

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



ĐẶNG VĂN PHÚ

**NGHIÊN CỨU CHẾ TẠO VÀ KHẢO SÁT HIỆU QUẢ
PHÒNG TRỪ NẤM *Colletotrichum truncatum* GÂY BỆNH
THÁN THƯ TRÊN CÂY ĐẬU NÀNH (*Glycine max*)
CỦA PHỨC OLIGOCHITOSAN-Zn²⁺**

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ HÓA SINH HỌC

Mã số: 9 42 01 16

TP. HỒ CHÍ MINH – 2024

Công trình được hoàn thành tại: Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện
Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Người hướng dẫn khoa học:

1. TS. Bùi Duy Du, Viện Khoa học Vật liệu Ứng dụng, VAST
2. GS.TS. Nguyễn Quốc Hiến, Viện Năng lượng Nguyên tử Việt Nam

Phản biện 1: PGS.TS. Lê Quang Luân

Phản biện 2: GS.TS. Phan Đình Tuấn

Phản biện 3: PGS.TS. Nguyễn Tiến Thắng

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án tiến sĩ, họp tại Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam vào hồi ... giờ ...', ngày ... tháng ... năm 202....

Có thể tìm hiểu luận án tại:

1. Thư viện Học viện Khoa học và Công nghệ
2. Thư viện Quốc gia Việt Nam

MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết của luận án

Oligochitosan (OC) là loại polysaccharide tự nhiên có khối lượng phân tử (KLPT) thấp được chế tạo bằng phương pháp cắt mạch chitosan bởi các tác nhân như enzyme, hóa học và bức xạ. OC đã được nghiên cứu và minh chứng là không độc, có khả năng ức chế vi sinh vật gây bệnh, có hiệu ứng kích kháng và phòng trừ đối với nhiều loại bệnh gây hại trên thực vật. OC có KLPT < 10 kDa thể hiện hiệu ứng kích kháng bệnh hiệu quả.

OC có khả năng tạo phức với nhiều ion kim loại như Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} ,... thông qua liên kết phối trí với nhóm amin ($-\text{NH}_2$) và hydroxyl ($-\text{OH}$), làm tăng cường khả năng kháng khuẩn, kháng nấm. Trong đó, phức OC- Zn^{2+} được quan tâm nghiên cứu và sử dụng phòng trừ bệnh cho cây trồng. Kẽm là nguyên tố vi lượng thiết yếu cho sự sinh trưởng, phát triển và có vai trò trong việc tăng cường phản ứng phòng vệ của cây trồng. Phức OC- Zn^{2+} có khả năng kháng vi khuẩn, nấm bệnh cao hơn từ 2 – 8 lần so với OC và 4 – 16 lần so với Zn^{2+} . Ngoài ra, việc sử dụng kẽm trên thực vật còn làm tăng tích lũy vi chất dinh dưỡng thiết yếu trong nông sản mà thường thiếu hụt trong chế độ ăn uống của con người. Vì vậy, phức OC- Zn^{2+} là loại vật liệu tiềm năng có thể ứng dụng trong sản xuất nông nghiệp an toàn.

Trong sản xuất nông nghiệp tại Việt Nam, đậu nành (*Glycine max*) là cây trồng quan trọng vì là cây thực phẩm lâu đời, là nguồn cung cấp protein cho người và vật nuôi. Diện tích trồng đậu nành tại Việt Nam theo thống kê đến năm 2020 là 166.000 ha với sản lượng đạt 265.000 tấn nhưng chỉ đủ cung cấp 8 – 10% cho nhu cầu sử dụng trong nước. Vì vậy, phát triển sản xuất đậu nành để đáp ứng nhu cầu là hướng đi đúng đắn. Xu hướng toàn cầu trong sản xuất nông nghiệp an toàn nói chung và đậu nành nói riêng, việc kiểm soát các loại bệnh hại thường xuyên do nấm *Colletotrichum truncatum* (*C. truncatum*), *Fusarium solani*,... bằng chế phẩm như phức OC- Zn^{2+} là cần thiết. Tác động của phức OC- Zn^{2+} đối với mỗi loại cây trồng và mỗi loại vi

sinh vật gây bệnh là khác nhau. Tuy nhiên cho đến nay hiệu quả phòng trừ bệnh thán thư trên cây đậu nành do nấm *C. truncatum* của phức OC-Zn²⁺ chưa được nghiên cứu.

Vì các lý do trên, chúng tôi chọn và thực hiện đề tài “**Nghiên cứu chế tạo và khảo sát hiệu quả phòng trừ nấm *Colletotrichum truncatum* gây bệnh thán thư trên cây đậu nành (*Glycine max*) của phức oligochitosan-Zn²⁺”.**

2. Mục tiêu nghiên cứu của luận án

Mục tiêu của luận án là nghiên cứu chế tạo OC có KLPT nhỏ hơn 10 kDa bằng phương pháp chiếu xạ gamma Co⁶⁰ kết hợp với H₂O₂ nồng độ thấp, sử dụng để chế tạo phức OC-Zn²⁺. Nghiên cứu hiệu ứng sinh học về phòng trừ bệnh thán thư do nấm *C. truncatum*, kích thích tạo enzyme chitinase kháng bệnh và tăng trưởng trên cây đậu nành của phức OC-Zn²⁺.

3. Các nội dung nghiên cứu chính của luận án

Nghiên cứu chế tạo OC có KLPT từ 2 – 8 kDa bằng phương pháp chiếu xạ gamma Co⁶⁰ kết hợp với H₂O₂ và xác định đặc trưng tính chất của OC.

Nghiên cứu chế tạo phức OC-Zn²⁺ và xác định đặc trưng tính chất.

Nghiên cứu hiệu lực ức chế nấm *C. truncatum* của phức OC-Zn²⁺ trong điều kiện phòng thí nghiệm (*in vitro*).

Nghiên cứu hiệu ứng kích tạo enzyme chitinase và các chỉ tiêu tăng trưởng của cây đậu nành được xử lý với phức OC-Zn²⁺ và gây nhiễm nấm *C. truncatum* gây bệnh thán thư trong thí nghiệm nhà kính.

Đánh giá hiệu quả phòng trừ bệnh và hiệu lực nông học của phức OC-Zn²⁺ đối với cây đậu nành trên thí nghiệm đồng ruộng.

Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. Chitosan, oligochitosan và khả năng kiểm soát bệnh hại thực vật

1.1.1. Chitosan

Chitosan (CTS) là sản phẩm đề acetyl của chitin có trong vỏ các loài giáp xác, côn trùng, tế bào nấm,... chúng có phạm vi ứng dụng rộng rãi do có

những đặc tính như không độc, có khả năng phân hủy và tương hợp sinh học, kháng khuẩn, kháng nấm. Về cấu tạo, CTS là một copolymer bao gồm các đơn vị D-glucosamine (GluN) và N-acetyl-D-glucosamine (GluNAc), trong đó lượng monomer GluN chiếm ít nhất là 50%.

Cơ chế kháng vi sinh vật của CTS là phá vỡ màng tế bào của vi khuẩn do sự tương tác tĩnh điện, tác động đến DNA làm giảm rối loạn sao chép DNA, hoặc liên kết với các chất dinh dưỡng cần thiết cho sự phát triển của vi sinh vật và làm chết vi sinh vật. CTS còn được xem là một vắc xin thực vật, nó giúp cây trồng tăng cường sức đề kháng, kích tạo ra kháng thể và các enzyme như chitinase, glucanase,... chống lại vi sinh vật gây hại xâm nhập.

Gần đây có một số nghiên cứu sử dụng CTS để kiểm soát các bệnh hại trên cây trồng. CTS nồng độ 1 mg/ml kháng nấm *Phytophthora infestans* hại cà chua và ức chế nấm *Phytophthora palmivora* gây bệnh rụng lá cao su. Sử dụng CTS nồng độ 100 µg/ml, ức chế trên 90% nấm *Phytophthora capsici* gây bệnh chết nhanh cây hồ tiêu; nồng độ CTS từ 0,2 – 2,0 mg/ml giảm đáng kể vết thương cổ rễ do nấm *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* gây ra trên cà chua. CTS nồng độ 3 mg/ml ức chế nấm *Fusarium solani* f. sp. *glycines* và kháng nấm *Fusarium sulphureum* gây hại rễ khoai tây. CTS và dẫn xuất của chúng có khả năng kháng vi khuẩn, vi nấm phổ rộng, có tiềm năng ứng dụng diệt trừ vi khuẩn, nấm, tuyến trùng gây hại cây trồng.

1.1.2. Oligochitosan

Oligochitosan (OC) là sản phẩm CTS cắt mạch có KLPT < 10 kDa, được điều chế bằng cách cắt đứt các liên kết β -1,4-glycoside trong chuỗi mạch phân tử CTS bởi các tác nhân như hóa học, enzyme, bức xạ ion hóa (tia gamma Co^{60} , dòng điện tử gia tốc). So với CTS, OC tan tốt hơn trong môi trường từ axit đến kiềm do chuỗi phân tử ngắn và nhiều nhóm amin tự do.

Hoạt tính kháng vi sinh vật của OC cao hơn so với CTS tùy thuộc KLPT và loại vi sinh vật. Khả năng kích thích thực vật sản sinh kháng thể và protein enzyme chống bệnh trên nhiều loại cây trồng của OC đã được nghiên cứu.

Burkhanova (2007) công bố OC có KLPT 5 – 10 kDa có tác dụng kiểm soát bệnh thối rữa trên lúa mì, *Ozeretskovskaya và cộng sự* (2006) chứng minh OC với KLPT từ 2 – 6 kDa thể hiện hiệu quả phòng bệnh mốc sương ở khoai tây tốt hơn so với CTS có KLPT lớn. Theo *Xu và cộng sự* (2007), OC có tác dụng phòng chống nấm *Phytophthora capsici* gây thối rữa cây trồng. *Li và cộng sự* (2016) chứng minh OC phòng được bệnh thối thân thực vật do nấm *Fusarium sambucinum* ở nồng độ 1 mg/ml. *Du và cộng sự* (2015) công bố sử dụng OC KLPT ~5 kDa ở nồng độ 150 ppm rồi phun nhiễm nấm *Neoscytalidium dimidiatum* gây bệnh đốm nâu trên cây thanh long đã kích tạo enzyme chitinase đạt 34,9 UI/g cao hơn so với đối chứng phun nước (19,1 UI/g), đồng thời làm giảm tỷ lệ bệnh và chỉ số bệnh. *Tuấn và cộng sự* (2019) cũng minh chứng OC với KLPT 3 kDa giúp thanh long kích tạo enzyme chitinase đạt hiệu quả phòng trừ bệnh đốm nâu cao hơn loại OC có KLPT 5 kDa và 7 kDa. Khả năng kích thích thực vật tạo kháng sinh (phytoalexin) và kháng thể chống lại vi sinh vật gây bệnh phụ thuộc vào KLPT, khi KLPT < 5 kDa thì CTS thể hiện hiệu ứng kích kháng rõ rệt.

1.2. Phức OC-Zn²⁺ và khả năng kiểm soát bệnh hại thực vật

CTS và OC có khả năng tạo phức với nhiều ion kim loại như Cu²⁺, Zn²⁺, Fe²⁺,... bằng liên kết phối trí với nhóm amin (-NH₂) và hydroxyl (-OH).

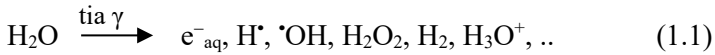
Phức OC-Zn²⁺ được quan tâm nghiên cứu ứng dụng cho thực vật bởi vì kẽm là vi chất dinh dưỡng cần thiết cho tất cả các sinh vật sống và thực vật, chúng tham gia vào quá trình tăng trưởng, phát triển cũng như kích thích khả năng miễn dịch. Kẽm tác động lên các chức năng hoạt động của vi sinh vật gây hại và làm bất hoạt chúng, đồng thời kích thích thực vật hoạt hóa các phản ứng phòng vệ như tăng cường sản xuất axit salicylic, axit jasmonic hoặc etylen, tăng cường sinh tổng hợp lignin để gia cố thành tế bào, kích hoạt các enzyme hoặc protein chứa kẽm chống lại sự tấn công của mầm bệnh.

Do phức OC-Zn²⁺ tạo nên từ hai thành phần đều có khả năng kháng vi sinh vật và kích kháng bệnh nên phức này có hiệu quả cao khi sử dụng kiểm

soát bệnh hại cây trồng. *Wang và cộng sự* (2004) đã minh chứng phức CTS-Zn²⁺ có hiệu ứng kháng khuẩn, kháng nấm cao hơn 2 – 8 lần so với CTS và 4 – 16 so với Zn²⁺ trên 11 loài vi khuẩn và vi nấm. Khi sử dụng phức CTS-Zn²⁺ trên cây ngô làm gia tăng hiệu quả kích kháng bệnh và tăng năng suất ngô từ 20 – 40%. *Ibrahim và cộng sự* (2015) đã chứng minh phức CTS-Zn²⁺ làm gia tăng sinh trưởng, hiệu quả hấp thu dưỡng chất, và sức chống chịu với môi trường, tăng năng suất cây đậu từ 25% – 33%. *Hiên và cộng sự* (2008) sử dụng hỗn hợp OC + Zn²⁺ đã làm giảm tỷ lệ bệnh lá 36%, bệnh thân 66%, và tăng năng suất cây mía 12%. Gần đây, phức hợp OC-nanosilica (OC-nSiO₂) đã được công bố là có hiệu ứng phòng trừ và kích kháng bệnh thán thư trên ớt, đốm nâu trên thanh long. Cho đến nay, các công trình nghiên cứu về hiệu ứng phòng trừ bệnh thông qua hiệu ứng kích kháng của phức OC-Zn²⁺ đối với các bệnh trên cây đậu nành chưa được công bố.

1.3. Các phương pháp điều chế OC

OC được chế tạo chủ yếu bằng phương pháp cắt mạch: hóa học (H₂O₂, axit mạnh), vật lý (bức xạ vi sóng, tia tử ngoại, bức xạ tia gamma Co⁶⁰, chùm điện tử gia tốc,..), sinh học (sử dụng enzyme cellulase, chitinase,..) hoặc kết hợp các phương pháp. Phương pháp chiếu xạ gamma Co⁶⁰ kết hợp với H₂O₂ được sử dụng để chế tạo OC như trong luận án này có cơ chế như sau: đầu tiên là phản ứng xạ ly của H₂O và H₂O₂ tạo thành các gốc tự do hoạt động



Các gốc tự do $\bullet\text{OH}$ sinh ra gây phản ứng thủy phân oxi hóa cắt đứt liên kết β -1,4-glycoside của CTS tạo thành OC. Kết hợp chiếu xạ tia gamma Co⁶⁰ với H₂O₂ nồng độ thấp để chế tạo OC được xem là quy trình có ý nghĩa khoa học và thực tiễn vì giảm được liều xạ nên góp phần giảm giá thành sản phẩm.

1.4. Enzyme chitinase trong hệ thống phòng bệnh cây trồng

Chitinase (EC 3.2.1.14) xúc tác thủy phân chitin, chitosan, peptidoglycan, lipochitooligosaccharide, đây là các thành phần đặc trưng ở màng tế bào vi sinh vật. Chitinase có vai trò bảo vệ hoặc tăng cường khả năng chống bệnh ở thực vật và động vật bậc cao không chứa chitin. Chitinase từ thực vật sẽ thủy phân tế bào vi sinh vật và tiêu diệt mầm bệnh, đồng thời phân tử chitin hoặc OC giải phóng từ thành tế bào nấm bệnh gây đáp ứng phản vệ hệ thống. Do vậy, khi xử lý với chitin hay OC, thực vật sẽ nhận diện như bị mầm bệnh tấn công. Sau đó tiếp nhận và dẫn truyền tín hiệu gây đáp ứng kích hoạt hệ miễn dịch tự nhiên hoặc sinh tổng hợp PR-protein để loại trừ mầm bệnh.

1.5. Cây đậu nành và bệnh thán thư do nấm *Colletotrichum truncatum*

Đậu nành (*Glycine max*) là một trong những loại cây trồng có giá trị kinh tế và là nguồn cung cấp protein, dầu thực vật lớn trên thế giới. Đậu nành là cây công nghiệp và thực phẩm quan trọng trong cơ cấu cây trồng ở Việt Nam.

Năng suất đậu nành bị ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố, phổ biến là yếu tố bệnh hại do vi sinh vật gây ra như bệnh lở cổ rễ, thối hạt, đốm nâu, sương mai, rỉ sắt, thán thư,... Trong số đó, bệnh thán thư do nấm *C. truncatum* gây ra là một trong những bệnh phổ biến và gây thiệt hại nghiêm trọng đến năng suất (giảm 30% – 70%) đậu nành. Cho đến nay, biện pháp kiểm soát bệnh thán thư trên cây đậu nành chủ yếu sử dụng các sản phẩm thuốc diệt nấm hóa học có nguy cơ ảnh hưởng đến sức khỏe con người và sinh thái. Do vậy, việc sử dụng các vật liệu mới có nguồn gốc thiên nhiên để kiểm soát hiệu quả bệnh thán thư trên cây đậu nành là cần thiết. Một số nghiên cứu sử dụng CTS, OC hoặc các dẫn xuất của chúng để kiểm soát bệnh hại và tăng trưởng trên cây đậu nành đã được công bố. [Prapagdee và cộng sự](#) (2007) sử dụng CTS đã làm giảm tỉ lệ bệnh chết nhanh do nấm *Fusarium solani* trên cây đậu nành. [Hirano và cộng sự](#) (2001) công bố sử dụng OC đã làm gia tăng lượng enzyme chitinase để chống lại mầm bệnh gây hại cây đậu nành. Chưa có công bố về hiệu quả phòng trừ bệnh của phức OC-Zn²⁺ trên đậu nành.

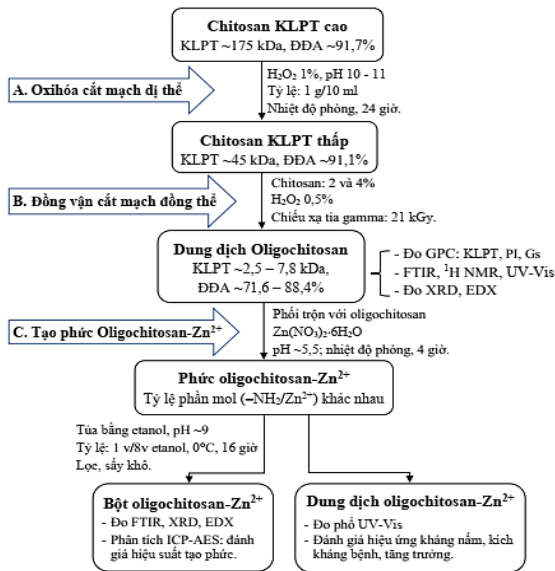
Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu và hóa chất

Chitosan có KLPT ~171 kDa, môi trường nuôi cấy nấm potato dextrose agar (PDA), $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$, H_2O_2 30%, $C_8H_{15}O_6$, $C_7H_4N_2O_7$,... Giống đậu nành HL 07-15, chủng nấm *Colletotrichum truncatum*.

2.2. Thực nghiệm và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Chế tạo oligochitosan, phức oligochitosan-Zn²⁺



Hình 2.1: Sơ đồ chế tạo OC, phức OC-Zn²⁺ và xác định đặc trưng tính chất

Phương pháp chế tạo OC, phức OC-Zn²⁺ và xác định các đặc trưng tính chất theo sơ đồ **Hình 2.1**. Bột chitosan (CTS) ngâm trong dung dịch 1% H_2O_2 theo tỉ lệ 1 g CTS/10 ml dung dịch, ở nhiệt độ phòng, điều chỉnh pH ~10 – 11 bằng NaOH 2M. Sau 24 giờ ngâm, lọc và rửa bằng nước đến pH ~7, sấy khô thu CTS KLPT thấp. Sử dụng mẫu CTS này để pha tạo các dung dịch 4% và 2% CTS trong 2% và 1% axit lactic có và không có bổ sung 0,5% H_2O_2 . Chiếu xạ các dung dịch CTS trên nguồn gamma Co^{60} , suất liều ~1,1

kGy/giờ tại Trung tâm VINAGAMMA để tạo OC có KLPT khác nhau.

Dung dịch phức OC-Zn²⁺ được điều chế bằng phương pháp phối trộn dung dịch OC với Zn(NO₃)₂·6H₂O theo tỷ lệ phần mol (–NH₂/Zn²⁺) khác nhau.

2.2.2. Các phương pháp và kỹ thuật sử dụng để nghiên cứu

Đo phổ hấp thụ ánh sáng vùng tử ngoại - khả kiến – UV-Vis: Các mẫu được pha loãng bằng nước đến nồng độ OC 0,1%, đo mẫu trên máy UV-Vis, Jasco V630 trong khoảng bước sóng 200 – 800 nm.

Đo phổ sắc ký gel thấm qua – GPC: Mẫu CTS và OC được đo trên máy GPC, LC-20AB Shimadzu, detector RID-10A, và cột Ultrahydrogel 250 Waters. Dung chất chuẩn là pullulan với KLPT Mw ~ 780 – 380.000 Da.

Đo phổ hấp thụ hồng ngoại – FTIR: 3 – 5 mg mẫu được trộn với 200 mg KBr, nén viên, và đo trên máy FTIR 8400S trong dải sóng 800 – 4000 cm⁻¹.

Đo phổ cộng hưởng từ proton – ¹H NMR: Hòa tan 50 mg bột OC trong 0,5 ml dung dịch 2% CD₃COOD/D₂O và đo trên máy Bruker AVANCE III 500 spectrometer, Bruker BioSpin AG.

Đo giản đồ nhiễu xạ tia X – XRD: Mẫu bột mịn CTS, OC, và phức OC-Zn²⁺ được ép thành dạng màng và đo trên máy XRD Siemens D5000, sử dụng ống phát tia X Cu-Kα (1,54 Å), điện áp 40 kV, cường độ dòng 40 mA, góc quét 2θ thay đổi từ 0 – 80°.

Đo phổ tán sắc năng lượng tia X – EDX: Các mẫu bột OC và phức OC-Zn²⁺ được nén thành dạng màng và đo trên máy EDX, JEOL 6610 LA gắn cùng hệ FE-SEM, S-4800, Hitachi, ghi dữ liệu trong dải điện thế 0 – 20 keV.

Đo phổ phát xạ nguyên tử cảm ứng plasma – ICP-AES: Phá mẫu OC-Zn²⁺ bằng HNO₃ rồi đo trên máy ICP-AES, PerkinElmer, Optima 5300DV.

2.2.3. Xác định hiệu lực ức chế nấm *C. truncatum* trong *in vitro*

Hiệu lực ức chế (AE) nấm *C. truncatum* trong *in vitro* của vật liệu được xác định theo phương pháp gây độc môi trường. AE% được tính theo công thức: AE (%) = (Dc – Ds) × 100/Dc, trong đó Dc và Ds lần lượt là đường kính tăng nấm (mm) tương ứng của mẫu đối chứng và mẫu thử.

2.2.4. Nghiên cứu hiệu quả phòng trừ bệnh thán thư và các chỉ tiêu sinh trưởng của phức OC-Zn²⁺ trên cây đậu nành trong nhà kính

Gieo 9 hạt giống đậu nành (HL 07-15) đã xử lý vô trùng bề mặt trong chậu nhựa đường kính 30 cm chứa giá thể hữu cơ. Sau 1 tuần, tĩa bỏ và giữ lại 4 cây/chậu có chiều cao và kích thước đồng đều. Thí nghiệm trong nhà kính được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên (CRD) với 3 lần lặp lại.

Cây đậu nành được phun qua lá các dung dịch mẫu thử gồm muối kẽm nitrate, OC, phức OC-Zn²⁺ được pha loãng với nước đến nồng độ thiết lập. Phun vật liệu 3 lần vào các ngày thứ 15, 25 và 35 sau khi gieo hạt với lượng 0,5; 0,75; và 1 lít/nghiệm thức. Sau lần phun thứ ba 24 giờ, phun dung dịch nấm *C. truncatum* (mật độ ~10⁵ bào tử/ml) với lượng phun 1 lít/nghiệm thức để lây nhiễm bệnh thán thư cho cây đậu nành. Xác định các chỉ tiêu sinh trưởng tại thời điểm 36 ngày sau gieo; hàm lượng enzyme chitinase trước và sau phun bệnh; tỷ lệ và chỉ số bệnh tại thời điểm 21 ngày sau phun bệnh.

Xác định hàm lượng chlorophyll tổng số của lá cây đậu nành tại thời điểm 36 ngày sau gieo bằng phương pháp Arnon – 1949. Mẫu lá được nghiền và chiết bằng dung môi acetol 80%, ly tâm để thu dịch chiết. Đo mật độ quang của dịch chiết trên máy UV-Vis tại bước sóng 663 nm (đặc trưng cho chlorophyll *a*) và 645 nm (đặc trưng chlorophyll *b*). Hàm lượng chlorophyll tổng (mg/g lá) = $[20,2 \times (\Delta A_{645}) - 8,02 \times (\Delta A_{663})] \times V / (1000 \times W)$, trong đó ΔA là độ hấp thụ quang học tại bước sóng tương ứng; V (ml) là thể tích dịch chiết; W (g) là khối lượng mô lá tươi dùng để chiết.

Xác định chiều cao cây đậu nành tại thời điểm 36 ngày sau gieo bằng thước dây có độ chia nhỏ 1 mm, đo ngẫu nhiên 5 cây/nghiệm thức.

Xác định hàm lượng chất khô/cây đậu nành tại thời điểm 36 ngày sau gieo bằng cách cắt bỏ phần rễ, sấy khô trong tủ sấy ở 65°C đến khối lượng không đổi, cân và tính hàm lượng chất khô (g/cây).

Hoạt tính enzyme chitinase (CA) được xác định bằng cách đo lượng N-acetyl-glucosamine (GluNAc) được giải phóng từ phản ứng thủy phân chitin. Dung dịch chất chuẩn GluNAc trong đệm phosphate (pH 7) nồng độ 0,1 –

1,0 $\mu\text{mol/ml}$ được sử dụng để lập đường chuẩn biểu diễn sự phụ thuộc cường độ hấp thụ vào lượng đường khử GluNAc. Chiết dịch enzyme chitinase thô từ lá cây đậu nành bằng đệm natri phosphat 0,1 M (pH 7). Huyền phù chitin (1% trong đệm phosphate, pH 7) được sử dụng làm cơ chất phản ứng. Hỗn hợp phản ứng gồm 2 ml huyền phù chitin và 2 mL dịch chiết enzyme chitinase thô. Sau 3 giờ ở 45°C , dừng phản ứng bằng cách đun sôi cách thủy trong 5 phút, sau đó bổ sung 2 ml dung dịch NaOH 2M. Hỗn hợp dung dịch phản ứng (6 ml) được chia ra làm 02 ống nghiệm. Mỗi ống sau đó được bổ sung 1 ml DNS, đun sôi cách thủy trong 5 phút và làm nguội xuống nhiệt độ phòng ($\sim 30^{\circ}\text{C}$). Đo cường độ hấp thụ tại bước sóng 540 nm trên máy UV-Vis. Giá trị CA trong mẫu lá được tính theo công thức $CA \text{ (U/g lá tươi)} = (X.k.V)/(v.t)$, trong đó: X là lượng GluNAc suy ra từ đường chuẩn (μmol); k là hệ số pha loãng (g lá/ml); V là tổng thể tích của phản ứng (ml); v là thể tích của dịch chiết enzyme sử dụng (ml); t là thời gian phản ứng (phút).

Xác định tỷ lệ bệnh và chỉ số bệnh theo QCVN 01-168: 2014/BNNPTNT.

2.2.5. Đánh giá hiệu quả phòng trừ bệnh và hiệu lực nông học của phức oligochitosan-Zn²⁺ đối với cây đậu nành trên ruộng thí nghiệm

Thí nghiệm được bố trí theo thể thức khối đầy đủ hoàn toàn ngẫu nhiên (RCBD), mỗi khảo nghiệm gồm 3 nghiệm thức, với 3 lần lặp lại, diện tích ô thí nghiệm là $30 \text{ m}^2/\text{ô}$. Hoạt tính chitinase xác định theo mục 2.2.4. Điều tra bệnh hại và chỉ tiêu nông học theo QCVN 01-168:2014/BNNPTNT.

2.2.6. Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu thu được từ thực nghiệm được xử lý bằng phương pháp phân tích phương sai (ANOVA) và trắc nghiệm phân hạng LSD bởi phần mềm MSTATC, version 1.2, Đại học bang Michigan (MSU), Mỹ phát hành 1989.

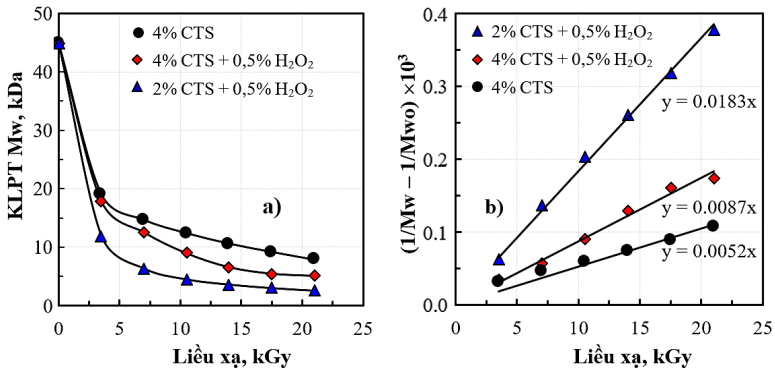
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Chế tạo OC có KLPT 2 – 8 kDa và phức OC-Zn²⁺

3.1.1. Oxi hóa cắt mạch dị thể giảm khối lượng phân tử chitosan

Sử dụng H_2O_2 1% để oxy hóa cắt mạch dị thể CTS, sau 24 giờ phản ứng, KLPT của CTS ban đầu là ~ 171 kDa có chỉ số đa phân tán KLPT (PI) là 3,26 đã giảm xuống còn ~ 45 kDa và PI là 2,78 được xác định bằng đo phổ GPC. Kết quả này chứng tỏ sản phẩm CTS cắt mạch có KLPT đồng đều hơn. Phổ FTIR của CTS và CTS oxy hóa cắt mạch hầu như không khác biệt, chứng tỏ điều kiện cắt mạch này không làm thay đổi cấu trúc hóa học của CTS.

3.1.2. Cắt mạch đồng thể bằng bức xạ gamma Co^{60} kết hợp H_2O_2 tạo OC

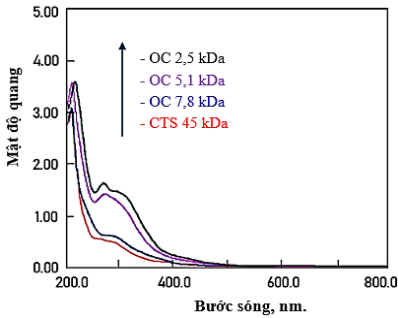


Hình 3.1: Sự phụ thuộc KLPT của CTS và $1/M_w - 1/M_{w0}$ theo liều xạ

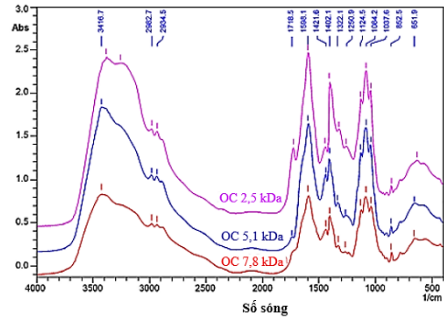
Các dung dịch CTS chiếu xạ được chuẩn bị từ mẫu CTS ~ 45 kDa. Sự giảm KLPT của CTS phụ thuộc vào liều xạ và có bổ sung hoặc không bổ sung H_2O_2 0,5% được thể hiện trên **Hình 3.1**. Kết quả **Hình 3.1a** cho thấy KLPT của 03 mẫu CTS đều giảm khi tăng liều xạ. Mức độ giảm KLPT xảy ra nhanh ở liều xạ $< 10,5$ kGy. Khi xử lý với liều xạ $> 10,5$ kGy thì mức độ giảm KLPT chitosan diễn ra chậm lại. Tại liều xạ xử lý 21 kGy, KLPT của các mẫu 4% CTS; 4% CTS + 0,5% H_2O_2 ; và 2% CTS + 0,5% H_2O_2 giảm xuống tương ứng là 7,8 kDa; 5,1 kDa; và 2,5 kDa. Kết quả trên minh chứng rằng bổ sung H_2O_2 có tác dụng làm giảm liều xạ xử lý cần thiết.

Từ phương trình biểu diễn sự phụ thuộc của $(1/M_w - 1/M_{w0})$ theo liều xạ (**Hình 3.1b**) xác định được hiệu suất cắt mạch bức xạ (Gs) là 0,4 $\mu\text{mol}/\text{J}$; 0,67 $\mu\text{mol}/\text{J}$; và 0,72 $\mu\text{mol}/\text{J}$ tương ứng với dung dịch chitosan chiếu xạ 4% CTS; 4% CTS + 0,5% H_2O_2 ; và 2% CTS + 0,5% H_2O_2 . Kết quả giá trị Gs

nhận được trong nghiên cứu này là cao hơn so với một số công bố trước đây, có thể do họ sử dụng CTS có KLPT lớn.



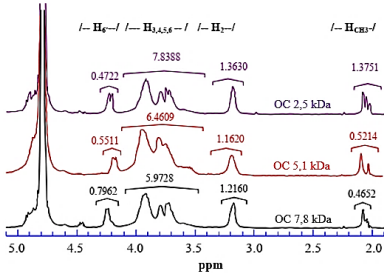
Hình 3.2: Phổ UV-Vis của CTS 45 kDa và OC có KLPT khác nhau



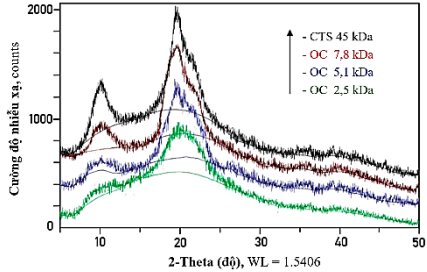
Hình 3.3: Phổ FTIR của OC có KLPT khác nhau

Phổ UV-Vis trong Hình 3.2 cho thấy dung dịch CTS 45 kDa ban đầu chỉ có 01 đỉnh hấp thụ tại ~ 206 nm do chuyển dịch điện tử trung gian trong liên kết $n \rightarrow \sigma^*$ của nhóm amido trên CTS. Phổ UV-Vis của các OC xuất hiện các đỉnh mới trong vùng 265 – 281 nm đặc trưng cho nhóm carbonyl. Đỉnh ở 240 – 265 nm do sự chuyển dịch điện tử trung gian trong liên kết $n \rightarrow \sigma^*$ của nhóm amino và cũng là hấp thụ đặc trưng cho $C=O$ của nhóm carboxyl.

Hình 3.3. là phổ FTIR của các OC có KLPT khác nhau. Chúng đều xuất hiện các đỉnh đặc trưng của CTS: vị trí số sóng ở $3200 - 3420 \text{ cm}^{-1}$ là dao động căng của liên kết O–H và N–H; $2850 - 2900 \text{ cm}^{-1}$ là dao động căng của C–H; 1598 cm^{-1} đặc trưng của $-\text{NH}_2$; 1421 cm^{-1} dao động biến dạng đối xứng của $-\text{CH}_2$ và $-\text{CH}_3$; 1322 cm^{-1} dao động của amid III (C–N) trong $-\text{NHCOCH}_3$; 1251 cm^{-1} dao động xoắn của O–H; và $1000 - 1200 \text{ cm}^{-1}$ được cho dao động căng của liên kết C–O–C. Kết quả này chứng tỏ rằng cấu trúc hóa học của OC gần như không thay đổi so với CTS ban đầu. Tuy nhiên, trên phổ FTIR của OC 2,5 kDa xuất hiện đỉnh $\sim 1718 \text{ cm}^{-1}$ với cường độ thấp, đặc trưng cho dao động $C=O$ của carbonyl hoặc carboxyl. Điều này có nghĩa là dung dịch 2% CTS + 0,5% H_2O_2 , chiếu xạ 21 kGy có thể tạo sản phẩm phụ là carbonyl hoặc carboxyl trên phân tử CTS bị cắt mạch sâu (OC 2,5 kDa).



Hình 3.4: Phổ ^1H NMR của OC có KLPT khác nhau



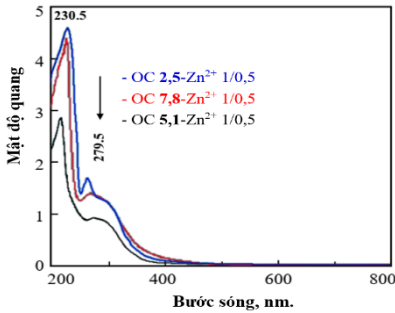
Hình 3.5: Giảm độ XRD của CTS 45 kDa và OC có KLPT khác nhau

Các tín hiệu cộng hưởng proton của OC có KLPT khác nhau được trình bày trên **Hình 3.4**. Đỉnh tại 2,02 – 2,10 ppm tương ứng với cộng hưởng của các proton thuộc nhóm acetyl trên các đơn vị N-acetyl-D-glucosamine, đỉnh trong vùng 3,30 – 4,30 ppm là đặc trưng của các proton H3, H4, H5, H6 và H6', đỉnh tại ~3,20 ppm là đặc trưng proton H2 của đơn vị D-glucosamine. Như vậy, tất cả các đỉnh cộng hưởng proton đặc trưng của CTS đều xuất hiện trong phổ ^1H NMR của các OC. Độ đề acetyl (ĐĐA) được tính toán từ phổ ^1H NMR theo công thức của [Larvetu và cộng sự](#) (2003) của OC 7,8 kDa; OC 5,1 kDa và OC 2,5 kDa tương ứng là 88,35%; 87,24% và 71,57%. Như vậy, ĐĐA có xu hướng giảm khi KLPT giảm, tuy nhiên ở mẫu OC 7,8 kDa và OC 5,1 kDa không có sự khác biệt đáng kể. Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu được công bố trước đây.

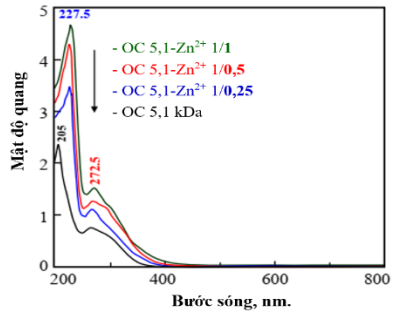
Bằng phương pháp đo phổ GPC xác định được KLPT của CTS và OC, và chỉ số PI của OC 7,8 kDa; OC 5,1 kDa và OC 2,5 kDa đạt được lần lượt là 1,78; 1,56 và 1,41, có nghĩa là KLPT OC càng nhỏ thì các chuỗi phân tử của chúng càng đồng đều hơn. Độ kết tinh của các OC được thể hiện trong phổ XRD ở **Hình 3.5** cho thấy các mẫu OC có KLPT càng nhỏ thì đỉnh đặc trưng tại $2\theta \sim 10,2^\circ$ và $\sim 20^\circ$ có cường độ giảm dần và xu hướng mở rộng. Điều này chứng tỏ CTS cắt mạch giảm KLPT có kèm theo giảm mật độ liên kết hydro dẫn đến giảm độ kết tinh và tăng cấu trúc vô định hình trong sản phẩm OC.

3.1.3. Chế tạo phức OC-Zn²⁺ và các đặc trưng tính chất của phức

Các mẫu phức OC-Zn²⁺ được chế tạo bằng phương pháp phối trộn muối Zn(NO₃)₂ vào các dung dịch OC đã được điều chỉnh pH đến 5,5.

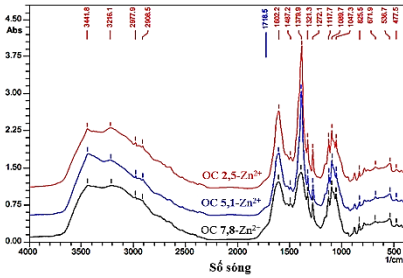


Hình 3.6: Phổ UV-Vis của phức OC có KLPT khác nhau với Zn²⁺, cùng tỷ lệ mol 1/0,5

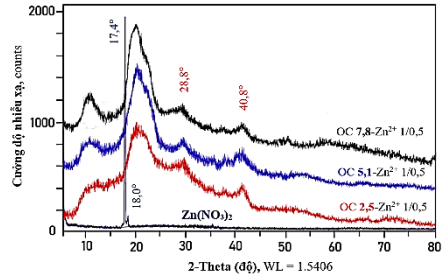


Hình 3.7: Phổ UV-Vis của phức OC 5,1 kDa với Zn²⁺ có tỷ lệ mol khác nhau

Zn(NO₃)₂ không có đỉnh hấp thụ đặc trưng trên phổ UV-Vis. Trong khi đó, kết quả phổ UV-Vis của phức OC-Zn²⁺ ở **Hình 3.6** cho thấy đỉnh hấp thụ cực đại của các OC trong khoảng 207 – 211 nm đã dịch chuyển sang bước sóng lớn hơn, cụ thể là 230,5; 227,0; và 219,5 nm tương ứng đối với các phức OC-Zn²⁺ có KLPT OC lần lượt là 2,5; 5,1 và 7,8 kDa. Cường độ hấp phụ tại các đỉnh này cao hơn so OC do sự dịch chuyển điện tử n - π*, π - π*, d-d, và orbital σ của phối tử CTS hoặc OC với orbital 3d của ion chelate (Cu²⁺, Zn²⁺). Đặc biệt, đối với phức OC_{2,5}-Zn²⁺ từ OC 2,5 kDa chỉ xuất hiện một đỉnh với cường độ cao tại 265 nm và khác biệt so với các phức khác, mà kiểu hấp phụ này được cho là đặc trưng cấu trúc của phức dạng treo có độ ổn định kém hơn so với cấu trúc phức dạng cầu nối. Khi tăng hàm lượng Zn trong phức OC_{5,1}-Zn²⁺ theo tỷ lệ mol -NH₂/Zn²⁺ thay đổi từ 1/0,25 – 1/1, kết quả phổ UV-Vis ở **Hình 3.7** cho thấy xuất hiện thêm đỉnh nhỏ tại vùng 280 – 295 nm trong các phức có tỷ lệ mol 1/0,5 và 1/1. Đỉnh này đặc trưng cho phức có cấu trúc dạng cầu nối. Như vậy, phức OC-Zn²⁺ từ OC có KLPT > 5,1 kDa và tỷ lệ mol từ 1/0,5 – 1/1 thì ưu tiên tạo phức có cấu trúc dạng cầu nối ổn định.



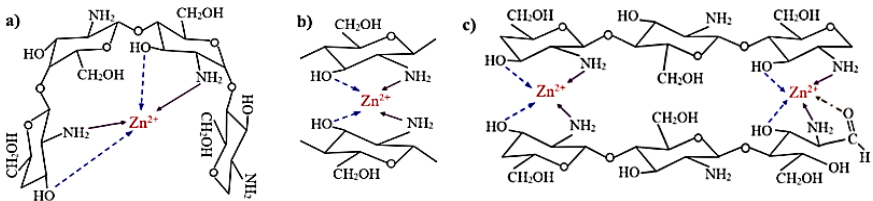
Hình 3.8: Phổ FTIR của phức OC-Zn²⁺ từ OC KLPT khác nhau, cùng tỷ lệ mol 1/0,5



Hình 3.9: Phổ XRD của muối Zn²⁺ và phức OC-Zn²⁺ từ OC KLPT khác nhau, cùng tỷ lệ mol 1/0,5

Phân tích phổ FTIR của các phức OC-Zn²⁺ với OC KLPT khác nhau cho thấy chúng có những đỉnh đặc trưng của OC, đồng thời xuất hiện một số đỉnh mới (Hình 3.8). Đỉnh mới tại số sóng 3220 cm⁻¹ là sự phân tách dao động của -OH chồng lên dao động căng -NH, đồng thời đỉnh 1598 cm⁻¹ đặc trưng của -NH₂ trên OC bị dịch sang số sóng lớn hơn ~1602 cm⁻¹ khi OC tương tác với ion Zn²⁺. Hai đỉnh mới khác ở 536 cm⁻¹ và 478 cm⁻¹, được cho là các dao động đặc trưng của liên kết N-Zn và liên kết O-Zn. Ngoài ra, đỉnh hấp phụ hồng ngoại tại ~1718 cm⁻¹ đặc trưng cho dao động của C=O trong nhóm carboxyl hoặc carbonyl trên phân tử OC hoàn toàn biến mất.

Từ những thay đổi trên chúng tỏ rằng ion Zn²⁺ tạo phức với OC thông qua liên kết phối trí với nhóm amin (-NH₂), hydroxyl (-OH), và -C=O của carboxyl (-COOH) hoặc carbonyl (-COH) trên phân tử OC (Hình 3.10). Sự liên kết phối trí của Zn²⁺ với nhóm -C=O của carboxyl hoặc carbonyl trong sản phẩm OC cắt mạch bức xạ là một phát hiện mới trong kết quả luận án.



Hình 3.10: Mô hình cấu trúc liên kết phối trí dạng cầu nối của phức OC-Zn²⁺

Hiệu suất tạo phức OC-Zn²⁺ cũng phụ thuộc vào KLPT của OC và tỷ lệ phần mol. Kết quả phân tích hàm lượng kẽm trong các mẫu phức OC-Zn²⁺ kết tủa bằng ethanol bằng phổ EDX và ICP-AES cho thấy OC_{2,5}-Zn²⁺ có hiệu suất tạo phức thấp nhất chỉ đạt 88,1%. Trong khi đó, OC_{5,1}-Zn²⁺ và OC_{7,8}-Zn²⁺ với tỷ lệ mol -NH₂/Zn²⁺ khác nhau đều đạt hiệu suất tạo phức từ 90,1% – 94,4% và xu hướng tăng theo chiều tăng lượng mol Zn²⁺. Kết quả này chứng tỏ rằng khi KLPT của OC quá nhỏ hoặc hàm lượng Zn²⁺ quá thấp thì hiệu suất tạo phức giảm và ưu tiên tạo cấu trúc phức dạng treo kém bền.

Kết quả giản đồ XRD trong [Hình 3.9](#) cho thấy Zn(NO₃)₂ xuất hiện hai đỉnh nhiễu xạ rõ nét tại góc 2θ là 17,4° và 18,0°, đặc trưng cho loại tinh thể đơn tà của muối kẽm nitrate (COD 9008175 trong cơ sở dữ liệu XRD). Phức OC-Zn²⁺ xuất hiện 2 đỉnh mới ở 2θ ~28,8° và 40,8° và cường độ tại vùng 2θ ~10,0° và 20,4° giảm so với OC tương ứng. Như vậy, sự tương tác giữa Zn²⁺ với OC trong phản ứng tạo phức đã dẫn đến hình thành pha tinh thể mới và làm giảm cường độ đỉnh 2θ ~10,0° hay giảm độ kết tinh của OC. Kết quả nhận được cũng tương tự như nhiều công trình đã được công bố trước đây.

3.2. Hiệu lực ức chế nấm *C. truncatum* của phức OC-Zn²⁺ trong *in vitro*

Hoạt lực ức chế nấm *C. truncatum* gây bệnh thán thư trên cây đậu nành của OC 5,1 kDa và của phức OC_{5,1}-Zn²⁺ với các nồng độ khác nhau là 250 ppm, 500 ppm, và 1.000 ppm và Zn(NO₃)₂·6H₂O nồng độ 390 mg/l (tương đương với lượng Zn²⁺ trong phức OC_{5,1}-Zn²⁺ tỷ lệ mol 1/0,25 sau pha loãng đạt nồng độ 1.000 mg OC/lít hay ~1.000 ppm OC) trong môi trường PDA nuôi cấy nấm được trình bày trong [Bảng 3.1](#).

Kết quả cho thấy, hoạt lực kháng nấm tăng theo nồng độ, mặt khác khi hàm lượng kẽm trong phức càng cao thì hiệu lực kháng nấm càng tăng. Hơn nữa, các giá trị AE đạt lần lượt là 11,6%; 44,1%; và 75,1% tương ứng với OC, Zn²⁺ và phức OC_{5,1}-Zn²⁺ tỷ lệ phần mol 1/0,25. Như vậy, giá trị AE của phức OC-Zn²⁺ cao hơn tổng giá trị AE của OC và Zn²⁺, chứng tỏ phức OC-Zn²⁺ thể hiện hiệu ứng đồng vận trong ức chế nấm *C. truncatum*.

Bảng 3.1: Hoạt lực ức chế nấm *C. truncatum* (AE%) theo nồng độ của OC 5,1 kDa; Zn²⁺; và phức OC5,1-Zn²⁺ với tỷ lệ phần mol khác nhau

Nghiem thức	ĐC (0 ppm)	250 ppm		500 ppm		1000 ppm	
	D, mm	D, mm	AE, %	D, mm	AE, %	D, mm	AE, %
OC 5,1	75,7 ± 2,1	75,3 ^a ± 1,5	0,4	74,7 ^a ± 1,5	1,3	67,0 ^a ± 1,7	11,5
Zn ²⁺		–	–	–	–	44,3 ^b ± 1,5	41,4
OC-Zn ²⁺ 1/0,25		61,7 ^b ± 2,1	18,5	56,7 ^b ± 1,5	25,1	18,7 ^c ± 2,5	75,3
OC-Zn ²⁺ 1/0,5		58,7 ^b ± 1,2	22,5	54,3 ^b ± 2,1	28,2	06,3 ^d ± 1,5	91,6
OC-Zn ²⁺ 1/1		52,3 ^c ± 2,5	30,4	09,3 ^c ± 2,5	87,7	<5	~100
CV%		3,05		4,02		5,49	
LSD _{0,50}		3,56		3,69		3,52	

* Các giá trị trung bình trong cùng 1 cột mang ký tự giống nhau thì không khác biệt ý nghĩa thống kê với mức xác suất tin cậy $p < 0,05$.

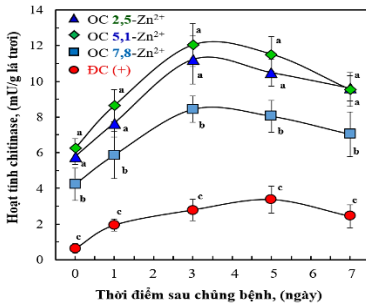
3.3. Hiệu ứng sinh học của OC-Zn²⁺ trên đậu nành trồng trong nhà kính

3.3.1. Hiệu quả kích tạo chitinase, kích thích sinh trưởng và kiểm soát bệnh trên cây đậu nành của phức OC-Zn²⁺ với OC KLPT khác nhau

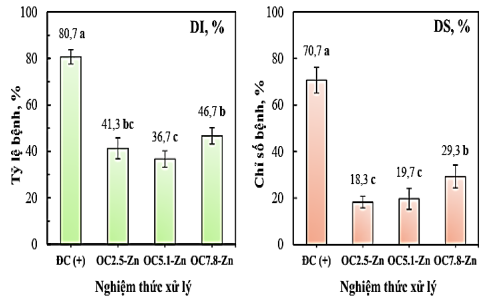
Kết quả sử dụng các phức OC-Zn²⁺ có tỷ lệ mol 1/0,5 và OC KLPT khác nhau cho thấy các chỉ tiêu sinh trưởng như tổng chlorophyll, chiều cao cây và hàm lượng chất khô đều cao hơn với đối chứng (phun nước) nhưng giữa các phức thì không khác biệt đáng kể. Ở 2 mẫu phức OC2,5-Zn²⁺ và OC5,1-Zn²⁺, các chỉ tiêu sinh trưởng tương ứng đạt được là 2,53 mg/g lá tươi; 43,8 cm; 5,77 g/cây; và 2,32 mg/g lá tươi; 42,3 cm; 5,86 g/cây. Đối với mẫu phức OC7,8-Zn²⁺ đạt được là 2,15 mg/g lá tươi; 40,8 cm; 5,42 g/cây là thấp hơn so với các phức khác, nhưng không khác biệt thống kê. Vì vậy, lựa chọn phức OC-Zn²⁺ từ OC 5,1 kDa để xử lý tăng trưởng đậu nành là thích hợp.

Hoạt tính enzyme chitinase (CA) trên lá đậu nành sau khi gây nhiễm bệnh

ở các nghiệm thức sử dụng phức OC-Zn²⁺ khác nhau đều cao hơn đáng kể so với nghiệm thức đối chứng + (phun nước – phun bệnh) như được thể hiện trong **Hình 3.11**. Phức OC5,1-Zn²⁺ và phức OC2,5-Zn²⁺ kích tạo CA đạt lần lượt là 12,04 và 11,22 mU/g lá tươi là cao hơn đáng kể so với CA của phức OC7,8-Zn²⁺ (8,43 mU/g lá tươi) và mẫu đối chứng + (2,79 mU/g lá tươi) vào ngày thứ 3 sau khi phun mầm bệnh. Kết quả chứng tỏ rằng hiệu quả kích thích tạo enzyme chitinase trên đậu nành của phức OC-Zn²⁺ có sự phụ thuộc vào KLPT của OC, KLPT càng thấp thì hiệu ứng kích tạo CA càng cao.



Hình 3.11: Hoạt tính chitinase tại các thời điểm (ngày) sau chủng bệnh trên cây đậu nành đã được xử lý phun các phức OC-Zn²⁺ với OC KLPT khác nhau, cùng tỷ lệ mol 1/0,5.



Hình 3.12: Tỷ lệ bệnh (DI%) và chỉ số bệnh (DS%) thán thư tại thời điểm 21 ngày sau chủng bệnh trên các cây đậu nành đã được xử lý phun các phức OC-Zn²⁺ với OC KLPT khác nhau, cùng tỷ lệ mol 1/0,5.

Kết quả kiểm soát bệnh thán thư thông qua khả năng làm giảm tỷ lệ bệnh và chỉ số bệnh như được trình bày trên **Hình 3.12**. Giá trị DI tương ứng là 36,7% và 41,3%, DS là 18,3% và 19,7% đối với phức OC2,5-Zn²⁺ và phức OC5,1-Zn²⁺, giá trị này thấp hơn so với phức OC7,8-Zn²⁺ (DI 46,7% và DS 29,3%). Hiệu quả cao trong phòng trừ bệnh thán thư ở đậu nành của phức OC-Zn²⁺ có thể do tác động trực tiếp gây ngộ độc diệt nấm và tác động gián tiếp kích thích cây đậu nành sinh tổng hợp enzyme chitinase gây phân hủy và chống nấm thâm nhập. Từ kết quả trên, sử dụng phức OC-Zn²⁺ để phòng

trừ thán thư trên đậu nành thì KLPT của OC ~5,1 kDa là hiệu quả.

3.3.2. Hiệu quả kích tạo enzyme chitinase, kích thích tăng trưởng và kiểm soát bệnh trên cây đậu nành của phức OC-Zn²⁺ theo nồng độ

Khi sử dụng phức OC5,1-Zn²⁺ với tỷ lệ mol 1/0,5 theo các nồng độ 25, 50 và 100 ppm cho thấy: ở nồng độ 50 và 100 ppm thì tổng chlorophyll, chiều cao cây và hàm lượng chất khô tương ứng là 2,31 và 2,41 mg/g lá tươi; 41,17 và 42,50 cm; 6,46 và 6,30 g/cây là khác biệt so với đối chứng và phun OC5,1-Zn²⁺ 25 ppm. Giữa 2 nghiệm thức sử dụng phức OC5,1-Zn²⁺ nồng độ 50 và 100 ppm không có khác biệt thống kê, vì vậy sử dụng nồng độ 50 ppm phức OC5,1-Zn²⁺ để tăng trưởng đậu nành là thích hợp.

Tương tự, hoạt tính chitinase ở nồng độ sử dụng phức OC5,1-Zn²⁺ nồng độ 50 và 100 ppm đạt các giá trị cao nhất và khác biệt thống kê so với nồng độ 25 ppm. Sau 3 ngày nhiễm bệnh trên đậu nành, hoạt tính chitinase của 2 mẫu đạt tương ứng là 13,16 và 14,33 mU/g so với 8,08 mU/g ở mẫu 25 ppm. Như vậy, lựa chọn phức OC5,1-Zn²⁺ với nồng độ 50 ppm đạt hiệu quả kích tạo chitinase cao nhất. Sử dụng OC5,1-Zn²⁺ để kiểm soát bệnh thán thư đậu đã làm giảm tỷ lệ bệnh và chỉ số bệnh. Sau 21 ngày nhiễm bệnh, tỷ lệ bệnh DI của nghiệm thức phun 50 ppm phức là 36,7%, phun 100 ppm phức là 28,3%, chỉ số bệnh DS tương ứng là 12,7% và 11,3%. Như vậy, ở nồng độ cao thì phức OC5,1-Zn²⁺ kiểm soát bệnh thán thư hại đậu nành hiệu quả hơn.

3.3.3. Hiệu quả tác động kích tạo chitinase, kích thích sinh trưởng và kiểm soát bệnh trên cây đậu nành của phức OC-Zn²⁺ so với OC và Zn²⁺

Kết quả thu được cho thấy các chỉ tiêu sinh trưởng là tổng chlorophyll, chiều cao cây, hàm lượng chất khô của nghiệm thức sử dụng phức OC5,1-Zn²⁺ đều cao hơn có ý nghĩa thống kê so với sử dụng OC hoặc Zn(NO₃)₂ với các giá trị tương ứng là 2,26 mg/g lá tươi; 42,3 cm và 5,96 g/cây.

Hoạt tính enzyme chitinase tại các thời điểm sau phun nhiễm bệnh (Bảng 3.2) ở nghiệm thức phun phức OC5,1-Zn²⁺ cũng đều cao khác biệt so với nghiệm thức khác.

Bảng 3.2: Hoạt tính chitinase (mU/g lá tươi) tại các thời điểm (ngày) sau chủng bệnh trên các cây đậu nành đã được xử lý phun các dung dịch thử nghiệm

Nghiệm thức	0 ngày	1 ngày	3 ngày	5 ngày	7 ngày
ĐC (nước)	0,65 ^d ± 0,10	0,76 ^d ± 0,08	0,74 ^c ± 0,12	0,63 ^d ± 0,11	0,67 ^d ± 0,15
ĐC (+)	0,67 ^d ± 0,09	1,94 ^c ± 0,25	2,73 ^d ± 0,36	3,18 ^c ± 0,38	2,51 ^c ± 0,29
Zn ²⁺	2,29 ^c ± 0,54	2,65 ^c ± 0,56	3,94 ^{cd} ± 0,74	3,69 ^c ± 0,51	2,31 ^c ± 0,32
OC 5,1 kDa	3,85 ^b ± 0,23	5,38 ^b ± 0,65	6,69 ^b ± 1,07	5,79 ^b ± 0,67	5,67 ^b ± 1,09
OC5,1-Zn ²⁺	6,31 ^a ± 1,54	8,79 ^a ± 1,43	11,56 ^a ± 1,12	10,59 ^a ± 0,95	9,77 ^a ± 1,03
CV%	16,74	15,14	13,98	12,43	14,07
LSD _{0,05}	0,84	1,08	1,18	1,08	1,07

* Các giá trị trên cùng 1 thời điểm có ký tự giống nhau thì không khác biệt ý nghĩa thống kê với mức xác suất tin cậy $p < 0,05$. Mẫu ĐC (+): Phun nước – phun bệnh.

Kết quả sau 3 ngày nhiễm bệnh, hoạt tính enzyme chitinase ở nghiệm thức sử dụng phức là 11,56 mU/g, cao hơn nghiệm thức sử dụng Zn²⁺ (2,65), sử dụng OC (5,38), đối chứng + (1,94) và đối chứng (0,76). Hoạt tính enzyme chitinase của nghiệm thức sử dụng phức OC5,1-Zn²⁺ cao hơn tổng hoạt tính của 2 nghiệm thức sử dụng OC và Zn²⁺ riêng rẽ, chứng tỏ phức OC5,1-Zn²⁺ thể hiện hiệu ứng kích tạo chitinase theo kiểu đồng vận (synergistic effect). Tương tự các nghiên cứu ở phần trước, tỷ lệ bệnh và chỉ số bệnh của nghiệm thức sử dụng phức OC5,1-Zn²⁺ sau 21 ngày gây nhiễm bệnh đều thấp hơn đáng kể so với sử dụng Zn²⁺ và OC với giá trị tương ứng là 38,67% và 17,67% (so với nghiệm thức sử dụng Zn²⁺ là 88,67% và 74,33% và nghiệm thức sử dụng OC5,1 là 63,67% và 47,67%).

3.4. Hiệu quả phòng trừ bệnh và hiệu lực nông học của phức OC-Zn²⁺ đối với cây đậu nành trên ruộng thí nghiệm

Trên cơ sở kết quả phân tích các đặc trưng tính chất hóa lý của OC 5,1 kDa; kết quả hoạt tính sinh học của phức OC5,1-Zn²⁺ (tỷ lệ mol 1/0,5) và nồng độ sử dụng phun phức OC5,1-Zn²⁺ (50 ppm) trên cây đậu nành trồng

trong nhà kính. Trong nội dung này, thực hiện đánh giá hiệu quả phòng trừ bệnh và hiệu lực nông học của OC5,1 và OC5,1-Zn²⁺ trên cây đậu nành được xử lý phun 3 lần trong thời kỳ sinh trưởng, kết quả về hoạt tính chitinase, chỉ số sâu cuốn lá và bệnh hại so với đối chứng được trình bày trong **Bảng 3.3**.

Bảng 3.3: Hoạt tính chitinase, chỉ số sâu, bệnh hại trên cây đậu nành khảo nghiệm tại thời điểm 38 ngày sau gieo.

Nghiệm thức	Hoạt tính chitinase, (mU/g lá tươi)	Sâu cuốn lá, (%)	Bệnh hại, (cấp)	
			Đốm nâu	Sương mai
1. Phun nước (ĐC)	0,88 ^c ± 0,18	9,43	2,67 ^a	1,63
2. Phun OC	4,15 ^b ± 0,57	8,53	2,61 ^a	1,40
3. Phun OC-Zn ²⁺	7,93 ^a ± 0,63	7,67	1,17 ^b	1,10
<i>CV%</i>	13,45	14,22	11,58	10,07
<i>LSD_{0,05}</i>	1,32	NS	0,68	NS

*Các số trung bình trong cùng một cột mang ký tự giống nhau thì không khác biệt ý nghĩa thống kê; và NS: Không có sự khác biệt ý nghĩa với mức xác suất $p < 0,05$.

Hoạt tính enzyme chitinase trong lá đậu nành cao nhất ở nghiệm thức sử dụng phức OC5,1-Zn²⁺ đạt 7,93 mU/g lá tươi, tiếp đến là nghiệm thức sử dụng OC 5,1 kDa đạt 4,15 mU/g, nghiệm thức đối chứng là 0,88 mU/g. Trong quá trình sinh trưởng, đậu nành bị nhiễm sâu cuốn lá với mức 7,67 – 9,43%.

Kết quả điều tra cho thấy có xuất hiện các loại bệnh hại như đốm nâu và sương mai, tỷ lệ nhiễm cao nhất ở nghiệm thức đối chứng với cấp bệnh là 2,67 và 1,63 (theo thang bệnh 9 cấp). Ở các nghiệm thức sử dụng OC 5,1 kDa và phức OC5,1-Zn²⁺ thì cấp bệnh giảm, tương ứng với bệnh đốm nâu và sương mai là 2,61 và 1,40; 1,17 và 1,10. Chứng tỏ rằng, do khả năng ức chế trực tiếp nấm bệnh và kích thích cây đậu nành tạo enzyme chitinase kháng bệnh của phức OC5,1-Zn²⁺ đã làm tăng khả năng phòng trừ bệnh đốm nâu và sương mai trong cùng điều kiện canh tác. Các chỉ tiêu tăng trưởng như chiều cao cây, trọng lượng khô, trọng lượng hạt của đậu nành khi sử dụng

OC 5,1 kDa và phức OC5,1-Zn²⁺ là cao hơn so với đối chứng, đặc biệt trọng lượng 1.000 hạt khi sử dụng OC5,1-Zn²⁺ đạt cao nhất là 154,8 g. Năng suất thực thu khi sử dụng OC5,1-Zn²⁺ trên đậu nành đạt 2,61 tấn/ha, cao hơn có ý nghĩa thống kê so với sử dụng OC5,1 (2,45 tấn/ha) và đối chứng (2,19 tấn/ha). Sử dụng phức OC5,1-Zn²⁺ trên đậu nành đã làm tăng năng suất so với đối chứng 19,2%. Do vậy chế phẩm phức OC5,1-Zn²⁺ rất có tiềm năng sử dụng làm chất phòng trừ bệnh hiệu quả trong canh tác đậu nành.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Kết luận

Dựa trên kết quả nghiên cứu, một số kết luận chính được rút ra như sau:

1. Đã xác định điều kiện thích hợp (nồng độ chitosan, nồng độ H₂O₂, liều xạ) để cắt mạch chitosan tạo OC có KLPT 2,5 – 7,8 kDa.
2. Đã chế tạo thành công phức OC-Zn²⁺ với tỷ lệ mol –NH₂/Zn²⁺ và OC có KLPT khác nhau. Phức OC-Zn²⁺ chế tạo từ OC 5,1 kDa và tỷ lệ mol 1/0,5 có cấu trúc phức theo kiểu cầu nối ổn định, đạt hơn 92% lượng Zn²⁺ liên kết phối trí với OC.
3. Phức OC-Zn²⁺ có hiệu lực ức chế hiệu quả đối với nấm *C. truncatum* đạt từ 75,1 – 100% phụ thuộc nồng độ và tỷ lệ mol –NH₂/Zn²⁺ trong thí nghiệm *in vitro*.
4. Phức OC-Zn²⁺ thể hiện hiệu ứng kích tạo enzyme chitinase theo kiểu đồng vận và đồng thời gia tăng các chỉ tiêu sinh trưởng của đậu nành trong thí nghiệm nhà kính. Phức OC-Zn²⁺ chế tạo từ OC 5,1 kDa, tỷ lệ mol 1/0,5, với nồng độ xử lý phun lá 50 ppm đạt hiệu quả cao nhất trong số các nghiệm thức khảo sát.
5. Kết quả thí nghiệm đồng ruộng phun 03 lần qua lá dung dịch 50 ppm phức OC5,1-Zn²⁺ trong giai đoạn cây sinh trưởng đã làm tăng hoạt tính chitinase, giảm chỉ số bệnh, đảm bảo các chỉ tiêu tăng trưởng và tăng năng suất đậu nành ~19% (2,61 tấn/ha) so với đối chứng (2,19 tấn/ha).

Phức lai hữu cơ-vô cơ OC-Zn²⁺ phòng trừ bệnh hiệu quả và tăng năng suất đậu nành nên có tiềm năng ứng dụng trong sản xuất nông sản an toàn.

Kiến nghị

Để có thể phát triển ứng dụng thực tiễn phức OC-Zn²⁺ kiểm soát bệnh hại trên đậu nành, một số nội dung cần tiếp tục nghiên cứu được kiến nghị sau:

1. Nghiên cứu đánh giá hiệu quả kích kháng và kiểm soát một số loại bệnh khác trên cây đậu nành của phức OC-Zn²⁺.
2. Phối hợp với các đơn vị có tiềm lực tổ chức sản xuất, triển khai khảo nghiệm diện rộng, hợp chuẩn hợp quy, thực hiện thủ tục cấp phép lưu hành, và thương mại hóa sản phẩm góp phần phát triển sản xuất nông nghiệp an toàn, bền vững.

NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

1. Đã chế tạo thành công phức OC-Zn²⁺ với tỷ lệ phần mol ($-NH_2/Zn^{2+}$) và OC KLPT khác nhau và đã xác định một số đặc trưng tính chất của. Phức OC-Zn²⁺ từ OC 5,1 kDa, tỷ lệ phần mol 1/0,5 có cấu trúc phức chủ yếu là dạng cầu nối ổn định đạt hơn 92% lượng Zn²⁺ liên kết phối trí với OC.
2. Đã đánh giá phức OC-Zn²⁺ có hiệu quả phòng trừ nấm *C. truncatum* gây bệnh thán thư, cải thiện chỉ tiêu sinh trưởng và gia tăng năng suất đối với cây đậu nành. Đã chứng minh được hiệu quả phòng trừ nấm bệnh của phức phụ thuộc vào KLPT OC và nồng độ OC-Zn²⁺ sử dụng.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. Dang Van Phu, Bui Duy Du, Le Nghiem Anh Tuan, Nguyen Quoc Hien*, *The study on antioxidant activity and enhancement of soybean seed yield of oligochitosan produced by gamma Co-60 irradiation*, Tạp chí Công nghệ Sinh học (ISSN: 1811-4989), **2017**, 15(3A), 179-184.
2. Dang Van Phu, Bui Duy Du, Le Nghiem Anh Tuan, Hoang Van Tam, Nguyen Quoc Hien*, *Preparation and foliar application of oligochitosan*

- *nanosilica on the enhancement of soybean seed yield*, International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology, **2017**, 2(1), 421-428. DOI: 10.22161/ijeab/2.1.53.
3. Dang Van Phu, Bui Duy Du*, Le Nghiem Anh Tuan, Le Thanh Hung, Nguyen Quoc Hien, *Preparation of radiolysis-degraded oligochitosan, oligochitosan-Zn²⁺ complex and their induced effect against anthracnose on soybean plants*, Vietnam Journal of Chemistry (ISSN: 2525-2321), **2019**, 57(3), 363-367. DOI: 10.1002/vjch.201900045.
 4. Dang Van Phu, Bui Duy Du*, Le Nghiem Anh Tuan, Le Thanh Hung, Hoang Dac Hiet, Nguyen Quoc Hien*, *Preparation and antifungal activity investigation of oligochitosan-Zn²⁺ on Colletotrichum truncatum*, International Journal of Polymer Science (ISSN: 1687-9422), **2019**, Article ID 8357381, 6 pages. DOI: 10.1155/2019/8357381. WoS (SCIE), IF: 2,792, Q2, H index: 50.
 5. Phu Van Dang, Ha Thi Tran, Duy Ngoc Nguyen, Quoc Anh Le, Du Duy Bui, Hien Quoc Nguyen, Cong-Sac Tran, Ha Manh Bui, *Study on the chitinase-induced efficiency against anthracnose on soybean plant by oligochitosan-Zn²⁺ complexes*, Case Studies in Chemical and Environmental Engineering (Online ISSN: 2666-0164), **2023**, 7, Article ID 100285, 6 pages. DOI: 10.1016/j.cscee.2022.100285. Scopus, SJR: 1,26, Q1, H index: 22.
 6. Dang Van Phu*, Nguyen Ngoc Duy, Le Anh Quoc, Bui Duy Du, Nguyen Quoc Hien, *Characterizations of oligochitosan-degraded irradiation and chitinase-induced efficiency by oligochitosan-Zn²⁺ complexes on soybean plant*, Proceedings of Vietnam Conference on Nuclear Science and Technology (ISBN: 978-604-67-2718-7), VINANST-15, Nha Trang City, Khanh Hoa, Vietnam, **2023**, 404-410, Nxb Khoa học và Kỹ thuật.