

Ảnh hưởng của chitosan chiếu xạ kết hợp nấm *Trichoderma* tới bệnh chết héo *Phytophthora* spp. trên cây dâu tây

Nguyễn Duy Hạng*, Nguyễn Trọng Hoàn Phong, Lê Thị Thái Hòa,
Nguyễn Tấn Mân, Lê Hữu Tư, Lê Xuân Cường, Lê Văn Toàn

Viện Nghiên cứu hạt nhân

Ngày nhận bài 2/5/2018; ngày chuyển phản biện 4/5/2018; ngày nhận phản biện 12/6/2018; ngày chấp nhận đăng 18/6/2018

Tóm tắt:

Hiệu ứng của chitosan chiếu xạ kết hợp với nấm *Trichoderma* đối với *Phytophthora* spp. gây bệnh chết héo ở cây dâu tây đã được nghiên cứu. Ảnh hưởng của chitosan chiếu xạ đối với sự sinh trưởng cây dâu tây và khả năng phòng trừ bệnh *Phytophthora* spp. đã được thực nghiệm ở điều kiện nhà kính và *in vitro*. Kết quả cho thấy, *Phytophthora* spp. gây bệnh chết héo trên cây dâu tây rất nhạy cảm với chitosan chiếu xạ. Chitosan chiếu xạ có khối lượng phân tử 30 kDa với nồng độ 800 ppm đã ức chế hoàn toàn sự sinh trưởng của hệ sợi nấm *Phytophthora* spp. Tưới chitosan chiếu xạ vào đất trồng cây dâu tây đã được gây nhiễm *Phytophthora* spp., sau đó bổ sung thêm nấm *Trichoderma* làm giảm hoàn toàn tỷ lệ bệnh chết héo do nấm *Phytophthora* spp. gây ra và làm cho cây dâu tây sinh trưởng tốt hơn. Mục tiêu của nghiên cứu này là đánh giá hiệu ứng của chitosan chiếu xạ và nấm *Trichoderma* đến khả năng sinh trưởng và phòng trừ bệnh chết héo ở cây dâu tây.

Từ khóa: Bệnh thối rễ, cây dâu tây, chitosan chiếu xạ, *Phytophthora*, *Trichoderma*.

Chỉ số phân loại: 4.1

Mở đầu

Dâu tây là loại cây ăn quả có giá trị dinh dưỡng, được trồng nhiều ở Đà Lạt với diện tích trên 117 ha. Một số loài vi nấm gây bệnh phát triển, làm cho hàng chục hecta dâu tây bị vàng lá, chết héo, đen rễ đờ gốc, chủ yếu là do nấm *Phytophthora* spp. gây ra. Phòng trừ bệnh nấm *Phytophthora* spp. chủ yếu là vệ sinh đồng ruộng và sử dụng thuốc bảo vệ thực vật. Thuốc bảo vệ thực vật hóa học sử dụng thường xuyên sẽ làm tăng tính kháng thuốc và ảnh hưởng đến sức khỏe con người [1]. Giải pháp sinh học được xem là giải pháp thay thế để kiểm soát các bệnh lây truyền trong đất [2], trong đó, các hợp chất sinh học có nguồn gốc tự nhiên được sử dụng thay thế cho hợp chất hóa học tổng hợp, không gây độc cho người, gia súc và thân thiện với môi trường. Chitosan là hợp chất polysaccharide tự nhiên, là dẫn xuất deacetyl hoá của chitin có trong vỏ giáp xác tôm cua, có hoạt tính sinh học nhiều hứa hẹn nhất [3]. Chitosan ức chế sự phát triển của nấm gây bệnh, và là một elicitor tăng cường các phản ứng tự vệ của cây trồng [4]. Ngoài ra, biện pháp sinh học còn sử dụng các vi sinh vật đối kháng các vi sinh vật gây bệnh thực vật. Nấm *Trichoderma* là nấm đối kháng, được sử dụng để kiểm soát, phòng ngừa một số loài nấm gây bệnh ở cây trồng như nấm *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Phytophthora*... [5, 6]. Sự kết hợp giữa các tác nhân sinh học làm giảm mức độ sử dụng thuốc

trừ nấm hóa học nhưng vẫn mang lại hiệu quả phòng bệnh rất cao [7]. Do đó, mục tiêu của nghiên cứu này là xác định, đánh giá khả năng ức chế của chitosan chiếu xạ khối lượng phân tử thấp kết hợp với nấm *Trichoderma* spp. đối với nấm *Phytophthora* spp. gây bệnh đen rễ và khả năng sinh trưởng của cây dâu tây, làm cơ sở khoa học cho việc xây dựng giải pháp phòng trừ bệnh, thúc đẩy tăng trưởng cho cây dâu tây.

Nội dung nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu

- Giống dâu tây: Giống dâu Mỹ đá (*Fragaria x ananassa*) sử dụng trong thực nghiệm được nhân giống bằng phương pháp nuôi cấy *in vitro*, sản xuất tại Trung tâm Nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật nông nghiệp Lâm Đồng.

- Chủng nấm *Phytophthora* spp. gây bệnh đen rễ được phân lập trên cây dâu tây bị bệnh tại Đà Lạt.

- Chủng nấm *Trichoderma* spp. sử dụng trong thực nghiệm được phân lập tại vùng đất Đà Lạt và lưu trữ tại phòng thí nghiệm của Trung tâm Công nghệ bức xạ, Viện Nghiên cứu hạt nhân.

Phương pháp nghiên cứu

- Chitosan được sử dụng trong các thực nghiệm có khối

*Tác giả liên hệ: Tel: 84-63-3823222 ; Email: nguyenduyhang7@yahoo.com

The effect of irradiated chitosan combined with *Trichoderma* on the root rot pathogen *Phytophthora* spp. in strawberry

Duy Hang Nguyen*, Trong Hoanh Phong Nguyen,
Thi Thai Hoa Le, Tan Man Nguyen, Huu Tu Le,
Xuan Cuong Le, Van Toan Le

Nuclear Research Institute

Received 2 May 2018; accepted 18 June 2018

Abstract:

Antifungal effects of irradiated chitosan in combination with *Trichoderma* strain on the root rot disease *Phytophthora* spp. in strawberry were investigated. The effect of irradiated chitosan on the growth and the root rot control of *Phytophthora* spp. in strawberry was evaluated *in vitro* and under greenhouse conditions. The results showed that irradiated chitosan with the molecular weight of 30 kDa strongly inhibited the mycelial growth of *Phytophthora* spp. The soil treatment by irradiated chitosan in combination with *Trichoderma* spp. strain completely reduced the root rot disease and promoted the growth of strawberry. The aim of this study was to evaluate the effect of irradiated low-weight chitosan in combination with *Trichoderma* spp. strain on the growth promotion and control of the root rot disease in strawberry.

Keywords: Irradiated chitosan, *Phytophthora*, root rot, strawberry, *Trichoderma*.

Classification number: 4.1

lượng phân tử 100 kDa, 30 kDa và chitosan oligomer (C_7). Chitosan 30 kDa được điều chế từ chitosan 100 kDa trong dung dịch H_2O_2 3% theo tỷ lệ 1:3 (w/v), và chiếu tia gamma với liều xạ 10 kGy. Chitosan oligomer (C_7) được điều chế từ dung dịch 10% chitosan 30 kDa (hòa tan trong dung dịch acid acetic 3%), chiếu tia gamma với liều xạ 20 kGy. Khối lượng phân tử của chitosan được xác định bằng phương pháp sắc ký gel (GPC) trên máy LC-20AB Shimadzu, Nhật Bản. Chất chuẩn là Pullulan có khối lượng phân tử từ 738 đến 380000 Da.

- Xác định khả năng kháng nấm *Phytophthora* spp. của chitosan chiếu xạ có khối lượng phân tử (Mw) khác nhau

trong điều kiện *in vitro*: Nấm *Phytophthora* spp. (một mẫu thạch PDA có chứa hệ sợi nấm, kích thước 1 mm²) được nuôi cấy trên môi trường PDA (glucose, dịch chiết khoai tây, thạch Agar) có bổ sung chitosan Mw khác nhau với các hàm lượng: 0, 50, 100, 300, 500, 800, 1000, 1500 và 2000 ppm. Khả năng kháng nấm *Phytophthora* spp. của chitosan được đánh giá bằng phương pháp đo kích thước của hệ sợi nấm sinh trưởng theo thời gian khác nhau ở nhiệt độ 25°C.

- Khảo sát ảnh hưởng chitosan chiếu xạ kết hợp với nấm đối kháng *Trichoderma* spp. đối với sự sinh trưởng, tỷ lệ bệnh của cây dâu tây trồng trên đất đã gây nhiễm nấm *Phytophthora* spp. trong điều kiện nhà kính. Thí nghiệm gồm 4 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần:

+ Nghiệm thức 1 (đối chứng): Cây dâu tây con 45 ngày tuổi được trồng trong chậu nhựa (Ø18 cm) với 1 kg đất được gây nhiễm 1% sinh khối nấm *Phytophthora* spp. (tính theo khối lượng đất). Sinh khối hệ sợi nấm *Phytophthora* spp. được nhân nuôi trên môi trường cám trấu sau 25 ngày ở nhiệt độ 25°C; sinh khối hệ sợi nấm *Phytophthora* spp. được sử dụng gây nhiễm trực tiếp vào đất trồng dâu tây.

+ Nghiệm thức 2 (xử lý nấm *Trichoderma* spp.): Cây dâu tây trồng trong chậu nhựa với đất đã nhiễm 1% sinh khối nấm *Phytophthora* spp. xử lý nấm *Trichoderma* spp. với số lượng bào tử là 10^8 bào tử/g đất.

+ Nghiệm thức 3 (xử lý chitosan): Cây dâu tây trồng trong chậu nhựa với đất đã nhiễm 1% sinh khối nấm *Phytophthora* spp. xử lý dung dịch chitosan với hàm lượng phù hợp (mg/kg đất).

+ Nghiệm thức 4 (xử lý chitosan + nấm *Trichoderma* spp.): Cây dâu tây trồng trong chậu nhựa với đất đã nhiễm 1% sinh khối nấm *Phytophthora* spp. xử lý dung dịch chitosan với hàm lượng phù hợp (mg/kg đất) và nấm *Trichoderma* spp. với số lượng bào tử là 10^8 bào tử/g đất.

Các chỉ tiêu về khối lượng tươi, khối lượng khô của rễ, thân và lá cây dâu tây, tỷ lệ bệnh, tỷ lệ ức chế được ghi nhận ở mỗi nghiệm thức.

Xử lý số liệu: Sử dụng phần mềm Excel 2013 để phân tích và tổng hợp các số liệu thu thập được từ các thí nghiệm. Dùng phần mềm SPSS 16.0 để phân tích thống kê các số liệu.

Kết quả và thảo luận

Ảnh hưởng của chitosan chiếu xạ khối lượng phân tử khác nhau đến khả năng sinh trưởng hệ sợi nấm *Phytophthora* spp.

Kết quả ở bảng 1 cho thấy, chitosan có khả năng ức chế sự sinh trưởng của hệ sợi nấm *Phytophthora* spp. so với đối chứng không có chitosan. Nồng độ của chitosan càng tăng

cao thì khả năng sinh trưởng của hệ sợi nấm càng giảm.

Bảng 1. Ảnh hưởng của chitosan chiếu xạ khối lượng phân tử khác nhau đến khả năng sinh trưởng hệ sợi nấm *Phytophthora* spp. gây bệnh hại cây dâu tây.

Chitosan	Nồng độ (ppm)	Đường kính tán nấm <i>Phytophthora</i> spp. theo thời gian nuôi cấy (mm)			
		24 giờ	48 giờ	72 giờ	144 giờ
C ₁₀₀	0	2,33±0,33 ^a	7,67±0,33 ^a	12,33±0,33 ^a	19,13±0,47 ^a
	50	2,33±0,33 ^a	6,33±0,33 ^b	12,03±0,32 ^a	18,33±0,33 ^a
	100	2,03±0,58 ^a	5,10±0,58 ^{bc}	10,17±0,49 ^b	16,37±0,32 ^b
	300	2,03±0,58 ^a	4,67±0,33 ^c	9,43±0,28 ^b	15,67±0,33 ^b
	500	1,33±0,33 ^a	3,33±0,33 ^d	7,33±0,33 ^c	14,13±0,49 ^c
	800	(-)	(-)	(-)	(-)
C ₃₀	50	2,33±0,33 ^a	5,47±0,32 ^b	10,67±0,35 ^b	16,67±0,33 ^b
	100	2,03±0,58 ^a	4,03±0,55 ^{bc}	9,33±0,27 ^c	13,10±0,49 ^c
	300	1,33±0,33 ^{ab}	3,10±0,58 ^c	8,67±0,58 ^c	12,33±0,33 ^c
	500	1,00±0,00 ^b	1,00±0,00 ^d	6,67±0,33 ^d	9,80±0,20 ^d
	800	(-)	(-)	(-)	(-)
	1000	(-)	(-)	(-)	(-)
C _T	50	2,33±0,33 ^a	6,33±0,33 ^b	12,10±0,49 ^a	18,67±0,33 ^a
	100	2,03±0,58 ^{ab}	6,07±0,55 ^b	12,03±0,55 ^a	16,10±0,49 ^b
	300	2,03±0,58 ^{ab}	5,33±0,33 ^b	10,33±0,33 ^b	15,67±0,33 ^b
	500	1,33±0,33 ^{ab}	5,10±0,55 ^b	10,07±0,52 ^b	14,07±0,52 ^c
	800	1,00±0,00 ^b	3,10±0,58 ^c	9,10±0,52 ^b	12,17±0,46 ^d
	1000	1,00±0,00 ^b	2,13±0,49 ^{cd}	7,33±0,33 ^c	11,67±0,33 ^d
	1500	1,00±0,00 ^b	1,73±0,27 ^d	6,03±0,12 ^d	8,20±0,41 ^e
	2000	1,00±0,00 ^b	1,67±0,33 ^d	4,10±0,18 ^e	7,33±0,33 ^e

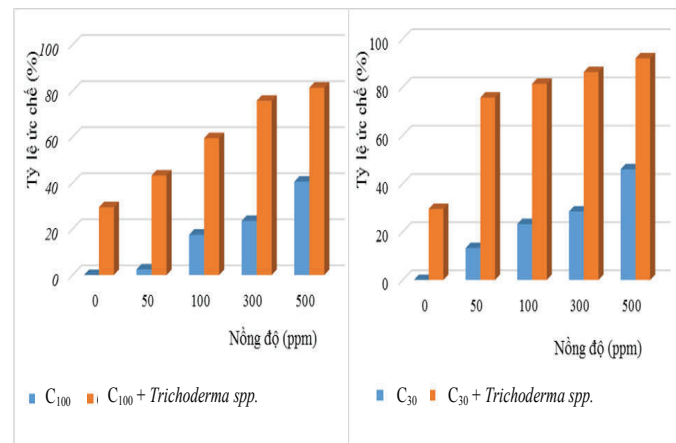
Ghi chú: (-) hệ sợi nấm không sinh trưởng. Trong cùng một cột, các giá trị có các chữ cái a,b,c,d,e theo sau chỉ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (P<0,05).

Trong ba loại chitosan được thử nghiệm thì chitosan 30 kDa (C₃₀) cho kết quả ức chế tốt hơn so với chitosan 100 kDa (C₁₀₀) và chitosan oligomer (C_T). Tỷ lệ ức chế hệ sợi nấm *Phytophthora* spp. sau 144 giờ của C₃₀ ở nồng độ 500 ppm đối với *Phytophthora* đạt 48,77%, cao hơn hẳn so với C₁₀₀ và C_T là 26%; còn ở nồng độ 800 ppm của C₁₀₀ và C₃₀ đã ức chế hoàn toàn sự phát triển của hệ sợi nấm *Phytophthora*. Sự ức chế phát triển hệ sợi nấm của C_T kém hơn so với C₁₀₀ và C₃₀, bằng chứng là sợi nấm vẫn phát triển tại mức nồng độ 2000 ppm tuy có giảm nhưng chưa ức chế được hoàn toàn.

Ảnh hưởng của chitosan chiếu xạ khối lượng phân tử khác nhau kết hợp với nấm *Trichoderma* spp. đối với sự sinh trưởng hệ sợi nấm *Phytophthora* spp.

Tỷ lệ ức chế của chitosan kết hợp với nấm *Trichoderma* đối với sự sinh trưởng hệ sợi nấm *Phytophthora* được thể

hiện rất rõ trong biểu đồ 1 và biểu đồ 2. Khi sử dụng C₁₀₀ và C₃₀ ở nồng độ 500 ppm kết hợp với nấm *Trichoderma* thì tỷ lệ ức chế sinh trưởng đạt gấp 2 lần so với các nghiệm thức chỉ sử dụng chitosan đơn lẻ. Tỷ lệ ức chế của C₃₀ kết hợp với nấm *Trichoderma* cao hơn hoạt lực của C₁₀₀ kết hợp với nấm *Trichoderma*. Ở nồng độ từ 100 đến 500 ppm của chitosan C₃₀ kết hợp với nấm *Trichoderma* ức chế hơn 80% sự sinh trưởng của hệ sợi nấm *Phytophthora* gây bệnh hại cây dâu tây.



Biểu đồ 1. Tỷ lệ ức chế của C₁₀₀ kết hợp *Trichoderma* spp. đối với sự sinh trưởng hệ sợi nấm *Phytophthora* spp.

Biểu đồ 2. Tỷ lệ ức chế của C₃₀ kết hợp *Trichoderma* spp. đối với sự sinh trưởng hệ sợi nấm *Phytophthora* spp.

Ảnh hưởng của chitosan chiếu xạ kết hợp với nấm *Trichoderma* spp. đối với tỷ lệ bệnh do nấm *Phytophthora* spp. được gây nhiễm nhân tạo và khả năng sinh trưởng của cây dâu tây trồng trong điều kiện nhà kính

Sau khi bổ sung sinh khối nấm *Phytophthora* spp. vào đất trồng dâu tây thì tỷ lệ bệnh trên cây dâu tây trong các nghiệm thức là 100%, đồng thời xuất hiện những triệu chứng bệnh điển hình do nấm *Phytophthora* gây ra được trình bày ở bảng 2. Khi sử dụng nấm *Trichoderma* để xử lý nấm *Phytophthora* thì *Trichoderma* vẫn có tác dụng ức chế hoạt động của nấm *Phytophthora* nhưng cho hiệu quả không cao. Tỷ lệ bệnh giảm rõ rệt khi xử lý nấm *Phytophthora* bằng C₃₀ (300 mg/kg đất) hoặc C₃₀ (300 mg/kg đất) kết hợp với nấm *Trichoderma*. Trong 30 ngày thử nghiệm, nghiệm thức sử dụng C₃₀ đơn lẻ để xử lý nấm *Phytophthora* thể hiện khả năng kháng nấm tốt, cây phát triển bình thường, nhưng sau đó thì hiệu lực kháng nấm bắt đầu giảm. Trong khi đó, cây dâu được gây nhiễm nấm *Phytophthora* sau khi xử lý bằng C₃₀ kết hợp với nấm *Trichoderma* thì hoàn toàn không bị bệnh sau 30 ngày xử lý.

Bảng 2. Tỷ lệ bệnh của cây dâu được gây nhiễm nấm *Phytophthora* spp. sau 30 ngày xử lý và tỷ lệ ức chế bệnh của chitosan khối lượng phân tử 30 kDa kết hợp nấm *Trichoderma* spp.

Nghiệm thức	Triệu chứng bệnh	Tỷ lệ bệnh sau 30 ngày xử lý (%)	Tỷ lệ ức chế bệnh (%)
Đối chứng <i>Phytophthora</i> spp.	Cây bị đốm gốc, héo, lá quăn, số lá giảm, thối gốc	100	0
<i>Phytophthora</i> spp. + <i>Trichoderma</i> spp.	Cây bị đốm gốc, héo, lá quăn, số lá giảm	67	33
<i>Phytophthora</i> spp. + C ₃₀	Cây bị đốm gốc, héo, lá quăn	28	72
<i>Phytophthora</i> spp. + C ₃₀ + <i>Trichoderma</i> spp.	Cây phát triển bình thường	0	100

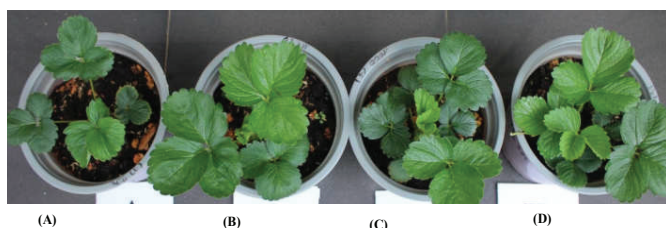
Bảng 3. Ảnh hưởng của chitosan khối lượng phân tử 30 kDa kết hợp với nấm *Trichoderma* spp. đến khối lượng tươi và khối lượng khô của cây dâu được gây nhiễm nấm *Phytophthora* spp.

Nghiệm thức	Khối lượng tươi (g/cây)		Khối lượng khô (g/cây)	
	Rễ	Thân + Lá	Rễ	Thân + Lá
Đối chứng <i>Phytophthora</i> spp.	2,09 ^d	3,24 ^d	0,28 ^d	0,81 ^d
<i>Phytophthora</i> spp. + <i>Trichoderma</i> spp.	3,96 ^c	3,78 ^c	0,48 ^c	0,93 ^c
<i>Phytophthora</i> spp. + C ₃₀	5,74 ^b	6,38 ^b	0,66 ^b	1,49 ^b
<i>Phytophthora</i> spp. + C ₃₀ + <i>Trichoderma</i> spp.	6,80 ^a	7,19 ^a	1,08 ^a	2,37 ^a

Ghi chú: Trong cùng một cột, các giá trị có các chữ cái a, b, c, d theo sau chỉ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (P<0,05).

Kết quả ở bảng 3 cho thấy, khối lượng tươi và khối lượng khô của rễ, thân và lá của cây dâu tây được gây nhiễm nấm *Phytophthora* spp. khi xử lý bằng C₃₀ kết hợp với nấm *Trichoderma* spp. cho kết quả là tốt nhất so với các nghiệm thức khác.

Dựa vào kết quả thực nghiệm sử dụng C₃₀ và C₃₀ kết hợp với *Trichoderma* spp. để xử lý nấm *Phytophthora* spp., chúng tôi nhận thấy việc bổ sung thêm nấm *Trichoderma* có



Hình 1. Ảnh hưởng của chitosan 30 kDa phối hợp với nấm *Trichoderma* đối với sự sinh trưởng của cây dâu tây được gây nhiễm nấm *Phytophthora* spp. (A) Đối chứng (1% sinh khối nấm *Phytophthora* spp.); (B) 0,1% sinh khối nấm *Phytophthora* spp. + 300 ppm C₃₀; (C) 0,5% sinh khối nấm *Phytophthora* spp. + 300 ppm C₃₀; (D) 1% sinh khối nấm *Phytophthora* spp. + 300 ppm C₃₀.

ảnh hưởng tích cực đến khả năng kháng nấm *Phytophthora* của C₃₀ và làm cho cây dâu tây tăng trưởng mạnh hơn (hình 1).

Kết luận

Ảnh hưởng của chitosan chiếu xạ khối lượng phân tử thấp phối hợp với nấm đối kháng *Trichoderma* đến sự sinh trưởng của cây dâu tây và khả năng phòng trừ bệnh nấm *Phytophthora* spp. đã được thực nghiệm ở điều kiện *in vitro* và trong điều kiện nhà kính. Nấm *Phytophthora* spp. rất nhạy cảm với chitosan chiếu xạ có khối lượng phân tử thấp. Chitosan có khối lượng phân tử 30 kDa được điều chế từ chitosan 100 kDa bằng phương pháp chiếu xạ ức chế mạnh sự phát triển hệ sợi nấm *Phytophthora* spp. Khi phối hợp chitosan 30 kDa với nấm *Trichoderma* đã ức chế hoàn toàn sự sinh trưởng hệ sợi nấm *Phytophthora* trong điều kiện *in vitro*. Sự phối hợp giữa chitosan 30 kDa với nấm đối kháng *Trichoderma* để xử lý bệnh *Phytophthora* đã tác động trực tiếp đến sự sinh trưởng của cây dâu tây, khối lượng thân lá cao gấp 2,2 lần và khối lượng tươi rễ cao gấp 3,2 lần so với cây dâu tây không xử lý. Đất trồng cây dâu tây đã được gây nhiễm *Phytophthora* spp. sau đó tưới chitosan 30 kDa và bổ sung thêm nấm *Trichoderma* làm giảm tỷ lệ bệnh chết héo do nấm *Phytophthora* spp. gây ra và làm cho cây dâu tây sinh trưởng tốt hơn. Sự kết hợp giữa các tác nhân đối kháng sinh học và hợp chất polymer sinh học là một giải pháp an toàn, giúp kiểm soát hiệu quả bệnh *Phytophthora* spp. gây hại cây dâu tây.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] R.K. Jones (1985), “Fungicides for bedding plants”, *Bedding plants Inc.*, **16(2)**, pp.3-4.
- [2] I.H. El-Abbasi, A.A. El-Wakil, M.M. Satour (2003), “Studies on the bioagent *Trichoderma* in Egypt: 1. In vitro determination of antagonistic potential of *Trichoderma harzianum* against some plant pathogenic fungi”, *Egyptian Journal of Phytopathology*, **31**, pp.59-74.
- [3] L. Hadwiger, C. Chiang, S. Victory, D. Horovitz (1988), *The molecular biology of chitosan in plant-pathogen interactions and its application to agriculture*, Elsevier Applied Science, Amsterdam.
- [4] R. Muzzarelli and G.W. Goody (1986), *Chitin in Nature and Technology*, Plenum Press, New York.
- [5] E. Monte (2001), “Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology”, *International Microbiology*, **4(1)**, pp.1-4.
- [6] N. Benhamou, P.J. Lafontaine, M. Nicole (1994), “Induction of systemic resistance of *Fusarium crown and root rot* in tomato plants by seed treatment with chitosan”, *Phytopathology*, **84**, pp.1432-1444.
- [7] E.C. Tjamos, G.C. Papavizas, R.J. Cook (1992), *Biological control of plant diseases - Progress and challenges for the future*, Plenum Press, New York.