

## KHẢ NĂNG DIỆT NẤM PHÒNG LÁ CHÈ (*EXOBASIDIUM VEXANS MASSEE*) CỦA CHITOSAN CHIẾU XẠ

PHẠM THỊ LỆ HÀ, TRẦN THỊ THÙY, LÊ HẢI,  
NGUYỄN QUỐC HIỂN

*Viện Nghiên cứu hạt nhân Đà Lạt*

Chitosan là một polyme sinh học, gồm các đơn vị của glucosamin và N-axetylglucosamin liên kết với nhau qua cầu nối  $\beta$ , 1-4 glycosit. Do các đặc tính như không độc, tính tương hợp sinh học nên chitosan được sử dụng trong bảo quản thực phẩm, trong lĩnh vực y tế để làm màng bóng, ... [3, 6]. Bên cạnh đó, chitosan cũng có khả năng kháng các loại vi khuẩn, virus, nấm bệnh trên thực vật mà không gây ô nhiễm môi trường, do vậy chitosan tỏ ra rất hữu ích trong việc sản xuất các loại nông phẩm và rau quả sạch [1-4, 6, 8]. Tuy nhiên, do chitosan có mức độ deaxetyl hoá khác nhau và khối lượng phân tử khá cao nên phần nào hạn chế khả năng ứng dụng của nó. Bức xạ gamma có khả năng cắt mạch các loại polysaccharit như tinh bột, anginat, chitosan, ... [5].

Trong bài báo này, chúng tôi nghiên cứu tăng cường khả năng kháng nấm phòng lá chè (*Exobasidium vexans* Masee) của chitosan chiếu xạ.

### I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 1. Chitosan

Sử dụng loại chitosan 7B, 8B và 10B có mức độ deaxetyl hoá tương ứng 70, 80 và 99% là sản phẩm của hãng Katokichi, Nhật Bản. Bột chitosan được chiếu xạ trên nguồn gamma Co-60 tại Viện Nghiên cứu hạt nhân Đà Lạt với liều xạ 50, 75, 100, 150 và 200 kGy, suất liều 2,2 kGy/h. Các mẫu chitosan nghiên cứu được hoà tan trong axit axetic 0,5% và điều chỉnh về pH = 6,0 bằng NaOH 1N. Sau đó, dung dịch được lọc bằng màng lọc Millipore (Millex GS) 0,22  $\mu$ m và pha loãng với các nồng độ 400, 300, 200, 100 ppm trong môi trường nuôi cấy.

#### 2. Nấm phòng lá chè (*Exobasidium vexans* Masee)

Nấm phòng lá chè được nuôi cấy trên môi trường Czapeck-Dox có bổ sung 1% nước chiết lá chè ở nhiệt độ 25°C.

#### 3. Thử nghiệm khả năng kháng nấm *in vitro*

Thử nghiệm khả năng kháng nấm *in vitro* được thực hiện theo phương pháp như đã mô tả trong công trình trước đây [6]. Khả năng kháng nấm của chitosan được xác định như sau: đếm số khuẩn lạc trong môi trường đối chứng không có chitosan ( $N_0$ ), số khuẩn lạc trong môi trường nuôi cấy chứa chitosan với nồng độ khác nhau ( $N$ ), xác định tỷ lệ  $N/N_0$  ở các nồng độ chitosan khác nhau.

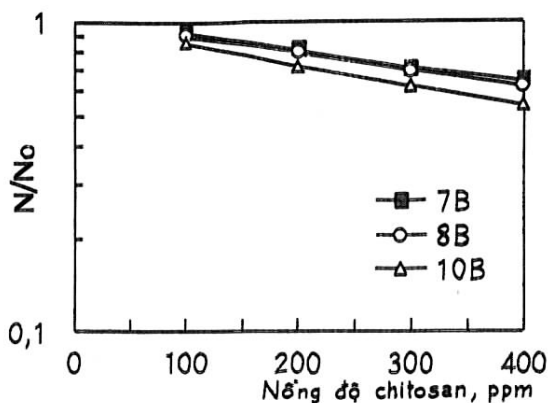
Biểu diễn sự phụ thuộc  $N/N_0$  theo nồng độ chitosan trên giấy bán logarit, xác định nồng độ chitosan gây chết 50% ( $LD_{50}$ ) số tế bào nấm. Mỗi thí nghiệm được tiến hành lặp lại 5 lần.

#### 4. Khả năng kháng nấm *in vivo*

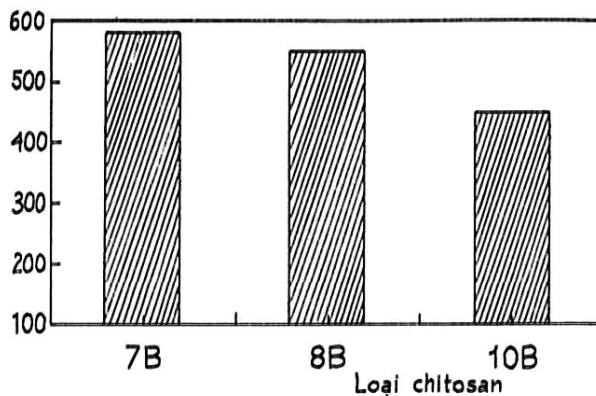
Cây chè 6 tháng tuổi được chia ra làm 3 lô thí nghiệm, mỗi lô 30 cây. Lô 1 (đối chứng) được chăm sóc bình thường, lô 2 và lô 3 được phun 3 lần với dung dịch nấm có số bào tử (hoặc hệ sợi) là  $10^6$ /ml cho ướt đều hai mặt lá, mỗi lần cách nhau 2 ngày. Sau 2 ngày tính từ lần phun thứ 3, lô 2 được phun dung dịch chitosan 10B chiếu xạ 75 kGy với nồng độ 3g/l, phun 5 lần, mỗi lần cách nhau 3 ngày. Lô 3 tiếp tục chăm sóc bình thường. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần và tiến hành trong 50 ngày. Các chỉ tiêu đo đặc là chiều cao cây, số lá, tần suất bệnh trên lá chè [7].

### II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 1. Khả năng kháng nấm phòng lá chè *in vitro* của 3 loại chitosan



Hình 1. Tương quan giữa tỷ lệ  $N/N_0$  và nồng độ chitosan

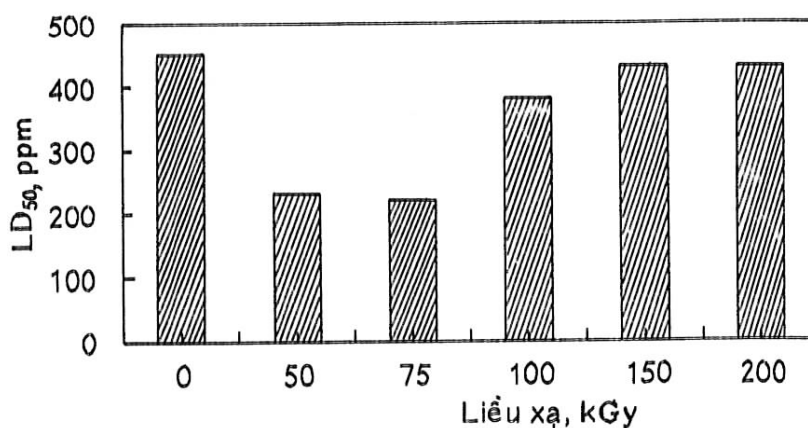


Hình 2. Nồng độ gây chết 50% ( $LD_{50}$ ) của chitosan 7B, 8B và 10B không chiếu xạ

Kết quả ở hình 1 cho thấy chitosan có khả năng kháng nấm phòng lá chè. Các loại chitosan với mức độ deaxetyl hoá khác nhau có khả năng kháng nấm khác nhau. Theo Kendra (1984), khả năng kháng nấm của chitosan có liên quan đến mức độ deaxetyl hoá, nếu mức độ này quá thấp (chitin) thì khả năng kháng nấm cũng không cao.

Chitosan có mức độ deaxetyl hoá càng cao khả năng kháng nấm càng lớn. Để ức chế 50% tế bào nấm, loại chitosan 7B cần nồng độ cao nhất (580ppm), trong khi đó loại chitosan 10 B, nồng độ này là thấp nhất (450 ppm) (hình 2).

### 2. Ảnh hưởng của liều xạ lên khả năng kháng nấm của chitosan 10B



Hình 3. Ảnh hưởng của liều xạ lên khả năng kháng nấm của chitosan 10B

Hình 3 cho thấy bức xạ đã ảnh hưởng lên khả năng kháng nấm của chitosan 10B và chitosan 10B chiếu xạ từ liều 50-200 kGy. Ở liều 50kGy, nồng độ chitosan ức chế 50% số tế bào nấm chỉ còn 230 ppm và ở liều 75 kGy nồng độ này là 220 ppm. Từ liều xạ 100 kGy đến 200 kGy, nồng độ ức chế 50% bắt đầu gia tăng. Như vậy, chiếu xạ chitosan liều cao cũng không mang lại

hữu ích đáng kể trong việc ức chế sự phát triển của nấm.

### 3. Ảnh hưởng của chitosan 10B chiếu xạ lên chiều cao cây và số lá cây chè

Bảng 1 cho thấy chitosan ảnh hưởng lên chiều cao và số lá cây chè. Sau 1 tháng, ở lô có phun chitosan 10B chiếu xạ 75kGy, cây đã cao hơn và

đặc biệt số lá nhiều hơn so với cây ở lô đối chứng.

Bảng 1

**Ảnh hưởng của chitosan 10B chiếu xạ lên chiều cao và số lá cây chè**

Lô	Ngày đo							
	30 tháng 6				30 tháng 7			
	Chiều cao (cm)	%	Số lá/cây	%	Chiều cao (cm)	%	Số lá/cây	%
1	38,1±0,2	100,0	11,4±0,1	100,0	41,0±0,1	100,0	13,1±0,1	100,0
2	38,0±0,4	99,7	11,3±0,1	99,1	41,8±0,2	102,0	14,2±0,2	108,4
3	38,2±0,1	100,3	11,0±0,2	96,5	40,6±0,3	99,0	12,8±0,1	97,7

Lô 1: đối chứng (cây được chăm sóc bình thường)

Lô 2: cây được nhiễm nấm nhân tạo, sau đó phun dung dịch chitosan 10B chiếu xạ 75 kGy để trị bệnh

Lô 3: cây được nhiễm nấm nhân tạo, nhưng không phun dung dịch chitosan để trị bệnh

**4. Khả năng kháng nấm phòng lá chè *in vivo* của chitosan 10B chiếu xạ**

Khả năng kháng nấm phòng lá chè trên cây chè của chitosan chiếu xạ được thể hiện rõ trên bảng 2. Ở giai đoạn đầu, các lô 1, 2 và 3 đều bị nhiễm bệnh gần như tương đương nhau (ngày 30/6). Sau khi cho nhiễm bệnh thì lô 2 và 3 nhiễm bệnh cao, do ngoài nhiễm tự nhiên còn bị nhiễm nhân tạo. Các giai đoạn sau, tần suất nhiễm bệnh phòng lá chè trên cây chè đều ở cấp 1, ở lô 2 (nhiễm bệnh nhân tạo và phun

chitosan) tần suất nhiễm bệnh thấp nhất 0,173. Ở lô 1 (đối chứng) tần suất nhiễm bệnh là 0,421 gần bằng với lô 3 (nhiễm bệnh nhân tạo và không phun chitosan) là 0,471, có lẽ do trong không gian tồn tại vô số bào tử nấm bệnh trong khi đó điều kiện khí hậu trong tháng 7 (ấm, ẩm) phù hợp cho sự nảy mầm và phát triển của nấm bệnh, dẫn đến có tần suất nhiễm bệnh cao hơn nhiều so với lô 2. Như vậy chitosan 10B chiếu xạ 75 kGy đã chứng tỏ hiệu ứng ức chế sự phát triển của nấm phòng lá chè trên cây.

Bảng 2

**Ảnh hưởng của chitosan 10B chiếu xạ đến khả năng kháng nấm phòng lá chè trên cây**

Lô	Tần số bệnh	Ngày đo				
		30/6	8/7	15/7	22/7	30/7
1		0,078	0,132	0,345	0,394	0,421
2		0,078	0,153	0,180	0,140	0,173
3		0,077	0,420	0,431	0,442	0,471

Lô 1: đối chứng (cây được chăm sóc bình thường)

Lô 2: cây được nhiễm nấm nhân tạo, sau đó phun dung dịch chitosan 10B chiếu xạ 75kGy để trị bệnh

Lô 3: cây được nhiễm nấm nhân tạo, nhưng không phun dung dịch chitosan

### III. KẾT LUẬN

Từ những kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của chitosan chiếu xạ lên khả năng kháng nấm phòng lá trên cây chè, có thể rút ra các kết luận sau:

1. Trong các loại chitosan nghiên cứu thì chitosan 10B có khả năng kháng nấm tốt nhất.

2. Chitosan 10B chiếu xạ ở liều 75kGy với nồng độ 220 ppm đã ức chế 50% số lượng nấm.

3. Phun dung dịch chitosan 10B chiếu xạ 75 kGy lên cây chè không những đã làm giảm tần suất bệnh từ 0,421 xuống còn 0,173 mà còn có hiệu ứng tăng trưởng thêm qua sự gia tăng chiều cao và số lá của cây chè.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Allan C. R. and Hadwiger L. A., 1979:

Exper. Mycol., 3: 285-287.

2. Chin L. F. and Wu J. C., 1998: Chitosan benefits cultivation of vegetable, 3rd Asia-Pacific Chitin and Chitosan Symposium, Taiwan.

3. Hirano S., 1996: Biotechnology Annual Review, 2: 237-258.

4. Kendra D. F. and Hadwiger L. A., 1984: Exper. Mycol. 8: 276-281.

5. Matsushashi S. and Kume T., 1997: J. Sci. Food Agric., 73: 237-241.

6. Pham Thi Le Ha, 1999: Food Irradiation, 34: 43-46.

7. Vụ Đào tạo, Bộ Nông nghiệp, 1976: Phương pháp thí nghiệm đồng ruộng, Nxb Nông nghiệp.

8. Pospieszny H., Chirkov S. and Atabekov J., 1991: Plant Science, 79: 63-68.

### ANTI-FUNGAL ACTIVITY OF IRRADIATED CHITOSAN AGAINST *EXOBASIDIUM VEXANS MASSEE*

PHAM THI LE HA et al

#### SUMMARY

The anti-fungal activity of chitosan induced by the irradiation has been investigated. The highly deacetylated chitosan (99%) irradiated at the dose 75 kGy, was the most effective for the growth inhibition of *Exobasidium vexans Massee* and the 50% lethal concentration ( $LD_{50}$ ) was of 220 ppm. The frequency of diseased leaves was 0.173 for tea bed sprayed with chitosan compared with 0.421 for the control.

Ngày nhận bài: 25-5-2001