

HOẠT TÍNH KHÁNG NẤM CỦA DẦU XOAN CHỊU HẠN VÀ SẢN PHẨM CHIẾT XUẤT TỪ XOAN CHỊU HẠN (*Azadirachta indica* A.Juss) LÊN NẤM GÂY BỆNH CÂY (*Fusarium oxysporum*)

Vũ Đăng Khánh, Vũ Văn Độ, Nguyễn Tiến Thắng

Viện Sinh học Nhiệt đới, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

(Bài nhận ngày 23 tháng 7 năm 2004, hoàn chỉnh sửa chữa ngày 26 tháng 10 năm 2004)

TÓM TẮT: Dầu xoan chịu hạn Ấn Độ, dầu xoan chịu hạn chiết xuất trong petroleum ether, cao chiết nhân hạt xoan chịu hạn trong ethanol và methanol được dùng làm nguyên liệu thử nghiệm hoạt tính kháng nấm gây bệnh cây *Fusarium oxysporum* theo dãy nồng độ 250 – 4000 ppm. Tất cả các nghiệm thức đều thể hiện hoạt tính kháng nấm với tác dụng ức chế khác nhau tùy theo nguyên liệu thử nghiệm và nồng độ xử lý. Tác dụng ức chế cao nhất ở nồng độ 4000 ppm. Cao chiết nhân hạt xoan chịu hạn trong ethanol có tác dụng ức chế nấm *Fusarium oxysporum* tốt nhất, thể hiện qua giá trị IC_{50} . Azadirachtin - một hoạt chất chính từ xoan chịu hạn cũng được chiết tách, tinh sạch và thử nghiệm hoạt tính kháng nấm *Fusarium oxysporum* ở nồng độ 4000 ppm. Azadirachtin tinh sạch đã thể hiện hoạt tính kháng nấm rất thấp. Điều đó có thể cho thấy rằng tác dụng kháng nấm của sản phẩm chiết xuất từ xoan chịu hạn là tác dụng cộng gộp của nhiều hợp chất khác ngoài azadirachtin.

I. GIỚI THIỆU

Bệnh héo vàng ở khoai tây do nấm *Fusarium oxysporum* là một trong những bệnh nguy hiểm gây thiệt hại lớn ở các nước trồng khoai tây như Trung Quốc, Mỹ, Anh, v.v. Ở nước ta, bệnh héo vàng phổ biến ở khắp các vùng trồng khoai tây. Tỷ lệ bệnh trung bình từ 1 – 3%, có nơi nấm gây thiệt hại tới 40% năng suất khoai tây [12].

Để phòng trừ bệnh cây nói chung và phòng trừ nấm *Fusarium oxysporum* nói riêng, người nông dân thường áp dụng nhiều biện pháp trong đó có biện pháp sử dụng thuốc hoá học, và biện pháp này đã mang lại hiệu quả đáng kể. Tuy nhiên, dư lượng thuốc bảo vệ thực vật hoá học là nguyên nhân làm mất cân bằng sinh thái và gây ô nhiễm môi trường [1-2].

Cây xoan chịu hạn (*Azadirachta indica* A.Juss), tên tiếng Anh là “Neem” có nguồn gốc từ Ấn Độ, được du nhập vào nước ta cách nay gần 30 năm và hiện đang được trồng trên diện tích khá lớn tại các tỉnh Ninh Thuận, Bình Thuận [3]. Theo Amadioha, Coventry, Govindachari, v.v thì các sản phẩm chiết xuất từ xoan chịu hạn cũng có tác dụng ức chế sinh trưởng một số loài nấm gây bệnh cây [1-7; 10].

Theo Coventry, hàm lượng hoạt chất và hoạt tính của sản phẩm chiết xuất từ xoan chịu hạn trên các đối tượng thử nghiệm như côn trùng, nấm, vi khuẩn, v.v chịu ảnh hưởng nhiều bởi các điều kiện sinh thái, môi trường sống của xoan chịu hạn [3]. Ở Việt Nam, chưa có những nghiên cứu tương tự, do vậy chúng tôi tiến hành khảo sát hoạt tính kháng nấm gây bệnh cây *Fusarium oxysporum* của dầu xoan chịu hạn Ấn Độ và sản phẩm chiết xuất thô từ xoan chịu hạn trồng tại Việt Nam, so sánh với thuốc diệt nấm hoá học Topsin-M và khảo sát hoạt tính kháng nấm *Fusarium oxysporum* của azadirachtin tinh sạch.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Đối tượng thử nghiệm

Nấm *Fusarium oxysporum* gây bệnh héo vàng ở khoai tây do Phòng Vi Sinh, Viện Sinh học Nhiệt đới cung cấp và được giữ giống trên môi trường PGA (Potato – glucose – agar), pH = 6.5 [11].

2. Sản phẩm thử nghiệm hoạt tính kháng nấm

Dầu xoan chịu hạn Ấn Độ do Viện Nghiên cứu Thực vật Quốc gia Ấn Độ (NBRI) cung cấp. Các

sản phẩm chiết xuất từ nhân hạt xoan chịu hạn trong ethanol, trong methanol và trong petrolium ether (dầu phòng thí nghiệm); sản phẩm azadirachtin được chiết xuất và tinh sạch bằng sắc ký cột trên nền silicagel. Các sản phẩm này nhận được tại Viện Sinh học Nhiệt đới. Thuốc diệt nấm hóa học Topsin-M, một loại thuốc diệt nấm hóa học có phổ tác dụng rộng, được dùng làm đối chứng dương.



Hình 1a. Cây xoan chịu hạn giống số 6 tại Ninh Thuận



Hình 1b. Hạt và nhân hạt xoan chịu hạn



Hình 1c. Cây xoan chịu hạn nuôi cấy mô

3. Phương pháp thử hoạt tính

- a. **Chuẩn bị giống gốc:** Nấm *Fusarium oxysporum* được nuôi cấy trên các đĩa petri chứa môi trường thạch PGA.
- b. **Chuẩn bị môi trường và dịch chiết thử nghiệm:** Hòa tan dầu xoan chịu hạn và các sản phẩm chiết xuất thô từ xoan chịu hạn, thuốc diệt nấm hoá học Topsin-M trong nước cất vô trùng, lọc dung dịch qua milipore có kích thước lỗ 0,45 µm và bổ sung vào môi trường nuôi cấy chưa đông (đã hấp khử trùng, để nguội đến nhiệt độ 45oC) để đạt các nồng độ mong muốn là 0 ppm (đối chứng); 250 ppm; 500 ppm; 1000 ppm; 2000 ppm; 4000 ppm. Rót từng 15 ml môi trường vào các đĩa petri vô trùng và để đông.
- c. **Phương pháp thử nghiệm hoạt tính:** Dùng nút khoan đục lỗ đường kính 5 mm, giữa các đám tơ nấm *Fusarium oxysporum* sinh trưởng trên môi trường PGA trong các đĩa petri vô trùng (giống gốc), đem cấy vào giữa đĩa môi trường chứa các sản phẩm thử nghiệm như mô tả trên. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần [1-3].
- d. **Chỉ tiêu theo dõi:** Đo đường kính sinh trưởng tơ nấm theo dạng tỏa tròn (mm) ở thời điểm tơ nấm ở lô đối chứng lan tỏa hết đĩa thạch.
- e. **Xử lý số liệu:** Các số liệu sẽ được xử lý ANOVA và trắc nghiệm LSD để phân hạng các nghiệm thức bằng phần mềm Statgraphics 7.0 [8].

4. Tính toán

- a. **Tính % ức chế sinh trưởng:** Từ dữ liệu đường kính tơ nấm trung bình (mm) ± sai số chuẩn (SE), tính % ức chế sinh trưởng tơ nấm so với đối chứng theo công thức:

$$\% \text{ Ức chế sinh trưởng} = \frac{DK1 - DK2}{DK1} \times 100$$

Trong đó:

DK1: Đường kính tơ nấm trung bình ở lô đối chứng

DK2: Đường kính tơ nấm trung bình ở lô thí nghiệm.

b. Tính giá trị IC_{50} : Từ % ức chế sinh trưởng nấm, áp dụng giải tích Probit để tính nồng độ cần thiết của sản phẩm thử nghiệm để ức chế 50% đường kính sinh trưởng của nấm [8].

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Hoạt tính ức chế sinh trưởng nấm *Fusarium oxysporum* của dầu xoan chịu hạn Ấn Độ và sản phẩm chiết xuất từ xoan chịu hạn

Kết quả thử nghiệm hoạt tính ức chế sinh trưởng của từng loại sản phẩm theo dãy nồng độ xử lý được trình bày ở bảng 1 và hình 2.

Dầu xoan chịu hạn trồng tại Việt Nam chiết xuất trong phòng thí nghiệm (Dầu PTN): ngay ở nồng độ 250 ppm đã có tác dụng ức chế (8,7%); tuy nhiên, tác dụng ức chế không cao ở nồng độ 4000 ppm (15,1%).

Dầu Ấn Độ (Dầu AD): tác dụng ức chế tương tự sản phẩm Dầu PTN; tác dụng cao nhất là 28,3% ở nồng độ 4000 ppm.

Sản phẩm chiết xuất trong ethanol (NE): có tác dụng ức chế ở nồng độ 250 ppm (11%, tác dụng ức chế tăng dần theo nồng độ xử lý, tác dụng cao nhất và lớn hơn 50% ở nồng độ 4000 ppm (53,3%).

Sản phẩm chiết xuất trong methanol (NM): có tác dụng ức chế ở nồng độ 250 ppm (24,2%), tác dụng ức chế tăng dần theo nồng độ xử lý, tác dụng ức chế cao nhất ở nồng độ 4000 ppm (46,2%)

Thuốc diệt nấm hóa học Topsin-M đã ức chế hoàn toàn sự sinh trưởng của nấm *Fusarium oxysporum* ngay từ ở nồng độ 250 ppm.

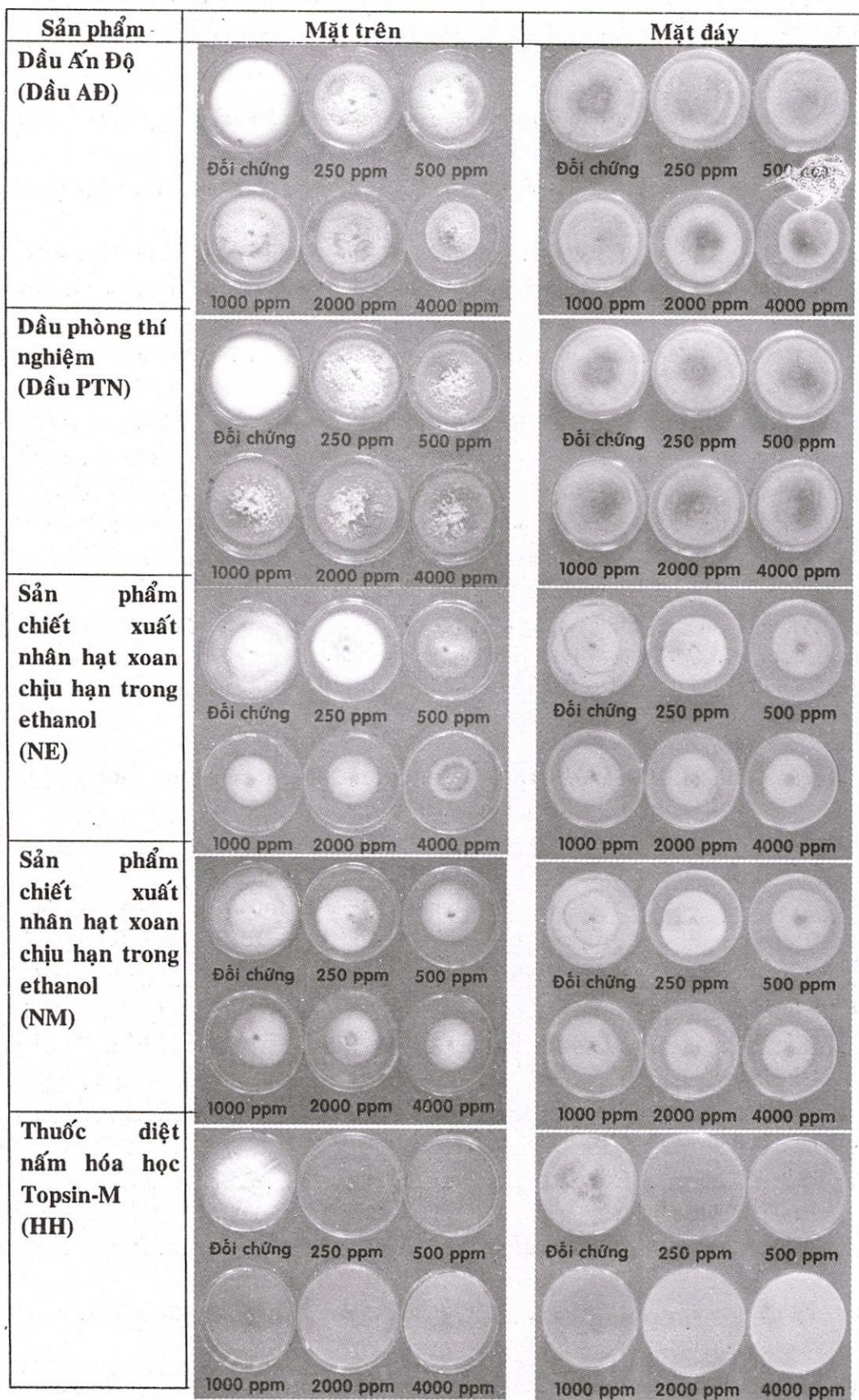
Những kết quả ghi nhận được ở từng nồng độ xử lý có thể thấy sản phẩm NE và NM có tác dụng ức chế sinh trưởng nấm *Fusarium oxysporum* cao hơn so với hai sản phẩm dầu, tác dụng ức chế cao nhất ở nồng độ 4000 ppm tương ứng là 53,3% và 46,2%. Tuy nhiên, tác dụng ức chế của các sản phẩm này thấp hơn so với thuốc hóa học Topsin-M.

Bảng 1. Đường kính tơ nấm [ĐKTN] (mm) và tác dụng ức chế sinh trưởng (%) nấm *Fusarium oxysporum*

Loại sản phẩm		Nồng độ xử lý [ppm]					
		ĐC	250	500	1000	2000	4000
Dầu AD	ĐKTN (mm)	86,3±0,4	79,0±0,8	76,0±0,8	68,8±0,2	67,8±0,7	58,0±1,2
	% ức chế *	0 e	8,5 d	12 c	20,3 b	21,4 b	28,3 a
Dầu PTN	ĐKTN (mm)	86,3±0,4	78,8±0,4	76,2±0,7	74,7±0,7	74,0±0,3	73,2±0,4
	% ức chế *	0 d	8,7 c	11,7 b	13,4 ab	14,3 a	15,2 a
NE	ĐKTN (mm)	86,8±0,2	77,3±0,9	73,8±0,2	62,3±0,6	54,5±0,9	40,5±0,8
	% ức chế *	0 f	11 e	15 d	28,2 c	37,2 b	53,3 a
NM	ĐKTN (mm)	86,8±0,2	65,8±1,0	62,2±0,6	56,3±0,7	52,7±0,6	46,7±0,6
	% ức chế *	0 f	24,2 e	28,3 d	35,1 c	39,3 b	46,2 a
HH	ĐKTN (mm)	86,7±0,2	0	0	0	0	0
	% ức chế *	0 b	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a

* Các ký tự khác nhau theo sau các giá trị trong cùng một hàng thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nghiệm thức ở $P \leq 0,05$.

Dựa trên kết quả % ức chế ở bảng 1, xây dựng mô hình toán học theo giải tích Probit để lập phương trình hồi quy tuyến tính giữa giá trị log của nồng độ xử lý (X) và giá trị Probit của % ức chế (Y) đối với từng loại sản phẩm thử nghiệm, phương trình này có dạng $Y = a + bX$. Từ phương trình tuyến tính đó, tính được nồng độ sản phẩm thử nghiệm cần để ức chế 50% sự sinh trưởng của nấm, tức giá trị IC_{50} (bảng 2).



Hình 2. Tác động của các sản phẩm thử nghiệm lên sự sinh trưởng nấm *Fusarium oxysporum*

Bảng 2. Giá trị [IC₅₀] của các sản phẩm thử nghiệm đối với nấm *Fusarium oxysporum*

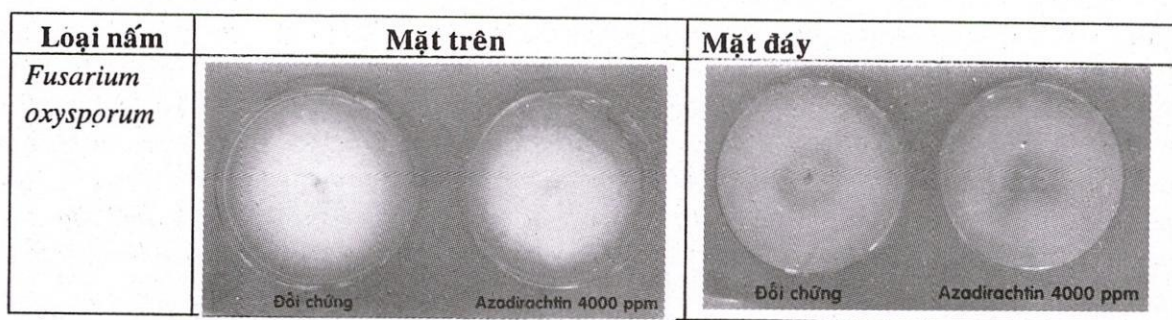
Stt	Loại sản phẩm*	Mô hình toán học (Y = a + bX)	Hệ số tương quan (R)	IC ₅₀ (50% Inhibition Concentration [ppm])
1	Dầu AD	Y = 2,08 + 0,66 X	0,9782	26546
2	Dầu PTN	Y = 3,09 + 0,26 X	0,9427	26485001
3	NE	Y = 1,07 + 1,11 X	0,9932	3467
4	NM	Y = 3,09 + 3,05 X	0,9972	6607

Theo bảng 2, giá trị IC₅₀ [ppm] của các sản phẩm: Dầu PTN (26485001) và Dầu AD (26546) rất lớn, điều đó cho thấy các sản phẩm này về cơ bản là không có tác dụng ức chế sự sinh trưởng nấm *Fusarium oxysporum*. Sản phẩm chiết xuất trong ethanol (NE) và methanol (NM) có giá trị IC₅₀ tương ứng là 6607 ppm và 3467 ppm, cho thấy các sản phẩm NE, NM có tác dụng ức chế nấm *Fusarium oxysporum* tốt hơn so với các sản phẩm dầu Ấn Độ và dầu PTN.

Kết quả nhận được phù hợp với nghiên cứu của Locke, Coventry, Dennis Dearth, Govindachari. Các tác giả này cho rằng đối với hoạt tính kháng nấm gây bệnh cây, các sản phẩm chiết xuất từ xoan chịu hạn cần sử dụng ở nồng độ khá cao thì tác dụng ức chế mới rõ rệt [3, 5]. Ngoài ra, từng hoạt chất riêng lẻ trong xoan chịu hạn thể hiện hoạt tính rất thấp đối với nấm gây bệnh cây. Để khẳng định kết luận trên, chúng tôi tiến hành khảo sát hoạt tính ức chế sinh trưởng nấm *Fusarium oxysporum* của azadirachtin chiết xuất và tinh sạch từ xoan chịu hạn trồng tại Việt Nam.

2. Hoạt tính ức chế sinh trưởng nấm gây bệnh cây của azadirachtin ở nồng độ 4000 ppm

Azadirachtin là hợp chất được biết đến nhiều nhất trong số các hợp triterpenoid của xoan chịu hạn và được cho là có vai trò quan trọng nhất trong việc xua đuổi, gây ngán ăn đối với nhiều loài côn trùng gây hại [4]. Đã tiến hành chiết tách, tinh sạch riêng azadirachtin và khảo sát hoạt tính ức chế sinh trưởng đối với nấm *Fusarium oxysporum* của azadirachtin đã tinh sạch ở nồng độ 4000 ppm, nồng độ cao nhất ở thí nghiệm 1. Kết quả trình bày ở hình 3 và bảng 3.



Hình 3. Tác động của azadirachtin tinh sạch lên sự sinh trưởng nấm *Fusarium oxysporum*

Bảng 3. Tác dụng ức chế sinh trưởng (%) nấm *Fusarium oxysporum* của azadirachtin đã tinh sạch

Sản phẩm	<i>Fusarium oxysporum</i>		
	ĐC	4000 ppm	
Azadirachtin	ĐKTN (mm)	86,7±0,2	83,2±0,4
	% ức chế *	0 b	4,0 a

* Các ký tự khác nhau theo sau các giá trị trong cùng một hàng (theo từng loại nấm) thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nghiệm thức ở P ≤ 0,05.

Bảng 3 và hình 3 cho thấy: Azadirachtin đã tinh sạch ở nồng độ 4000 ppm có tác động ức chế không đáng kể sự sinh trưởng của nấm *Fusarium oxysporum* (4,0%). Kết quả nghiên cứu này cho phép rút ra kết luận có ý nghĩa thực tiễn là: nếu chỉ sử dụng riêng azadirachtin hoặc hoạt chất nào khác chiết xuất từ xoan chịu hạn trong công tác bảo vệ thực vật thì sẽ không có ý nghĩa, cần có sự phối chế kết hợp tác động của chúng với nhau và với các hoạt chất có tính kháng nấm từ vi sinh vật hoặc thực vật khác.

IV. KẾT LUẬN

1. Dầu xoan chịu hạn do Ấn Độ sản xuất, dầu xoan chịu hạn nhận được ở Việt Nam và sản phẩm chiết xuất nhân hạt xoan chịu hạn trong ethanol, trong methanol thể hiện tác dụng ức chế sinh trưởng nấm gây bệnh cây *Fusarium oxysporum* không rõ rệt ở nồng độ xử lý thấp. Ở nồng độ xử lý 4000 ppm tác động trên mới rõ rệt, trong đó sản phẩm chiết trong ethanol có tác động ức chế mạnh nhất.
2. Hoạt chất chính của xoan chịu hạn là azadirachtin tinh sạch ngay ở nồng độ 4000 ppm cũng không thể hiện tác động ức chế đáng kể sự sinh trưởng của nấm *Fusarium oxysporum* (4,0%). Kết quả nhận được sẽ là cơ sở để phối chế các hoạt chất từ xoan chịu hạn với các chất từ vi sinh vật hoặc từ nguồn thực vật khác nhằm sản xuất thuốc kháng nấm gây bệnh cây *Fusarium oxysporum*.

ANTIFUNGAL ACTIVITY OF NEEM OIL, CRUDE EXTRACTS AND PURIFIED AZADIRACHTIN OF NEEM (*Azadirachta indica* A.Juss) SEED KERNELS ON PHYTOPATHOGENIC FUNGUS *Fusarium oxysporum*

Vu Dang Khanh, Vu Van Do, Nguyen Tien Thang

Institute of Tropical Biology, VietNameese Academy of Science and Technology

ABSTRACT: Indian neem oil, petroleum ether extract (laboratory neem oil), ethanol and methanol extracts of neem seed kernels at 250 ppm – 4000 ppm concentrations were investigated as antifungal agents on the phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. All treatments exhibit the antifungal activity on phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum* with different activities depending on the type of treatment materials and concentrations. The highest antifungal activity is at 4000 ppm concentration. The IC_{50} values showed that the ethanol extract has the highest antifungal activity on the growth of the fungus *Fusarium oxysporum*. Besides, the purified azadirachtin at 4000 ppm was also used for investigating the antifungal activity on fungus *Fusarium oxysporum* and purified azadirachtin exhibited a very little inhibition on the radial growth of this fungus. It probably showed that the antifungal activity of neem seed kernel extracts are the synergistic effect of many compounds other than azadirachtin.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Amadioha, A.C. (2000). Controlling rice blast *in vitro* and *in vivo* with extracts of *Azadirachta indica*. *Crop protection* 19, 287-290.
- [2]. Amadioha, A.C. (2002). Fungitoxic effects of extracts of *Azadirachta indica* against *Cochliobolus miyabeanus* causing brown spot disease of rice. *Arch. Phytopath. Pflanz.*, Vol.35, pp 37-42.
- [3]. Coventry, E. and Allan, E.J. (2001). Microbiological and chemical analysis of neem (*Azadirachta indica*) extracts: New data on antimicrobial activity. *Phytoparasitica* 29:5.
- [4]. Dennis Dearth, IR. (1992). *Neem – A tree for solving global problems*. National Academy Press, Washington D.C.

- [5]. Govindachari, T.R., Suresh, G., Gopalakrishnan Geetha, Banumathy, B. and Masilaman, S. (1998). Identification of antifungal compounds from seed oil of *Azadirachta indica*. *Phytoparasitica* 26:2.
- [6]. Hein, D.F., Hummel, H.E. and Weidenburner, M. (2000). Neem activity against microorganisms: azadirachtin A in bacterial and fungal agar diffusion tests. In: Practice Oriented Results on Use and Productions of Neem Ingredients and Pheromones VIII. Copyright 2000 by Druck & Graphic, Giessen, Germany.
- [7]. Narasimhan *et al.* (1998). Efficacy of neem EC formulation of neem oil and pongam oil for the management of sheath rot disease of rice. *Phytoparasitica* 26(4):301:306.
- [8]. Nguyễn Ngọc Kiểng (2000). Thống kê học ứng dụng-Các kiểu mẫu thí nghiệm. *Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh*.
- [9]. Nguyễn Tiến Thắng và những người khác (2003). Nghiên cứu và sử dụng cây xoan chịu hạn (*Azadirachta indica* A.Juss) trồng tại Việt Nam. *Báo cáo nghiệm thu đề tài cấp nhà nước theo Nghị định thư*.
- [10]. Rajappan *et al.* (2001). Management of grain discoloration of rice with solvent – free EC formulation of neem and pongam oils. *Phytoparasitica* 29:2.
- [11]. Trần Linh Thước và những người khác (2001). Thực tập Vi Sinh Năm IV. *Tủ sách Trường Đại học Khoa học Tự nhiên Tp.HCM*.
- [12]. Vũ Triệu Mân, Lê Lương Tề (1998). Giáo trình bệnh cây nông nghiệp. *Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội*.