

Nghiên cứu hiệu ứng của chế phẩm nano bạc tạo bằng phương pháp chiếu xạ gamma phối trộn với kẽm-EDTA lên nấm *Puccinia spp.* gây bệnh gỉ sắt ở cây hoa cúc

Nguyễn Duy Hạng*, Nguyễn Tấn Mân, Phạm Thị Sâm, Trần Thị Thủy,
Trần Thị Tâm, Nguyễn Trọng Hoàn Phong, Lê Xuân Cường,
Lê Hữu Tư, Lê Văn Toàn, Nguyễn Trường Ly Lan

Viện Nghiên cứu hạt nhân

Ngày nhận bài 2/8/2017; ngày chuyển phản biện 7/8/2017; ngày nhận phản biện 28/9/2017; ngày chấp nhận đăng 12/10/2017

Tóm tắt:

Hiệu ứng của chế phẩm nano bạc tạo bằng phương pháp chiếu xạ gamma phối trộn với kẽm-EDTA tới nấm *Puccinia spp.* gây bệnh gỉ sắt (bệnh cóc) ở cây hoa cúc cũng như khả năng sinh trưởng của cây đã được khảo sát ở điều kiện *in vitro* và điều kiện nhà kính. Kết quả cho thấy, nấm *Puccinia spp.* rất nhạy cảm với chế phẩm nano bạc phối trộn với kẽm-EDTA, nồng độ (3 mg Ag-20 mg Zn/l) ức chế hoàn toàn sự gây bệnh của nấm trên cây hoa cúc. Phun chế phẩm nano bạc phối trộn với kẽm-EDTA làm giảm 100% tỷ lệ bệnh gỉ sắt do nấm *Puccinia spp.* gây ra và làm cho cây hoa cúc sinh trưởng tốt hơn. Nghiên cứu mở ra hướng ứng dụng mới, sử dụng chế phẩm nano bạc-kẽm-EDTA thay thế cho các loại thuốc hóa học để phòng bệnh gỉ sắt cho cây hoa cúc Đà Lạt.

Từ khóa: Bệnh cóc, bệnh gỉ sắt, cây hoa cúc, kẽm-EDTA, nano bạc, *Puccinia spp.*

Chỉ số phân loại: 2.9

Mở đầu

Bệnh gỉ sắt (bệnh cóc) là một trong những bệnh hại chính trên cây hoa cúc, nguyên nhân là do nấm *Puccinia chrysanthemi* và *Puccinia horiana* gây ra. Bệnh gỉ sắt ảnh hưởng đến khả năng quang hợp của cây, do đó làm giảm năng suất cũng như chất lượng hoa [1-4]. Hiện tại, nhiều loại thuốc bảo vệ thực vật như Daconil, Nativo... đã được sử dụng để diệt trừ loại nấm bệnh này [5] nhưng hiệu quả phòng trừ vẫn còn hạn chế, gây ô nhiễm môi trường và đặc biệt giá thành của chúng khá cao. Nano bạc chế tạo bằng phương pháp chiếu xạ gamma đã được nghiên cứu ứng dụng để phòng trừ vi rút, vi khuẩn và vi nấm gây hại [6]. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh tính hiệu quả của nano bạc trong phòng trừ bệnh cho cây trồng [6, 7]. Tuy nhiên, phối trộn nano bạc với một vài nguyên tố dinh dưỡng để tạo ra chế phẩm có khả năng phòng trừ bệnh, tăng khả năng sinh trưởng

cho cây hiện vẫn chưa được công bố. Vì lý do đó, nghiên cứu này được thực hiện nhằm khảo sát khả năng ức chế nấm *Puccinia spp.* gây bệnh gỉ sắt trên cây hoa cúc của chế phẩm nano bạc tạo bằng phương pháp chiếu xạ phối trộn với kẽm-EDTA cũng như đánh giá sự sinh trưởng của cây hoa cúc Đà Lạt được xử lý bằng chế phẩm này.

Nội dung nghiên cứu

Đối tượng

- Các hóa chất được sử dụng để điều chế chế phẩm nano bạc phối trộn với kẽm là bạc nitrat (AgNO_3), chitosan, axit acetic (CH_3COOH), ammonium hydroxid (NH_4OH) và Zn-EDTA.

- Chủng vi nấm *Puccinia spp.* sử dụng trong thực nghiệm là chủng vi nấm gây bệnh gỉ sắt, được nhân nuôi trực tiếp trên cây hoa cúc tại vườn thực nghiệm, Trung tâm Công nghệ Bức xạ, Viện Nghiên cứu hạt nhân.

- Giống hoa cúc Vạn Thọ sử dụng

trong thực nghiệm được nhân giống bằng phương pháp giâm cành tại Làng hoa Hà Đông, Đà Lạt, Lâm Đồng.

Phương pháp

- Nano bạc được điều chế bằng phương pháp chiếu xạ gamma Co-60: Dung dịch 2,5 mM AgNO_3 được chiếu xạ trên nguồn gamma Co-60 (GC-5000) với liều xạ 12 kGy, suất liều 2,3 kGy/giờ. Dung dịch nano bạc sử dụng trong thực nghiệm có các đặc trưng sau: Hạt nano bạc có kích thước trung bình 10 nm, hàm lượng bạc trong dung dịch 0,25 mg/ml.

- Zn-EDTA được phối trộn với dung dịch nano bạc tạo chế phẩm nano Ag-Zn.EDTA.

- Đánh giá hiệu quả kháng nấm *Puccinia spp.* của chế phẩm nano Ag-Zn.EDTA trong điều kiện phòng thí nghiệm (*in vitro*): Nấm *Puccinia spp.* được nhân nuôi trên lá cúc; lá cúc đã nhiễm nấm gỉ sắt được nhúng vào dung dịch nano Ag-Zn.EDTA với hàm

* Tác giả liên hệ; Tel: 0263.3823222; Email: nguyenduyhang7@yahoo.com

Study on the effect of nano-silver synthesized by gamma radiation in combination with zinc-EDTA on chrysanthemum white rust caused by *Puccinia spp.* in chrysanthemum

Duy Hang Nguyen*, Tan Man Nguyen, Thi Sam Pham, Thi Thuy Tran, Thi Tam Tran, Trong Hoanh Phong Nguyen, Xuan Cuong Le, Huu Tu Le, Van Toan Le, Tuong Ly Lan Nguyen

Nuclear Research Institute

Received 2 August 2017; accepted 12 October 2017

Abstract:

Antifungal effects of nano-silver synthesized by gamma radiation in combination with zinc-EDTA on *Puccinia spp.*, the causal agent of the chrysanthemum white rust disease, were investigated. The effect of nano-silver in combination with zinc-EDTA on the growth of chrysanthemum plant and the chrysanthemum white rust control was experimented in vitro and under greenhouse condition. The results showed that nano-silver with zinc-EDTA strongly inhibited the chrysanthemum white rust causal pathogen *Puccinia spp.* When nano-silver with zinc-EDTA was applied as a fungicide, the chrysanthemum white rust incidence in chrysanthemum reduced by 100%, and growth parameters of chrysanthemum plants significantly increased as compared to the corresponding control. The objective of this study was to evaluate the effect of nano-silver synthesized by gamma radiation in combination with zinc-EDTA on the chrysanthemum plant growth promotion and control of the chrysanthemum white rust disease in chrysanthemum.

Keywords: Antifungal, chrysanthemum, chrysanthemum white rust, nano-silver, *Puccinia spp.*, zinc-EDTA.

Classification number: 2.9

lượng Ag-Zn (mg/ml) khác nhau: 0-0 (mg/ml); 1-20 (mg/ml); 3-20 (mg/ml); 5-20 (mg/ml) và 10-20 (mg/ml). Sau đó, lá cúc được nuôi ủ trên giá thể vôi có độ ẩm 100% ở nhiệt độ 25°C. Hiệu quả kháng nấm *Puccinia spp.* của dung dịch Ag-Zn.EDTA được đánh giá bằng phương pháp đếm số nốt gỉ sắt (mụn cóc) trên lá cúc sau 10 ngày xử lý chế phẩm.

- Đánh giá hiệu quả kháng nấm *Puccinia spp.* của chế phẩm nano Ag-Zn.EDTA trên cây hoa cúc trong điều kiện nhà kính (ngoài đồng ruộng):

+ **Thực nghiệm 1:** Phun bào tử nấm *Puccinia spp.* lên cây hoa cúc, ủ vào buồng ẩm khoảng 3 ngày. Sau khi mầm bệnh xuất hiện ở mặt dưới của lá, chế phẩm nano Ag-Zn.EDTA được phun với hàm lượng bạc-kẽm theo từng lô



Hình 1. Nuôi ủ lá cúc bị bệnh nấm cóc trong điều kiện phòng thí nghiệm.

thực nghiệm như sau: Lô 1 (phun Ag 1 ppm-Zn 20 ppm), lô 2 (phun Ag 3 ppm-Zn 20 ppm), lô 3 (phun Ag 5 ppm-Zn 20 ppm), lô 4 (phun Ag 0 ppm-Zn 20 ppm), lô 5 (phun thuốc Daconil, 1 ml/l), lô 6 (phun nước). Theo dõi, xác định nồng độ chế phẩm thích hợp có khả năng ức chế nấm *Puccinia spp.*

+ **Thực nghiệm 2:** Phun bào tử nấm *Puccinia spp.* lên cây hoa cúc và phun chế phẩm nano Ag-Zn với liều lượng gây ức chế bệnh đã được chọn ở thực nghiệm trước, sau đó ủ vào buồng ẩm 3 ngày; các lô thực nghiệm được phun như sau: Lô 7 phun chế phẩm nano Ag-Zn.EDTA; lô 8 phun thuốc Daconil (1 ml/l); lô 9 phun Zn-EDTA (20 mg/l); lô 10 (không gây nhiễm bệnh, phun chế phẩm nano Ag-Zn.EDTA).

+ **Thực nghiệm 3:** Không gây nhiễm bệnh gỉ sắt, phun chế phẩm với liều lượng gây ức chế bệnh gỉ sắt đã được chọn ở thí nghiệm trước. Lô A (cây hoa cúc không gây nhiễm, phun nước); lô B (cây hoa cúc không gây nhiễm, phun chế phẩm nano Ag-Zn.EDTA); lô C (cây hoa cúc không gây nhiễm, phun thuốc Daconil 1 ml/l).

- Đếm số nốt gỉ sắt trên lá cúc bị bệnh (nốt gỉ sắt bị chết và nốt gỉ sắt không phát triển) và so sánh với số nốt gỉ sắt ở lá cúc không xử lý chế phẩm. Các chỉ số sinh trưởng của cây hoa cúc như chiều cao cây, số lá, kích thước lá... cũng được đánh giá ở tất cả các lô thí nghiệm.

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



Kết quả và thảo luận

Ảnh hưởng của chế phẩm nano Ag-Zn.EDTA lên nấm *Puccinia spp.* gây bệnh gỉ sắt trên lá cúc trong điều kiện phòng thí nghiệm

Kết quả ở bảng 1 cho thấy nấm *Puccinia spp.* bị ức chế phát triển sau 10 ngày xử lý chế phẩm. Số mụn cóc bị chết 77,8% khi xử lý với liều lượng 1-20 (Ag-Zn) mg/l. Ở liều lượng (Ag-Zn) cao hơn số mụn cóc bị ức chế hoàn toàn (100%).

Tuy nhiên khi xử lý lá cúc bằng chế phẩm nano Ag-Zn.EDTA với hàm lượng 10-20 (Ag-Zn) mg/l gây tổn thương lớp tế bào biểu bì và làm cho sắc tố lá bị biến đổi. Ở hàm lượng 3-20 (Ag-Zn) mg/l không ảnh hưởng đến tế bào và sắc tố lá (hình 2).

Ảnh hưởng của chế phẩm nano Ag-Zn.EDTA lên nấm *Puccinia spp.* gây bệnh gỉ sắt trên cây hoa cúc trồng trong nhà kính

Khảo sát sự ảnh hưởng của chế phẩm nano Ag-Zn.EDTA lên nấm *Puccinia spp.* được gây nhiễm trực tiếp trên cây hoa cúc trồng trong điều kiện nhà kính (phun chế phẩm khi bệnh gỉ sắt bắt đầu xuất hiện ở lá):

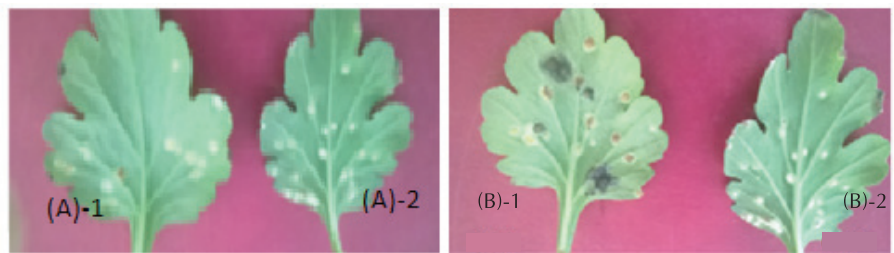
Ở phần thực nghiệm này, cây hoa cúc được gây nhiễm bệnh bằng cách phun dịch sinh khối bào tử nấm *Puccinia spp.* lên cây hoa cúc. Sau 8 ngày gây nhiễm khi mầm bệnh bắt đầu xuất hiện ở lá, cây hoa cúc được phun chế phẩm nano Ag-Zn.EDTA với liều lượng bạc-kẽm có trong dung dịch như miêu tả trong phần phương pháp. Kết quả thực nghiệm được minh họa ở hình 3.

Hình 3 cho thấy lô thí nghiệm xử lý bằng nước số mụn cóc xuất hiện sau 40 ngày gây nhiễm là 8,33 mụn cóc/lá; lô thí nghiệm xử lý bằng dung dịch Zn-EDTA số mụn cóc trên lá là 0,99

Bảng 1. Ảnh hưởng của chế phẩm nano Ag-Zn.EDTA lên sự phát triển của nấm *Puccinia spp.* gây bệnh gỉ sắt trên cây hoa cúc (sau 10 ngày xử lý).

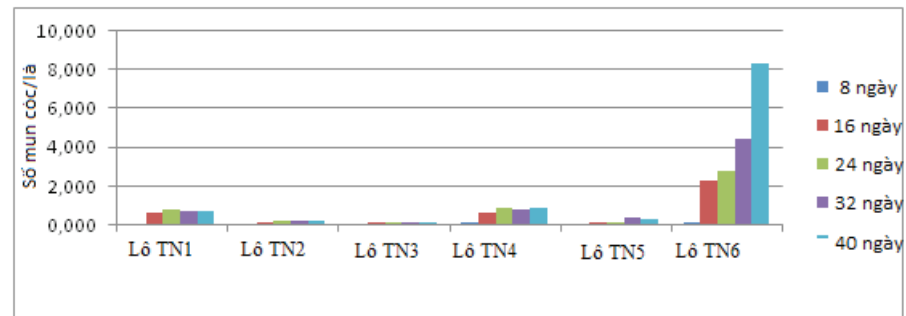
Nồng độ Ag-Zn (mg/l)	Số mụn cóc trước xử lý	Số mụn cóc chết sau xử lý	% số mụn cóc bị ức chế
0-0	75,0	00,0	00,0 ^c
1-20	72,0	56,0	77,8 ^b
3-20	73,0	73,0	100,0 ^a
5-20	72,0	72,0	100,0 ^a
10-20	74,0	74,0	100,0 ^a

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



(A)-1 nấm cóc sau xử lý bằng chế phẩm nanoAg(3mg/l)-Zn(20mg/l)
 (A)-2 nấm cóc sau xử lý bằng nước
 (B)-1 nấm cóc sau xử lý bằng chế phẩm nanoAg(10mg/l)-Zn(20mg/l)
 (B)-2 nấm cóc sau xử lý bằng nước

Hình 2. Ảnh hưởng của chế phẩm nano Ag-Zn.EDTA lên sự phát triển của nấm gỉ sắt (nấm cóc) trên lá cúc.



Hình 3. Sự phát triển của nấm gỉ sắt *Puccinia spp.* trên cây hoa cúc sau khi xử lý chế phẩm nano Ag-Zn.EDTA.

mụn cóc/lá. Ở các lô thực nghiệm xử lý bằng dung dịch nano Ag-Zn.EDTA (lô 2 và lô 3) tương ứng với nồng độ Ag 3 mg/l và 5 mg/l, số mụn cóc xuất hiện trên lá sau 40 ngày xử lý là 0,26 mụn cóc/lá và 0,14 mụn cóc/lá. Kết quả thu được chứng tỏ hai lô thí nghiệm này có hiệu ứng tương đương. Lô 5 xử lý thuốc Daconil có hiệu ứng

tương đương với lô 3. Lô 1 cho hiệu quả thấp hơn, số mụn cóc xuất hiện là 0,71 mụn cóc/lá sau 40 ngày xử lý.

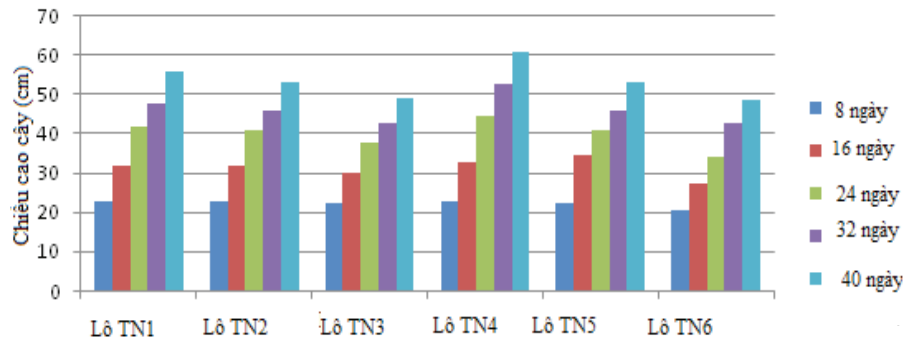
Khảo sát sự ảnh hưởng của chế phẩm nano Ag-Zn.EDTA lên sự sinh trưởng của cây hoa cúc trồng trong điều kiện nhà kính:

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của chế

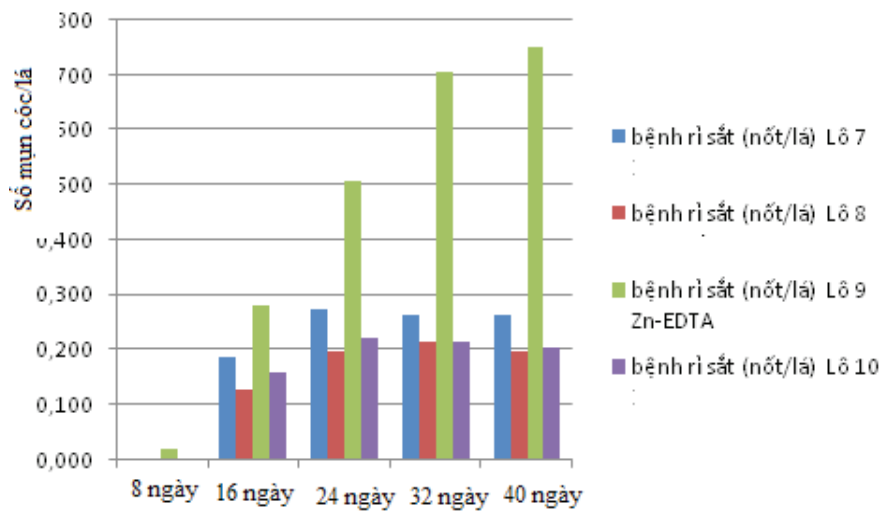
phẩm nano Ag-Zn.EDTA lên chiều cao của cây hoa cúc được thể hiện ở hình 4. Sau 40 ngày nuôi trồng trong nhà kính, cây hoa cúc ở lô thí nghiệm bằng dung dịch Zn-EDTA có chiều cao cây trung bình là 61,0 cm; lô xử lý bằng nước có chiều cao thấp nhất (48,60 cm), còn lô 1 (Ag 1 mg-Zn 20 mg/l) và lô 2 (Ag 3 mg-Zn 20 mg/l) thì giá trị này là 56,07 cm và 53,40 cm. Ở lô 3 (Ag 5 mg/l-Zn 20 mg/l) cây có chiều cao trung bình là 49,13 cm, tương đương với chiều cao cây ở lô 6 (xử lý bằng nước). Như vậy, Zn.EDTA có tác dụng làm cho cây hoa cúc sinh trưởng tốt hơn. So sánh cây hoa cúc xử lý bằng dung dịch nano Ag-Zn.EDTA (Ag 5 mg/l-Zn 20 mg/l) với cây hoa cúc xử lý bằng dung dịch nano Ag không có Zn.EDTA (Ag 5 mg/l) thì chiều cao của cây hoa cúc xử lý không có Zn.EDTA giảm, lùn, lá nhỏ (số liệu không trình bày trong bài báo này). Như vậy, cây hoa cúc sau khi xử lý bằng chế phẩm nano Ag-Zn.EDTA với hàm lượng (Ag 5 mg/l-Zn 20 mg/l) không ảnh hưởng đến sự phát triển chiều cao của cây mà còn có hiệu ứng ức chế mạnh sự phát triển của nấm *Puccinia spp.*

Khảo sát sự ảnh hưởng của chế phẩm nano Ag-Zn.EDTA lên nấm *Puccinia spp.* được gây nhiễm trực tiếp trên cây hoa cúc trồng trong điều kiện nhà kính (phun chế phẩm sau khi gây nhiễm bào tử nấm, mụn cóc chưa xuất hiện):

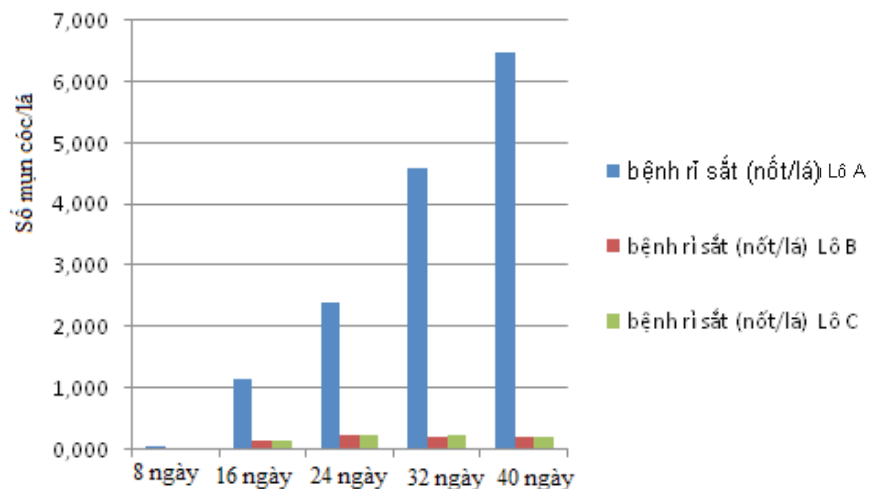
Kết quả thực nghiệm phun chế phẩm sau khi gây nhiễm bào tử nấm lên cây hoa cúc được thể hiện ở hình 5. Sau 8 ngày phun chế phẩm nano Ag-Zn.EDTA với hàm lượng 3-20 (Ag-Zn) mg/l, bào tử nấm bị ức chế không nảy mầm phát triển thành mụn cóc; còn ở lô thực nghiệm phun bằng dung dịch Zn.EDTA thì bào tử *Puccinia spp.* nảy mầm tạo số mụn cóc trên lá 0,02 mụn cóc/lá. Như vậy thực nghiệm này cho thấy chế phẩm nano Ag-Zn.EDTA



Hình 4. Sự phát triển chiều cao của cây hoa cúc sau xử lý chế phẩm nano Ag-Zn.EDTA.



Hình 5. Sự phát triển của nấm *Puccinia spp.* trên cây hoa cúc sau khi gây nhiễm và phun chế phẩm nano Ag-Zn.EDTA.



Hình 6. Sự phát triển của nấm gỉ sắt *Puccinia spp.* trên cây hoa cúc được phun chế phẩm nano Ag-Zn.EDTA.

có khả năng ức chế sự nảy mầm bào tử, ngăn cản sự lây lan bào tử nấm *Puccinia spp.* gây hại cho cây hoa cúc.

Khảo sát hiệu ứng phòng bệnh nấm gỉ sắt Puccinia spp. ở cây hoa cúc bằng chế phẩm nano Ag-Zn.EDTA:

Trong thực nghiệm này cây hoa cúc được phun chế phẩm nano Ag-Zn.EDTA để đánh giá hiệu ứng phòng bệnh. Lô A (không phun chế phẩm nano Ag-Zn.EDTA, phun nước); lô B (phun chế phẩm nano Ag-Zn.EDTA); lô C (phun thuốc Daconil 1 ml/l). Kết quả được minh họa ở hình 6 cho thấy cây hoa cúc được phun chế phẩm nano Ag-Zn.EDTA thì bệnh gỉ sắt không xuất hiện, cây hoa cúc sinh trưởng tốt. Cây không phun chế phẩm nano Ag-Zn.EDTA bệnh gỉ sắt phát triển mạnh. Như vậy, có thể sử dụng chế phẩm này thay cho thuốc Daconil để phòng bệnh gỉ sắt cho cây hoa cúc.

Kết luận

Chế phẩm nano Ag tạo bằng phương pháp chiếu xạ gamma phối

trộn với Zn-EDTA là chế phẩm có hiệu quả trong phòng và trị bệnh gỉ sắt (bệnh cóc) ở cây hoa cúc. Chế phẩm không những không làm ảnh hưởng đến khả năng sinh trưởng của cây hoa mà còn giúp sinh trưởng mạnh hơn. Nghiên cứu cho thấy chế phẩm nano Ag-Zn.EDTA có khả năng thay thế cho một vài loại thuốc hóa học như Daconil, Nativo, Macozeb... đang sử dụng hiện nay.

LỜI CẢM ƠN

Tập thể tác giả xin trân trọng cảm ơn Bộ Khoa học và Công nghệ, Viện Năng lượng Nguyên tử Việt Nam đã hỗ trợ thực hiện nghiên cứu thông qua Dự án sản xuất thử nghiệm mã số DASXTN.01/16/VNCHN.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] M.R. Bonde, C.A. Murphy, et al. (2015), "Evidence for systemic infection by *Puccinia horiana*, Causal agent of *Chrysanthemum white rust*", *Chrysanthemum. Phytopathology*, **105**, pp.91-98.
- [2] P. Chen, L. Song, Y. Liu and Y. Feng

(2007), "Synthesis of silver nanoparticles by γ -ray irradiation in acetic acid solution containing chitosan", *Radiation Physics and Chemistry*, **76**, pp.1165-1168.

- [3] R. Yoksan, S. Chirachanchai (2009), "Silver nanoparticles dispersing in chitosan solution: Preparation by γ -ray irradiation and their antimicrobial activities", *Materials Chemistry and Physics*, **115**, pp.296-302.

- [4] T. Noma, M. Colurga-Garcia, M. Brewer (2010), *Chrysanthemum white rust (Puccinia horiana)*, Michigan Department of Agriculture. Michigan State University.

- [5] H. McCain, Karen Gonot (1979), *Fungicide for control of Chrysanthemum rust*, California Agriculture.

- [6] D. Long, G. Wu, S. Chen (2007), "Preparation of oligochitosan stabilized silver nanoparticles by gamma irradiation", *Radiation Physics and Chemistry*, **76**, pp.1126-1131.

- [7] Jin Hee Jung, Sang Woo Kim, Ji Seon Min, Young Jae Kim, Kabir Lamsal, Kyoung Su Kim, Youn Su Lee (2010), "The Effect of Nano-Silver Liquid against the White Rot of the Green Onion Caused by *Sclerotium cepivorum*", *The Korean Society of Mycology, Microbiology*, **38(1)**, pp.39-45.