

## The composition of pests on early grand peach (DCS1) and pest management in Moc Chau, Son La

Le Quang Khai, Tran Thanh Toan, Le Ngoc Anh

### Abstract

Eight insect pests and seven plant diseases were collected and identified on early grand peach (DCS1) (*Prunus persica*) in Moc Chau, Son La. Red mite, rusts fungi and shot hole disease were main damaging pests. The insect pests and diseases intensively attack plants from April (harvest time) to September (before leaf drop period) of the year. The effectiveness of using pesticides such as Ortus 5EC, Lama 50EC and Comite 73 EC for controlling red mite on early grand peach (DCS1) in Moc Chau, Son La reached 62.74% to 90.62%. The effectiveness of using Mancozeb 800WG for controlling rusts fungi and shot hole diseases were 67.1% and 56.24% at 7 days after treatment.

**Key words:** Early grand peach, DCS1, red mite, rusts fungi, shot hole, pests

Ngày nhận bài: 10/3/2017

Ngày phản biện: 20/3/2017

Người phản biện: TS. Nguyễn Văn Vấn

Ngày duyệt đăng: 24/3/2017

## NGHIÊN CỨU HIỆU ỨNG PHÒNG BỆNH CHẾT NHANH DO NẤM *Phytophthora capsici* GÂY RA TRÊN CÂY TIÊU CỦA CHẾ PHẨM NANO BẠC CHẾ TẠO BẰNG PHƯƠNG PHÁP CHIẾU XẠ

Dương Hoa Xô<sup>1</sup>, Lê Quang Luân<sup>1</sup>

### TÓM TẮT

Bạc nano đã được chứng minh là có hiệu quả kháng nấm cao đối với nhiều loại nấm gây bệnh trên cây trồng. Trong nghiên cứu này, dung dịch bạc nano với các kích thước hạt khác nhau 5, 10 và 15 nm được chế tạo bằng phương pháp chiếu xạ  $\gamma$ -Co-60 sử dụng chất ổn định chitosan (1%). Hiệu quả kháng nấm của chế phẩm bạc nano đối với *Phytophthora capsici* (gây bệnh thối rễ chết nhanh) được đánh giá trong điều kiện *in vitro* và *in vivo*. Kết quả thử nghiệm trên môi trường carrot agar (CRA) cho thấy hiệu quả kháng nấm tăng tỉ lệ nghịch với kích thước hạt và hiệu quả kháng nấm đạt từ 62,7 đến 100% với kích thước hạt giảm dần từ 15 đến 5 nm. Ngoài ra khi xử lý chế phẩm trên cây tiêu 6 tháng tuổi cho thấy việc xử lý với bạc nano ở nồng độ từ 1 - 10 ppm đã làm tăng khả năng kháng bệnh cho cây từ 53,3 - 95,0% so với đối chứng không xử lý chế phẩm. Chế phẩm bạc nano được chế tạo bằng phương pháp chiếu xạ sử dụng chất ổn định chitosan có tiềm năng ứng dụng làm chất trừ nấm gây bệnh trên cây tiêu với các ưu điểm vượt trội như công nghệ sản xuất thân thiện với môi trường, sản phẩm có hoạt tính kháng nấm cao và an toàn cho người sử dụng.

**Từ khóa:** Bạc nano, bệnh thối rễ chết nhanh, cây tiêu, hoạt tính kháng nấm, *Phytophthora capsici*

### I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hồ tiêu được biết đến như là “vua” của các loại gia vị đồng thời vì đây là loại cây gia vị được sử dụng rộng rãi nhất trên toàn thế giới. Việt Nam hiện nay đang trở thành một trong những nước xuất khẩu hồ tiêu hàng đầu thế giới cả về khối lượng, chất lượng và tiềm năng phát triển. Tuy nhiên, cây tiêu hiện đã và đang bị tấn công bởi nhiều loại bệnh hại khác nhau do nấm, vi khuẩn, tuyến trùng, v.v. gây ra. Trong các loại bệnh hại nói trên, bệnh thối rễ chết nhanh gây ra bởi nấm *Phytophthora* là loại bệnh gây hại nghiêm trọng nhất và làm tổn thất lớn cho nông dân trồng tiêu ở nhiều nước khác nhau trong đó có Việt Nam (Nair, 2004). Nhằm giảm thiểu các thiệt hại gây ra

bởi bệnh do nấm *P. capsici*, nông dân hiện nay đã và đang phải sử dụng nhiều loại thuốc trừ nấm hóa học khác nhau. Tuy nhiên các loại thuốc này đã góp phần làm giảm giá trị và sản lượng hồ tiêu, gây ô nhiễm môi trường và không an toàn cho người sử dụng, v.v. Chính vì vậy, việc nghiên cứu chế tạo chế phẩm có nguồn gốc từ các polymer tự nhiên, an toàn nhưng lại có hiệu quả kháng nấm cao là rất quan trọng hiện nay. Chitosan là loại polysaccharide tự nhiên phổ biến thứ 2 trên trái đất, chỉ sau cellulose. Chitosan đã và đang được sử dụng rất rộng rãi trong nông nghiệp để bảo quản nông sản, hạt giống, làm phân bón tăng trưởng thực vật, v.v. (Vasyokova *et al.*, 2001; Kumar, 2001; Kume *et al.*, 2002). Xu *et al.* (2006) cũng đã

<sup>1</sup> Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh

công bố khả năng kháng nấm *P. capsici* và nhiều loại nấm bệnh khác nhau như *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, v.v. trong điều kiện *in vitro* của oligochitosan. Ngoài ra, oligochitosan còn có tác dụng kích thích tạo hiệu ứng tạo phytoalexin ở cây trồng giúp cây chống lại sự xâm nhiễm các loại nấm bệnh (Albersheim and Darvill, 1985).

Bên cạnh đó, bạc nano hiện nay được biết đến như là một loại chất kháng vi sinh vật thế hệ mới do các tính chất độc đáo và khả năng ứng dụng rộng rãi của chúng (Rai, *et al.*, 2009). Bạc nano đã được chứng minh là có khả năng kháng khuẩn và nấm rất mạnh (Morones *et al.*, 2005). Nhiều nghiên cứu cũng đã cho thấy rằng bạc nano có khả năng kháng khuẩn ở nồng độ rất thấp và không gây độc đối với tế bào người (Shrivastava *et al.*, 2007; Asharani *et al.*, 2009). Trên thực vật, nghiên cứu của Park *et al.* (2006) cho thấy nano bạc-silica có khả năng kiểm soát nhiều loại bệnh hại ở cây trồng. Các thí nghiệm *in vitro* của bạc nano đối với nấm bệnh cao su *Corticium salmonicolor* của Phu *et al.* (2010) cho thấy bạc nano có hiệu quả kháng nấm rất mạnh. Mặt khác, nghiên cứu của Pokhrel và Dubay (2017) cũng cho thấy độc tính của bạc nano đối với khả năng nảy mầm và phát triển rễ ở bắp là rất thấp so với bạc ion. Các nghiên cứu trên đã cho thấy tiềm năng của một loại thuốc trừ nấm thế hệ mới được chế tạo bằng cách kết hợp chitosan và bạc nano, chế phẩm này hứa hẹn sẽ có hiệu quả cao đối với nhiều loại nấm bệnh. Mục tiêu của nghiên cứu này là chế tạo bạc nano ổn định trong chitosan bằng phương pháp chiếu xạ và đánh giá hiệu ứng kháng nấm *P. capsici* của chế phẩm trong điều kiện *in vitro* và *in vivo*.

## II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Bạc nitrate ( $\text{AgNO}_3$ ) tinh khiết, acid lactic, NaOH và môi trường carrot agar (CRA) do Merck (Đức) cung cấp.

- Chitosan 8B với độ deacetyl hóa khoảng 80% do Funakoshi (Tokyo, Nhật Bản) cung cấp.

- Nguồn xạ  $\gamma$ -Co-60 dùng cho chiếu xạ là BRIT-5000 (Ấn Độ).

- Chủng nấm *Phytophthora capsici* do Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh cung cấp.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

Dung dịch chitosan được chuẩn bị bằng cách hòa tan 2 g chitosan trong 80 mL dung dịch lactic acid 2% (v/v) ở pH ~ 3 và để qua đêm. Để chế tạo bạc nano ở kích thước hạt 15 nm, dung dịch bạc nitrate được

cho vào chai thủy tinh có chứa dung dịch chitosan ở pH 3, hỗn hợp được bơm  $\text{N}_2$  trong 15 phút để loại bỏ không khí. Để chế tạo bạc nano ở kích thước hạt 10 và 5 nm, dung dịch chitosan được điều chỉnh về pH ~ 6 sử dụng NaOH 2 M trước khi được bổ sung dung dịch bạc nitrate. Tất cả các mẫu được chiếu xạ ở liều xạ từ 8 - 32 kGy sử dụng nguồn xạ gamma với suất liều 3 kGy/h ở điều kiện nhiệt độ phòng.

Phổ UV-vis của dung dịch bạc nano được đo bằng cách pha loãng dung dịch trong nước cất sao cho nồng độ bạc đạt 0,1 mM, sử dụng máy quang phổ UV-2401PC (Shimadzu, Nhật Bản) với bước sóng từ 200 - 800 nm. Hình ảnh TEM của các hạt bạc nano được chụp sử dụng kính hiển vi điện tử truyền qua (JEM 1010, JEOL, Nhật Bản).

Hoạt tính kháng nấm *P. capsici* của dung dịch bạc nano trong điều kiện *in vitro* được đánh giá bằng phương pháp gây độc môi trường (Stelfox và Herbut, 1979, Cho *et al.*, 2004; Sanpui *et al.*, 2008,). Để xác định ảnh hưởng của kích thước hạt bạc nano đến hoạt tính kháng nấm, khoanh nấm *P. capsici* có đường kính khoảng 3 mm được cấy lên đĩa petri có chứa môi trường CRA đã bổ sung bạc nano ở các kích thước hạt khác nhau 5, 10 và 15 nm với nồng độ bạc là 60 ppm. Các đĩa môi trường CRA sau đó được nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C và tiến hành đo đường kính tán nấm sau 24 - 60 giờ. Hoạt tính kháng nấm được tính theo công thức: Hoạt tính kháng nấm ( $\eta$ ), % =  $100 - (100 \times d/d_0)$ ; trong đó  $d_0$  và  $d$  lần lượt là đường kính tán nấm của mẫu đối chứng và mẫu có bổ sung bạc nano.

Cây tiêu 6 tháng tuổi sạch bệnh được trồng trong chậu trong nhà kính trước khi được thử nghiệm đánh giá hoạt tính kháng nấm *in vivo*. Cây tiêu sau đó được xử lý với dung dịch nano bạc bằng cách phun trực tiếp lên lá và tưới gốc trước và sau khi cây bị gây nhiễm *P. capsici* theo phương pháp được miêu tả bởi Drenth và Guest (2004). Trong thí nghiệm phòng bệnh, cây tiêu được xử lý với dung dịch bạc nano 3 lần, mỗi lần cách nhau 7 ngày với nồng độ bạc sử dụng từ 1 - 10 ppm. Huyền phù nuôi cấy *P. capsici* ở  $10^4$  bào tử/mL được gây nhiễm theo cách tương tự sau 3 ngày. Các cây đã gây nhiễm với nấm bệnh được theo dõi 35 ngày sau khi xử lý, các cây nhiễm bệnh được nhận diện theo triệu chứng được miêu tả bởi Nair *et al.* (2004).

Tất cả thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Kết quả được xử lý thống kê bằng ANOVA. Các kết quả trung bình được so sánh dựa vào mức khác biệt tối thiểu có ý nghĩa (LSD) với sai số 5%.

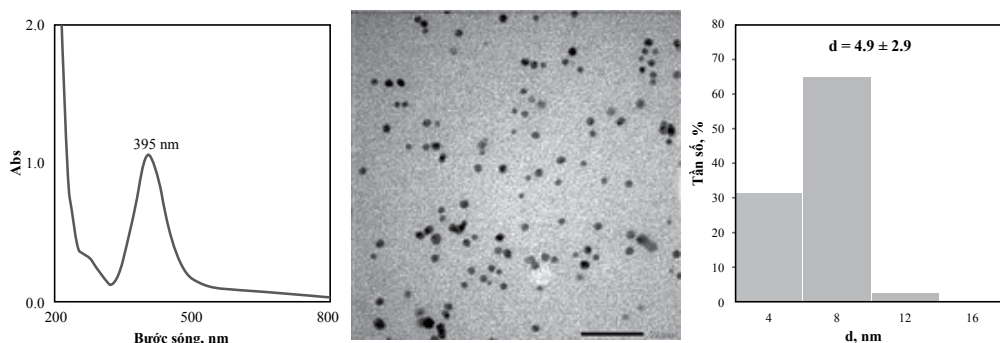
### III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Các đặc trưng của bạc nano chế tạo bằng phương pháp chiếu xạ

Chitosan đã và đang được sử dụng rộng rãi để làm chất khử và chất ổn định trong chế tạo bạc nano. Trong phương pháp khử bằng bức xạ, chitosan sẽ bắt các gốc OH tự do được sinh ra trong quá trình phân giải nước, các phân tử chitosan này sau đó có khả năng khử  $Ag^+$  thành  $Ag^0$  (Chen *et al.*, 2007). Thêm vào đó, cơ chế ổn định của chitosan trong quá trình chế tạo nano bạc đã được chứng minh là do tương tác giữa các gốc  $-NH_2$  với mạch chitosan, các hạt bạc nano bị bao phủ bởi các mạng lưới chitosan này.

Đồng thời, khi tồn tại trong dung dịch, các nhóm  $-NH_2$  của chitosan có xu hướng nhận thêm proton để tạo thành  $NH_3^+$  và sự kết cụm của các hạt bạc nano bị ngăn cản do lực đẩy tĩnh điện giữa các gốc này (Chen *et al.*, 2007). Vì vậy, trong nghiên cứu này, chitosan được sử dụng làm chất ổn định trong quá trình chế tạo dung dịch keo bạc nano.

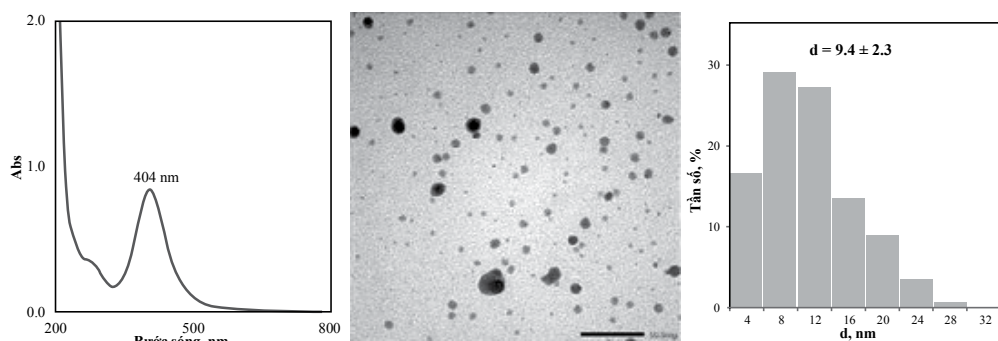
Kết quả ở hình 1 cho thấy giá trị OD của dung dịch keo bạc nano đạt 1,057 ở liều xạ 8 kGy với  $\lambda_{max}$  ở 395 nm, kích thước trung bình của hạt bạc nano là 5 nm. Theo Phu *et al.* (2010), liều xạ 8 kGy là liều bão hòa để chuyển hóa hoàn toàn ion  $Ag^+$  thành  $Ag^0$ .



**Hình 1.** Phổ UV-vis, hình ảnh TEM và phân bố kích thước hạt của dung dịch bạc nano chế tạo từ dung dịch chitosan 1% trong 1% lactic acid (pH 6) và 1 mM bạc nitrate

Kết quả từ hình 2 cho thấy bạc nano với kích thước trung bình 10 nm được chế tạo từ dung dịch

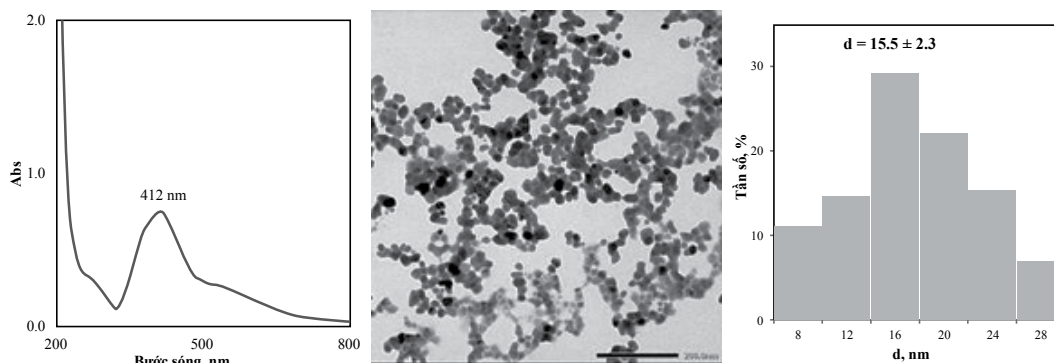
bạc nitrate 10 mM, chiếu xạ ở liều xạ 28 kGy với giá trị OD đạt 0,847 ở  $\lambda_{max}$  404 nm.



**Hình 2.** Phổ UV-vis, hình ảnh TEM và phân bố kích thước hạt của dung dịch bạc nano chế tạo từ dung dịch chitosan 1% trong 1% lactic acid (pH 6) và 10 mM bạc nitrate

Kết quả từ hình 3 cho thấy dung dịch bạc nano với kích thước hạt trung bình 15 nm có giá trị OD đạt 0,754 và  $\lambda_{max}$  đạt 412 nm. Nguyên nhân kích thước hạt trong thí nghiệm này lớn hơn so với khi sử dụng dung dịch bạc nitrate 10 mM là do phản ứng khử từ  $Ag^+$  trở thành  $Ag^0$  không được thuận lợi trong môi trường acid có mật độ  $H^+$  cao (Phu *et*

*al.*, 2010). Hơn thế nữa, nghiên cứu của Sun *et al.* (2010) cũng cho thấy rằng mạch chitosan dễ bị đứt gãy trong môi trường acid, điều này góp phần làm giảm hiệu quả ổn định bạc nano của chitosan. Các sản phẩm sau khi chế tạo được sử dụng để xác định hoạt tính kháng nấm *in vitro* và *in vivo*.



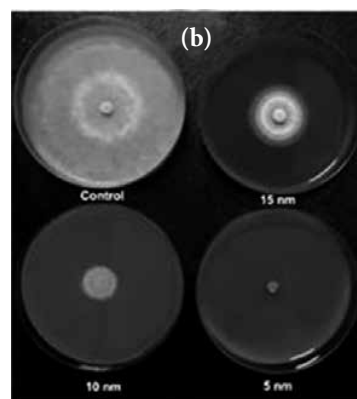
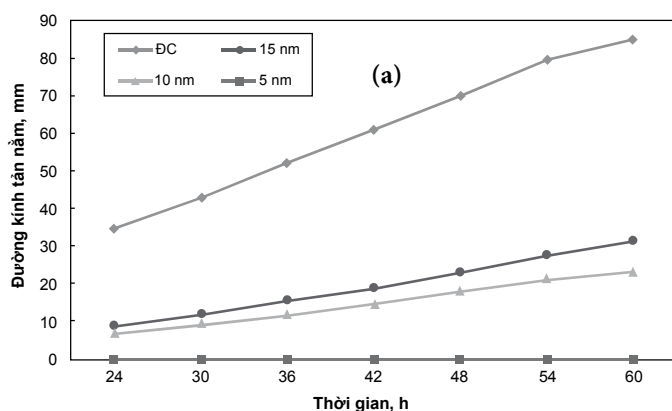
**Hình 3.** Phổ UV-vis, hình ảnh TEM và phân bố kích thước hạt của dung dịch bạc nano chế tạo từ dung dịch chitosan 1% trong 1% lactic acid (pH 3) và 5 mM bạc nitrate

**3.2. Hoạt tính kháng nấm của bạc nano ở các kích thước hạt khác nhau đối với *P. capsici* trong điều kiện *in vitro***

Đã có nhiều nghiên cứu về hiệu quả kháng khuẩn của bạc nano đối với các chủng vi khuẩn khác nhau (Cho *et al.*, 2004), kết quả cho thấy hiệu quả kháng khuẩn phụ thuộc vào kích thước hạt bạc nano. Trong nghiên cứu này, hoạt tính kháng nấm của bạc nano ở các kích thước khác nhau 5, 10 và 15 nm được biểu diễn ở hình 4 và bảng 4. Kết quả cho thấy hoạt tính kháng nấm *P. capsici* tỉ lệ nghịch với kích thước hạt bạc nano, hoạt tính kháng nấm tăng dần khi kích thước hạt giảm dần từ 15 xuống 5 nm.

Cụ thể hơn, bạc nano có kích thước 5 nm có khả

năng ức chế hoàn toàn sự sinh trưởng của nấm *P. capsici* ở nồng độ bạc 60 ppm và hoạt tính kháng nấm này giảm dần xuống còn 72,5% ở kích thước hạt 10 nm và 62,7% ở kích thước hạt 15 nm. Mặc dù bạc nano ở kích thước 5 nm cho hiệu quả kháng nấm tối ưu nhất (đạt 100%), dung dịch keo bạc nano kích thước 5 nm có nồng độ tương đối thấp (chỉ 1 mM), điều này sẽ gặp một số hạn chế khi sản xuất và triển khai ứng dụng của chế phẩm ở quy mô lớn. Trong khi đó, bạc nano ở kích thước 10 nm cũng có khả năng kháng nấm lên đến 72,5% và nồng độ bạc trong chế phẩm có thể lên đến 10 mM (gấp 10 lần). Do đó, bạc nano ở kích thước 10 nm được lựa chọn cho các thí nghiệm tiếp theo trong nghiên cứu này.



**Hình 4.** Hoạt tính kháng nấm của bạc nano ở các kích thước hạt khác nhau đối với *P. capsici* trên môi trường CRA

**3.3. Hoạt tính kháng nấm của nano bạc đối với *P. capsici* trong điều kiện *in vivo***

Đã có nhiều nghiên cứu về hoạt tính kháng vi sinh vật của bạc nano trên nhiều chủng vi khuẩn và nấm khác nhau (Cho *et al.*, 2004; Jo *et al.*, 2009; Phu *et al.*, 2010), tuy nhiên các nghiên cứu trong điều

kiện *in vivo* vẫn còn nhiều hạn chế. Hơn thế nữa, bệnh chết nhanh do nấm *P. capsici* gây ra trên cây hồ tiêu hiện nay đang gây ra nhiều thiệt hại nghiêm trọng (Nair, 2004). Chính vì vậy, trong nghiên cứu này, hiệu quả kháng nấm của bạc nano đối với *P. capsici* được đánh giá trực tiếp trên cây tiêu. Do con

đường lây nhiễm của bệnh thông qua cả môi trường đất lẫn không khí, cây tiêu giống được xử lý với chế phẩm bạc nano ở nồng độ thấp (1 - 10 ppm) thông qua cách phun trực tiếp lên lá và tưới gốc trước khi được gây nhiễm với chủng nấm bệnh nhằm đánh giá khả năng phòng bệnh của chế phẩm. Sau 35 ngày gây nhiễm với nấm bệnh *P. capsici*, các cây bị bệnh được xác định dựa trên các triệu chứng được miêu tả bởi Nair (2004): Bệnh lây lan qua đường lá làm xuất hiện nhiều đốm sẫm màu, có viền đặc trưng, sau đó lan nhanh và dẫn đến hiện tượng rụng lá ngay cả khi các tổn thương chưa lan hết phần phiến lá. Ở chồi non, nấm bệnh tích tụ các bào tử tạo thành mảng trắng bao phủ chồi và xuất hiện hiện tượng héo rũ đột ngột trên cả cây khi bệnh lây lan đến cuống lá. Trong trường hợp bệnh lây qua môi trường đất vào rễ, hiện tượng thối rễ dẫn đến hiện tượng vàng, rụng lá và héo rũ trên cả cây. Bệnh lây lan từ rễ đến phần cổ rễ thông qua rễ chính, là một điểm đặc trưng của bệnh thối rễ chết nhanh. Như vậy kết quả từ bảng 6 và hình cho thấy việc xử lý phòng bệnh với bạc nano có nồng độ từ 1 - 10 nm làm tăng đáng kể tỉ lệ cây sống từ chỉ 9% ở các cây đối chứng lên đến 32% ở cây xử lý với chế phẩm bạc nano 1 ppm, và lên đến 95% ở các cây xử lý chế phẩm bạc nano ở 10 ppm. Nguyên nhân là do ở các cây được xử lý, bạc nano tồn tại bên trong các tế bào giúp tấn công và tiêu diệt các tác nhân gây bệnh khi chúng tiếp xúc với các tế bào ký chủ (Shrivastava *et al.*, 2007). Hơn thế nữa, chitosan được dùng làm chất ổn định bạc nano còn có khả năng kích thích nhiều loại đánh ứng miễn dịch ở các cây được xử lý chế phẩm.

**Bảng 1.** Ảnh hưởng của nồng độ bạc nano đến khả năng kháng bệnh chết nhanh do nấm *P. capsici* của cây tiêu đã được xử lý với bạc nano trước khi gây nhiễm

Nồng độ bạc, ppm	Số cây thử nghiệm	Số cây sống*	Tỉ lệ cây sống, %
0	60	9 <sup>e</sup>	15,0
1	60	32 <sup>d</sup>	53,3
3	60	49 <sup>c</sup>	81,7
5	60	54 <sup>b</sup>	90,0
10	60	57 <sup>a</sup>	95,0

\*Cây không có biểu hiện triệu chứng của bệnh thối rễ chết nhanh sau 35 ngày gây nhiễm với *P. capsici*

#### IV. KẾT LUẬN

Bạc nano ở các kích thước 5, 10 và 15 nm đã được chế tạo thành công bằng phương pháp chiếu xạ tia  $\gamma$ -Co-60 sử dụng chất ổn định chitosan. Bạc

nano chế tạo được cho thấy hoạt tính kháng nấm rất mạnh đối với *P. capsici* trong điều kiện *in vitro*. Bên cạnh đó, bạc nano còn có khả năng giảm thiểu thiệt hại gây ra do bệnh thối rễ chết nhanh (do nấm *P. capsici*) trên cây tiêu, ngay cả khi cây đã bị xâm nhiễm bởi nấm bệnh. Việc xử lý với bạc nano ngay cả ở nồng độ thấp (chỉ khoảng 3 ppm) trước khi cây bị xâm nhiễm bởi nấm bệnh *P. capsici* cũng cho thấy khả năng kháng bệnh, tăng trưởng và phát triển rất tốt, đồng thời giúp giảm chi phí trị bệnh khoảng 10 lần.



**Hình 5.** Hình cây tiêu đã được xử lý bạc nano và sau 20 ngày lây nhiễm với *P. capsici*

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Albersheim, P. and Darvill, A.G., 1985. Oligosaccharins. *Sci. Am.*, 253: 44-50.
- Asharani, P.V., Mun, G.L.K., Hande, M.P., Valiyaveetil, S., 2009. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano*, 3: 279-90.
- Chen, P., Song, L., Lui, Y., Fang, Y., 2007. Synthesis of silver nanoparticles by  $\gamma$ -rays irradiation in acetic water solution containing chitosan. *Rad. Phys. Chem.*, 76: 1165-1168.
- Cho, K.H., Park, J.E., Osaka, T. and Park, S.G., 2004. The study of antimicrobial activity and preservative effects of nanosilver ingredient. *Electrochim. Acta*, 51: 956-960.
- Drenth, A. and Guest, D.I., 2004. *Diversity and Management of Phytophthora in Southeast Asia*. BPA Print Group Pty Ltd, Melbourne, Australia, 235 pp.
- Jo, Y.K., Kim, B.H., Jung, G., 2009. Antifungal activity of silver ions and nanoparticles on *Phytopathogenic fungi*. *Plant Dis.*, 10: 1037-1043.
- Kumar, M.N.V.R., 2001. A review of chitin and chitosan applications. *React. Funct. Polym.*, 46: 1-27.

- Kume, T., Nagasawa, N., Yoshii, F.**, 2002. Utilization of carbohydrates by radiation processing. *Rad. Phys. Chem.*, 63: 625-627.
- Morones, J.R., Elechiguerra, J.L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J.B. and Ramirez, J.T.**, 2005. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 16: 2346-2353.
- Park, H.J., Kim, S.H., Kim, H.J. and Choi, S.H.**, 2006. A new composition of nanosized silica-silver for control of various plant diseases. *Plant Pathol. J.*, 22(3): 295-302.
- Pokhrel, L.R. and Dubey, B.**, 2013. Evaluation of developmental responses of two crop plants exposed to silver and zinc oxide nanoparticles. *Sci. Total Environ.*, 452-453: 321-332.
- Prabhakaran Nair, K.P.**, 2004. *The agronomy and economy of black pepper (Piper nigrum L.) the "king of spices"*. Academic Press, New Delhi, India.
- Phu, D.V., Lang, V.T.K.L., Lan, N.T.K.L., Duy, N.N., Chau, N.D., Du, B.H., Cam, B.D. and Hien, N.Q.**, 2010. Synthesis and antimicrobial effects of colloidal silver nanoparticles in chitosan by  $\gamma$ -irradiation. *J. Exper. Nanosci.*, 5:2: 169-179.
- Rai, M., Yadav, A. and Gade, A.**, 2009. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnol. Adv.*, 27: 76-83.
- Shrivastava, S., Bera, T., Roy, A., Singh, G., Ramachandrarao, P. and Dash, D.**, 2007. Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 18: 103-112.
- Stelfox, D. and Herbut, M.**, 1979. Growth of a *Phytophthora* sp. on carrot agar. *Canadian Plant Dis. Survey*, 59(3): 61-62.
- Sun, C., Qu, R., Chen, H., Ji, C., Wang, C., Sun, Y. and Wang, B.**, 2008. Degradation behavior of chitosan chains in the 'green' synthesis of gold nanoparticles. *Carbohydr. Res.*, 343: 2595-2599.
- Sanpui, P., Murugadoss, A., Prasad, P.V.D., Ghosh, S.S. and Chattopadhyay, A.**, 2008. The antibacterial properties of a novel chitosan-Ag-nanoparticle composite. *Int. J. Food Microbiol.*, 124(2): 142-146.
- Vasyokova, N.I., Zinov'eva, S.V., Il'inskaya, L.I., Perekhod, E.A., Chalenko, G.I., Gerasimova, N.G., Il'ina, A.V., Valamov, V.P. and Ozeretskovskaya, O.L.**, 2001. Modulation of plant resistance to diseases by water-soluble chitosan. *App. Biochem. Microbiol.*, 37: 103-109.
- Xu, J., Zhao, X., Han, X., Du, Y.**, 2007. Antifungal activity of oligochitosan against *Phytophthora capsici* and other plant pathogenic fungi *in vitro*. *Pest. Biochem. Physiol.*, 87 (3): 220-228.

## Study on the antifungal effect of silver nanoparticles synthesized by $\gamma$ -irradiation on *Phytophthora capsici* causing the foot rot disease on pepper plant

Duong Hoa Xo, Le Quang Luan

### Abstract

Silver nanoparticles (AgNPs) have been proved to have strong inhibition activities against many fungal plant pathogens. In this study, the colloidal AgNPs solution with particle sizes of approximate 5, 10 and 15 nm were prepared by  $\gamma$ -rays Co-60 irradiation method using chitosan (1%) as a stabilizer. The inhibition effects of AgNPs against *Phytophthora capsici* (which cause foot rot disease) were also evaluated *in vitro* and *in vivo*. The results showed that the fungal inhibition activities on carrot agar (CRA) media increased with the decrease of the particle size and the inhibition rate varied from 62.7 to 100% corresponding to the AgNPs size from 15 to 5 nm. The results of *in vivo* tests on 6-month-old pepper plants also indicated that the treatment with 1 - 10 ppm AgNPs before spraying with *P. capsici* spores reduced the ratio of diseased plants of 53.3 - 95% compared to that of the untreated control. The AgNPs stabilized in chitosan solution prepared by radiation technique may potentially be used as an antimicrobial agent for protection of peppers because of the environmental-friendly production technology, highly antimicrobial effect and safe use of AgNPs.

**Key words:** Antifungal activity, foot rot disease, pepper plant, *Phytophthora capsici*, silver nanoparticle

Ngày nhận bài: 12/3/2017

Người phản biện: TS. Hà Minh Thanh

Ngày phản biện: 20/3/2017

Ngày duyệt đăng: 24/3/2017

# NGHIÊN CỨU GIẢI PHẪU LÁ CÂY HOA CÚC CẤY MÔ Ở GIAI ĐOẠN VƯỜN ƯƠM VÀ MỘT SỐ BIỆN PHÁP KỸ THUẬT NHÂN GIỐNG

Nguyễn Văn Đình<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Oanh<sup>1</sup>,  
Lê Thu Hằng<sup>1</sup>, La Việt Hồng<sup>1</sup>

## TÓM TẮT

Cây hoa cúc (*Chrysanthemum* sp.) là một trong những loại hoa thương phẩm quan trọng trên thế giới. Trong nghiên cứu này, cây in vitro được huấn luyện ở vườn ươm có kiểm soát độ ẩm, ánh sáng thông qua màng che nilon và lưới cản quang, tỷ lệ sống đạt từ 83,16 đến 91,10%. Trong giai đoạn huấn luyện cây in vitro có một số đặc điểm giải phẫu lá thích ứng với môi trường tự nhiên như tăng độ dày của lá; tăng số lượng khí khổng; lông che chở và giảm kích thước khí khổng. Các chỉ tiêu chiều dài rễ, khối lượng tươi, khối lượng khô của cây hoa cúc tăng nhanh... Cây sinh trưởng phát triển rất tốt. Cây có nguồn gốc cấy mô 60 ngày tuổi được sử dụng làm cây mẹ. Cây mẹ được bấm ngọn và xử lý bằng phun dung dịch Atonik 5 ml/lít để phát sinh chồi bên đồng đều. Chồi bên được xử lý bằng dung dịch  $\alpha$ -NAA 0,5 mg/lít hoặc chế phẩm kích thích ra rễ N3M 20 g/lít để tạo cây con hoàn chỉnh.

**Từ khóa:** Cây hoa Cúc, giải phẫu, nuôi cấy mô, giai đoạn ươm, nhân giống, cây mẹ

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây hoa cúc (*Chrysanthemum* sp.) là một trong những loại hoa cắt cành và trồng chậu quan trọng trên thế giới (Teixeira da Silva, 2014). Nuôi cấy mô thực vật (vi nhân giống) cho phép sản xuất các cây giống chất lượng cao, không nhiễm bệnh và đồng đều mà không phụ thuộc vào thời tiết và mùa vụ. Đã có nhiều công bố ứng dụng công nghệ sinh học nói chung và kỹ thuật nuôi cấy mô nói riêng trên đối tượng cây hoa cúc (Teixeira da Silva, 2014; La Việt Hồng và cs., 2016). Tuy nhiên, hạn chế lớn trong quá trình áp dụng kỹ thuật này để sản xuất cây giống ở quy mô lớn là tỷ lệ chết của cây mô khi được chuyển ra điều kiện tự nhiên là rất cao. Theo Hazarika (2003), Lavanya *et al.* (2009), Deb và Imchen (2010), cây sống trong điều kiện *in vitro* có hình thái, giải phẫu và sinh lý hoàn toàn khác biệt so với cây sống ở ngoài tự nhiên, do vậy, hiệu quả của giai đoạn huấn luyện để cây *in vitro* thích nghi sẽ quyết định đến sự thành công của cả quy trình. Một hạn chế nữa của việc ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy mô là giá thành sản xuất cây giống còn cao, chính vì vậy để giảm giá thành sản xuất cây giống thì phương pháp giảm cành là một lựa.

Ba giống hoa cúc Đò Cờ, Thạch Bích và Chi Vàng thuộc nhóm hoa cúc dạng chùm, kích thước hoa nhỏ và có màu đẹp, được thị trường hoa ưa chuộng. Hiện nay, các giống này được nhân lên bằng phương pháp nhân giảm cành, nhưng do việc nhân giống đã diễn ra trong một thời gian dài nên chất lượng cây mẹ bị thoái hóa. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá một số đặc điểm giải phẫu lá của 3 giống hoa cúc (Đò Cờ, Thạch Bích, Chi Vàng), một số biện pháp nâng cao tỷ lệ sống, chất lượng cây *in vitro* ở

giai đoạn vườn ươm và hoàn thiện quy trình nhân giống hoa cúc bằng phương pháp giảm cành, đảm bảo việc cung cấp giống cho sản xuất với số lượng và chất lượng tốt.

## II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

Ba giống cúc sản xuất: Thạch Bích, Đò Cờ, Chi Vàng (*Chrysanthemum* sp.) dạng cúc chùm, được thu tại xã Đại Thịnh, huyện Mê Linh, thành phố Hà Nội. Mẫu sau đó được lưu giữ dưới dạng cây *in vitro* tại phòng thí nghiệm Sinh lý thực vật, Khoa Sinh - Kỹ thuật Nông nghiệp, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2 (ĐHSP Hà Nội 2).

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

Các thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần nhắc lại. Thí nghiệm được tiến hành trong vườn thực nghiệm sinh học của Khoa Sinh - Kỹ thuật Nông nghiệp, Trường, ĐHSP Hà Nội 2 từ tháng 8/2016 - 2/2017. Khu vực vườn ươm được che bằng 2 lớp lưới cản quang, có hệ thống tưới phun sương.

#### 2.2.1. Tỷ lệ sống, một số chỉ tiêu sinh lý và đặc điểm giải phẫu lá của cây cúc cấy mô giai đoạn huấn luyện

- Thí nghiệm đánh giá tỷ lệ sống và một số chỉ tiêu sinh lý của cây cúc cấy mô giai đoạn huấn luyện

Các cây cúc cấy mô (chiều cao cây: 3 - 4 cm; số lá trên cây: 4 - 6; số rễ/cây: 6 - 8 rễ) của mỗi giống được dùng làm vật liệu thí nghiệm. Theo dõi tỷ lệ sống của mỗi giống được xác định cây sống sót sau 14 ngày. Xác định chỉ tiêu sinh lý: Khối lượng tươi - khô của cây (g), chiều dài rễ (cm) vào các thời điểm 0 ngày (bắt đầu đưa ra vườn ươm), 7 ngày và 14 ngày.

<sup>1</sup> Khoa Sinh - Kỹ thuật Nông nghiệp, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2