có khả năng kháng thuốc.

Chitosan, một polymer tự nhiên không độc hại, dễ phân hủy, dễ tương hợp sinh học, có khả năng kháng khuẩn, kháng nấm nhưng không hòa tan trong nước nên khả năng ứng dụng còn nhiều hạn chế. Nanochitosan được tạo ra bằng các phương pháp khác nhau, có kích thước rất nhỏ (nanomet), diện tích và điện tích bề mặt lớn nên hiệu quả kháng nấm vượt trội hơn nhiều so với chitosan (Zahid et al., 2012; Mustafa et al., 2013). Kết quả nghiên cứu bước đầu của chúng tôi đã cho thấy, nanochitosan được tạo ra bằng phương pháp tạo gel ionic có hiệu quả đáng kể trong phòng trừ nấm *C. gloeosporioides* gây bệnh thán thư trên ớt (Nguyễn Cao Cường et al., 2014). Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả phân lập và định danh nấm *C. acutatum* (mẫu L2) từ quả cà chua bị bệnh, đồng thời khảo sát khả năng ức chế nấm *C. acutatum* gây bệnh thán thư trên cà chua của nanochitosan ở điều kiện *in vitro* và *in vivo*.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Quả cà chua có vết bệnh điển hình được thu thập tại chợ đầu mối rau quả Bãi Dâu, thành phố Huế để phân lập nấm. Quả cà chua khỏe tương đồng về màu sắc, kích thước, không bị xây xát, không có dấu hiệu tổn thương cơ học.

Nanochitosan được chuẩn bị bằng phương pháp tạo gel ionic với sodium tripolyphosphat (Nguyễn Cao Cường et al., 2014). Nhỏ từ từ STPP 0,25% (w/v) vào dung dịch chitosan nồng độ 0,5% (w/v), pH 4,0 trên máy khuấy từ với tốc độ 1.500 vòng/phút, tỷ lệ chitosan/tripolyphosphat là 6/1.

Môi trường PDA (250 g khoai tây, 20 g dextrose, 20 g agar) và PDB (250 g khoai tây, 20

g dextrose) được dùng để khảo sát ảnh hưởng của nanochitosan đến sự sinh trưởng và phát triển của nấm *C. acutatum* L2.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập và định danh loài nấm *C. acutatum* gây bệnh thán thư trên cà chua

Môi trường PDA được dùng để phân lập nấm từ cà chua. Dựa vào hình thái, màu sắc khuẩn lạc, đặc điểm bào tử, sơ bộ tuyển chọn ra mẫu nấm nghi ngờ là *C. acutatum*. Mẫu nấm này được định danh bằng phương pháp khuếch đại (PCR), giải trình tự gene mã hoá 28S rRNA và tra cứu bằng công cụ BLAST (NCBI).



Hình 1. Mẫu cà chua bị nhiễm bệnh thán thư

2.2.2. Ảnh hưởng của nanochitosan đến sự phát triển của *C. acutatum* trên môi trường PDA

Môi trường PDA có chứa các nồng độ nanochitosan (0 g/l - đối chứng; 0,2 g/l, 0,4 g/l, 0,8 g/l và 0,16 g/l) được đổ vào các đĩa petri đường kính 9 cm (14 ml/đĩa), lặp lại 3 lần ở mỗi công thức. Từ rìa tản nấm *C. acutatum* thuần chủng (sau khi nuôi cấy 7 ngày ở 28°C), cắt mảnh nấm có đường kính 2 mm đặt vào tâm các đĩa môi trường chứa nanochitosan đã chuẩn bị sẵn, nuôi cấy ở 28°C. Theo dõi và đo đường kính tản nấm (ĐKTN), 2 ngày/lần bằng thước kẹp điện tử. Hiệu lực ức chế được tính theo tỷ lệ phần trăm (%) ức chế sự phát triển của đường kính tản nấm, PIRG (%) (Percentage Inhibition of Radial Growth); Hiệu lực ức chế 50% và 90% (MIC_Minimum Inhibitory Concentration) được tính theo phương trình tương quan giữa nồng độ nanochitosan và hiệu lực ức

chế trong khoảng nồng độ khảo sát (Al-Hetar et al., 2010). Mức độ tiến triển bệnh được xác định theo đường cong tiến triển bệnh AUDPC (Area Under Disease Progress Curve) theo Campbell and Madden (1990).

2.2.3. Ảnh hưởng của nanochitosan đến sự phát triển sinh khối của nấm *C. acutatum* trên môi trường PDB

Cắt mảnh nấm có đường kính 2mm từ mép rìa của tản nấm *C. acutatum* đặt vào giữa các đĩa petri có chứa 5 ml môi trường PDB với các nồng độ nanochitosan (0 g/l - đối chứng; 0,1 g/l; 0,2 g/l; 0,4 g/l, 0,8 g/l và 1,6 g/l), mỗi nồng độ lặp lại 3 lần. Sau khi nuôi ở 28°C trong 7 ngày, thu sinh khối của nấm bằng cách lọc qua giấy lọc và sấy ở 55°C cho đến khi khối lượng không đổi. Xác định hiệu lực ức chế của nanochitosan đến sinh khối nấm *C. acutatum* (Al-Hetar et al., 2011).

2.2.4. Ảnh hưởng của nanochitosan đến sự nảy mầm của bào tử nấm *C. acutatum*

Nghiên cứu ảnh hưởng của nanochitosan đến sự nảy mầm bào tử nấm bệnh được tiến hành trên lam kính lõm theo phương pháp của Cronin et al. (1996). Dùng 20 µl môi trường PDA sau khi tiệt trùng, làm nguội và phối trộn với nanochitosan ở các nồng độ (0 g/l - đối chứng; 0,2 g/l; 0,4 g/l, 0,8 g/l và 1,6 g/l) cho vào phần lõm của lam kính, 3 lần lặp lại. Để yên 15 phút, tiếp tục cho 5µl huyền phù bào tử nồng độ 10⁵ bào tử/ml lên lam, đặt lam kính và ủ ở 28°C. Cứ mỗi giờ một lần, quan sát dưới kính hiển vi điện với độ phóng đại 40X ở 4 vi trường, mỗi vi trường 50 bào tử, xác định số bào tử nảy mầm. Một bào tử được xem là đã nảy mầm khi chiều dài ống mầm xuất hiện dài hơn chính nó. Tỷ lệ ức chế nảy mầm của nanochitosan lên bào tử *C. acutatum* được tính theo công thức: Tỷ lệ ức chế (%) = [(Tổng số bào tử nảy mầm ở công thức ĐC - Tổng số bào tử nảy mầm ở công thức TN)/Tổng số bào tử nảy mầm ở công thức ĐC] x 100.

2.2.5. Ảnh hưởng của nanochitosan tới khả năng gây bệnh của nấm *C. acutatum* ở điều kiện *in vivo*

Quả cà chua khỏe được rửa bằng nước sạch, khử trùng bằng cồn 70° trong 3 phút, rửa lại

bằng nước cất vô trùng và làm khô ở nhiệt độ phòng (28 ± 2°C). Tạo 2 vết thương giống nhau bằng đầu kim vô trùng (1 x 1 mm) và lây bệnh bằng cách cho vào mỗi vết 10 µl huyền phù bào tử *C. acutatum* nồng độ 10⁵ bào tử/ml. Để khô tự nhiên trong 2 giờ, nhúng vào các dung dịch nanochitosan có nồng độ 0% (đối chứng), 0,5 g/l; 1 g/l; 2 g/l và 4 g/l trong 150 giây, lặp lại 3 lần ở mỗi nồng độ khảo sát. Cho quả đã lây bệnh và xử lý với nanochitosan vào khay giữ ẩm, bọc bằng túi PE (có đục lỗ) và ủ ở 28°C. Đo đường kính vết bệnh 2 ngày/lần bằng thước kẹp điện tử và xác định hiệu lực ức chế, mức độ tiến triển bệnh.

2.2.6. Xử lý số liệu

Các số liệu thí nghiệm được xử lý bằng phân tích phương sai ANOVA để xác định sự sai khác giữa các giá trị trung bình, có ý nghĩa với độ tin cậy p<0,05, sử dụng phần mềm SAS 9.13.

3. KẾT QUẢ

3.1. Phân lập và định danh nấm *C. acutatum*

Từ các quả cà chua hồng bị bệnh đã phân lập được 2 mẫu nấm ký hiệu là L1, L2. Kết quả so sánh cho thấy mẫu L2 có mức tương đồng cao nhất về hình thái, màu sắc khuẩn lạc cũng như đặc điểm sinh bào tử với nấm *C. acutatum*. Trên môi trường PDA, tản nấm xốp, sợi nấm phân nhánh mỏng dần về phía rìa tản nấm, có màu trắng hồng tới màu trắng xám. Bào tử phân sinh hình trụ, đỉnh tròn, trong suốt.

Mẫu nấm L2 được định danh bằng phương pháp giải trình tự một phần gen mã hoá cho tiểu phần ribosome 28S (rRNA 28S), trình tự nucleotide của nấm L2 được trình bày như sau:

```
ACACACCGCCCGTTCGCTACTACCGATT
GAATGGCTCAGTGAGGCTTTCGGACTGGCC
CAGAGAGGCGGGCAACCGCCACTCAGGGC
CGGAAAGTTATCCAAACTCGGTCATTTAGA
GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTT
GGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACTGAGT
TACCGCTCTATAACCCTTTGTGAACATACCT
AACCGTTGCTTCGGCGGGCAGGGGAAGCCT
CTCGCGGGCCTCCCCTCCCGGCGCCGGCCC
CCACCACGGGGACGGGGCGCCCGCGGAG
```

GAAACCAAACCTCTATTTACACGACGTCTCTT
 CTGAGTGGCACAAGCAAATAATTAACAACTT
 TTAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCG
 ATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAA
 TGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGA
 ATCTTTGAACGCACATTGCGCTCGCCAGCA
 TTCTGGCGAGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAT
 TTCAACCCTCAAGCACCGCTTGGTTTTGGG
 GCCCCACGGCACACGTGGGCCCTTAAAGGT
 AGTGGCGGACCCTCCCGGAGCCTCCTTTGC
 GTAGTAACTAACGTCTCGCACTGGGATTTCG
 GAGGGACTCTTGCCGTAAAACCCCAAATT
 TTTTACAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGA
 ATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAG
 CGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCC
 CAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAACAGCTC
 AAATTTGAAATCTGGCCCCAGGCCCGAGTT
 GTAATTTGCAGAGGATGCTTTTGGCGCGGT
 GCCTTCCGAGTTCCTTGAACGGGACGCCA
 TAGAGGGTGAGAGCCCCGTACGGTTGGACA
 CCAAGCCTTTGTAAAGCTCCTTCGACGAGT
 CGAGTAGTTTTGGG

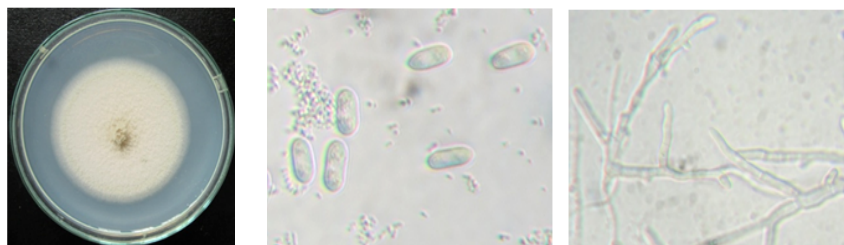
Kết quả so sánh trình tự gen rRNA 28S của mẫu nấm L2 bằng chương trình BLAST trên NCBI cho thấy trình tự gen tương đồng 100%

với mẫu *C. acutatum* AJ301964. Kết quả này đã cho phép kết luận rằng mẫu nấm L2 là loài *C. acutatum*, ký hiệu là *C. acutatum* L2.

3.2. Ảnh hưởng của nanochitosan đến sự phát triển của *C. acutatum* L2 trên môi trường PDA

Ảnh hưởng của nanochitosan đến sự phát triển của *C. acutatum* L2 trên môi trường PDA được thể hiện qua bảng 1.

Kết quả từ bảng 1 cho thấy nanochitosan ảnh hưởng đáng kể đến sự phát triển của tảo nấm ở tất cả các nồng độ khảo sát, so với ĐC, ĐKTN giảm dần khi nồng độ nanochitosan tăng lên. Sau 4 ngày, nấm mới bắt đầu phát triển ở các công thức có bổ sung 0,8 g/l nanochitosan trong khi ĐKTN ở ĐC đã đạt 3,48 cm và sự sinh trưởng của nấm bị ức chế hoàn toàn ở nồng độ nanochitosan 1,6 g/l. Sau 10 ngày, ĐKTN từ 7,20 cm (ĐC) giảm xuống còn 3,56 cm (nanochitosan 0,8 g/l), tương ứng với hiệu lực ức chế đạt đến 50,56%. Giá trị MIC₅₀ và MIC₉₀ tương ứng là 0,75 g/l và 1,53 g/l ($y = -18,07x^2 + 92,36x - 8,95$; $R^2 = 0,971$).



Hình 2. Hình thái khuẩn lạc trên môi trường PDA và đặc điểm vi thể của chủng L2

Bảng 1. Ảnh hưởng của nanochitosan đến sự sinh trưởng của tảo nấm *C. acutatum* L2 trên môi trường PDA

Nồng độ nanochitosan (g/l)	Đường kính tảo nấm (cm)					PIRG (%) 10 ngày	AUDPC
	2 ngày	4 ngày	6 ngày	8 ngày	10 ngày		
0 (ĐC)	1,61 ^a	3,48 ^a	4,95 ^a	5,88 ^a	7,20 ^a	0,00	898,40 ^a
0,2	1,50 ^b	3,18 ^b	4,79 ^{ab}	5,65 ^b	6,55 ^b	9,03	846,96 ^b
0,4	1,33 ^c	3,01 ^c	4,63 ^b	5,45 ^c	6,28 ^c	12,78	810,96 ^c
0,8	0,00 ^d	0,73 ^d	2,05 ^c	2,87 ^d	3,56 ^d	50,56	356,72 ^d
1,6	0,00 ^d	0,00 ^e	0,00 ^d	0,00 ^c	0,00 ^e	100	0,00 ^e

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

3.3. Ảnh hưởng của nanochitosan đến sự phát triển sinh khối của nấm *C. acutatum* L2 trên môi trường PDB

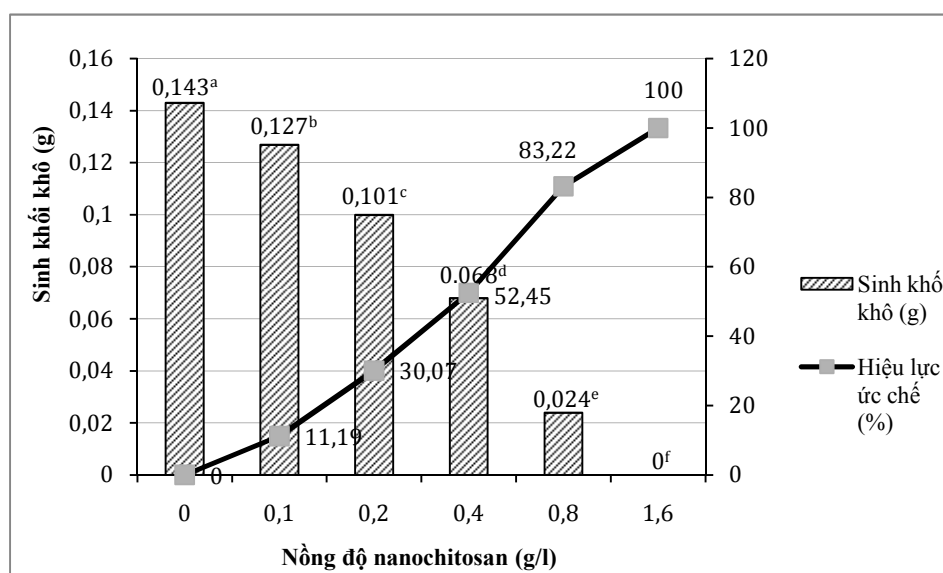
Ảnh hưởng của nanochitosan đến sự phát triển sinh khối của *C. acutatum* L2 sau 10 ngày nuôi trong môi trường PDB được biểu diễn ở hình 3.

Kết quả khảo sát cho thấy việc bổ sung nanochitosan vào môi trường PDB gây ức chế rõ rệt đến sự phát triển sinh khối của nấm *C. acutatum* L2 và tác dụng mạnh hơn so với môi trường PDA. Sau 7 ngày nuôi cấy, khối lượng khô của nấm thu được tỷ lệ nghịch với nồng độ nanochitosan trong môi trường. Khối lượng khô của nấm giảm hơn một nửa ở nồng độ 0,4

g/l và gần 6 lần ở nồng độ 0,8 g/l so với ĐC. Hiệu lực ức chế của nanochitosan tới sự phát triển sinh khối của nấm thấp nhất ở nồng độ 0,1 g/l (11,19%) và ở nồng độ 1,6 g/l nấm không phát triển được trong môi trường (ức chế 100%). Giá trị MIC₅₀ và MIC₉₀ tương ứng là 0,46 g/l và 1,1g/l ($y = -54,65x^2 + 149,9x - 0,26$; $R^2 = 0,987$).

3.4. Ảnh hưởng của nanochitosan đến khả năng nảy mầm của bào tử nấm *C. acutatum* L2

Ảnh hưởng của nanochitosan đến khả năng nảy mầm nấm *C. acutatum* L2 được trình bày ở bảng 2.



Hình 3. Hiệu lực ức chế của nanochitosan đến sự phát triển sinh khối của nấm *C. acutatum* L2 sau 7 ngày nuôi cấy, ở 28°C

Ghi chú: Các giá trị trung bình sinh khối không có cùng chữ cái thường là không sai khác ở mức ý nghĩa $p < 0,05$

Bảng 2. Ảnh hưởng của nanochitosan đến sự nảy mầm của bào tử nấm *C. acutatum* L2

Nồng độ nanochitosan (g/l)	Tỷ lệ nảy mầm của bào tử (%)		Hiệu lực ức chế sau 7 giờ (%)	Hiệu lực ức chế sau 12 giờ (%)
	7 giờ	12 giờ		
0,0 (ĐC)	74,00 ^a	100,00 ^a	0,00	0,00
0,2	34,50 ^b	92,50 ^b	53,37	7,50
0,4	13,83 ^c	71,83 ^c	81,31	28,17
0,8	0,00 ^d	10,83 ^d	100	89,17
1,6	0,00 ^d	0,00 ^e	100	100

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

Bảng 3. Ảnh hưởng của nanochitosan đến khả năng gây bệnh của nấm *C. acutatum* trên quả cà chua

Nồng độ nanochitosan (g/l)	Đường kính vết bệnh (cm)					PIRG (%) 10 ngày	AUDPC
	2 ngày	4 ngày	6 ngày	8 ngày	10 ngày		
0 (ĐC)	0,32 ^a	0,84 ^a	1,67 ^a	2,15 ^a	2,83 ^a	0	300,48 ^a
0,5	0,17 ^{ab}	0,52 ^b	1,16 ^b	1,78 ^b	2,18 ^b	22,97	222,58 ^b
1,0	0,03 ^{bc}	0,50 ^b	0,80 ^c	1,22 ^c	1,33 ^c	53,00	154,17 ^c
2,0	0,0 ^c	0,28 ^c	0,51 ^d	0,69 ^d	0,92 ^d	67,49	93,39 ^d
4,0	0,0 ^c	0,11 ^c	0,34 ^e	0,48 ^e	0,66 ^d	76,68	60,93 ^e

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

Từ bảng 2 cho thấy, sau 7 giờ và 12 giờ, tỷ lệ nảy mầm bào tử nấm *C. acutatum* L2 giảm đáng kể trong khoảng nồng độ nanochitosan từ 0,2-1,6 g/l so với ĐC. Mức độ ảnh hưởng có xu hướng tăng mạnh ở các nồng độ nanochitosan 0,4-0,8 g/l và bào tử nấm không nảy mầm ở nồng độ nanochitosan 1,6 g/l.

3.5. Ảnh hưởng của nanochitosan đến nấm *C. acutatum* L2 trên quả cà chua ở điều kiện *in vivo*

Ảnh hưởng của nanochitosan đến khả năng gây bệnh của nấm *C. acutatum* L2 trên quả cà chua được thể hiện ở bảng 3.

Kết quả từ bảng 3 cho thấy đường kính vết bệnh ở tất cả các mẫu có xử lý nanochitosan với các nồng độ tương ứng tại các thời điểm khác nhau đều giảm đáng kể so với mẫu ĐC. Ở nồng độ nanochitosan 2 g/l, sau 4 ngày vết bệnh mới hình thành và sau 10 ngày đường kính vết bệnh ở nồng độ 4 g/l nhỏ hơn 4 lần so với mẫu ĐC, giảm từ 2,83 cm (ĐC) xuống còn 0,66 cm (nanochitosan 4 g/l). Giá trị MIC₅₀ tương ứng 1,14 g/l ($y = -8,41x^2 + 52,28x + 1,34$; $R^2 = 0,977$).

4. THẢO LUẬN

Hiệu quả ức chế của chitosan và dẫn xuất nanochitosan tới sự sinh trưởng của tản nấm, nảy mầm của bào tử, hình thành sinh khối của nấm gây bệnh thán thư ở điều kiện *in vitro* trên quả cà chua, chuối, đu đủ và thanh long đã được công bố (Munoz et al., 2009; Zahid et al., 2012; Mustafa et al., 2013). Các nghiên cứu trên cho

thấy chitosan và nanochitosan đều có tác dụng ức chế đáng kể các đối tượng nấm bệnh khác nhau trong khoảng nồng độ 0,5-2%, đồng thời nanochitosan với các kích thước hạt khác nhau đều có hiệu quả ức chế phát triển nấm bệnh tốt hơn so với chitosan thông thường. Cơ chế tác dụng của chitosan và nanochitosan lên các loại nấm bệnh cũng đã được đánh giá ở các mức độ khác nhau và được giải thích theo cơ chế tương tác trực tiếp của nhóm NH₃⁺ có trong cấu trúc chitosan lên bề mặt màng tế bào nấm (Hình thành các phức polyelectrolyte giữa chitosan với nhóm điện tích âm trên bề mặt tế bào) gây rò rỉ, thay đổi vật chất bên trong tế bào (tính thẩm thay đổi, co rút nguyên sinh chất). Ngoài ra chitosan và dẫn xuất nanochitosan có thể gây tổn thương trực tiếp màng tế bào, ảnh hưởng đến tính toàn vẹn của tế bào gây ức chế phát triển nấm (Hernandez et al., 2011; Zahid et al., 2012). Như vậy, kết quả kháng nấm *C. acutatum* L2 của chúng tôi bằng chế phẩm nanochitosan thu được ở điều kiện *in vitro* là phù hợp với các nghiên cứu khả năng kháng nấm của chitosan và nanochitosan của các tác giả đã công bố ở trên.

Ở điều kiện *in vivo*, kết quả nghiên cứu chứng tỏ nanochitosan có tác dụng ức chế rõ rệt đến mức độ tiến triển của nấm *C. acutatum* L2 trong trường hợp chúng xâm nhập vào quả cà chua. Kết quả là tốt hơn so với chitosan (Munoz et al., 2009) và phù hợp với kết quả đã được công bố trên đối tượng nấm thán thư của nanochitosan trên xoài và chuối, đu đủ và thanh long (Zahid et al., 2012). Tuy nhiên, tác dụng ức

chế phát triển nấm *C. acutatum* L2 trên cà chua bằng lây bệnh nhân tạo của nanochitosan yếu hơn so với điều kiện *in vitro*. Kết quả cũng cho thấy dung dịch nanochitosan có khả năng tạo ra một lớp màng bán thấm, có tác dụng điều hòa sự trao đổi khí, giảm quá trình thoát hơi nước và làm chậm quá trình chín (không được trình bày). Bên cạnh đó, ngoài tác dụng trực tiếp lên bề mặt tế bào nấm, chitosan còn có tác dụng như một chất kích kháng ngoại bào, có thể tạo ra sức đề kháng ở vật chủ (quả) bằng cơ chế kích thích tăng cường sinh tổng hợp một số enzyme phòng vệ như chitinase, β -1,3-glucanase, phenylalanine ammonia-lyase (PAL) (Asgar et al., 2012). Tuy vậy, với môi trường dinh dưỡng tối thích trên quả cà chua sau thu hoạch, nấm *C. acutatum* L2 phát triển thuận lợi bên trong vết bệnh nhân tạo, tác dụng ức chế của nanochitosan kém hơn so với điều kiện *in vitro* có thể được lý giải.

5. KẾT LUẬN

C. acutatum L2 là tác nhân gây bệnh thán thư trên cà chua. Nanochitosan có khả năng ức chế mạnh mẽ đến sự sinh trưởng của tản nấm, sự nảy mầm của bào tử, sự phát triển sinh khối của nấm *C. acutatum* L2 cũng như hạn chế sự phát triển, gây hại của nấm trên quả cà chua. Giá trị MIC₅₀ và MIC₉₀ của nanochitosan với sự sinh trưởng của tản nấm, sự phát triển sinh khối nấm của nấm *C. acutatum* L2 tương ứng là 0,75 g/l và 1,53 g/l, 0,46 g/l và 1,1 g/l. Sau 10 ngày, dung dịch 4 g/l nanochitosan có khả năng ức chế 76% sự phát triển của đường kính vết bệnh, giá trị MIC₅₀ đạt được ở nồng độ nanochitosan 1,14 g/l.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Al-Hetar M.Y., M.A.Z. Abidin., M. Sariah., M.Y. Wong (2011). Antifungal activity of chitosan against *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense*. J. Appl. Polym. Sci., 120: 2434-2439.

- Asgar A., T.M. Mahmud., Yasmeen S. (2012). Control of anthracnose by chitosan through stimulation of defence-related enzymes in Eksotika II papaya (*Carica papaya* L.) fruit. J.Biol. Life. Sci., 3(1): 1-12.
- Bailey J.A., R.J. O'Connell., R.J. Pring., C. Nash (1992). Infection strategies of *Colletotrichum* species. In: *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*, Bailey J.A. and M.J. Jeger (Eds.), CAB International, Wallingford, UK, pp. 88-120.
- Campbell L.L., L.V. Madden (1990). Spatial aspects of plant disease epidemics II: analysis of spatial pattern. Introduction to plant Disease Epidemiology, 1: 289-238.
- Cronin M.J., D.S. Yohalem., R.F. Harris., J. Andrews (1996). Putative mechanism and dynamics of inhibition of apple scab pathogen *Venturia inaequalis* by compost extracts. Soil. Biol. Biochem., 28: 1241- 1249.
- Nguyễn Cao Cường, Lê Thanh Long, Nguyễn Thị Thủy Tiên, Trần Bích Lam (2014). Nghiên cứu ứng dụng nanochitosan trong phòng trừ bệnh thán thư hại ớt sau thu hoạch. Tạp chí Khoa học và Công nghệ, 52(5C): 222-228.
- Hernández L.A., M.G. Valle., M.G. Guerra-Sánchez (2011). Current status of action mode and effect of chitosan against phytopathogens fungi. Microbiol. Res., 5(25): 4243-4247.
- Vũ Triệu Mân (2007). Giáo trình bệnh cây chuyên khoa. Trường Đại học Nông Nghiệp I, Hà Nội.
- Munoz Z., A. Moret., S. Garces (2009). Assessment of chitosan for inhibition of *Colletotrichum* sp. on tomatoes and grapes. Crop. Prot., 28: 36-40.
- Mustafa M.A., A. Ali., S. Manickam (2013). Application of a chitosan based nanoparticle formulation as an edible coating for tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.). Acta Horticulturae, 1012: 445-452.
- Svetlana Z., S. Saša., I. Žarko., T. Nenad., D. Nenad., B. Jelica (2010). Morphological and molecular identification of *Colletotrichum acutatum* from tomato fruit. Pestic. Phytomed., 25(3): 231-239.
- Zahid N., A. Ali., S. Manickam., Y. Siddiqui., M. Maqbool (2012). Potential of chitosan-loaded nanoemulsions to control different *Colletotrichum* spp. and maintain quality of tropical fruits during cold storage. J. Appl. Microbiol., 113: 925-939.