

NGHIÊN CỨU CHẾ TẠO CHẾ PHẨM OLIGOCHITOSAN-BẠC NANO ỨNG DỤNG LÀM PHÂN BÓN KHÁNG BỆNH HÉO VÀNG DO NẤM *FUSARIUM OXYSPORUM* GÂY RA TRÊN CÀ CHUA

Nguyễn Thanh Vũ¹, Huỳnh Quyền², Dương Hoa Xô¹, Lê Quang Luân¹✉

¹Trung tâm Công nghệ Sinh học Tp. Hồ Chí Minh

²Trung tâm Sở hữu Trí tuệ và Chuyển giao Công nghệ, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

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

Ngày nhận bài: 15.8.2016

Ngày nhận đăng: 20.3.2017

TÓM TẮT

Chitosan có khối lượng phân tử (Mw) khoảng 573,2 kDa được chiếu xạ tia gamma ở trạng thái trương trong dung dịch H₂O₂ để cắt mạch chế tạo chitosan có khối lượng phân tử (Mw) thấp. Chitosan có Mw thấp được tiếp tục chiếu xạ dạng dung dịch 5% trong acetic acid 0,5% để chế tạo loại oligochitosan có hiệu ứng tăng trưởng thực vật. Chế phẩm oligochitosan (Mw ~ 19,5 kDa) thu được khi chiếu xạ dung dịch chitosan Mw khối lượng phân tử thấp (~ 48,4 kDa) ở liều xạ 4 kGy đã có tác dụng tăng trưởng tốt nhất khi xử lý phun lá ở cây cà chua ở giai đoạn 28 ngày tuổi với nồng độ 100 ppm. Chế phẩm oligochitosan-bạc nano cũng được chế tạo bằng phương pháp chiếu xạ dung dịch gồm 5% chitosan Mw thấp và 1 mM nitrate bạc ở liều xạ 4 kGy nhằm mục đích làm phân bón kháng bệnh cho cây cà chua. Kết quả thử nghiệm hoạt tính kháng nấm *in vitro* đối với nấm gây bệnh héo vàng trên cây cà chua (*Fusarium oxysporum*) cho thấy khi bổ sung chế phẩm oligochitosan-bạc nano vào môi trường nuôi cấy đã có tác dụng ức chế mạnh sự phát triển của nấm trên môi trường carrot agar. Tại nồng độ bạc là 20-30 ppm thì hiệu lực ức chế đạt 50,5 - 94,9% và khi bổ sung nồng độ 40 ppm thì hiệu quả đạt 100%. Như vậy chế phẩm oligochitosan-bạc nano không chỉ có tác dụng tăng trưởng đối với cây cà chua mà còn có hiệu lực diệt nấm cao đối với nấm *F. oxysporum*. Chính vì vậy chế phẩm này hứa hẹn là loại phân bón an toàn, hiệu quả và kháng bệnh tốt cho cây cà chua.

Từ khóa: Cà chua, chiếu xạ tia gamma, phân bón chứa oligochitosan-bạc nano, *Fusarium oxysporum*

MỞ ĐẦU

Chitosan là polymer của các D-glucosamine liên kết với nhau bằng liên kết (1-4)-glucoside, có nguồn gốc tự nhiên, thân thiện với môi trường (Methacanona *et al.*, 2003). Nhiều nghiên cứu đã mô tả oligochitosan (chitosan có khối lượng phân tử thấp) như là một chất kích thích tăng trưởng cây trồng, giúp gia tăng sự phát triển chồi và kéo dài rễ (Luan *et al.*, 2005; 2006). Bên cạnh đó, oligochitosan cũng được sử dụng với mục đích giúp cây trồng có khả năng kháng lại sự xâm nhiễm của các vi sinh vật gây bệnh (virus, vi khuẩn và nấm) (Matsuhashi, Kume, 1997; Kim *et al.*, 2003) thông qua sự kích thích hệ thống miễn dịch của tế bào thực vật (hiệu ứng phytoalexin) (Ryan, 1998; Hammerschmidt, 1999). Cho đến nay, phương pháp cắt mạch bức xạ đang được sử dụng đối với một số loại polysaccharide như chitosan (Nguyen *et al.*, 2011),

glucan (Lê Quang Luân *et al.*, 2013), alginate và pectin (Luan *et al.*, 2012). Phương pháp này đã thể hiện nhiều ưu điểm nổi bật như thời gian ngắn, quy trình đơn giản, sản phẩm không cần tinh chế (do không dùng chất xúc tác), độ chính xác cao và thân thiện với môi trường. Bên cạnh đó, việc kết hợp đồng thời phương pháp chiếu xạ và xử lý hóa học (hiệu ứng đồng vận, synergic) đã được chứng minh là phương pháp có tác dụng nâng cao hiệu suất cắt mạch trên alginate (Luan *et al.*, 2012) và chitosan (Duy *et al.*, 2011) một cách rất hiệu quả. Phương pháp này có thể làm giảm đáng kể liều chiếu xạ nhưng lại không làm thay đổi cấu trúc phân tử cũng như hoạt tính sinh học của sản phẩm. Công trình này tiến hành chiếu xạ chitosan kết hợp xử lý đồng thời với H₂O₂ với mục đích gia tăng hiệu suất cắt mạch trong chế tạo oligochitosan làm chất ổn định bạc nano nhằm giảm giá thành sản phẩm và nâng cao khả năng ứng dụng sản xuất rau quả và nông phẩm sạch.

Thêm vào đó, bạc nano (AgNPs) được xem là một chất kháng sinh phổ rộng thế hệ mới với nhiều đặc tính mới và có khả năng ứng dụng rộng rãi mà không bị kháng thuốc (Kim *et al.*, 2012; Franci *et al.*, 2015). Bạc nano còn cho thấy có thể ức chế vi sinh vật bằng nhiều con đường, vì vậy, chúng có thể được sử dụng như là một sản phẩm đa ức chế kiểm soát nhiều tác nhân gây bệnh thực vật khác nhau (Kim *et al.*, 2012). Ngoài ra, nhiều nghiên cứu cũng đã chứng minh bạc nano có khả năng diệt khuẩn rất tốt với liều lượng thấp (Cho *et al.*, 2005; Panacek *et al.*, 2006), không gây ảnh hưởng đến sức khỏe của con người (Carlson *et al.*, 2008). Hơn thế nữa, chiếu xạ là phương pháp khá hữu hiệu để chế tạo nano bạc bởi nhiều ưu điểm như tiết kiệm năng lượng, không gian và nguyên liệu; phản ứng ở nhiệt độ thường; sản phẩm có độ tinh khiết và độ đồng đều cao; quy trình dễ kiểm soát; thân thiện môi trường và dễ dàng triển khai sản xuất ở qui mô lớn với giá thành cạnh tranh (Du *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007; Naghavi *et al.*, 2010).

Mặt khác, cà chua (*Solanum lycopersicum* L.) là loại rau ăn quả giàu dinh dưỡng, dễ chế biến, có thể sử dụng lâu dài và liên tục, mang lại lợi ích kinh tế lớn. Tuy nhiên, người trồng cà chua hiện đang gặp rất nhiều khó khăn trong việc phòng và trị nhiều loại bệnh do vi sinh vật gây nên. Trong đó, bệnh héo rũ chết vàng do nấm *Fusarium oxysporum* gây ra, được xem là một trong những bệnh nghiêm trọng nhất (Cha *et al.*, 2007; Jacobs *et al.*, 2013). Bệnh thường xảy ra một cách đột ngột, lây lan nhanh chóng và kéo dài sang những vụ tiếp theo, làm ảnh hưởng rất lớn đến năng suất, dẫn tới thiệt hại nghiêm trọng về kinh tế đối với người trồng cà chua. Tuy nhiên, việc nghiên cứu phòng và trị bệnh héo rũ chết vàng là hết sức khó khăn và vẫn chưa có thuốc đặc trị nào hiệu quả cho loại bệnh này. Người nông dân hiện chủ yếu sử dụng một số loại thuốc hóa học hiện có trên thị trường vừa chưa có hiệu quả nhưng lại gây ảnh hưởng đến chất lượng sản phẩm cũng như gây ô nhiễm môi trường. Vì vậy, việc tạo ra các chế phẩm có nguồn gốc tự nhiên, thân thiện với môi trường nhưng lại có khả năng kháng nấm hiệu quả là vô cùng quan trọng và cấp thiết hiện nay. Mục đích của nghiên cứu này là chế tạo ra chế phẩm phân bón có chứa oligochitosan-bạc nano, có nguồn gốc tự nhiên, an toàn khi sử dụng và hiệu quả trong việc hỗ trợ điều trị héo vàng do nấm *Fusarium oxysporum* gây ra trên cây cà chua.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Vật liệu sử dụng trong nghiên cứu bao gồm

AgNO₃, H₂O₂ (Merck, Đức) và chất ổn định chitosan có độ acetyl hóa trên 80% và Mw~573,2 kDa là sản phẩm của Công ty Chitoworld (Việt Nam). Giống cà chua F1 TN 52 do Công ty Trang nông cung cấp và dinh dưỡng thủy canh là của Công ty Sài Gòn Thủy canh. Chủng nấm *Fusarium oxysporum* được cung cấp bởi Trung tâm Công nghệ Sinh học Tp. Hồ Chí Minh. Môi trường sử dụng trong thí nghiệm là môi trường carrot agar (CRA). Nguồn xạ gamma Co-60 BRIT 5000 (India) với suất liều 3 kGy/h, tại Viện Nghiên cứu Hạt nhân Đà Lạt.

Chiếu xạ chế tạo mẫu

Chế tạo chitosan khối lượng phân tử thấp (Mw thấp)

Ngâm trương chitosan theo tỉ lệ 1:5 (w/v) trong nước cất và dung dịch 1, 2 và 3% H₂O₂ qua đêm, trộn đều và cho vào lọ thủy tinh rồi tiến hành chiếu xạ ở các liều 5 – 20 kGy trên nguồn xạ gamma Co-60. Mẫu chitosan Mw thấp sau khi xử lý cắt mạch được sấy khô ở nhiệt độ 40-60°C và nghiền thành bột mịn để sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

Chế tạo oligochitosan

Hòa tan Chitosan Mw thấp (Mw ~ 48,4 kDa) trong dung dịch acetic acid 0,5% để tạo dung dịch chitosan 5% (w/v). Tiến hành điều chỉnh pH về 6 bằng dung dịch NaOH trước khi chiếu xạ tia gamma ở các liều 4-16 kGy trên nguồn xạ gamma Co-60.

Chế tạo oligochitosan-bạc nano

Dung dịch Ag⁺ có nồng độ 1 mM được ổn định trong 5% chitosan Mw thấp được tiến hành chiếu xạ trong chai thủy tinh trung tính trên nguồn xạ gamma Co-60 ở liều xạ 4 kGy để chế tạo dung dịch keo oligochitosan-bạc nano.

Xác định khối lượng phân tử (Mw)

Mẫu chitosan Mw thấp và oligochitosan sau khi chiếu xạ được xác định Mw trên máy GPC sử dụng 3 cột TSKgel PW_{XL} (300 mm x 7,8 mm) bao gồm G6000PW_{XL}, G3000PW_{XL} và G2500PW_{XL} được kết nối với cột bảo vệ TSK guard column PW_{XL} (40 mm x 6,0 mm). Dung dịch chitosan được đo với nồng độ 1% trong dung môi gồm 0,2 M CH₃COOH và 0,1 M CH₃COONa ở nhiệt độ 40°C sử dụng detector tán xạ RI-8020 (Tosho Co. Ltd. Japan) sử dụng chất chuẩn pullulan (USA) (Luan *et al.*, 2005).

Đo phổ FTIR, UV-vis và chụp ảnh TEM

Xác định đặc trưng của mẫu chitosan sau khi chiếu xạ bằng phổ FTIR. Mẫu được nghiền thành bột mịn và trộn với KBr với tỉ lệ 3:100 để tạo dạng viên nén. Phổ FTIR được đo trên máy quang phổ hồng ngoại model

Shimadzu FTIR-8400s spectrophotometer (Japan) với số sóng từ 4000 - 400 cm^{-1} .

Độ ổn định của chế phẩm oligochitosan - bạc nano sau khi chiếu xạ được xác định bằng phương pháp đo phổ tử ngoại khả kiến (UV-Vis), mẫu được pha loãng trong nước khử ion sao cho nồng độ Ag^+ là 0,1 mM và tiến hành đo trên máy quang phổ UV-Vis (UV-2401PC, Shimadzu, Nhật Bản) (Li *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2007). Kích thước và phân bố kích thước của hạt bạc nano trong dung dịch được xác định bằng phương pháp chụp ảnh dưới kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM) trên thiết bị hiển vi điện tử truyền qua (JEM 1400, JEOL, Nhật Bản) theo phương pháp của Li *et al.* (2007).

Khảo sát ảnh hưởng của oligochitosan đối với sự tăng trưởng của cà chua

Chọn cây cà chua non sau khi nảy mầm 5 ngày, khỏe và đồng đều nhau được bố trí ngẫu nhiên vào các nghiệm thức (mỗi nghiệm thức 10 cây và lặp lại 3 lần). Sau đó tiến hành phun lá bằng dung dịch chitosan và oligochitosan có Mw khác nhau từ 11,2 – 48,4 kDa với nồng độ 100 ppm (đối chứng chỉ phun nước). Sau 30 ngày tiến hành xác định các chỉ tiêu sinh trưởng bao gồm số lá, số cành, chiều cao cây, đường kính thân và số hoa.

Xác định hoạt tính kháng nấm *in vitro*

Môi trường được sử dụng trong thí nghiệm là môi trường carrot agar có bổ sung oligochitosan-bạc nano có nồng độ khác nhau (0-40 ppm). Các khoanh nấm có đường kính 5 mm được cấy vào trung tâm đĩa môi trường, ủ trong điều kiện tối ở nhiệt độ phòng. Đường kính khuẩn lạc nấm *F. oxysporum* được theo dõi sau 24 giờ cấy, cách 24 giờ tiến hành đo đường kính một lần cho đến khi khuẩn lạc nấm ở mẫu đối chứng phát triển đầy kín đĩa. Mức độ hiệu quả của chế phẩm bạc nano/chitosan sẽ được đánh giá dựa trên hiệu lực kháng nấm (Kim *et al.*, 2012): $\text{HLKN} (\%) = ((D-d)/D) \times 100$, trong đó: D, d (mm) lần lượt là đường kính khuẩn lạc nấm trên môi trường thạch cao su không bổ sung (đối chứng) và có bổ sung oligochitosan-bạc nano.

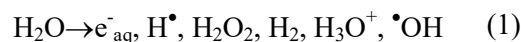
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Chế tạo chitosan Mw thấp bằng phương pháp chiếu xạ kết hợp xử lý H_2O_2

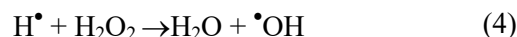
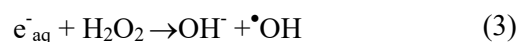
Chiếu xạ tia gamma từ nguồn Co-60 là phương

pháp hiệu quả để cắt mạch các polysaccharide tự nhiên nói chung và chitosan nói riêng. Hiệu suất cắt mạch cắt mạch của bức xạ thường tỷ lệ nghịch với nồng độ các polymer trong dung dịch chiếu xạ. Gần đây nhiều tác giả đã chứng minh rằng hiệu quả cắt mạch của bức xạ gamma sẽ rất cao khi kết hợp xử lý đồng thời với H_2O_2 và đã có tác dụng làm giảm đáng kể liều chiếu xạ. Trong nghiên cứu này, chitosan được chiếu xạ ở trạng thái tương trong dung dịch H_2O_2 ở các nồng độ khác nhau. Kết quả nhận được từ hình 1 cho thấy sự suy giảm Mw của chitosan trong dung dịch chiếu xạ tỷ lệ thuận với liều xạ và với sự gia tăng của nồng độ H_2O_2 . Cụ thể khi chiếu xạ liều 10 kGy thì Mw của chitosan của mẫu tương trong dung dịch H_2O_2 nồng độ 1, 2 và 3% đã suy giảm từ 573,2 xuống còn tương ứng là 76,0; 67,8 và 48,4 kDa, trong khi đó Mw của mẫu chitosan chiếu xạ trong nước vẫn còn khá cao với 149,8 kDa. Từ kết quả này có thể thấy hiệu quả cắt mạch chitosan khi có sự hiện diện của H_2O_2 là cao hơn nhiều so với khi chiếu xạ mẫu tương trong nước. Điều này có thể là do sự hiện diện của H_2O_2 trong dung dịch chiếu xạ làm gia tăng hiệu quả cắt mạch bởi hiệu ứng *đồng vận* theo các phương trình sau:

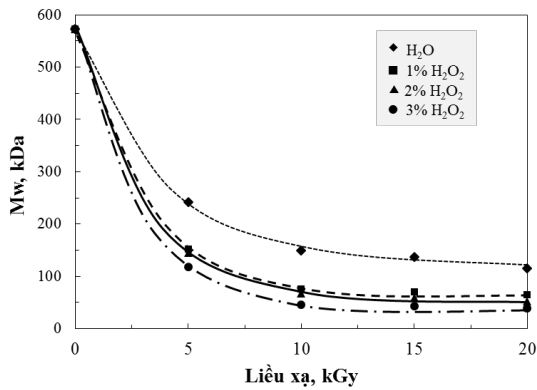
Tia γ



Tia γ



Các phản ứng (2), (3) và (4) đã làm gia tăng số lượng các gốc $\bullet\text{OH}$ vốn là tác nhân tham gia cắt mạch chitosan trong dung dịch (Woods, Pikaev, 1994). Kết quả này cũng phù hợp với công bố trước đây khi cắt mạch bức xạ có kết hợp xử lý H_2O_2 dung dịch chitosan (Duy *et al.*, 2011) cũng như các polymer tự nhiên khác như alginate, pectin và β -glucan (Lê Quang Luân *et al.*, 2012; 2013). Từ kết quả thí nghiệm này, chitosan có Mw ~ 48,4 kDa được lựa chọn làm nguyên liệu cho thí nghiệm tiếp theo nhằm chế tạo oligochitosan có hiệu ứng tăng trưởng đối với thực vật.

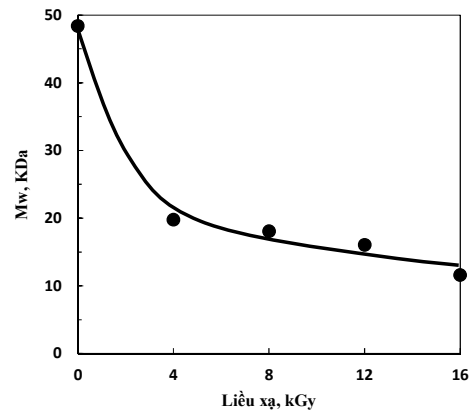


Hình 1. Sự suy giảm Mw của chitosan theo nồng độ H₂O₂ và liều xạ.

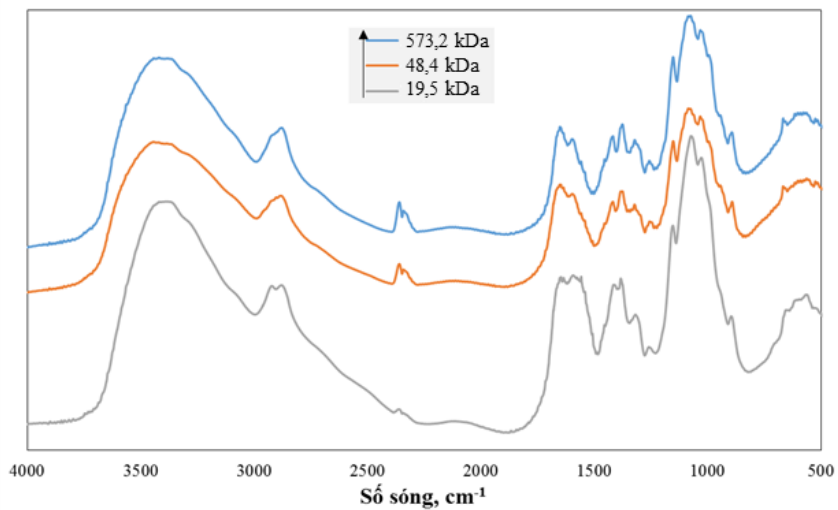
Chế tạo oligochitosan từ chitosan Mw thấp

Mục đích của thí nghiệm này là nhằm khảo sát liều xạ để chế tạo oligochitosan từ mẫu chitosan Mw thấp. Kết quả nhận được từ hình 2 cho thấy khi chiếu xạ dạng dung dịch 5% chitosan Mw thấp thì Mw của chúng tiếp tục giảm xuống còn 19,5 kDa khi chiếu liều 4 kGy và sự suy giảm này chậm dần xuống còn 18,1 kDa ở liều xạ 8 kGy. Khi tiếp tục tăng liều chiếu xạ cao hơn từ 12-16 kGy thì Mw của chitosan trong mẫu chiếu xạ tiếp tục giảm nhưng không đáng kể. Từ kết quả này cho thấy khi sử dụng chitosan

Mw thấp để cắt mạch chế tạo oligochitosan với nồng độ 5% thì liều xạ hiệu quả là khoảng 4 kGy và kết quả phân tích đặc trưng cấu trúc từ hình 3 cũng cho thấy các đỉnh đặc trưng trong phổ hồng ngoại của mẫu oligochitosan có Mw ~ 19,5 kDa là không có sự thay đổi so với mẫu chitosan Mw thấp (Mw ~ 48,4 kDa) chiếu xạ dạng tương và mẫu chitosan chưa chiếu xạ (Mw ~ 573,2 kDa). Như vậy để chế tạo oligochitosan thì việc xử lý kết hợp chiếu xạ và H₂O₂ là rất hiệu quả để giảm liều chiếu xạ đồng thời xử lý cắt mạch theo 2 bước như trên là cơ sở rất tốt cho mục đích sử dụng chitosan Mw thấp làm chất ổn định trong chế tạo chế phẩm oligochitosan-bạc nano bằng phương pháp chiếu xạ.



Hình 2. Sự phụ thuộc Mw của oligochitosan theo liều xạ.

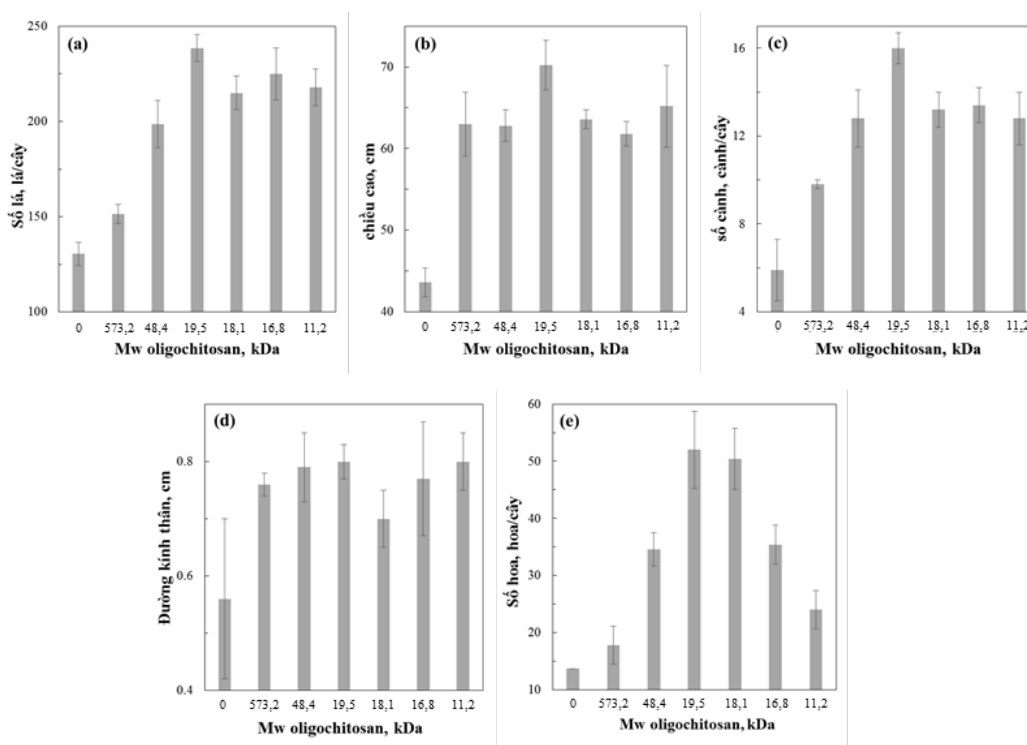


Hình 3. Phổ IR của chitosan, chitosan Mw thấp và oligochitosan.

Hiệu ứng tăng trưởng của chitosan chiếu xạ ở cà chua sau

Kết quả nhận được từ hình 4 cho thấy việc xử lý chitosan lên cây cà chua giai đoạn 30 ngày tuổi đã có ảnh hưởng tốt đến sự sinh trưởng của chúng. Khi xử lý chitosan không chiếu xạ có Mw cao đã không thể hiện sự khác biệt đáng kể ở cây cà chua, nhưng chitosan chiếu xạ có Mw dưới 49 kDa đã thể hiện sự tăng trưởng rõ rệt qua các yếu tố về sự phát triển chiều cao cây, đường kính thân, số lá/cây, số cành/cây và số hoa mỗi cây so với lô đối

chứng không xử lý chitosan. Trong đó oligochitosan có Mw ~ 19,5 kDa đã thể hiện hiệu ứng tăng trưởng cao nhất với các chỉ số chiều cao cây: 70,2 cm, đường kính thân: 0,8 cm, số lá/cây là 237 lá, số cành/cây: 16 cành và số hoa/cây 10 hoa. So với các chỉ số này ở lô đối chứng lần lượt là: 43,6 cm, 0,6 cm, 131 lá/cây, 6 cành/cây và 3 hoa/cây. Như vậy từ kết quả trên có thể thấy oligochitosan có Mw ~ 19,5 chế tạo được bằng cách chiếu xạ dung dịch 5% chitosan Mw thấp (48,4 kDa) ở liều xạ 4 kGy có thể sử dụng làm phân bón cho cây cà chua là rất hiệu quả.



Hình 4. Hiệu ứng tăng trưởng của chitosan chiếu xạ có Mw khác nhau lên sự sinh trưởng ở cây cà chua giai đoạn 28 ngày tuổi. (a): số lá, (b): chiều cao, (c): số cành, (d): đường kính thân, (e): số hoa.

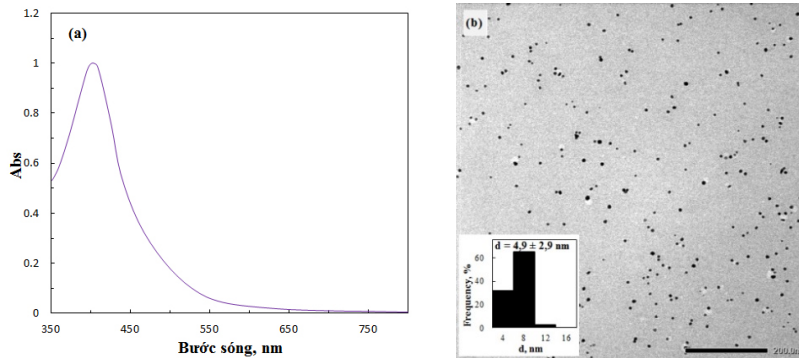
Chế tạo và hoạt tính kháng nấm *F. oxysporum* chế phẩm oligochitosan-bạc nano

Bạc nano ổn định trong chitosan đã được chế tạo thành công bằng phương pháp chiếu xạ (Du *et al.*, 2007). Tuy nhiên thông thường các nghiên cứu trước đây chủ yếu chế tạo bạc nano ổn định trong chitosan có Mw cao với mục đích làm chế phẩm diệt nấm cho cây. Kết quả nghiên cứu trước đây của Luân và cộng sự (2014) cũng đã cho thấy hiệu lực diệt nấm của

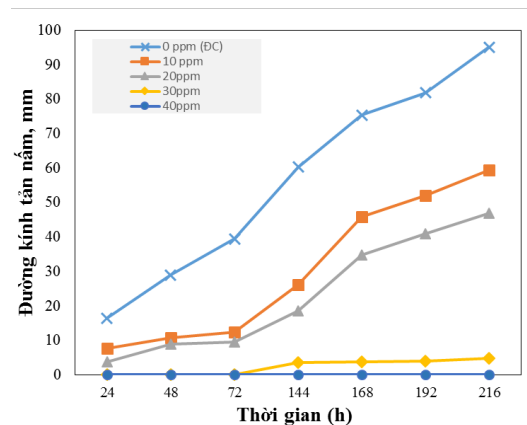
chế phẩm bạc nano phụ thuộc rất lớn vào kích thước hạt bạc nano trong chế phẩm và hạt bạc có kích thước 5 nm có hiệu lực diệt nấm cao hơn rất nhiều so với hạt bạc có kích thước 10 và 15 nm. Thêm vào đó Phu *et al.*, (2010) cũng cho thấy để chế tạo dung dịch bạc nano có kích thước hạt trung bình là 5 nm thì nồng độ bạc nitrate cần sử dụng là 1 mM. Hơn nữa từ kết quả nhận được ở các thí nghiệm nêu trên đã cho thấy khi chiếu xạ dung dịch 5% chitosan Mw thấp đã tạo ra sản phẩm oligochitosan có khả năng

kích thích tăng trưởng tốt cho cây cà chua. Chính vì vậy dung dịch 1 mM bạc nitrate và 5% chitosan có Mw thấp (48,4 kDa) được chiếu xạ tia gamma ở liều 4 kGy để chế tạo chế phẩm oligochitosan-bạc nano. Kết quả nhận được từ hình 5(a) cho thấy phổ UV-vis của chế phẩm có xuất hiện đỉnh hấp phụ đặc trưng của bạc nano với đỉnh hấp phụ cực đại (λ_{max}) tại

bước sóng 403 nm. Cũng từ kết quả nhận được ở hình 5 (b) về ảnh TEM và phân bố kích thước hạt của chế phẩm cũng cho thấy kích thước trung bình của hạt bạc nano là khoảng 5 nm. Kết quả nhận được về kích thước hạt là phù hợp với các kết quả đã công bố trước đây của Phu *et al.*, (2010) và Luân *et al.*, (2014).



Hình 5. Phổ UV (a), ảnh TEM và phân bố kích thước hạt (b) của mẫu oligochitosan-bạc nano chế tạo bằng phương pháp chiếu xạ liều 4 kGy dung dịch chứa 1mM bạc nitrate và 5% chitosan Mw thấp.



Hình 6. Sự phát triển nấm *F. oxysporum* trên môi trường CRA có bổ sung nano bạc ở các nồng độ khác nhau.

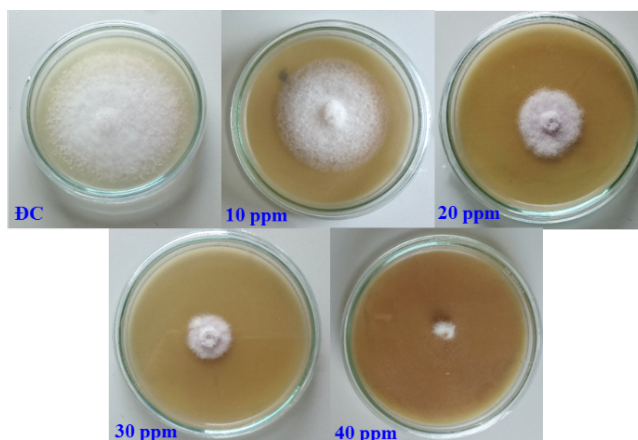
Hoạt tính kháng nấm *in vitro* của chế phẩm sau khi chế tạo cũng được khảo sát đối với nấm *F. oxysporum* gây bệnh héo vàng ở cây cà chua. Kết quả nhận được ở hình 6 cho thấy khi bổ sung nồng độ bạc trong môi trường nuôi cấy càng cao thì sự phát triển của đường kính tán nấm càng thấp do sự ức chế của bạc nano càng mạnh. Kết quả từ hình 7 và bảng 1 cũng cho thấy hiệu lực kháng nấm sau 7 ngày nuôi cấy là 37,5; 50,6 và 94,9% ở các nồng độ bạc xử lý lần lượt là 10, 20 và 30 ppm. Khi gia tăng nồng độ bạc lên 40 ppm thì hiệu lực

ức chế đối với nấm *F. oxysporum* là 100%. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với kết quả nghiên cứu trước đây của Luân *et al.*, (2014) khi khảo sát hiệu lực diệt nấm của chế phẩm bạc nano có kích thước hạt 5 nm ổn định trong chitosan trên đối tượng nấm *Phytophthora capsici* gây bệnh chết nhanh ở cây tiêu.

Như vậy có thể thấy rằng khi chiếu xạ dung dịch gồm 1 mM bạc nitrate và 5% chitosan có Mw thấp (48,4 kDa) ở liều 4 kGy đã tạo ra chế phẩm

oligochitosan-bạc nano vừa có chứa oligochitosan có hoạt tính tăng trưởng đối với cây cà chua và vừa có

chứa nano bạc với hiệu lực kháng khuẩn cao đối với nấm *F. oxysporum* gây bệnh héo vàng ở cây cà chua.



Hình 7. Tảo nấm *F. oxysporum* trên môi trường CRA có bổ sung nano bạc ở các nồng độ khác nhau sau 216 giờ nuôi cấy. ĐC: đối chứng không bổ sung bạc nano.

Bảng 1. Khả năng ức chế sự phát triển nấm *F. oxysporum* của nano bạc ở các nồng độ khác nhau sau 216 h nuôi cấy.

Nồng độ nano bạc, ppm	Đường kính tảo nấm, mm	Hiệu lực kháng nấm, %
0 (ĐC)	95,0 ^a	0,0 ^e
10	59,4 ^b	37,5 ^d
20	46,9 ^c	50,6 ^c
30	4,8 ^d	94,9 ^b
40	0,0 ^e	100 ^a

Ghi chú: Trong cùng một cột các giá trị có các kí tự giống nhau thì không khác biệt về mặt thống kê ($p < 0,05$).

KẾT LUẬN

Phương pháp cắt mạch chitosan bằng bức xạ gamma Co-60 kết hợp xử lý H₂O₂ đã làm gia tăng đáng kể hiệu suất cắt mạch qua đó làm giảm đi đáng kể liều chiếu xạ. Oligochitosan có Mw 19,5 kDa đã có tác dụng thúc đẩy sự sinh trưởng và phát triển đối với cây cà chua giai đoạn 30 ngày tuổi khi xử lý phun lá với nồng độ 100 ppm. Công trình khoa học này đã chế tạo thành công chế phẩm oligochitosan-bạc nano vừa có chứa oligochitosan có hoạt tính tăng trưởng đối với cây cà chua và vừa có chứa nano bạc với hiệu lực kháng nấm *F. oxysporum* gây bệnh héo vàng ở cây cà chua. Chế phẩm phân bón công nghệ cao có nguồn gốc tự nhiên và khả năng kích kháng bệnh tốt chế tạo bằng phương pháp chiếu xạ nói trên là sản phẩm rất có tiềm năng và triển vọng ứng dụng để sản xuất cà chua sạch, an toàn và chất lượng cao.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu được tài trợ bởi Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh (ĐHQG-HCM) trong khuôn khổ đề tài mã số B2016-52-01. Nhóm tác giả xin cảm ơn Trung tâm Sở hữu Trí tuệ, ĐHQG-HCM và Trung tâm Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh đã tạo điều kiện để chúng tôi thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Carlson C, Hussain SM, Schrand AM, Braydich-Stolle LK, Hess KL, Jones RL, Schlager JJ (2008) Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size dependent generation of reactive oxygen species. *J Phys Chem B* 112: 13608–13619.
- Cha SD, Jeon YJ, Ahn GR, Han JI, Han KH and Kim SH (2007) Characterization of *Fusarium oxysporum* Isolated from Paprika in Korea. *Mycobiology* 35(2): 91–96.

- Chen P, Song L, Liu Y, Fang Y (2007) Synthesis of silver nanoparticles by γ -ray irradiation in acetic water solution containing chitosan. *Radiat Phys Chem* 76(7): 1165–1168.
- Cho KH, Park JE, Osaka T, Park SG (2005) The study of antimicrobial activity and preservative effects of nanosilver ingredient. *Electrochim Acta* 51(5): 956–960.
- Du BD, Phu DV, Cam BD, Hien NQ (2007) Synthesis of silver nanoparticles by γ -ray irradiation using PVA as stabilizer. *Vietnam J Chem* 45: 136–140.
- 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. *Radiat Phys Chem* 80: 848–853.
- Franci G, Falanga A, Galdiero S, Palomba L, Rai M, Morelli G and Galdiero M (2015) Silver nanoparticles as potential antibacterial agents, *Molecules* 20(5): 8856–8874.
- Hammerschmidt R (1999) PHYTOALEXINS: What have we learned after 60 years? *Annu Rev Phytopathol* 37: 285–306.
- Jacobs A, Govender R and Heerden SW (2013) *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 causing tomato wilt in South Africa. *Australas Plant Dis Notes* 8(1): 145–147.
- Kim JY, Lee JK, Lee TS, Park WH (2003) Synthesis of chitooligosaccharide derivative with quaternary ammonium group and its antimicrobial activity against *Streptococcus mutans*. *Int J Biol Macromol* 32: 23–27.
- Kim SW, Jung JH, Lamsal K, Kim YS, Min JS and Lee YS (2012) Antifungal effects of silver nanoparticles (AgNPs) against various plant pathogenic fungi. *Mycobiology* 40(1): 53–58.
- Lê Quang Luân, Nguyễn Huỳnh Phương Uyên, Lê Thị Thùy Trang, Lê Văn Trường, Lăng Đức Quỳnh, Võ Thị Thu Hà (2011) Nghiên cứu chế tạo oligopectin từ vỏ bưởi phế thải bằng phương pháp cắt mạch bức xạ và ứng dụng trong sản xuất rau thủy canh. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 9(4A): 549–556.
- Lê Quang Luân, Nguyễn Huỳnh Phương Uyên, Võ Thị Thu Hà (2013) Nghiên cứu sản xuất chất tăng trưởng thực vật oligo- β -glucan bằng phương pháp chiếu xạ kết hợp xử lý hydroperoxit. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam* 22: 56–60.
- Lê Quang Luân, Nguyễn Huỳnh Phương Uyên, Phan Hồ Giang (2014) Nghiên cứu hiệu ứng kháng nấm *Phytophthora capsici* gây bệnh chết nhanh ở cây hồ tiêu của chế phẩm nano bạc-chitosan chế tạo bằng phương pháp chiếu xạ. *Tạp chí Sinh học* 36 (1Se): 152-157.
- Li T, Park HG, Choi SH (2007) γ -Irradiation-induced preparation of Ag and Au nanoparticles and their characterizations. *Mater Chem Phys* 105(2-3): 325–330.
- Luan LQ, Ha VT, Nagasawa N, Kume T, Yoshii F, Nakanishi TM (2005) Biological effect of irradiated chitosan on plants *in vitro*. *Biotechnol Appl Biochem* 41(1): 49–57.
- Luan LQ, Ha VTT, Uyen NHP, Trang TTL, Hien QN (2012) Preparation of oligoalginate plant growth promoter by γ irradiation of alginate solution containing hydrogen peroxide. *J Agric Food chem* 60: 1737–1741.
- Luan LQ, Nagasawa N, Tamada M, Nakanish TM (2006) Enhancement of plant growth activity of irradiated chitosan by molecular weight. *Radioisotopes* 55(1): 21–27.
- Matsushashi S, Kume T (1997) Enhancement of antimicrobial activity of chitosan by irradiation. *J Sci Food Agric* 73(2): 237–241.
- Methacanon P, Prasitsilpa M, Pothsreea T, Pattaraarchachai J (2003) Heterogeneous N-deacetylation of squid chitin in alkaline solution. *Carbohydr Polym* 52(2): 119–123.
- Naghavi K, Saion E, Rezaee K and Yunus WMM (2010) Influence of dose on particle size of colloidal silver nanoparticles synthesized by gamma radiation. *Radiat Phys Chem* 79(12): 1203–1208.
- Panacek A, Kvítek L, Pucek R, Kolar M, Vecerova R, Pizúrova N, Sharma VK, Nevecna T, Zboril R (2006) Silver colloid nanoparticles: Synthesis, characterization, and their antibacterial activity. *J Phys Chem* 110: 16248–16253.
- Phu DV, Lang VTK, Lan NTK, Duy NN, Chau ND, Du BH, Cam BD, Hien NQ (2010) Synthesis and antimicrobial effects of colloidal silver nanoparticles in chitosan by γ -irradiation. *J Exp Nanosci* 5(2): 169-179.
- Ryan CA (1988) Oligosaccharides as recognition signals for the expression of defensive genes in plants. *Biochemistry* 27(25): 8879–8883.
- Woods RT, Pikaev AK (1994) *Applied Radiation Chemistry: Radiation Processing*. Wiley, New York: 341–342.

PREPARATION OF THE OLIGOCHITOSAN-SILVER NANOPARTICLES WITH A POTENTIAL APPLICATION AS AN ANTIFUNGAL FERTILIZER AGAINST *FUSARIUM OXYSPORUM* CAUSING FUSARIUM WILT DISEASE ON TOMATO

Nguyen Thanh Vu¹, Huynh Quyen², Duong Hoa Xo¹, Le Quang Luan¹

¹Biotechnology Center of Ho Chi Minh City

²Intellectual Property and Technology Transfer, Vietnam National University Ho Chi Minh City

SUMMARY

Chitosan with molecular weight (Mw) approx. 573,2 kDa and deacetylation degree about 80% was irradiated by gamma rays at swollen state in the present of 1 - 3% hydrogen peroxide for degradation to prepare low Mw products. The solution of 5% low Mw chitosan in 0.5% acetic acid was further irradiated for induction of oligochitosan. The obtained results indicated that the foliar application by 100 ppm oligochitosan with Mw ~ 19.5 kDa prepared by 4kGy-irradiation of the low Mw chitosan with Mw ~ 48.4 kDa had a strongly growth promotion effect on tomato plants after 30 days cultivation. The oligochitosan silver nanoparticles (AgNPs) was also synthesized by gamma irradiation of solution contained 5% low Mw chitosan and 1 mM silver nitrate in order to prepared antifungal fertilizer for tomato plants. The results on *in vitro* test for the antifungal activity oligochitosan AgNPs against *Fusarium oxysporum* causing Fusarium wilt disease pointed out that the addition of this product into cultivated media inhibited strongly the growth of the *Fusarium oxysporum* pathogen fungus on carrot agar media. The antifungal efficiency values were found from 50.5 to 94.9% by the supplementations of silver concentrations from 20 to 30 ppm, respectively. The supplementation with a silver concentration of 40 ppm inhibited completely the growth of *F. oxysporum* on the cultivated media. Thus the oligochitosan AgNPs product had not only the growth promotion activity for tomato, but also high antifungal activity against *F. oxysporum*. This product is promising to be used as an antifungal fertilizer for tomato with safety and efficiency.

Keywords: *Fusarium oxysporum*, gamma-rays irradiation, leaf fall disease, oligochitosan-silver nanoparticles fertilizer, tomato