

HIỆU QUẢ ỨC CHẾ *Fusarium oxysporum* CỦA CAO CHIẾT LÁ ĐIỀU (*Anacardium occidentale* L.) GIÀU POLYPHENOL

Nguyễn Thị Bé Thu¹, Vũ Thị Mỹ Tâm¹, Lê Nguyễn Thanh Đông²,
Nguyễn Dương Hoàng Vinh², Trịnh Thị Phi Ly^{1,2*}

¹Khoa Khoa học Sinh học, Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh

²Viện Nghiên cứu Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Fusarium oxysporum là mầm bệnh phổ biến gây thiệt hại nghiêm trọng trên nhiều đối tượng cây trồng khác nhau. Sử dụng chiết xuất thực vật giàu các hợp chất sinh học để kiểm soát bệnh do *Fusarium oxysporum* gây ra là một giải pháp an toàn và hiệu quả đang được quan tâm phát triển hiện nay. Nghiên cứu này đánh giá hiệu quả ức chế nấm *Fusarium oxysporum* của các loại cao chiết lá Điều trong điều kiện *in vitro*. Đồng thời hàm lượng phenolic tổng số và acid gallic được phân tích để làm rõ cơ chế tác động của các loại cao chiết. Kết quả cho thấy các loại cao chiết lá Điều đều thể hiện khả năng ức chế nấm *F. oxysporum*, trong đó cao ethanol có hiệu quả kháng nấm cao nhất đạt 67,50%. Khả năng kháng nấm tương quan với hàm lượng polyphenol trong cao chiết, cao ethanol chứa polyphenol nổi trội nhất với 332,68 mg/g. Cao ethyl acetate chứa hàm lượng acid gallic cao nhất 65,91 mg/g nhưng hiệu quả kháng nấm thấp nhất.

Từ khóa: Acid gallic, cây Điều, *Fusarium oxysporum*, kháng nấm, polyphenol.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Nông nghiệp là ngành sản xuất góp phần duy trì sự ổn định an ninh lương thực cũng như đóng vai trò quan trọng đến sự phát triển của nền kinh tế quốc gia. Bệnh trên thực vật đã làm hạn chế sản lượng cây trồng trên toàn thế giới, dẫn đến thiệt hại về năng suất từ 50 – 70%. Những thiệt hại kể trên là do mầm bệnh tồn tại trong đất hoặc tàn dư nông nghiệp, bao gồm các tác nhân vi sinh như vi khuẩn, nấm, virus, tuyến trùng. Hiện nay, các quy trình nông nghiệp thường áp dụng các tác nhân kiểm soát sinh học như một giải pháp thay thế thích hợp hơn để giải quyết các mối lo ngại về sức khỏe liên quan đến việc tiếp xúc liên tục với các hóa chất tổng hợp, trong đó các chiết xuất thực vật giàu hợp chất có hoạt tính sinh học ngày càng nhận được nhiều sự chú ý (Fenibo *et al.*, 2022).

Fusarium oxysporum là nấm gây bệnh héo vàng trên nhiều loại cây trồng (Edel-Hermann, Lecomte, 2019). Sự phân bố và mức độ gây hại của *F. oxysporum* ở mỗi vùng sinh thái sẽ khác nhau. Sợi nấm và bào tử vô tính tồn tại và nảy mầm trong tàn dư cây bệnh, trong đất qua mỗi mùa vụ, chúng xâm nhập vào rễ non, gốc rễ hay vết thương của cây trồng ký chủ để tiếp cận mạch xylem (Petrovic *et al.*, 2009). Cây trồng nhiễm bệnh do *F. oxysporum* sẽ xuất hiện những thay đổi về hình dạng cũng như các hoạt động sinh lý, ảnh hưởng đến các cơ quan khác nhau ở thực vật, làm suy yếu và gây chết cây (Okungbowa, Shittu, 2012). Trong số các mầm bệnh nghiêm trọng, *F. oxysporum* gây bệnh héo Fusarium, được xếp vào danh sách bệnh gây thiệt hại nặng nề thứ 5 trên thế giới và làm giảm năng suất cây trồng tới 80 – 90% (Srinivas *et al.*, 2019).

Cây Điều (*Anacardium occidentale* L.) thuộc họ *Anacardiaceae* là một loài cây công nghiệp lâu năm ở Việt Nam với tổng diện tích trồng đạt 320 nghìn ha. Các nghiên cứu gần đây đã chứng minh rằng dịch chiết lá Điều có khả năng ức chế một số nấm gây bệnh cây trồng như *Fusarium* sp., *Pyricularia grisea*, *Alternaria solani*, *Aspergillus flavus* và *Aspergillus niger* (Tafinta *et al.*, 2020). Nghiên cứu gần đây của nhóm đã cho thấy lá Điều chứa hàm lượng acid gallic cao vượt trội 377,29 mg/100 g so với một số thực vật khác như tỏi (*Allium sativum*), vỏ măng cụt (*Garcinia mangostana* L.), lá bàng (*Terminalia catappa*), chiêu liêu nghệ (*Terminalia nigrovenulosa*) và quả nho. Acid gallic là một loại acid phenolic có trong nhiều loài thực vật với khả năng chống oxy hóa, kháng nấm và kháng khuẩn mạnh do cấu trúc hóa học đặc trưng của nó (Cushnie, Lamb, 2005; Nguyen *et al.*, 2013). Các nghiên cứu về hàm lượng acid gallic và đặc tính sinh học của chiết xuất lá Điều còn hạn chế. Nghiên cứu này đánh giá hiệu quả ức chế *F. oxysporum* của cao chiết lá Điều giàu acid gallic trong điều kiện *in vitro*. Kết quả của nghiên cứu cung cấp nền tảng để phát triển thuốc bảo vệ thực vật sinh học có hiệu quả và an toàn trong tương lai.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

- Nguyên liệu: Lá Điều (*Anacardium occidentale* L.) được thu tại huyện Hớn Quản, tỉnh Bình Phước.

- Chủng nấm *Fusarium oxysporum* được phân lập và định danh tại Viện nghiên cứu Công nghệ Sinh học và Môi trường (RIBE), Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh.

- Hóa chất: Acid gallic (Sigma-Aldrich, USA), acetonitrile, acid acetic và chloroform (loại HPLC) được cung cấp bởi Thermo Fisher Scientific Co., Ltd. (Waltham, Hoa Kỳ), thuốc thử Folin-Ciocalteu (Merck, Đức), tất cả các hóa chất khác đều thuộc loại phân tích.

- Thiết bị: Bộ chiết sinh hàn hồi lưu (Isolab, Đức), hệ thống quang phổ hấp thụ phân tử (8453 Spectrophotometer, Hewlett Packard, Mỹ), thiết bị cô quay chân không (Hei-VAP Value G3, Heidolph, Đức), thiết bị sắc ký lỏng hiệu năng cao đầu dò DAD (Agilent 1260 Infinity II, Santa Clara, United States).

Phương pháp nghiên cứu

Chuẩn bị cao chiết

Lá Điều sau khi sấy khô, được nghiền và sàng qua rây có đường kính lỗ $\phi = 1\text{mm}$. Bột lá Điều được chiết với các dung môi khác nhau bao gồm ethyl acetate, ethanol 70% và ethanol 96% với tỉ lệ nguyên liệu: dung môi là 1:10 (w/v) bằng cách sử dụng hệ thống đun hồi lưu (Isolab, Đức) trong 1 giờ, ở nhiệt độ sôi của dung môi. Phần dịch chiết được tách khỏi bã rắn bằng cách lọc qua giấy lọc Whatman No.1. Phần bã rắn được chiết thêm 2 lần nữa với dung môi tương ứng. Cao chiết thực vật thu được bằng cách loại bỏ dung môi bằng thiết bị bay hơi chân không. Sau đó, cao chiết được hòa tan ở nồng độ thích hợp trước khi xác định hàm lượng phenolic tổng và sử dụng trong các thí nghiệm tiếp theo.

Xác định hàm lượng phenolic tổng số

Hàm lượng phenolic tổng (TPC) trong cao chiết lá Điều được xác định bằng phương pháp quang phổ UV/Vis sử dụng thuốc thử Folin-Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1999). Cao chiết được hòa tan trong dung môi tương ứng ở nồng độ thích hợp, sử dụng 100 μL dịch chiết cho vào ống nghiệm, sau đó thêm vào 100 μL thuốc thử Folin – Ciocalteu. Sau 5 phút, cho thêm 300 μL dung dịch Na_2CO_3 20% lắc đều sau đó thêm 4,5 mL nước cất. Để yên 60 phút trong tối ở nhiệt độ phòng. Độ hấp thụ của hỗn hợp được đo ở bước sóng 760 nm bằng máy đo quang phổ UV-Vis (8453 Spectrophotometer, Hewlett Packard, Mỹ). Acid gallic được sử dụng làm chất chuẩn với khoảng nồng độ 100 – 500 mg/L. Tổng hàm lượng phenolic được biểu thị bằng mg acid gallic tương đương trên g cao chiết khô (mg GAE/g).

Định lượng acid gallic trong cao chiết bằng HPLC

Hàm lượng acid gallic trong cao chiết được xác định bằng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) với đầu dò DAD (Agilent 1260 Infinity II, Santa Clara, United States) ở bước sóng 270 nm. Pha động bao gồm A: 1% acid acetic trong acetonitrile và B: 1% acid acetic trong nước. Cột pha đảo Poroshell 120-EC C18 (100 mm x 4,6 mm, kích thước hạt 2,7 μm) được sử dụng để phân tách ở nhiệt độ cột 35°C. Chương trình rửa giải gradient là 0 phút (5% B), 0 – 2 phút (5 – 5% B), 2 – 17 phút (5 – 40% B), 17 – 20 phút (40 – 40% B), 20 – 21 phút (40 – 5% B) và 21 – 25 phút (5 – 5% B). Thể tích tiêm mẫu là 5 μL và pha động được bơm với tốc độ dòng 1 mL/phút.

Đánh giá hoạt tính ức chế nấm *F. oxysporum* của cao chiết lá Điều *in vitro*

Các thí nghiệm thực được thực hiện bằng cách đặt một tầng nấm có đường kính 8 mm lên đĩa petri (đường kính 80 x 15 mm). Môi trường PDA được bổ sung cao chiết từ 1 – 5%. Các đĩa đã cấy được ủ ở $28 \pm 2^\circ\text{C}$. Sự phát triển của sợi nấm và đường kính của tầng nấm được quan sát và ghi nhận vào ngày 1, 3, 5 và 7. Khả năng ức chế nấm (H) được tính bằng công thức sau:

$$H = \frac{D_c - D}{D_c} \times 100$$

Trong đó:

H: Khả năng ức chế nấm (%);

D: Đường kính tăng trưởng tầng nấm của đĩa bổ sung dịch chiết (mm);

D_c: Đường kính tăng trưởng tầng nấm của đĩa đối chứng (mm).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả tổng hàm lượng phenolic và acid gallic

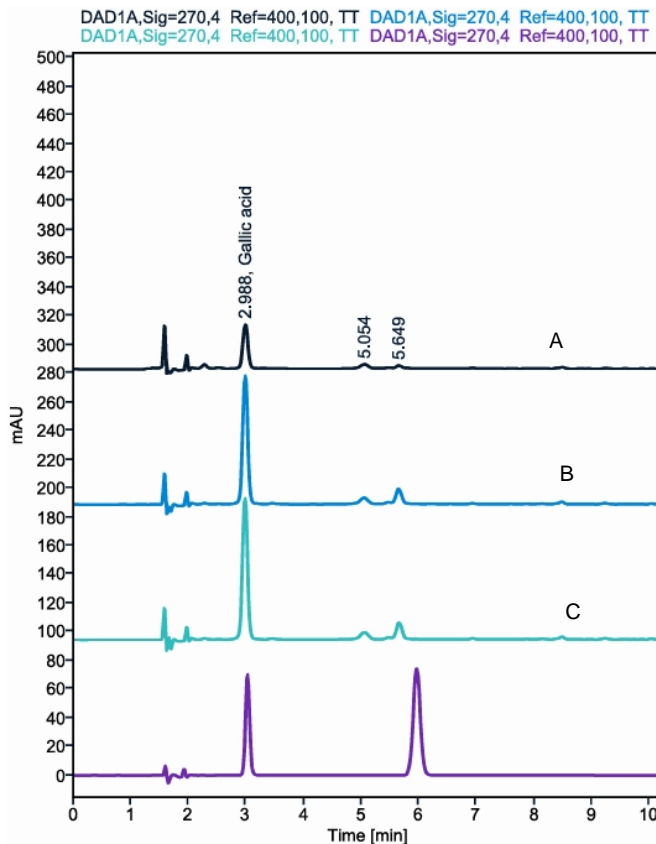
Phenolic là hợp chất thực vật được nghiên cứu và ứng dụng rộng rãi vì có chứa nhiều hoạt tính sinh học đã được chứng minh bao gồm khả năng kháng khuẩn, kháng nấm, chống viêm và kháng oxy hóa (Montenegro-Landívar *et al.*, 2021). Trong nghiên cứu này, bột lá Điều được chiết kiệt bằng các loại dung môi khác nhau, hàm lượng phenolic tổng và acid gallic trong các loại cao chiết được xác định.

Bảng 1. Hàm lượng phenolic tổng và acid gallic trong cao lá Điều

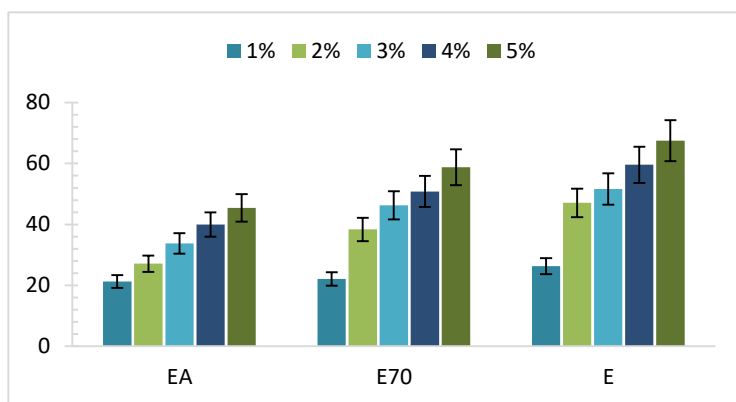
Mẫu cao chiết	Phenolic tổng (mg GAE/g)	Hiệu suất chiết cao (%)	Acid gallic/cao chiết (mg/g)	Acid gallic/ nguyên liệu (mg/g)
Cao ethyl acetate	143,81 ± 0,22	5,11 ± 0,17	65,91 ± 0,32	3,37 ± 0,016
Cao ethanol 70%	318,54 ± 1,05	27,98 ± 0,89	12,96 ± 0,11	3,62 ± 0,03
Cao ethanol 96%	332,68 ± 1,33	21,45 ± 0,47	11,83 ± 0,14	2,54 ± 0,03

Kết quả Bảng 1 cho thấy tổng hàm lượng phenolic trong các mẫu dao động từ 143,81 đến 332,68 mg GAE/g tùy vào loại dung môi chiết. Độ phân cực của dung môi ảnh hưởng đến hàm lượng các chất chiết. Trong đó các hợp chất phenolic chứa nhiều nhóm hydroxyl phân cực nên hòa tan tốt trong các dung môi phân cực. Ethanol và nước có độ phân cực cao hơn ethyl acetate nên hàm lượng phenolic tổng trong hai loại cao này đạt 318,54 – 332,68 mg GAE/g, cao gấp 2,2 – 2,3 lần so với cao ethyl acetate. Duangjan và đồng tác giả (2019) đã ghi nhận chiết xuất lá Điều bằng dung môi methanol có hàm lượng phenolic tổng số 160,35 mg GAE/g, chứa các thành phần như flavonoid, tanin, saponin và anthocyanin. Dịch chiết lá Điều có khả năng ức chế nhiều loài vi sinh vật gây bệnh như *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli*, *Candida albican* và *Aspergillus niger*.

Acid gallic là một chất chống oxy hóa phổ biến và thể hiện nhiều chức năng sinh học khác nhau như kháng vi sinh vật, kháng viêm và ức chế một số dòng tế bào ung thư. Theo nghiên cứu của El-Nagar và đồng tác giả (2020), acid gallic ức chế sự phát triển của sợi nấm và khả năng ức chế nấm tỷ lệ thuận với nồng độ của hợp chất. Trong nghiên cứu này, mẫu cao chiết lá Điều có sự hiện diện của acid gallic với hàm lượng khác nhau, trong đó cao ethyl acetate có hàm lượng acid gallic cao nhất đạt 65,91 mg/g, cao gấp 5,1 – 5,6 lần so với 2 loại cao còn lại (Bảng 1 và Hình 1). Bên cạnh đó, hiệu suất chiết cao của ethanol 96% và ethanol 70% cao hơn ethyl acetate 4,2 – 5,5 lần; chứng tỏ ethyl acetate chiết xuất chọn lọc một số hợp chất trong đó có acid gallic dẫn đến hàm lượng acid gallic trong cao chiết ethyl acetate cao hơn 2 loại cao còn lại. Nguyễn Đặng Minh Chánh và đồng tác giả (2013) đã cho thấy acid gallic từ lá và vỏ của cây chiêu liêu nghệ có khả năng ức chế nấm *Fusarium solani* với hiệu quả ức chế từ 33,75 – 81% ở nồng độ 100 ppm, 500 ppm và 1000 ppm. Một trong những cơ chế mà hợp chất này phát huy được hoạt tính kháng nấm là thông qua sự phân hủy thành tế bào sợi nấm và khả năng ngăn chặn sự hình thành chitin trong thành tế bào (Nguyen *et al.*, 2013).

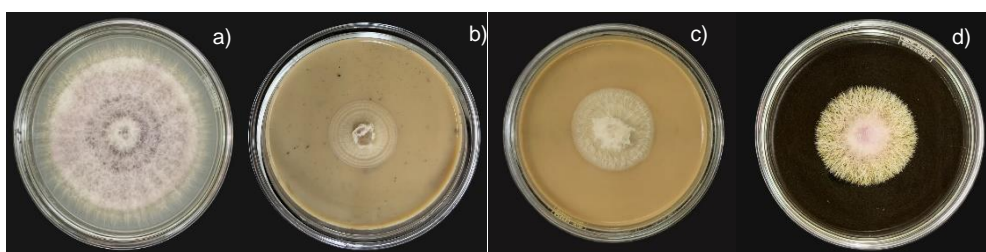


Hình 1. Sắc ký đồ phân tích hàm lượng acid gallic trong cao chiết lá Điều
 A: Cao ethyl acetate; B: Cao ethanol 70%; C: cao ethanol 96%; D: chất chuẩn acid gallic.

Hoạt tính ức chế nấm *F. oxysporum* của cao chiết lá Điều *in vitro*

Hình 2. Khả năng ức chế nấm *F.oxysporum* của cao chiết lá Điều từ 1% - 5%

EA: Cao ethyl acetate; E70: Cao ethanol 70%; E: Cao ethanol 96%

Kết quả hoạt tính ức chế nấm *F. oxysporum* của cao chiết được thể hiện thông qua Hình 2 và 3. Môi trường được bổ sung cao chiết lá Điều với nồng độ từ 1 đến 5% cho hiệu quả ức chế nấm tăng dần. Cao ethanol ở nồng độ 5% có khả năng ức chế nấm *F. oxysporum* cao nhất 67,50% sau 7 ngày cấy, cao ethyl acetate kém hiệu quả nhất. Kết quả cũng cho thấy khả năng ức chế nấm *F. oxysporum* tương quan với hàm lượng polyphenol có trong cao chiết, trong đó cao ethanol với hàm lượng polyphenol cao nhất có hiệu quả kháng nấm cao nhất. Ngược lại cao ethyl acetate có hàm lượng polyphenol thấp nhất và khả năng kháng nấm thấp nhất. Quan sát hình thái sợi nấm trên đĩa thạch bổ sung cao ethanol (96%) cho thấy sợi nấm mịn, thưa, ít lan ra bề mặt môi trường thạch, sợi tơ nấm xẹp xuống có màu trắng, mất sắc tố tím đặc trưng ở nồng độ cao chiết 2%. Trong khi môi trường bổ sung cao ethyl acetate có mật độ sợi tơ nấm dày hơn, lan rộng hơn và sắc tố tím biến mất hoàn toàn ở nồng độ cao chiết 5%. Một kết quả đáng chú ý khác là hiệu quả ức chế nấm *F. oxysporum* không tương quan với hàm lượng acid gallic có trong cao chiết như một số nghiên cứu trước đây. Cao ethyl acetate có hàm lượng acid gallic cao nhất 65,91 mg/g nhưng hiệu quả kháng nấm thấp nhất. Trong cao chiết lá Điều ngoài acid gallic còn có các hợp chất phenolic khác như acid protocatechuic, epicatechin, acid p-courmaric, quercetin và kaempferol với hàm lượng nhỏ hơn nhưng đây cũng là các hợp chất ảnh hưởng đến sự phát triển của nấm (Shen *et al.*, 2022). Muốn đánh giá hoạt chất có vai trò chính ức chế sự phát triển của nấm cần những nghiên cứu sâu hơn. Các loại cao chiết có hiệu quả ức chế sự phát triển của nấm không giống nhau, phụ thuộc vào hàm lượng và cấu trúc nhóm hợp chất có trong từng loại cao chiết. Theo các nghiên cứu trước đây các hợp chất phenolic có khả năng tương tác với protein và lipid trên màng tế bào, ức chế enzyme và phá vỡ màng tế bào của vi khuẩn làm thay đổi sự thẩm thấu của màng tế bào, dẫn đến rò rỉ các ion, proton và các phân tử nội bào. Các hợp chất này cũng ngăn cản sự phát triển của sợi nấm và ức chế hình thành màng sinh học dẫn đến tổn thương vách tế bào và giải phóng chất nội bào (El-Nagar *et al.*, 2020).


Hình 3. Ảnh hưởng của cao chiết lá Điều đến sự phát triển của tảo nấm sau 7 ngày ở nồng độ 4%.

a) Đối chứng; b) cao ethanol 96%; c) cao ethanol 70%; d) cao ethyl acetate

KẾT LUẬN

Cao ethanol lá Điều có hiệu quả kháng nấm *F. oxysporum* cao nhất đạt 67,50% với hàm lượng polyphenol nổi trội nhất 332,68 mg GAE/g. Kết quả nghiên cứu bước đầu cho thấy lá Điều có thể là một nguồn nguyên liệu kháng nấm *F. oxysporum* tiềm năng. Do đó, cần tiếp tục thực hiện các thử nghiệm trên quy mô nhà lưới và đồng ruộng để đánh giá hiệu quả kiểm soát *F. oxysporum* của cao ethanol từ lá Điều. Cao ethyl acetate có hàm lượng acid gallic cao nhất với 65,91 mg/g nhưng không phải là hoạt chất chính ức chế sự phát triển của nấm *F. oxysporum*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Cushnie TT and Lamb AJ (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *Int J Antimicro Agents*, 26: 343-356.
- Duangjan C, Rangsinth P, Gu X, Wink M, and Tencomnao T (2019). Lifespan extending and oxidative stress resistance properties of a leaf extracts from *Anacardium occidentale* L. in *Caenorhabditis elegans*. *Oxi Med Cell Longev*, 2019: 9012396.
- Edel-Hermann V, and Lecomte C (2019). Current status of *Fusarium oxysporum* formae speciales and races. *Phytopathology*, 109: 512-530.
- El-Nagar A, Elzaawely AA, Taha N A, and Nehela Y (2020). The antifungal activity of gallic acid and its derivatives against *Alternaria solani*, the causal agent of tomato early blight. *Agronomy*, 10: 1402.
- Fenibo EO, Ljoma GN, and Matambo T (2022). New and future development in biopesticide research: Biotechnological exploration. *Springer Nature Singapore*: 1-53.
- Montenegro-Landivar MF, Tapia-Quirós P, Vecino X, Reig M, Valderrama C, Granados M, Cortina JL, and Saurina J (2021). Polyphenols and their potential role to fight viral diseases: An overview. *Sci Total Environ*, 801: 149719.
- Nguyen DMC, Seo DJ, Lee HB, Kim IS, Kim KY, Park RD, and Jung WJ (2013). Antifungal activity of gallic acid purified from *Terminalia nigrovenulosa* bark against *Fusarium solani*. *Microb Pathog*, 56: 8-15.
- Okungbowa FI and Shittu HO (2012). *Fusarium* wilts: An overview. *Environ Res J*, 6: 83-102.
- Petrovic T, Walsh JL, Burgess LW, and Summerell BA (2009). *Fusarium* species associated with stalk rot of grain sorghum in the northern grain belt of eastern Australia. *Australas Plant Pathol*, 38: 373-379.
- Shen N, Wang T, Gan Q, Liu S, Wang L, and Jin B (2022). Plant flavonoids: Classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity. *Food Chem*, 383: 132531.
- Srinivas C, Devi DN, Murthy KN, Mohan CD, Lakshmeesha TR, Singh B, Kalagatur NK, Niranjana SR, Hashem A, Alqaraw AA, Tabassum B, Abd-Allah EF, Chandra Nayakan S, and Srivastava RK (2019). *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici causal agent of vascular wilt disease of tomato: Biology to diversity—A review. *Saudi J Biol Sci*, 26: 1315-1324.
- Tafinta IY, Okoye NH, Batagarawa US, Hamma II, and Abubakar M (2020). Phytochemical screening and antifungal activities of cashew (*Anacardium occidentale* Linn.) leaves extract on some fungal isolates. *Asian Plant Res J*, 5: 30-37.

INHIBITORY EFFECT OF POLYPHENOL-RICH CASHEW LEAVES EXTRACTS (*Anacardium occidentale* L.) ON *Fusarium oxysporum*

Nguyen Thi Be Thu¹, Vu Thi My Tam¹, Le Nguyen Thanh Dong²,
Nguyen Duong Hoang Vinh², Trinh Thi Phi Ly^{1,2*}

¹Faculty of Biological sciences, Nong Lam University, Ho Chi Minh City

²Research Institute for Biotechnology and Environment, Nong Lam University, Ho Chi Minh City

SUMMARY

Fusarium oxysporum is a common pathogen causing severe damage to many different crops. The use of plant extracts rich in bioactive compounds to control diseases caused by *Fusarium oxysporum* is an environmental friendly and effective solution that has attracted increasing attentions. This study investigated the inhibitory effects of cashew leaf extracts on *F.oxysporum* *in vitro*. In addition, the total phenolic and gallic acid content in the extracts were analyzed to clarify the effects of cashew leaf extracts. As results, all cashew leaf extracts showed the ability to inhibit *F.oxysporum*, in which ethanolic extract had the highest antifungal efficiency of 67.50%. Additionally, ethanolic extract contained the highest polyphenol at 332.68 mg GAE/g. The data demonstrated that antifungal activity correlated with the polyphenol content in the cashew leaf extract. Ethyl acetate extract contained the highest gallic acid content of 65.91 mg/g but it had the lowest antifungal capacity.

Keywords: Antifungal activity, cashew leaves, *Fusarium oxysporum*, gallic acid, phenolic compounds.

* Author for correspondence: Tel: 0379700703; Email: phily@hcmuaf.edu.vn