

NGHIÊN CỨU HIỆU LỰC KHÁNG NẤM *COLLECTOTRICHUM CAPSICI* GÂY BỆNH THÁN THƯ TRÊN CÂY ỚT CỦA PHÂN ĐOẠN OLIGOCHITOSAN CHẾ TẠO BẰNG PHƯƠNG PHÁP CHIẾU XẠ KẾT HỢP XỬ LÝ HÓA HỌC

Phạm Đình Dũng^{1,2}, Nguyễn Tiến Thắng³, Dương Hoa Xô⁴, Lê Quang Luân⁴✉

¹Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Nông nghiệp Công nghệ cao Thành phố Hồ Chí Minh

²Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³Viện Sinh học nhiệt đới Thành phố Hồ Chí Minh

⁴Trung tâm Công nghệ sinh học Thành phố Hồ Chí Minh

✉ Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: lequangluan@gmail.com

Ngày nhận bài: 08.8.2016

Ngày nhận đăng: 20.02.2017

TÓM TẮT

Chitosan được cắt mạch bằng phương pháp chiếu xạ dung dịch chitosan 5% trong acetic acid có và không có xử lý kết hợp H₂O₂ để chế tạo oligochitosan. Chế phẩm oligochitosan có khối lượng phân tử (Mw) ~ 14,84 kDa chế tạo bằng phương pháp chiếu xạ kết hợp xử lý H₂O₂ được sử dụng để tách thành 5 phân đoạn oligochitosan có Mw khác nhau (F₁: Mw < 1 kDa, F₂: ~ 1-3 kDa, F₃: Mw ~ 3-10 kDa, F₄: Mw ~ 10-30 kDa và F₅: Mw > 30 kDa) phục vụ cho nghiên cứu hiệu ứng sinh học trên cây ớt (*Capsicum frutescens* L.). Kết quả thử nghiệm về hiệu ứng tăng trưởng cho thấy các phân đoạn oligochitosan đều có tác dụng gia tăng sinh khối tươi (9,9 - 56,3%) và hàm lượng chlorophyll (20 -92,4%) khi xử lý trên cây ớt. Thêm vào đó, kết quả khảo sát hiệu lực kháng nấm *Collectotrichum capsici* gây bệnh thán thư (anthracnose) trên cây ớt trong điều kiện *in vitro* cho thấy, các phân đoạn F₃, F₄ và F₅ có Mw ≥ 3 kDa đều có tác dụng ức chế sự phát triển của nấm *C. capsici* ở nồng độ sử dụng là 0,5%. Trong khi đó xử lý phun các phân đoạn F₂ và F₃ có Mw ~ 1 - 10 kDa lại có tác dụng gia tăng khả năng kháng bệnh của cây ớt đối với loại nấm bệnh này đồng thời còn gia tăng trọng lượng quả từ 39,0 đến 48,7%. Như vậy, các phân đoạn oligochitosan có Mw ~ 1-10 kDa không chỉ có tác dụng tăng trưởng mà còn có tác dụng làm gia tăng khả năng kháng bệnh thán thư do nấm *C. capsici* gây ra ở cây ớt.

Từ khóa: Bệnh thán thư, chiếu xạ γ , *Collectotrichum capsici*, oligochitosan, phân đoạn

MỞ ĐẦU

Bệnh thán thư (anthracnose) làm thối trái do nấm *Collectotrichum capsici* gây ra trên cây ớt là một trong các bệnh gây thiệt hại nghiêm trọng nhất là và làm tổn thất từ 10 đến 80% sản lượng trồng ớt ở Ấn Độ, Thái Lan, Hàn Quốc và Việt Nam. Ở Việt Nam, tất cả các vùng trồng ớt tập trung trên cả nước đều bị bệnh thán thư phá hoại nặng nề (Trần Thanh Tùng, 2003). Các biện pháp phòng trừ bệnh do nấm *C. capsici* thông dụng hiện nay là dùng thuốc bảo vệ thực vật có nguồn gốc hóa học không an toàn, gây độc hại cho người sử dụng và môi trường (Trần Thanh Tùng, 2003; Alexander, Waldenmaier, 2002; Roberts *et al.*, 2001).

Chitosan là một polymer có nguồn gốc tự nhiên gồm các đơn phân β -D-glucosamine và β -N-acetyl-

glucosamine (Le *et al.*, 2005). Trong nông nghiệp, chitosan được sử dụng làm chất tăng trưởng thực vật (Kumar, 2001), bảo quản nông sản và bọ hạt giống do chúng có hoạt tính kháng vi sinh vật (Tay *et al.*, 1993; Vasyokova *et al.*, 2001; Kume *et al.*, 2002). Oligochitosan còn có tác dụng hỗ trợ vào cơ chế phòng vệ ở thực vật, kích thích sự tổng hợp và tiết ra một số loại enzyme như phytoalexin, chitinase, pectinase, ... như là các chất kháng bệnh tự nhiên trên thực vật (Warker-Shimmons *et al.*, 1983; Roberts *et al.*, 2001; Badawy, Rabea, 2009; Le *et al.*, 2006). Gần đây Xu *et al.*, (2006) cũng đã thông báo rằng phân đoạn oligochitosan có khối lượng phân tử (Mw) thấp đã có hoạt tính kháng đối với nhiều loại nấm gây bệnh thực vật như *Phytophthora capsici*, *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum orbiculare*, *Exserohilum turcicum*, *Fusarium oxysporum* và *Pyricularia oryzae*. Thêm vào đó,

Luan *et al.*, (2006) cũng đã cho thấy các phân đoạn oligochitosan có khối lượng phân tử từ 1 đến 10 kDa có hoạt tính tăng trưởng và hiệu ứng phytoalexin cao hơn so với các phân đoạn khác. Để chế tạo oligochitosan, chiếu xạ được cho là phương pháp hiệu quả nhất hiện nay do có nhiều ưu điểm hơn các phương pháp sử dụng enzyme hay các tác nhân hóa học (Kume *et al.*, 2002). Mặc dù vậy, gần đây phương pháp chiếu xạ kết hợp xử lý hydrogen peroxide trong cắt mạch các polysachride tự nhiên đã có tác dụng làm giảm một đáng kể liều chiếu xạ (Luan *et al.*, 2012; Duy *et al.*, 2011) và do đó đã làm giảm chi phí chiếu xạ và hạ giá thành sản phẩm. Mục đích của nghiên cứu này là nghiên cứu hiệu ứng tăng trưởng và hoạt lực kháng nấm *C. capsici* gây bệnh thán thư trên cây ớt của các phân đoạn oligochitosan chế tạo bằng phương pháp cộng hợp (synergic) nhằm tiến tới ứng dụng trong sản xuất nông nghiệp để tạo ra các sản phẩm nông sản sạch, chất lượng cao và thân thiện với môi trường.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Chitosan 8B có độ deacetyl khoảng 80% của Hãng Kaitokichi, Nhật Bản. Hydrogen peroxide, acetic acid, môi trường potato dextrose agar (PDA) của Hãng Merk, Đức. Nguồn xạ tia gamma GC-5000, BRIT, Ấn Độ tại Viện Nghiên cứu Hạt nhân Đà Lạt. Chủng nấm *Collectotrichum capsici* do Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Nông nghiệp Công nghệ cao cung cấp và giống ớt thí nghiệm là ớt chỉ thiên TN278 (*Capsicum frutescens* L.) do Công ty Trang Nông cung cấp.

Chế oligochitosan bằng phương pháp chiếu xạ và chiếu xạ kết hợp xử lý H₂O₂

Hòa tan 5 g chitosan trong dung dịch acetic acid 0,5% có và không có 1% H₂O₂ sau định mức đến 100 ml bằng chính các dung môi tương ứng để có được dung dịch chứa 5% chitosan trong 0,5% acetic acid và trong 0,5% acetic acid kết hợp 1% H₂O₂. Tiến hành chiếu xạ các mẫu trên nguồn xạ gamma Co-60 trong dây liều 5 – 150 kGy với suất liều 3 kGy/h.

Xác định khối lượng phân tử

Mẫu oligochitosan sau khi chiếu xạ được xác định khối lượng phân tử (Mw) trên máy GPC sử dụng 4 cột TSKgel PW_{xl}, (G6000PW_{xl}, G4000PW_{xl}, G3000PW_{xl}, G2500PW_{xl}) được kết nối với cột bảo vệ TSK guard column PW_{xl}. Các mẫu chitosan được đo với nồng độ 0,1% (w/v) trong dung môi

CH₃COOH 0,2M và CH₃COONa 0,1M ở nhiệt độ 40°C với tốc độ bơm là 1 ml/phút và chất chuẩn sử dụng là PEG có Mw là 0,2 – 6 kDa và PEO với Mw là 24 – 920 kDa. Độ suy giảm khối lượng phân tử được tính như sau: ĐSG (%) = $(Mw_0 - Mw) \times 100 / Mw_0$; trong đó Mw₀ là khối lượng phân tử của chitosan ban đầu, Mw là khối lượng phân tử của oligochitosan tại liều chiếu xạ tương ứng.

Tách các phân đoạn oligochitosan

Dung dịch chitosan sau khi chiếu xạ được tiến hành tách để thu nhận các phân đoạn oligochitosan trên hệ thống lọc khuấy nén khí (Stirred Ultrafiltration Cell, model 8400, Milopore Co., USA) sử dụng màng tách cellulose có đường kính 63,5 nm và kích thước lỗ lọc là 1000 (YM1), 3000 (YM3), 10.000 (YM10) và 30.000 kDa (YM30). Dung môi sử dụng là acetic acid 0,5% và áp suất nén 0,1 Mpa từ khí nitơ (Luan *et al.*, 2005; 2009).

Xác định hiệu ứng tăng trưởng

Cây ớt sau khi gieo 10 ngày tuổi được chuyển vào chậu nhựa có chứa xơ dừa và tiến hành trồng theo phương pháp thủy canh tĩnh sử dụng dinh dưỡng hyponex 0,1% (Nhật Bản) có bổ sung 100 ppm các phân đoạn oligochitosan tương ứng (Luan *et al.*, 2012). Đối chứng được trồng trên nguồn dinh dưỡng tương tự nhưng chỉ bổ sung thêm dung dịch acetic acid. Sau 14 ngày trồng trong nhà kính, tiến hành xác định sinh khối tươi và hàm lượng chlorophyll. Hàm lượng sắc tố chlorophyll được xác định theo phương pháp quang phổ (Nguyễn Ngọc Tân, Nguyễn Đình Huyền, 1981; Nguyễn Văn Mã *et al.*, 2013) như sau: nghiền 5 g lá trong 100 ml dung dịch ethanol 95%, sau đó ly tâm trong 10 phút ở 4.000 vòng/phút và định lượng trên máy UV-Vis Lambda 25 (của Hãng Perkin Elmer – Mỹ) ở hai bước sóng 648 và 664 nm. Hàm lượng chlorophyll tổng số được tính theo công thức: Chlorophyll (µg/g) = $(\alpha_a \times D_{664} + \beta_b \times D_{648}) \times k/m$; trong đó D₆₆₄, D₆₄₈ lần lượt là độ hấp thụ ở bước sóng 664 và 648 nm, $\alpha_a = 5,24$ (hằng số chlorophyll a chiết trong cồn), $\beta_b = 22,44$ (hằng số chlorophyll b chiết trong cồn), k là hệ số pha loãng, m là khối lượng mẫu ban đầu.

Đánh giá hiệu lực ức chế của các phân đoạn oligochitosan đối với nấm *C. capsici* trên môi trường thạch rắn

Môi trường PDA có bổ sung dung dịch oligochitosan có Mw và nồng độ khác nhau. Các khoanh nấm 7 ngày tuổi có đường kính 6 mm được cấy vào trung tâm đĩa môi trường, nuôi cấy trong

điều kiện tối ở nhiệt độ phòng. Theo dõi đường kính khuẩn lạc nấm *C. capsici* và bắt đầu đo đường kính sau 10 ngày nuôi cấy. Hoạt lực ức chế của các phân đoạn oligochitosan được xác định trên cơ sở mức độ phát triển so với đối chứng (SVĐC) như sau: MĐP.TSVĐC (%) = $d/D \times 100$, trong đó: D, d (mm) lần lượt là đường kính khuẩn lạc nấm trên môi trường PDA không bổ sung (đối chứng) và có bổ sung phân đoạn oligochitosan.

Đánh giá hiệu ứng phòng bệnh thán thư *in vivo* trên cây ớt

Cây ớt được trồng trong nhà kính sau 62-65 ngày tuổi và ngay khi bắt đầu ra quả non cây được sử dụng để xử lý phun phân đoạn oligochitosan với nồng độ 100 ppm. Mỗi nghiệm thức chọn 5 cây và lặp lại 3 lần. Nghiệm thức đối chứng xử lý bằng dung môi tương ứng và không chứa oligochitosan. Dung dịch thí nghiệm được phun ướt đều toàn bộ thân và lá cây ớt và tiến hành phun liên tục 3 lần, mỗi lần cách nhau 7 ngày. Sau 24 giờ tính từ lần phun thứ 3, chọn ngẫu nhiên mỗi cây 50 quả ớt và tiến hành gây nhiễm bằng cách tạo vết thương trên

trái rồi phun dung dịch nấm *C. capsici* với mật độ 10^4 bào tử/ml. Theo dõi và xác định tỷ lệ nhiễm bệnh của quả ớt sau 14 ngày phun nấm bằng cách đếm số quả bị nhiễm bệnh trên tổng số 50 quả gây nhiễm nhân tạo ở mỗi cây. Trọng lượng quả được xác định bằng cách cân 50 quả vừa chuyển đều sang màu đỏ ở mỗi cây.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Chiếu xạ chitosan và tách các phân đoạn oligochitosan

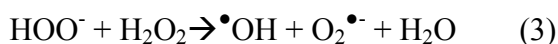
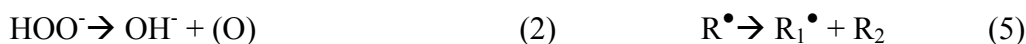
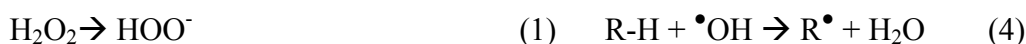
Kết quả bảng 1 cho thấy trong cả 2 trường hợp có và không có bổ sung H_2O_2 thì sự suy giảm Mw của chitosan bằng bức xạ tia γ đều rất nhanh trong khoảng liều thấp và sau đó giảm chậm dần ở các liều xạ cao hơn. Tuy nhiên việc xử lý kết hợp với H_2O_2 đã có tác dụng làm giảm đi đáng kể liều xạ, cụ thể là để cắt mạch chitosan có Mw từ 193,7 kDa xuống còn 11,4 kDa thì cần đến 75 kGy trong khi nếu kết hợp xử lý với 1% H_2O_2 thì chỉ cần liều xạ là 10 kGy để tạo ra sản phẩm oligochitosan có Mw ~ 14,8 kDa.

Bảng 1. Sự suy giảm Mw của theo liều xạ khi chiếu xạ dung dịch chitosan 5%.

Liều xạ, kGy	Không bổ sung H_2O_2		Liều xạ, kGy	Có xử lý kết hợp 1% H_2O_2	
	Mw, kDa	Độ suy giảm Mw, %		Mw, kDa	Độ suy giảm Mw, %
0	193,662	0	0	193,662	0
10	100,542	48,08	5	39,197	79,76
25	45,143	76,69	10	14,837	92,58
75	11,406	94,11	15	7,510	96,12
100	5,894	96,96	20	5,067	97,38
150	4,630	97,61	25	4,102	97,88

Cơ chế cắt mạch chitosan hiệu quả bằng kết hợp đồng vận có thể được giải thích là do sự phân ly bức xạ của nước và H_2O_2 dưới tác dụng của tia γ hình thành nên gốc tự do hydroxyl ($\bullet OH$) có tính oxy hóa

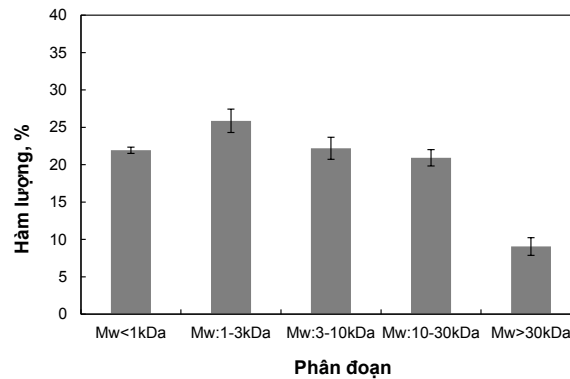
manh làm tăng hiệu quả cắt mạch của chitosan. Cơ chế cắt mạch chitosan (ký hiệu là R-H) khi có mặt của H_2O_2 đã được Qin *et al.* (2002) đề cập, theo đó cơ chế cắt mạch gồm các bước như sau:



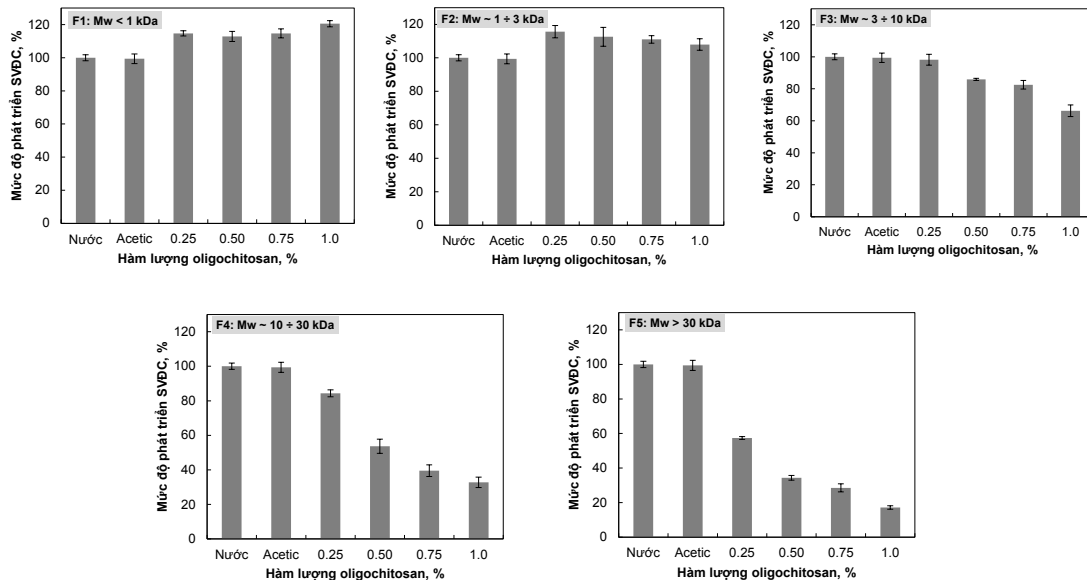
Các kết quả nghiên cứu cho thấy phương pháp kết hợp đồng thời tia γ và H_2O_2 cho hiệu quả cắt mạch rất nhanh và có thể giảm được gần 7,5 lần chi phí chiếu xạ. Trong nghiên cứu trước đây đã cho thấy oligochitosan có $M_w \sim 11-16$ kDa không những có hiệu ứng tăng trưởng mà còn có tác dụng thúc đẩy cây trồng gia tăng hiệu ứng của nhiều loại enzyme giúp cây kháng bệnh như chitinase, phenylalanyl ammonia-lyase (PAL) v.v. (Luan *et al.*, 2005 và 2006). Chính vì vậy dung dịch oligochitosan chiếu xạ 10 kGy kết hợp xử lý 1% H_2O_2 và có $M_w \sim 14,8$

kDa được lựa chọn để tách các phân đoạn cho các nghiên cứu tiếp theo nhằm tìm hiểu hoạt tính sinh học của các phân đoạn trong sản phẩm này.

Với việc sử dụng 5 loại màng tách là YM1, YM3, YM10 và YM30 chúng tôi đã tách được 5 phân đoạn oligochitosan tương ứng là $F_1: M_w < 1$ kDa, $F_2: M_w \sim 1-3$ kDa, $F_3: M_w \sim 3-10$ kDa, $F_4: M_w \sim 10-30$ kDa và $F_5: M_w > 30$ kDa với hàm lượng cụ thể được trình bày ở hình 1. Các phân đoạn này được sử dụng để thử nghiệm các hoạt tính sinh học trên ớt và nấm *C. capsici*.



Hình 1. Hàm lượng các phân đoạn oligochitosan tách được từ dung dịch oligochitosan 5% chiếu xạ 10 kGy kết hợp xử lý 1% H_2O_2 .



Hình 2. Ảnh hưởng của các phân đoạn oligochitosan ở nồng độ khác nhau đến sự phát triển của nấm *C. capsici* trên môi trường PDA.

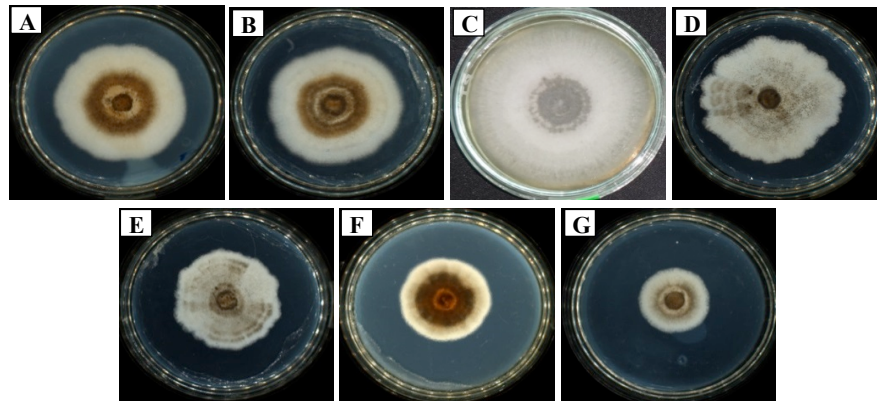
Hoạt tính kháng nấm *C. capsici* in vitro của các phân đoạn oligochitosan

Kết quả khảo sát hoạt lực ức chế nấm *C. capsici* trên môi trường PDA của các phân đoạn và nồng độ oligochitosan khác nhau được trình bày trên hình 2 và 3 cho thấy hiệu lực ức chế nấm trong điều kiện in vitro gia tăng theo nồng độ và khối lượng phân tử của oligochitosan. Các phân đoạn F₃, F₄ và F₅ đều có hoạt tính ức chế trực tiếp loại nấm này ở nồng độ 0,5%, trong khi đó các phân đoạn F₁ và F₂ với Mw < 3 kDa lại không có tác dụng ức chế ngay cả ở nồng độ bổ sung là 1%. Hoạt tính kháng nấm của oligochitosan được giải thích là do chúng làm thay đổi tính thấm của tế bào (Kim, Rajapakse, 2005; Long et al., 2014), ngăn chặn việc sao chép RNA của tế bào (Bautista-Baños et al., 2006; Long et al., 2014) hay do hoạt tính tạo phức (chelate) với các yếu tố vi lượng làm ức chế sự phát triển của hệ sợi nấm (Kim, Rajapakse, 2005, Bautista-Baños et al., 2006). Thêm vào đó oligochitosan còn được cho là chế

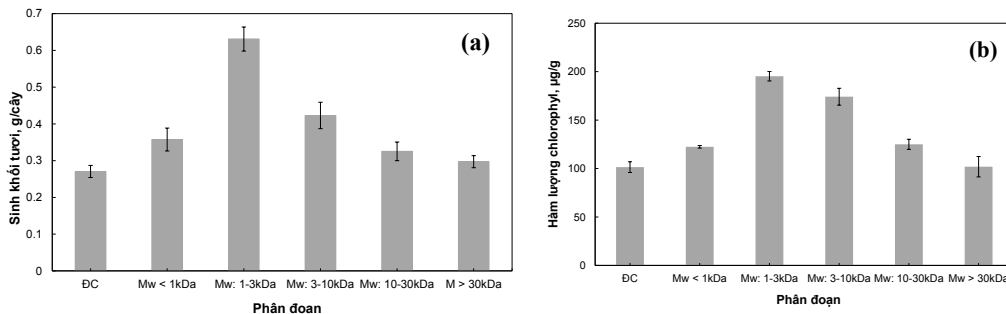
phẩm diệt nấm hiệu quả bằng cách ngăn cản bào tử nấm nảy mầm, cản trở ống mầm kéo dài và ức chế sợi nấm bệnh phát triển (Eweis et al., 2006; Liu et al., 2007; Hernández-Lauzardo et al., 2011).

Khảo sát hiệu ứng tăng trưởng của các phân đoạn oligochitosan trên cây ớt

Kết quả khảo sát hiệu ứng tăng trưởng trên cây ớt trồng theo phương pháp thủy canh tĩnh được trình bày trên hình 4 cho thấy các lô thí nghiệm có sử dụng oligochitosan ở các phân đoạn khác nhau với nồng độ 100 ppm đều cho sinh khối vượt trội so với lô đối chứng. Trong đó, lô thí nghiệm được xử lý với oligochitosan ở phân đoạn F₂ cho kết quả tốt nhất khi gia tăng sinh khối tươi lên 56,3% và hàm lượng chlorophyll trong lá lên 92,4% so với đối chứng. Kết quả này cho thấy oligochitosan làm gia tăng hàm lượng chlorophyll ở lá và qua đó giúp gia tăng năng suất quang hợp dẫn đến làm gia tăng sinh khối cây ớt.



Hình 3. Sự phát triển của nấm *C. capsici* sau 10 ngày nuôi cấy trên môi trường PDA có bổ sung 1% phân đoạn oligochitosan. A: Đối chứng chỉ bổ nước; B: Chỉ bổ sung acetic acid; C-F: Bổ sung các phân đoạn F₁, F₂, F₃, F₄, và F₅ tương ứng.

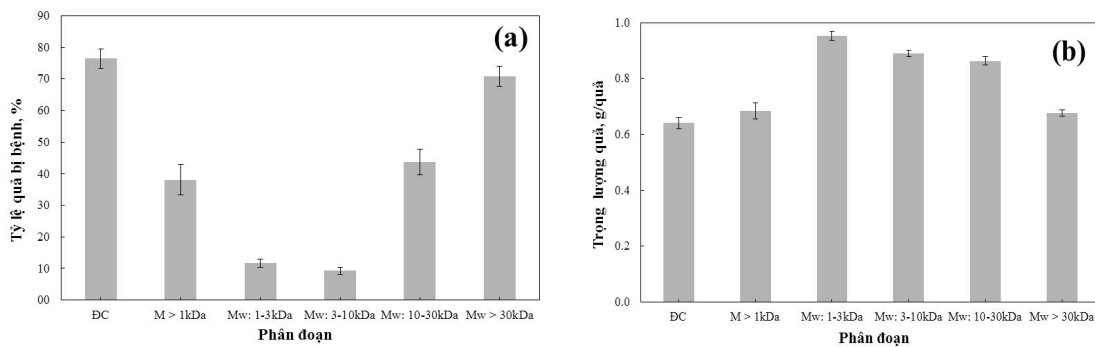


Hình 4. Sự gia tăng sinh khối(a) và hàm lượng chlorophyll (b) ở cây ớt khi bổ sung các phân đoạn oligochitosan khác nhau.

Khảo sát hiệu ứng phòng bệnh thán thư *in vivo* của các phân đoạn oligochitosan trên cây ớt

Kết quả khảo sát hiệu ứng phòng bệnh thán thư trên cây ớt được trình bày trên hình 5a cho thấy các phân đoạn oligochitosan đều có khả năng hạn chế tỷ lệ nhiễm bệnh trên quả ớt. Trong đó, nghiệm thức xử lý oligochitosan phân đoạn F₂ và F₃ đã hạn chế tỷ lệ nhiễm bệnh của quả ớt có ý nghĩa nhất với tỷ lệ quả bị bệnh lần lượt chỉ là 11,6% và 9,2%, trong khi lô đối chứng không xử lý oligochitosan có tỷ lệ nhiễm bệnh lên đến 76,4%. Điều này được giải thích là do các oligochitosan mạch ngắn (Mw ~ 1-10 kDa) dễ dàng xâm nhập vào tế bào và tham gia hiệu quả

trong hiệu ứng phối hợp, tạo các phytoalexin được xem như là một chất kháng nấm tự nhiên trên thực vật (Luan *et al.*, 2005). Ngoài ra kết quả nhận được từ hình 5b cũng cho thấy rằng tất cả các lô thí nghiệm có xử lý phun các phân đoạn oligochitosan đều có trọng lượng trái vượt trội so với đối chứng, trọng lượng trái tăng cao nhất ở nghiệm thức bổ sung oligochitosan phân đoạn F₂ đạt mức 9,5 g/quả tươi (tăng 48,7% trọng lượng quả so với đối chứng). Như vậy, có thể thấy khi phun chế phẩm oligochitosan có Mw ~ 1-10 kDa không những làm giảm tỷ lệ nhiễm bệnh trên quả ớt mà còn làm gia tăng trọng lượng quả, góp phần tăng năng suất và cải thiện chất lượng quả ớt.



Hình 5. Tỷ lệ quả bị bệnh thán thư (a) và trọng lượng quả (b) ở cây ớt sau khi xử lý phun các phân đoạn oligochitosan và gây nhiễm nấm *C. capsici*.

KẾT LUẬN

Năm phân đoạn oligochitosan là F₁: Mw < 1 kDa, F₂: Mw ~ 1-3 kDa, F₃: Mw ~ 3-10 kDa, F₄: Mw ~ 10-30 kDa và F₅: Mw > 30 kDa đã được chế tạo bằng phương pháp chiếu xạ gamma Co-60 kết hợp xử lý H₂O₂. Các phân đoạn oligochitosan đều có tác dụng làm gia tăng hàm lượng chlorophyll và sinh khối tươi khi xử lý trên cây ớt. Các phân đoạn F₃, F₄ và F₅ đã có tác dụng ức chế sự phát triển của nấm *C. capsici in vitro* ở nồng độ bổ sung là 0,5 - 1%. Trong khi đó kết quả nghiên cứu *in vivo* cho thấy các phân đoạn F₂ và F₃ có Mw ~ 1-10 kDa lại có tác dụng tăng khả năng kháng bệnh của cây ớt và gia tăng trọng lượng quả từ 39,0 đến 48,7%. Chế phẩm oligochitosan có Mw ~ 1-10 kDa chế tạo bằng phương pháp chiếu xạ hứa hẹn là một sản phẩm tiềm năng ứng dụng trong sản xuất nông nghiệp theo hướng công nghệ cao để phòng bệnh thán thư cũng như gia tăng năng suất và chất lượng quả ớt nói riêng và nhiều loại rau quả nói chung.

Lời cảm ơn: Nhóm tác giả xin cảm ơn Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Nông nghiệp Công nghệ cao Thành phố Hồ Chí Minh, khu Nông nghiệp Công nghệ cao Thành phố Hồ Chí Minh đã tài trợ kinh phí cho nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Alexander SA, Waldenmaier C (2002) Management of anthracnose in bell pepper. *Fungicide and Nematicide Tests* 58: 49.
- Badawy MEI, Rabea EI (2009) Potential of the biopolymer chitosan with different molecular weights to control postharvest gray mold of tomato fruit. *Postharvest Biol Tec* 51(1): 110–117.
- Bautista-Baños S, Hernández-Lauzardo AN, Velázquez-del Valle MG, Hernández-López M, Ait Barka E, Bosquez-Molina E, Wilson CL (2006) Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. *Crop Prot* 25(2): 108–118.

- Duy NN, Phu DV, Anh NT, Hien NQ (2011) Synergistic degradation to prepare oligochitosan by γ -irradiation of chitosan solution in the presence of hydrogen peroxide. *Rad Phys Chem* 80: 848–853.
- Eweis M, Elkholy SS and Elsabee MZ (2006) Antifungal efficacy of chitosan and its thiourea derivatives upon the growth of some sugar-beet pathogens. *Int J Biol Macromol* 38: 1–8.
- Hernández-Lauzardo AN, Velázquez-del Valle MG, Guerra-Sánchez MG (2011) Current status of action mode and effect of chitosan against phytopathogens fungi. *Microbiol Res* 5: 4243–4247.
- Kim SK, Rajapakse N (2005) Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A review. *Carbohydr Polym* 62:357-368.
- Kumar MNVR (2001) A review of chitin and chitosan applications. *React Funct Polym* 46: 1–27.
- Kume T, Nagasawa N, Yoshii F (2002) Utilization of carbohydrates by radiation processing. *Rad Phys Chem* 63: 625–627.
- Liu J, Tian SP, Meng XH, Xu Y (2007) Control effects of chitosan on postharvest diseases and physiological response of tomato fruit. *Postharvest Biol Tec* 44: 300–306.
- Long LT, Tien NTT, Trang NH, Ha TTT, Hieu NM (2014) Study on antifungal ability of water soluble chitosan against green mould infection in harvested oranges. *J Agric Sci* 6(8): 205–213.
- Luan LQ, Ha VTT, Uyen NHP, Hien NQ (2012) Preparation of oligoalginate plant growth promoter by gamma irradiation of alginate solution containing hydrogen peroxide. *J Agr Food Chem* 60: 1737–1741.
- Luan LQ, Nagasawa N, Ha VTT, Hien NQ, Nakanishi TM (2009) Enhancement of plant growth simulation activity of irradiated alginate by fractionation. *Rad Phys Chem* 78: 796–799.
- Luan LQ, Nagasawa N, Ha VTT, Kume T, Yoshii F, Nakanishi TM (2005) Biological effect of irradiated chitosan plant on plant *in vitro*. *Biotechnol Appl Bioc* 41: 49–57.
- Luan LQ, Nagasawa N, Tamada M, Nakanishi TM (2006) Enhancement of plant growth activity of irradiated chitosan by fractionation. *RadioIsotops* 55(1): 21–27.
- Nguyễn Ngọc Tân, Nguyễn Đình Huyền (1981) *Sách tra cứu tóm tắt về sinh lý thực vật*. NXB Khoa học và Kỹ thuật.
- Nguyễn Văn Mã, La Việt Hồng, Ông Xuân Phong (2013) *Phương pháp nghiên cứu sinh lý thực vật*, NXB Đại học Quốc gia Hà Nội.
- Quin C, Du YM, Xiao L (2002) Effect of hydrogen peroxide treatment on the molecular weight and structure of chitosan. *Polym Degrad Stabil* 76: 211–218.
- Roberts PD, Pernezny K, Kucharek TA (2001) Anthracnose caused by *Collectotrichum sp.* on pepper. *J Univ of Florida/Institute of Food Agr Sci*: 178–179.
- Tay LP, Khoh LK, Loh CS, Khor E (1993) A review of the applications of chitin and its derivatives in agriculture to modify plant-microbial interactions and improve crop yields biotechnol. *Bioeng* 42: 449–454.
- Trần Thanh Tùng (2003) Nghiên cứu xây dựng quy trình phòng trừ tổng hợp bệnh thán thư trên ớt cay tại Thành phố Hồ Chí Minh. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn* 10: 879–880.
- Vasyokova NI, Zinov'eva SV, Il'inskaya LI, Perekhod EA, Chalenko GI, Gerasimova NG, Il'ina AV, Valamov VP, Ozeretskoykaya OL (2001) Modulation of plant resistance to diseases by water-soluble chitosan. *Appl Biochem Microb* 37: 103–109.
- Warker-Shimmons M, Hadadwiger L, Ryan CA (1983) Chitosans and pectic polysaccharides both induce the accumulation of antifungal phytoalexin pisatin in pea pods and antinutrient proteinase inhibitor in tomato leaves. *Bioche Biophys Res Commun* 110: 194–199.
- Xu J, Zhao X, Han X, Du Y (2007) Antifungal activity of oligochitosan against *Phytophthora capsici* and other plant pathogenic fungi *in vitro*. *Pestic Biochem Phys* 87 (3): 220–228.

STUDY ON ANTIFUNGAL EFFECT OF OLIGOCHITOSAN FRACTIONS PREPARED BY IRRADIATION COMBINED WITH CHEMICAL TREATMENT ON COLLETOTRICHUM CAPSICI CAUSING ANTHRACNOSE IN CAPSICUM

Pham Dinh Dung^{1,2}, Nguyen Tien Thang³, Duong Hoa Xo⁴, Le Quang Luan⁴

¹Research & Development Center for High Technology Agriculture Ho Chi Minh City

²Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology

³Institute of Tropical Biology

⁴Biotechnology Center of Ho Chi Minh City

SUMMARY

Chitosan was degraded by gamma rays irradiation method using 5% chitosan solution in 0.5% acetic acid with and without addition of 1% H₂O₂ for preparation of oligochitosan. The oligochitosan product with molecular weight (Mw) ~ 14.84 kDa prepared by radiation in combination with H₂O₂ treatment was used to fractionate into 5 different Mw fractions (F₁: Mw < 1kDa, F₂: Mw ~ 1-3 kDa, F₃: Mw ~ 3-10 kDa, F₄: Mw ~ 10-30 kDa và F₅: Mw > 30 kDa) for testing its biological effects on red pepper plant (*Capsicum frutescens* L.). The obtained results showed that all separated fractions had the growth promotion effects on the increase of fresh biomass (9.9 - 56.3%) and chlorophyll content (20 - 92%) compared to those of the control one. In addition, the *in vitro* test of antifungal effect of separated fraction against *C. capsici* causing anthracnose on capsicum indicated that the fractions F₃, F₄ and F₅ with Mw ≥ 3 kDa inhibited the growth of *C. capsici* colonies in a Potato Dextrose Agar (PDA) media at the concentration of 0.5%. While the the results from *in vivo* tests pointed out that the fractions F₂, and F₃ with the Mw in range of 1-10 kDa not only strongly stimulated the defense response of tested plants to this pathogenic fungi causing anthracnose disease, but also the increased significantly gains of fruit biomass in 39 - 47%. Thus the oligochitosan fractions with Mw ~ 1-10 kDa are quite good products for both growth promotion effect as well as antifungal purpose for *C. capsici* causing anthracnose disease on capsicum.

Keywords: Anthracnose, *Collectotrichum capsici*, fraction, γ -irradiation, oligochitosan