

NÂNG CAO KHẢ NĂNG KHÁNG NẤM *FUSARIUM SOLANI* TRÊN CÀ CHUA SAU THU HOẠCH CỦA NANOCHITOSAN BẰNG CÁCH KẾT HỢP VỚI AXIT PROPIONIC

Tổng Thị Huế, Lê Thanh Long, Nguyễn Thị Thủy Tiên*
Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế

*Liên hệ email: nguyenthithuytien84@huaf.edu.vn

TÓM TẮT

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá khả năng kháng nấm của nanochitosan kết hợp axit propionic (PA) trong việc ức chế sự sinh trưởng và phát triển của nấm *Fusarium solani* ở điều kiện in vitro và in vivo. Sự kết hợp của nanochitosan với PA thể hiện khả năng kháng nấm *F. solani* cao hơn so với sử dụng đơn lẻ PA. Nồng độ các chất sử dụng càng cao, khả năng kháng nấm càng cao. Ở điều kiện in vitro, nồng độ PA 0,16% ức chế hoàn toàn sự sinh trưởng và phát triển của nấm *F. solani* trong khi PA 0,04% có khả năng ức chế trên 50% sự phát triển của chúng. Sự kết hợp nanochitosan ở các nồng độ khác nhau 0,01%, 0,02% và 0,04% với PA 0,04% kìm hãm mạnh mẽ sự phát triển của nấm bệnh. Nồng độ 0,01% nanochitosan kết hợp PA 0,04% đã ức chế hoàn toàn sự nảy mầm của nấm sau 24 giờ. Nấm không thể phát triển ở nồng độ nanochitosan 0,04% kết hợp PA 0,04%. Ở điều kiện in vivo, nanochitosan 0,4% kết hợp PA 0,04% gây ức chế lên đến 62,16% sự phát triển đường kính vết bệnh trên cà chua nhiễm *F. solani*. Có thể thấy rằng, nanochitosan kết hợp PA đã nâng cao khả năng kháng nấm của nanochitosan.

Từ khóa: axit propionic, bảo quản cà chua, bệnh sau thu hoạch, *Fusarium solani*, nanochitosan

Nhận bài: 07/10/2018

Hoàn thành phản biện: 15/12/2018

Chấp nhận bài: 30/01/2019

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). 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.

Chitosan là một polymer sinh học dễ phân hủy, không độc, rẻ tiền và có tính năng đặc biệt hữu ích trong bảo vệ thực vật là kháng nấm và kích thích cơ chế phòng vệ ở thực vật (Badawy và Rabea, 2011, Xu và cs., 2007). Tuy nhiên, độ nhớt cao và không hòa tan trong nước nên chitosan chưa thể hiện đầy đủ hoạt tính sinh học của một polycation đặc biệt có nguồn gốc tự nhiên, phạm vi ứng dụng hạn chế. Nanochitosan với kích thước nanomet siêu nhỏ, diện tích bề mặt lớn nên có khả năng kháng khuẩn cao hơn chitosan nhờ khả năng xâm nhập vào tế bào nhanh và sâu hơn. Chính những đặc điểm vượt trội này mà nanochitosan đang được quan tâm nghiên cứu để ứng dụng hiệu quả trong các lĩnh vực khác nhau (Cota-Arriola và cs., 2013).

Axit propionic (PA) là một loại thuốc diệt nấm, diệt khuẩn được sử dụng trong bảo quản các loại ngũ cốc, bảo quản hạt, thức ăn gia cầm và nước uống cho gia súc, gia cầm (Haque và cs., 2009). Mặc dù PA là chất bảo quản có hiệu quả nhưng theo Poverenov và cs. (2013),

PA là chất dễ bay hơi, làm giảm hiệu quả kháng nấm của nó. Do đó, PA cần được duy trì sự tồn tại của chúng trong quá trình sử dụng. Rahman (2013) đã chứng minh sự kết hợp chitosan với các chất diệt nấm khác nhau như PA, Teldor, Switch để nghiên cứu khả năng kháng nấm đã làm giảm hàm lượng chất diệt nấm tổng hợp sử dụng nhờ vào khả năng phối hợp ức chế cũng như khả năng tạo màng của chitosan.

Việc sử dụng của nanochitosan hay PA đơn lẻ đã được nghiên cứu và công bố rộng rãi (Chien và Chou, 2006; Al-Hetar và cs., 2010). Tuy nhiên, sự kết hợp giữa nanochitosan và các chất bảo quản như PA chưa thu hút được nhiều sự quan tâm. Do đó, nghiên cứu khả năng kháng nấm *F. solani* bởi nanochitosan kết hợp PA có ý nghĩa thực tiễn cao.

2. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

2.1.1. Quả cà chua

Cà chua sử dụng trong các thí nghiệm được lựa chọn và thu mua tại chợ đầu mối Bãi Dâu, phường Phú Hậu, thành phố Huế. Cà chua được chọn lựa đồng đều về kích thước, màu sắc, không bị tổn thương cơ học hay nhiễm bệnh.

2.1.2. Chất kháng nấm axit propionic và nanochitosan

Axit propionic dạng lỏng có độ tinh khiết 95% được cung cấp bởi công ty Kemin Việt Nam. Chế phẩm nanochitosan được chuẩn bị theo phương pháp của Nguyễn Cao Cường và cs. (2014).

2.1.3. Nấm *Fusarium solani*

Nấm *F. solani* được cung cấp bởi phòng thí nghiệm vi sinh, khoa Cơ khí – Công nghệ, trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế. Nấm *F. solani* được nuôi cấy trên môi trường PDA (Potato Dextrose Agar). 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.

2.2. Nội dung và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Nội dung nghiên cứu

- Đánh giá khả năng kháng nấm *F. solani* ở điều kiện in vitro của PA và PA kết hợp nanochitosan (PA + nanochitosan) ở các nồng độ khác nhau, bao gồm các chỉ tiêu: Sự nảy mầm của bào tử, đường kính tản nấm (ĐKTN) và sinh khối sợi nấm.

- Đánh giá khả năng kháng nấm *F. solani* ở điều kiện in vivo của PA và PA kết hợp nanochitosan bằng cách đo đường kính vết bệnh trên cà chua đã được lây bệnh nhân tạo với *F. solani*.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.2.1. Ảnh hưởng của PA và PA + nanochitosan đến sự phát triển và sinh trưởng của *F. solani* ở điều kiện in vitro

Nanochitosan đã được khảo sát ở các nồng độ 0,00% (ĐC); 0,01%; 0,02%; 0,04%; 0,08% và 0,16% (Nguyễn Thị Thủy Tiên và cs., 2017) để nghiên cứu khả năng ức chế nấm *F. solani* ở điều kiện in vitro và in vivo. Trong nghiên cứu này, PA cũng được khảo sát ở các nồng độ tương tự, tức là 0,00% (ĐC); 0,01%; 0,02%; 0,04%; 0,08% và 0,16%. Sau khi xác

định được nồng độ PA phù hợp, bổ sung nồng độ này vào chế phẩm nanochitosan ở các nồng độ khác nhau để khảo sát khả năng kháng nấm *F. solani*.

* Ảnh hưởng của PA và PA kết hợp nanochitosan đến tỷ lệ nảy mầm của nấm *F. solani*

Thời điểm nảy mầm của bào tử nấm *F. solani* được xác định là sau 5 giờ (Nguyễn Thị Thủy Tiên và cs., 2017). Ảnh hưởng của các dung dịch chất kháng nấm (PA và PA + nanochitosan) được xác định tại thời điểm nảy mầm của bào tử theo mô tả của Nguyễn Thị Thủy Tiên và cs. (2017). Hiệu lực ức chế (HLUC, %) = [(Tỷ lệ nảy mầm ở công thức đối chứng - Tỷ lệ nảy mầm ở công thức thí nghiệm)/Tỷ lệ nảy mầm ở công thức đối chứng] x 100. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần đối với mỗi nồng độ theo dõi (Ali, 2006).

* Ảnh hưởng của PA và PA kết hợp nanochitosan đến sự phát triển đường kính tán nấm *F. solani*

Ảnh hưởng của PA và PA + nanochitosan đến sự phát triển ĐKTN *F. solani* được thực hiện theo phương pháp mô tả bởi Al-Hetar và cs. (2010) và Nguyễn Thị Thủy Tiên và cs. (2017). Cho 15 mL môi trường PDA có bổ sung chất kháng nấm ở các nồng độ khảo sát vào các đĩa Petri đường kính 10 cm. Dùng đục lỗ kiểu nút chai lấy một tán nấm có đường kính 2 mm từ mép rìa của khuẩn lạc nấm sau 7 ngày nuôi cấy ở 25°C đặt lên tâm các đĩa môi trường đã chuẩn bị sẵn, lặp lại 3 lần đối với mỗi nồng độ. Ủ đĩa ở 25°C, quan sát hình thái và đo ĐKTN ở từng công thức thí nghiệm một ngày một lần cho đến khi nấm mọc tràn đĩa ở công thức đối chứng. HLUC (%) = [(ĐKTN ở công thức đối chứng - ĐKTN ở công thức thí nghiệm)/ĐKTN ở công thức đối chứng] x 100.

* Ảnh hưởng của PA và PA kết hợp nanochitosan đến sự phát triển sinh khối nấm *F. solani*

Cho 30 mL môi trường PDB có chứa chất kháng nấm ở các nồng độ khảo sát vào các bình nón 100 mL. Bổ sung 20 μ L huyền phù bào tử nấm *F. solani* nồng độ 10^5 bào tử/mL vào các bình trên. Nuôi cấy các bình trên máy lắc với tốc độ 180 vòng/phút ở 25°C. Sau 7 ngày, thu sinh khối khô bằng cách lọc canh trường nuôi cấy nấm qua giấy lọc và sấy ở 55°C đến khối lượng không đổi. HLUC (%) = [(Sinh khối ở công thức đối chứng - Sinh khối ở công thức thí nghiệm)/Sinh khối ở công thức đối chứng] x 100 (Al-Hetar và cs., 2010; Nguyễn Thị Thủy Tiên và cs., 2017). Thí nghiệm được lặp lại 3 lần đối với mỗi nồng độ khảo sát.

2.2.2.2. Ảnh hưởng của PA kết hợp nanochitosan đến sự sinh trưởng và phát triển của *F. solani* gây thối quả cà chua ở điều kiện in vivo

Theo Nguyễn Thị Thủy Tiên và cs. (2017), nanochitosan 0,4% đã thể hiện khả năng ức chế trên 50% đường kính vết bệnh thối hồng do *F. solani* gây ra trên cà chua ở điều kiện in vivo. Trong nghiên cứu này, để đánh giá ảnh hưởng của sự kết hợp PA và nanochitosan, các công thức được bố trí như sau: 1. Đối chứng (không xử lý); 2. Xử lý PA với nồng độ đã xác định ở điều kiện in vitro; 3. Xử lý nanochitosan 0,4%; 4. Xử lý với PA (ở nồng độ đã chọn ở điều kiện in vitro) + nanochitosan 0,4%.

Cà chua được lây bệnh nhân tạo trên quả với 2 vết bệnh giống nhau có kích thước sâu 1 mm, rộng 1 mm và đối nhau theo đường xích đạo trên mỗi quả với 4 μ L huyền phù bào tử nấm *F. solani* có nồng độ với ngưỡng gây bệnh 10^5 bào tử/mL (Nguyễn Thị Thủy Tiên và cs., 2017). Đặt mẫu quả trên giấy vô trùng trong hộp nhựa đã khử trùng bằng cồn 70°. Cho nước cất vô trùng vào giấy vô trùng để duy trì độ ẩm. Sau đó, dùng túi nilon bọc hộp nhựa lại và ủ mẫu ở 25°C. Theo dõi và đo đường kính vết bệnh mỗi ngày một lần để xác định mức độ tiến triển của bệnh ở các công thức thí nghiệm. Chỉ tiêu theo dõi: Thời gian hình thành vết

bệnh (giờ); Theo dõi tỷ lệ bệnh TLB (%) ở các công thức; Đường kính vết bệnh (mm) theo thời gian (giờ); Hiệu lực ức chế HLUC (%) (Meng và cs., 2010; Ben-Shalom và cs., 2003). Thí nghiệm được lặp lại 3 lần đối với mỗi công thức khảo sát.

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 phương pháp DUNCAN (Duncan's Multiple Range Test) trên phần mềm thống kê SAS, phiên bản 9.13 chạy trên môi trường Windows.

3. KẾT QUẢ

3.1. Ảnh hưởng của PA đến sự phát triển và sinh trưởng của *F. solani* ở điều kiện in vitro

3.1.1. Ảnh hưởng của PA đến sự nảy mầm của bào tử nấm

PA có khả năng ức chế nảy mầm đối với nấm *F. solani*, thể hiện qua hiệu quả ức chế tỷ lệ nảy mầm (bảng 1) sau 5 giờ, 10 giờ và 24 giờ quan sát. Tại thời điểm nảy mầm của bào tử (5 giờ), PA 0,08% và 0,16% ức chế hoàn toàn tỷ lệ nảy mầm của bào tử trong khi PA không có khả năng ức chế hoàn toàn tỷ lệ nảy mầm ở các nồng độ thấp hơn, trừ mẫu đối chứng. Sau khi quan sát tại thời điểm này, chúng tôi đã muốn theo dõi thêm ảnh hưởng của PA theo thời gian đến HLUC nảy mầm nấm *F. solani* nên tiếp tục quan sát sự nảy mầm của bào tử nấm tại thời điểm 10 giờ và 24 giờ.

Có thể thấy rằng, theo chiều tăng của nồng độ PA, tỷ lệ nảy mầm của bào tử *F. solani* càng giảm, tỷ lệ ức chế nảy mầm càng tăng, mầm bào tử càng ngắn. PA nồng độ 0,08% và 0,16% ức chế hoàn toàn sự nảy mầm của bào tử ở tất cả các thời điểm khảo sát. Ở nồng độ PA 0,16%, màng bào tử bị mờ một phần. Nồng độ 0,01% PA không gây ra sự ức chế đối với sự nảy mầm của bào tử sau 24 giờ, trong khi đó, hiệu quả ức chế nảy mầm ở nồng độ 0,02% và 0,04% lần lượt là 18,78% và 63,22%. Nồng độ ức chế hiệu quả (Effective Concentration, EC₅₀ = 0,039% (~ 0,04%) và nồng độ ức chế tối thiểu (Minimum Inhibitory Concentration, MIC₁₀₀ = 0,078% (~ 0,08%) ($y = 1282x$; $R^2 = 0,953$).

Bảng 1. Ảnh hưởng của PA đến sự nảy mầm của bào tử nấm *F. solani*

Nồng độ PA (%)	Hiệu lực ức chế (%)		
	5 giờ	10 giờ	24 giờ
0,00 (ĐC)	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a
0,01	46,78 ^b	0,00 ^a	0,00 ^a
0,02	70,56 ^c	30,33 ^b	18,78 ^b
0,04	85,56 ^d	78,56 ^c	63,22 ^c
0,08	100,00 ^e	100,00 ^d	100,00 ^d
0,16	100,00 ^e	100,00 ^d	100,00 ^d

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

3.1.2. Ảnh hưởng của PA đến đường kính tản nấm

Hiệu quả ức chế sự phát triển ĐKTN của *F. solani* ở các nồng độ PA khảo sát được thể hiện trong Bảng 2.

Có thể thấy rằng ĐKTN giữa các nồng độ khảo sát đều sai khác có ý nghĩa thống kê, ngoại trừ nồng độ 0,08% và 0,16% sau 24 giờ. Nồng độ PA càng cao, ĐKTN càng nhỏ, hiệu lực ức chế càng tăng. Nấm không thể phát triển ở nồng độ 0,16%. Giá trị EC₅₀ và MIC₁₀₀ sau 168 giờ lần lượt 0,08% và 0,15% ($y = 645,5x$; $R^2 = 0,974$).

Khả năng ức chế nấm *F. solani* của PA nhìn chung tăng khi tăng nồng độ PA, thể hiện qua sự giảm của ĐKTN. Ở công thức ĐC, sợi nấm phát triển đồng đều, xốp mịn và lan rộng. Sau 120 giờ, nấm chỉ phát triển được 28,30 mm khi môi trường có bổ sung 0,08% PA trong khi đạt đến 58,39 mm trong môi trường không có PA. Ngoài tác dụng kìm hãm tốc độ lan rộng của tản nấm, ở các công thức có nồng độ PA cao như 0,04% và 0,08%, sợi nấm còn bị co ép lại, không mịn như ở công thức đối chứng. Nồng độ PA 0,16% ức chế hoàn toàn sự phát triển của sợi nấm ở tất cả các thời điểm quan sát.

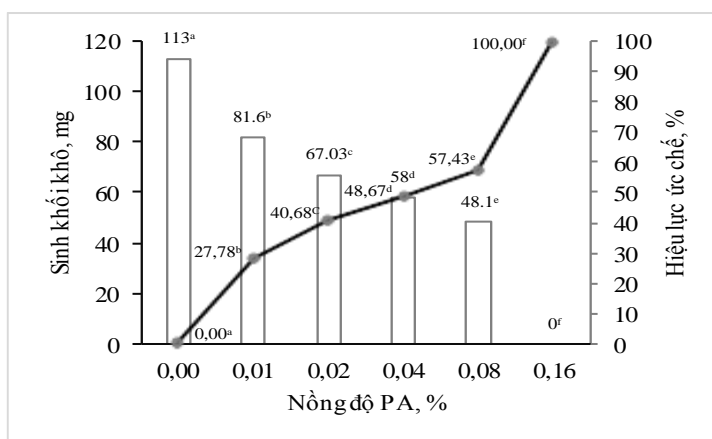
Bảng 2. Ảnh hưởng của PA đến ĐKTN *F. solani* ở các nồng độ khác nhau sau các thời gian theo dõi ở 25°C

Nồng độ PA (%)	Đường kính tản nấm (mm)							HLUC (%) sau 168 giờ
	24 giờ	48 giờ	72 giờ	96 giờ	120 giờ	144 giờ	168 giờ	
0,00 (ĐC)	9,63 ^a	21,34 ^a	35,34 ^a	46,13 ^a	58,39 ^a	71,99 ^a	83,42 ^a	0,00 ^a
0,01	7,93 ^b	18,47 ^b	30,84 ^b	43,01 ^b	54,91 ^b	64,03 ^b	76,41 ^b	8,40 ^b
0,02	6,89 ^c	15,45 ^c	26,53 ^c	37,14 ^c	48,01 ^c	60,48 ^c	69,87 ^c	16,24 ^c
0,04	6,13 ^d	13,89 ^d	22,35 ^d	30,61 ^d	39,25 ^d	45,06 ^d	53,13 ^d	36,31 ^d
0,08	0,00 ^e	8,11 ^e	14,30 ^e	20,78 ^e	28,30 ^e	36,44 ^e	41,50 ^e	50,25 ^e
0,16	0,00 ^e	0,00 ^f	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 của tỷ lệ này mầm theo cột có cùng chữ cái in thường là không sai khác ở mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$.

3.1.3. Ảnh hưởng của PA đến sinh khối sợi nấm

Thông qua sinh khối sợi nấm có thể xác định sự sinh trưởng và phát triển của nấm mốc. Trong canh trường PDB, nồng độ PA càng tăng, sinh khối nấm thu được càng ít, hiệu lực ức chế càng lớn. Tương tự các kết quả trên, trong môi trường lỏng, nấm không thể phát triển ở nồng độ PA 0,16%, hiệu lực ức chế đạt 100%. Trong điều kiện không có chất kháng nấm PA, sinh khối nấm đạt được 113 mg sau 168 giờ nuôi cấy ở 25°C. Nồng độ PA 0,04% ức chế được 48,67% khả năng sinh trưởng của nấm *F. solani*, thu 58,0 mg sinh khối nấm.



Hình 1. Ảnh hưởng của PA đến sinh khối của nấm *F. solani* và hiệu lực ức chế của chúng sau 168 giờ nuôi cấy ở 25°C.

Các giá trị trung bình tỷ lệ này mầm theo cột có cùng chữ cái in thường là không sai khác ở mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$

3.2. Ảnh hưởng của PA + nanochitosan đến sự phát triển và sinh trưởng của *F. solani* ở điều kiện in vitro

Trong nghiên cứu về hiệu quả kháng nấm *F. solani* của nanochitosan, chúng tôi đã xác định được nồng độ nanochitosan 0,16% ức chế hoàn toàn khả năng nảy mầm, sự phát triển ĐKTN và sinh khối của nấm *F. solani*. Nồng độ nanochitosan 0,08% ức chế 100% khả năng nảy mầm sau 24 giờ nhưng không ức chế hoàn toàn sự phát triển ĐKTN và sinh khối nấm *F. solani* (Nguyễn Thị Thủy Tiên và cs., 2017). Kết quả trình bày ở trên cho thấy hiệu quả ức chế của các nồng độ PA đến nấm *F. solani* cho kết quả tương tự như đối với nanochitosan. Chúng tôi giả định khi kết hợp nanochitosan với PA, hiệu lực ức chế nấm *F. solani* của hỗn hợp này ở nồng độ thấp sẽ cao hơn so với việc sử dụng riêng lẻ từng hợp chất ở cùng nồng độ. Do đó, nồng độ 0,04% PA được lựa chọn kết hợp với nanochitosan ở các nồng độ 0,01%; 0,02% và 0,04% để khảo sát hiệu quả kháng nấm *F. solani* của hỗn hợp này. Mẫu đối chứng là mẫu không có chứa bất kỳ chất kháng nấm nào (0,00%).

3.2.1. Ảnh hưởng của PA + nanochitosan đến sự nảy mầm của nấm *F. solani*

Bảng 3. Ảnh hưởng của PA + nanochitosan đến sự nảy mầm của bào tử nấm *F. solani*

PA (0,04%) + nanochitosan (%)	Hiệu lực ức chế (%)		
	5 giờ	10 giờ	24 giờ
0,00	0 ^a	0 ^a	0 ^a
0,01	100,00 ^b	100,00 ^b	100,00 ^b
0,02	100,00 ^b	100,00 ^b	100,00 ^b
0,04	100,00 ^b	100,00 ^b	100,00 ^b

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

Kết quả thể hiện ở Bảng 3 cho thấy, rõ ràng là sự kết hợp nanochitosan với axit propionic có khả năng ức chế hoàn toàn sự nảy mầm của bào tử nấm *F. solani*, với hiệu lực ức chế 100% ở tất cả các nồng độ qua các thời điểm khảo sát. Việc sử dụng đơn lẻ 0,04% PA chỉ ức chế được 63,22% tỷ lệ nảy mầm của nấm sau 24 giờ. Theo nghiên cứu của Nguyễn Thị Thủy Tiên và cs. (2017), nanochitosan 0,04% có hiệu lực ức chế nảy mầm nấm *F. solani* sau 24 giờ là 76,44%. Trong khi đó, sử dụng 0,04% PA kết hợp với nanochitosan 0,01% đã gây ức chế hoàn toàn sự nảy mầm của nấm *F. solani*. Ngoài khả năng ức chế nảy mầm, hỗn hợp chế phẩm này có thể làm mờ thành bào tử, thành tế bào không rõ nét và gây ra sự rò rỉ tế bào.

3.2.2. Ảnh hưởng của PA + nanochitosan đến đường kính tản nấm *F. solani*

Bảng 4. Ảnh hưởng của PA (0,04%) + nanochitosan đến đường kính tản nấm *F. solani* sau các thời gian theo dõi ở 25°C

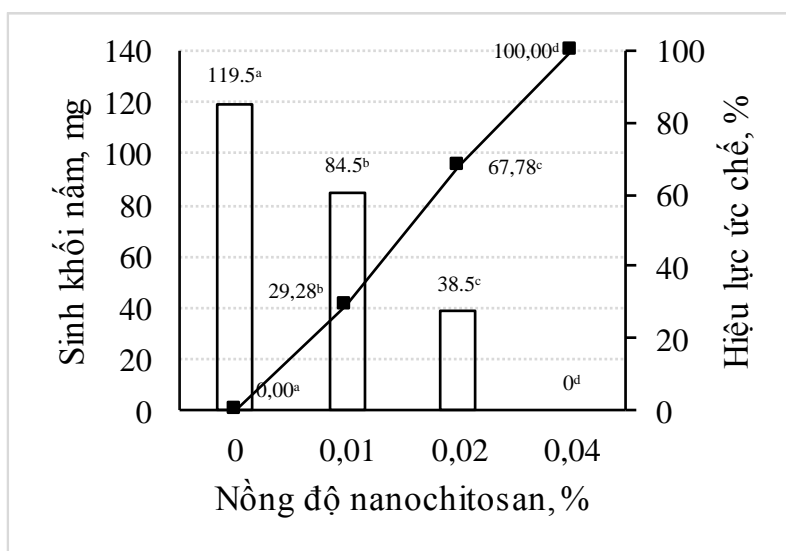
PA (0,04%) + nanochitosan (%)	Đường kính tản nấm (mm)						
	24 giờ	48 giờ	72 giờ	96 giờ	120 giờ	144 giờ	168 giờ
0,00	12,81 ^a	25,73 ^a	38,02 ^a	50,51 ^a	62,75 ^a	75,84 ^a	86,11 ^a
0,01	5,60 ^b	14,38 ^b	22,75 ^b	33,70 ^b	43,26 ^b	55,09 ^b	63,97 ^b
0,02	0,00 ^c	10,81 ^c	18,01 ^c	23,93 ^c	31,37 ^c	38,18 ^c	43,69 ^c
0,04	0,00 ^c	0,00 ^d	0,00 ^d	0,00 ^d	0,00 ^d	0,00 ^d	0,00 ^d

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

Khả năng ức chế sự sinh trưởng và phát triển của nấm *F. solani* cao hơn của hỗn hợp PA + nanochitosan so với việc sử dụng đơn lẻ từng hợp chất cũng được thể hiện qua ĐKTN (bảng 4). Nồng độ 0,04% hỗn hợp này đã có thể ức chế hoàn toàn khả năng phát triển tản nấm của *F. solani* trong khi ĐKTN *F. solani* vẫn đạt 53,13 mm sau 168 giờ khi có mặt 0,04% PA (bảng 2). Ở nồng độ 0,02%, sau 168 giờ, ĐKTN đạt xấp xỉ một nửa ĐKTN ở công thức đối chứng, 43,69 mm so với 86,11 mm. Khả năng ức chế sự phát triển của nấm không những thể hiện qua việc giảm ĐKTN mà còn thể hiện ở hình thái nấm. Ở các nồng độ càng cao sợi nấm bị co lại, màu nâu sẫm và ở mặt sau còn xuất hiện màu nâu tím so với mẫu đối chứng có màu xanh lam đặc trưng.

3.2.3. Ảnh hưởng của PA + nanochitosan đến sinh khối nấm *F. solani*

Hỗn hợp PA 0,04% và nanochitosan ở các nồng độ khảo sát có ảnh hưởng mạnh mẽ đến khả năng phát triển sinh khối nấm *F. solani*. Khi tăng nồng độ nanochitosan, sinh khối nấm giảm và hiệu lực ức chế tăng lên. Chỉ với 0,02% nanochitosan, hỗn hợp này đã có thể ức chế lên đến 67,78% sự phát triển sinh khối nấm, đạt được 38,5 mg sinh khối khô. Hiệu lực ức chế đạt 100% ở nồng độ nanochitosan 0,04% và PA 0,04%. Khi không có chất ức chế, sinh khối nấm có thể đạt tới 119,5 mg (Hình 2).



Hình 2. Ảnh hưởng của PA (0,04%) và nanochitosan đến sinh khối nấm *F. solani* sau 168 giờ nuôi cấy ở 25°C.

Ghi chú: Các giá trị trung bình của sinh khối nấm có cùng chữ cái in thường không sai khác ở mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$

3.3. Ảnh hưởng của PA kết hợp nanochitosan đến nấm *F. solani* ở điều kiện in vivo

Theo Nguyễn Thị Thủy Tiên và cs. (2017), ở điều kiện in vitro, nanochitosan 0,4% có hiệu quả ức chế 55,24% sự phát triển đường kính vết bệnh thối hồng do nấm *F. solani* gây ra trên cà chua. Do đó, 0,4% nanochitosan được sử dụng để kết hợp với PA 0,04% để khảo sát khả năng kháng nấm của hỗn hợp này với các công thức thí nghiệm khác nhau (Đối chứng, PA 0,04%, nanochitosan 0,4% và PA 0,04% + nanochitosan 0,4%). Mẫu đối chứng là mẫu cà chua không xử lý với chất kháng nấm.

Bảng 5. Ảnh hưởng của PA+ nanochitosan đến đường kính vết bệnh thối hồng trên cà chua

Nồng độ chất kháng nấm (%)	Đường kính vết bệnh (mm)								HLUC (%) (216 giờ)
	48 giờ	72 giờ	96 giờ	120 giờ	144 giờ	168 giờ	192 giờ	216 giờ	
0,00% (ĐC)	4,19 ^a	8,06 ^a	13,58 ^a	21,61 ^a	29,51 ^a	40,22 ^a	45,95 ^a	48,44 ^a	0,00
0,04% PA	4,16 ^a	7,92 ^a	13,51 ^a	19,69 ^b	26,66 ^b	30,48 ^b	37,27 ^b	42,99 ^b	11,26
0,40% nanochitosan	0,00 ^b	3,56 ^b	7,00 ^b	12,36 ^c	14,76 ^b	17,81 ^c	19,96 ^c	21,63 ^c	55,24
0,40% nanochitosan + 0,04% PA	0,00 ^b	0,00 ^c	4,91 ^c	10,24 ^d	12,88 ^c	16,88 ^c	17,83 ^d	18,33 ^d	62,16

Ghi chú: Các giá trị trung bình của tỷ lệ nảy mầm theo cột có cùng chữ cái in thường là không sai khác

ở mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$.

Kết quả phân tích bảng trên tương tự kết quả ở phần in vitro, khi sử dụng kết hợp nanochitosan với PA, hiệu quả kháng bệnh cao hơn khi sử dụng riêng lẻ từng hợp chất. Khi xử lý kết hợp, sau 96 giờ, vết bệnh mới hình thành, trong khi đó vết bệnh hình thành sau 48 giờ ở các công thức đối chứng và xử lý PA 0,04% và sau 72 giờ khi xử lý với nanochitosan 0,4%. Khả năng ức chế bệnh ở các công thức khác nhau là không giống nhau. Trong 4 ngày đầu quan sát, hầu như việc sử dụng PA không có hiệu quả, thể hiện qua đường kính vết bệnh ở công thức này không có sự sai khác có ý nghĩa so với mẫu đối chứng. Tuy nhiên, sau 168 giờ, ở công thức đối chứng đường kính vết bệnh đạt 40,22 mm. Trong khi đó, đường kính vết bệnh giảm còn 30,48 mm, 17,81 mm và 16,88 mm tương ứng với các công thức xử lý PA 0,04%, nanochitosan 0,4% và kết hợp PA 0,04% với nanochitosan 0,4%. Ngoài ra, sau 216 giờ, nếu việc nhúng PA chỉ có hiệu lực ức chế 11,26% sự phát triển của đường kính vết bệnh thì việc sử dụng nanochitosan gây ức chế lên đến 55,24%. Tuy nhiên, tác dụng kháng nấm đã tăng lên đến 62,16% khi xử lý đồng thời với nanochitosan và PA. Như vậy, có thể thấy sự kết hợp này có hiệu quả tích cực trong vấn đề kiểm soát bệnh thối hồng sau thu hoạch của cà chua gây ra bởi *F. solani*.

4. THẢO LUẬN VÀ KẾT LUẬN

4.1. Thảo luận

Việc sử dụng PA và chitosan hay các dẫn xuất của chúng trong nghiên cứu kháng nấm, kháng khuẩn đã được nghiên cứu rộng rãi. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi có kết quả tương đồng với các nghiên cứu khác. Nghiên cứu của Do và cs. (2013) chứng minh rằng PA 0,06% và 0,09% ức chế tỷ lệ nảy mầm của *Colletotrichum gloeosporioides* lần lượt là 36,60% và 84,72% (Do và cs., 2013). PA dạng muối của canxi không gây ức chế đối với nấm men và nấm mốc ở nồng độ 3,176 $\mu\text{g/mL}$, ngoại trừ *Fusarium graminearum* PM162 bị ức chế ở 352 $\mu\text{g/mL}$. Ngoài ra, ở ngưỡng pH khác nhau thì khả năng ức chế nấm của PA và muối của nó cũng không giống nhau. Nấm men và nấm mốc không bị đình chỉ ở nồng độ 3,176 $\mu\text{g/mL}$ PA ở pH 3,5 nhưng ở nồng độ 182 $\mu\text{g/mL}$ có thể gây ức chế *Fusarium graminearum* ở pH tương ứng (Razavi – Rohani và cs., 1999).

Khả năng kháng nấm của chitosan và dẫn xuất của chúng đã được trình bày trong nhiều nghiên cứu trong cùng lĩnh vực (Lê Thanh Long và cs., 2015; Al-Hetar và cs., 2010; Chookhongkha và cs., 2013). Nanochitosan có tác dụng kìm hãm sự sinh trưởng của *Colletotrichum acutatum* L2, giá trị EC_{50} và MIC_{90} đối với sự phát triển ĐKTN tương ứng là 0,75 g/L và 0,46 g/L (Lê Thanh Long và cs., 2015). Chookhongkha và cs. (2013) đã nghiên cứu ảnh hưởng của nanochitosan đến *Rhizopus* sp., *Colletotrichum capsici*, *Colletotrichum gloeosporioides* và *Aspergillus niger*. Kết quả cho thấy *Rhizopus* sp., *C. capsici*, *C.*

gloeosporioides bị đình chỉ ở nồng độ nanochitosan 0,6% nhưng nồng độ này chưa ức chế hoàn toàn sự phát triển của nấm *A. niger* (Chookhongkha và cs., 2013).

Trong điều kiện *in vivo*, chitosan và các dẫn xuất của chúng cũng đã được khảo sát khả năng kháng các loại nấm bệnh khác nhau. Trên táo sau thu hoạch, sự phát triển của loài nấm *Alternaria alternata* gây thối rữa trên quả táo Tàu giảm đáng kể khi xử lý bởi chitosan hòa tan trong nước ở nồng độ lớn hơn 0,1% (Yan và cs., 2011). Trên xoài, đường kính tổn thương do *C. gloeosporioides* giảm đáng kể so với đối chứng không xử lý màng phủ chitosan sau 10 ngày bảo quản (Jitareerat và cs., 2007). Trên đu đủ, màng chitosan ở nồng độ 0,5; 1,0; 1,5 và 2,0% có hiệu quả trong việc kiểm soát bệnh và làm chậm mức độ tiến triển của bệnh thán thư trên đu đủ với mức độ tổn thương ứng với các nồng độ chitosan sử dụng giảm lần lượt 7,0; 7,5; 49,9 và 100% (Ali, 2006). Nồng độ 4 g/L nanochitosan có khả năng ức chế 76% sự phát triển của đường kính vết bệnh thán thư do *C. acutatum* L2 gây ra, giá trị MIC₅₀ đạt được ở nồng độ nanochitosan 1,14 g/L (Lê Thanh Long và cs., 2015).

Ngoài ra, Do và cs. (2013) đã nghiên cứu ảnh hưởng của PA kết hợp sáp ong nhằm ức chế *C. gloeosporioides* và kiểm soát bệnh thán thư hại xoài. Kết quả cho thấy, chỉ có 10% xoài mắc bệnh thán thư khi kết hợp 0,12% PA với 8% sáp ong, trong khi chỉ sử dụng PA có 50% và 80% tỷ lệ xoài nhiễm bệnh tương ứng nồng độ PA là 0,09% và 0,06%. Từ kết quả nghiên cứu này, nồng độ 0,12% PA và 6% sáp ong được lựa chọn để ức chế *C. gloeosporioides* gây bệnh thán thư trên xoài (Do và cs., 2013). Chitosan và oligochitosan đã được kết hợp với thuốc diệt nấm để khảo sát khả năng kháng các tác nhân gây bệnh ở thực vật. Kết quả cho thấy ở mẫu ĐC (không có chất diệt nấm), 100% hoa dâu có dấu hiệu nhiễm bệnh sau khi cấy 3 – 4 ngày và kết quả tương tự với oligochitosan (10 mg/mL), Teldor (15 mg/mL), Switch (5 mg/mL), Amistar (10 mg/mL) hoặc Signum (10 mg/mL) khi sử dụng riêng lẻ. Tuy nhiên, khi hoa dâu được xử lý kết hợp của oligochitosan và thuốc diệt nấm tổng hợp, không có dấu hiệu xuất hiện sự nhiễm bệnh trong 6 ngày sau khi cấy. Kết quả đã chứng minh sự kết hợp của oligochitosan và thuốc diệt nấm tổng hợp làm giảm đáng kể thuốc diệt nấm tổng hợp sử dụng (Rahman, 2013).

Như vậy, các kết quả nghiên cứu ở điều kiện *in vitro* trong nghiên cứu này có sự tương đồng với các nghiên cứu khác. Việc kết hợp nanochitosan với PA đã làm tăng khả năng kháng nấm của chúng dù sử dụng ở nồng độ thấp hơn khi sử dụng đơn lẻ từng hợp chất. Có nhiều giả thuyết khác nhau giải thích cho hoạt tính kháng nấm của nanochitosan, PA cũng như khi có sự kết hợp giữa chúng. Hoạt tính kháng khuẩn của PA liên quan đến việc giảm pH cũng như khả năng phân ly của nó khi hòa tan, giúp chúng có thể xâm nhập vào tế bào vi sinh vật. Khi ở trong tế bào, axit phân ly thành cation hydro và anion cacboxy. Các cation làm giảm độ pH bên trong của tế bào vi khuẩn; các anion trực tiếp phá vỡ quá trình tổng hợp ADN trong nhân tế bào dẫn đến làm ngừng lại quá trình sinh sản của vi khuẩn (Shekhar và cs., 2009). Đối với chitosan và nanochitosan, một số nghiên cứu cho thấy rằng chitosan trung hòa điện tích trên bề mặt tế bào và làm thay đổi tính thấm của màng, sự tương tác này gây ra sự rò rỉ tế bào chất như axit amin và protein của tế bào. Nghiên cứu của Xu và cs. (2007) về hoạt tính kháng *Phytophthora capsici* của oligochitosan cho thấy rằng bản chất polycationic của oligochitosan chỉ đóng góp một phần vào hoạt tính kháng nấm. Để giải thích cho cơ chế kháng nấm còn có thể dựa vào một số cơ chế khác. Chitosan làm thay đổi cấu trúc tế bào như phá vỡ màng, không bào bị bóp méo gây rò rỉ tế bào chất. Trong nghiên cứu này, một số tế bào sợi nấm của *P. capsici* bị biến dạng ở 10 g/L oligochitosan. Không bào đóng vai trò quan trọng trong việc duy

tri áp suất thẩm thấu của tế bào, nồng độ 10-100 g/L oligochitosan làm cho không bào bị bóp méo và phá vỡ hoàn toàn, do đó ảnh hưởng tới sự phát triển của nấm (Xu và cs., 2007).

Trong điều kiện in vivo, ngoài những lý giải cho hiệu quả kháng nấm của nanochitosan tương tự như ở điều kiện in vitro, khả năng này có được còn là nhờ một số tác động tích cực của chế phẩm lên quả. Nanochitosan có khả năng tạo ra một lớp màng bán thấm, tạo ra sự khác biệt giữa khí quyển bên ngoài và phần tiếp xúc trực tiếp của quả có tác dụng điều hòa sự trao đổi khí, giảm quá trình thoát hơi nước và làm chậm quá trình chín bằng cách hạn chế sự sản sinh ethylen và CO₂ (Meng và cs., 2010; Muñoz và cs., 2009). Bên cạnh đó, như một chất kích kháng ngoại bào, chitosan hòa tan trong nước có thể tăng cường sức đề kháng ở vật chủ bằng cách hoạt hoá một số enzyme phòng vệ và chống oxy hóa như chitinase, β -1,3-glucanase, phenylalanine ammonia-lyase.

4.2. Kết luận

Trong nghiên cứu này, việc kết hợp nanochitosan với PA đã có tác dụng tích cực trong việc nâng cao khả năng kháng nấm của nanochitosan. Nanochitosan ngoài việc tạo ra môi trường vi khí quyển trên bề mặt quả, nó còn có tác dụng lưu giữ PA, giúp cho PA tồn tại lâu hơn trên bề mặt quả, phát huy đồng thời tác dụng của hai hợp chất kháng nấm thân thiện với môi trường này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Tài liệu tiếng Việt

- Lê Thanh Long, Nguyễn Thị Nga, Nguyễn Cao Cường, Trần Ngọc Khiêm và Nguyễn Thị Thủy Tiên. (2015). Khả năng ức chế của nanochitosan đối với *Colletotrichum acutatum* L2 gây hại quả cà chua sau thu hoạch. *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, 13(8), 1481-1487.
- Nguyễn Thị Thủy Tiên, Lê Thanh Long, Nguyễn Hiền Trang, Trần Thị Thu Hà và Nguyễn Cao Cường. (2017). Khả năng kháng nấm *Fusarium solani* gây thối quả cà chua sau thu hoạch của nanochitosan. *Tạp chí Khoa học Đại học Huế*, 3+4, 65-72.

2. Tài liệu tiếng nước ngoài

- Abu Bakar A. I., Nur Ain Izzati, M. Z. and 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. and Wong, M. Y. (2010). Antifungal activity of chitosan against *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense. *Journal of Applied Polymer Science*, 120, 2434-2439.
- Ali A. (2006). Anthracnose incidence, biochemical changes, postharvest quality and gas exchange of chitosan - coated papaya. Unpublished doctoral dissertation, Universiti Putra Malaysia.
- Ben-Shalom, N., Ardi, R., Pinto, R., Aki, C. and Fallik, E. (2003). Controlling gray mold caused by *Botrytis cinerea* in cucumber plants by means of chitosan. *Crop Protection*, 22, 285-290.
- Chien, P. J. and Chou, C. C. (2006). Antifungal activity of chitosan and its application to control post-harvest quality and fungal rotting of Tankan citrus fruit (*Citrus tankan* Hayata). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 1964-1969.
- Chookhongkha N., Spondilok, T. and Photchanachai S. (2013). Effect of chitosan and chitosan nanoparticles on fungal growth and chilli seed quality. *Acta Horticulturae*, 973, 231-237.
- Cota-Arriola O., Cortez-Rocha M. O. and Ezquerro-Brauer J. M. (2013). Ultrastructural, morphological, and antifungal properties of micro and nanoparticles of chitosan crosslinked with sodium tripolyphosphate. *Journal of Polymers and the Environment*, 21(971). <https://doi.org/10.1007/s10924-013-0583-1>

- Nguyễn Cao Cường, Lê Thanh Long, Nguyễn Thị Thủy Tiên and Trần Bích Lam. (2014). Study on nanochitosan application in prevention of anthracnose disease of post-harvest chilli. *Journal of Science and Technology*, 52(5C), 222-228.
- Badawy M. E. I. and Rabea E. I. (2011). A biopolymer chitosan and its derivatives as promising antimicrobial agents against plant pathogens and their applications in crop protection. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, 2011, 1-29. <https://doi.org/10.1155/2011/460381>.
- Do, C. T. and Kaewalin, K. (2013). Inhibition of *Colletotrichum gloeosporioides* and control of postharvest anthracnose disease on mango fruit using propionic acid combined with beecarnauba wax emulsion. *Journal of Agricultural Science*, 5(12), 110 – 116.
- Haque M. N. R., Chowdhury, R., Islam, K. M. S. and Akbar, M. A. (2009). Propionic acid is an alternative to antibiotics in poultry diet. *Bangladesh Journal of Animal Science*, 38(1&2), 111-122.
- Jitareerat, P., Paumchai, S., Kanlayanarat, S. and Sangchote, S. (2007). Effect of chitosan on ripening, enzymatic activity, and disease development in mango (*Mangifera indica*) fruit. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 35(2), 211-218.
- Meng X., Lingyu, Y., Kennedy, J.F. and Tian, S. (2010). Effects of chitosan and oligochitosan on growth of two fungal pathogens and physiological properties in pear fruit. Unpublished doctoral dissertation, Ocean University of China.
- Muñoz Z., Moret A. and Garcés, S. (2009). Assessment of chitosan for inhibition of *Colletotrichum* sp. on tomatoes and grapes. *Crop Protection*, 28, 36-40.
- Poverenov E., Granit, R. and Gabai, S. (2013). Encapsulation and controlled release of antifungal propionic acid utilizing biodegradable active films based on natural polymers. *European Food Research and Technology*, 237, 19–26.
- Rahman H. (2013). Antifungal activity of chitosan/chitoooligosaccharides alone and in combination with chemical fungicides against fungal pathogens. Unpublished doctoral dissertation, Norwegian University of Life Sciences.
- Razavi – Rohani, S. M. (1999). Antifungal effects of sorbic acid and propionic acid different pH and NaCl conditions. *Journal of Food Safety*, 19, 109 – 120.
- Shekhar M., Singh S., Khan A. A. A. and Kumar S. (2009). Efficacy of inorganic salts and organic acids against colony growth of *Aspergillus flavus* and their use to control aflatoxin level in post harvest maize. Unpublished doctoral dissertation, Pusa Campus IARI New Delhi- India.
- Xu J. Zhao X., Hana X. and Du Y. (2007). Antifungal activity of oligochitosan against *Phytophthora capsici* and other plant pathogenic fungi in vitro. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 87, 220–228.
- Yan J., Li J., Zhao H. and Chen, N. (2011). Effects of oligochitosan on postharvest Alternaria rot, storage quality and defense responses in Chinese jujube (*Zizyphus jujuba* Mill. Cv. *Dongzao*) fruit. *Journal of Food Protection*, 74(5), 783-788.

IMPROVING ANTIFUNGAL ABILITY OF NANOCHITOSAN AGAINST *FUSARIUM SOLANI* ON POST-HARVEST TOMATO BY A COMBINATION WITH PROPIONIC ACID

Tong Thi Hue, Le Thanh Long, Nguyen Thi Thuy Tien*
Hue University – University of Agriculture and Forestry

*Contact email: nguyenthithuytien84@huaf.edu.vn

ABSTRACT

This study was conducted to evaluate the antifungal ability of a combination of nanochitosan and propionic acid (PA) in inhibiting the growth and development of *Fusarium solani* in vitro and in vivo. The combination of nanochitosan and PA exhibited higher inhibition on *F. solani* than PA independently. The higher the concentration of these compounds is, the higher the inhibition on fungi is. In in vitro, the concentration of PA 0.16% completely inhibited the growth and development of *F. solani* while PA 0.04% was able to inhibit over 50% of their growth. The combination of various concentration nanochitosan at 0.01%, 0.02% and 0.04% with PA 0.04% strongly inhibited the development of fungal pathogens. The concentration of 0.01% nanochitosan combined with PA 0.04% has completely inhibited the germination of fungi after 24 h. The fungus was unable to grow at a concentration of 0.04% nanochitosan and 0.04% PA combination. In in vivo conditions, nanochitosan 0.4% combined with PA 0.04% inhibited up to 62.16% of lesion diameter growth on tomato infected with *F. solani*. It can be seen that PA helped to enhance the antifungal ability of nanochitosan against *F. solani*.

Từ khóa: acid propionic, *Fusarium solani*, nanochitosan, post-harvest disease, tomato preservation.

Received: 7th October 2018

Reviewed: 15th December 2018

Accepted: 30th January 2019