

ĐẠI HỌC HUẾ
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

NGUYỄN QUANG HOÀNG VŨ

NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA VẬT LIỆU
NANO BẠC ĐẾN MỘT SỐ BỆNH HẠI TRÊN
CÂY SEN (*Nelumbo nucifera*) TRỒNG
Ở THỪA THIÊN HUẾ

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

Chuyên ngành: Sinh học

Mã số: 9420101

Huế, 2025

ĐẠI HỌC HUẾ
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

NGUYỄN QUANG HOÀNG VŨ

NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA VẬT LIỆU
NANO BẠC ĐẾN MỘT SỐ BỆNH HẠI TRÊN
CÂY SEN (*Nelumbo nucifera*) TRỒNG
Ở THỪA THIÊN HUẾ

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC
Chuyên ngành: Sinh học
Mã số: 9420101

Người hướng dẫn khoa học
PGS.TS. HOÀNG THỊ KIM HỒNG
TS. HOÀNG TẤN QUẢNG

Huế, 2025

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH/BÀI BÁO CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

- [1]. **Nguyễn Quang Hoàng Vũ, Hoàng Tấn Quảng, Hoàng Thị Kim Hồng (2021). Hiệu quả kháng nấm của vật liệu nano bạc lên nấm *Curvularia lunata* gây bệnh đốm lá phân lập trên giống sen trắng (*Nelumbo nucifera*) trồng tại Thừa Thiên Huế. Báo cáo đăng toàn văn tại Hội nghị khoa học toàn quốc về Công nghệ sinh học, trang 861 – 867.**
- [2]. **Vu Nguyen Quang Hoang, Quang Hoang Tan, Hong Hoang Thi Kim, Agaric Sakae (2022). Microbiology associated with disease on white lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) and application of silver nanoparticles for controlling plant pathogens *in vitro*. Faculty of Agriculture, Kyushu University, 67 (2), 165–172. <https://doi.org/10.5109/4797823>.**
- [3]. **Vu Quang Hoang Nguyen, Tram Thi Ngoc Tran, Lan Thuy Tran, Thi Thi Diem Pham, Quang Tan Hoang, Hong Thi Kim Hoang (2023). *Neofusicoccum parvum*: a novel pathogen species causing wilted leaves and dieback petioles on lotus (*Nelumbo nucifera*) in Thua Thien Hue, Vietnam. Hue University Journal of Science: Agriculture and Rural Development. Vol. 132, No. 3C, 2023, pp. 51–67, <https://doi.org/10.26459/hueunijard.v132i3C.7275>**
- [4]. **Vu Quang Hoang Nguyen, Quang Tan Hoang, Lan Thuy Tran, Tram Tran Thi Ngoc, Hoang Thi Kim Hong (2024). Molecular phylogeny of *Lasiodiplodia theobromae* associated with *Nelumbo nucifera* in Thua Thien Hue, Vietnam, and their sensitivity to silver nanoparticles. Báo cáo toàn văn Hội nghị khoa học toàn quốc về Công nghệ sinh học, pp. 1135-1141**
- [5]. **Vu Quang Hoang Nguyen, Thi Thi Diem Pham, Lan Thuy Tran, Tram Thi Ngoc Tran, Hoang Tan Quang, Hoang Thi Kim Hong (2025). First report of *Colletotrichum plurivorum* causing anthracnose on the aquatic plant (*Nelumbo nucifera*) from Vietnam. Journal of Phytopathology 173, No. 5: e70177. <https://doi.org/10.1111/jph.70177>**

MỞ ĐẦU

Sen (*Nelumbo nucifera*) một loài hoa đẹp, thanh khiết, là biểu tượng gắn liền với Phật Giáo cũng như văn hóa và lịch sử. Bên cạnh đó, cây sen còn mang nhiều giá trị kinh tế gắn liền với sự đa dạng sản phẩm đặc sản địa phương và các yếu tố liên quan đến cảnh quan sinh thái. Tất cả các bộ phận của cây sen từ hoa, lá cho đến ngó sen, gương sen và hạt sen đều được sử dụng để làm món ăn và vị thuốc có giá trị trong y học cổ truyền (Pokhrel et al., 2022; Sharma et al., 2017). Hạt sen và củ sen là hai bộ phận được sử dụng phổ biến nhất, từ lâu cũng được dùng trong chế biến thực phẩm hay thức uống như trà thảo mộc. Các hợp chất có hoạt tính sinh học cao như alkaloid, flavonoid, triterpenoid, vitamin có trong hoa, lá, hạt và củ sen có tác dụng lớn trong cải thiện các vấn đề về sức khỏe con người như chống viêm, hoạt tính chống oxy hóa cao cũng được ghi nhận ở các báo cáo gần đây (Chen et al., 2018; Lin et al., 2023; Liu et al., 2015; Zheng et al., 2016).

Sản xuất nông nghiệp liên tục bị ảnh hưởng bởi rất nhiều các mối đe dọa, tác động bởi nhiều loại mầm bệnh thực vật khác nhau dẫn đến thiệt hại lớn về năng suất và kinh tế, với con số ước tính xấp xỉ 25-30% (Gai & Wang, 2024). Ở Thừa Thiên Huế, cây sen được trồng tập trung trong các ao, hồ ở cả Nội thành và ngoại thành như một tập quán truyền thống có từ lâu đời. Tuy nhiên, trong quá trình trồng, canh tác sen ghi nhận nhiều bệnh hại gây thiệt hại lớn về cả chất lượng, sản lượng, ảnh hưởng trực tiếp đến các hộ nông dân trồng và kinh doanh về sen. Năm 2019, một số diện tích sen ở các địa phương có hiện tượng chết, bệnh với tỷ lệ lớn (có nhiều vùng tỷ lệ chết lên đến 50 - 70%). Phương thức xử lý được áp dụng phổ biến hiện nay là sử dụng thuốc diệt nấm, thuốc trừ sâu. Tuy nhiên, cường độ sử dụng và phổ hoạt động hẹp của hầu hết các loại thuốc diệt nấm tổng hợp là dẫn đến các vấn đề về kháng thuốc và gia tăng chi phí xử lý môi trường do dư lượng thuốc còn lại trong môi trường.

Nhiều giải pháp chiến lược, đổi mới công nghệ tiên tiến được đưa ra để giảm thiểu những thiệt hại. Trong đó, công nghệ nano đang nổi lên, thu hút sự quan tâm của các nhà khoa học với tiềm năng ứng dụng, cách mạng hóa mạnh mẽ nhiều lĩnh vực như khoa học, công nghệ, y học và nông nghiệp nhờ các đặc tính lý hóa độc đáo, diện tích bề mặt tác động lớn, khả năng phản ứng cao (Siddiqui et al., 2015). Hiện nay, việc phát triển và ứng dụng các hạt nano sinh tổng hợp đã mở ra con đường mới trong nghiên cứu nông nghiệp hướng tới phát triển các phương pháp kiểm soát bệnh cây thân thiện với môi trường và hiệu quả. Trong các vật liệu nano, nano bạc (AgNPs) với đặc tính kháng đặc trưng và diện tích bề mặt lớn đã được minh chứng và tăng hiệu quả ở liều thấp, hứa hẹn sẽ cung cấp một giải pháp thay thế phù hợp, thân thiện với môi trường (Roy et al., 2013; Zhang et al., 2016). Như vậy, việc ứng dụng các vật liệu nano được kỳ vọng sẽ đóng một vai trò như một giải pháp đầy hứa hẹn trong việc giải quyết thách thức này. Nhằm mục tiêu chung là thúc đẩy tính hiệu quả và tính bền vững của các hoạt động nông nghiệp đòi hỏi ít đầu vào, tạo ra ít chất thải, vật chất thừa so với phương pháp truyền thống.

Xuất phát từ những nhu cầu thực tiễn nêu trên, đề tài “**Nghiên cứu ảnh hưởng của vật liệu nano bạc đến một số bệnh hại trên cây sen (*Nelumbo nucifera*) trồng ở Thừa Thiên Huế**” được tiến hành nhằm xác định các tác nhân gây hại và đánh giá hiệu quả của nano bạc trong việc phòng chống các tác nhân gây hại trên cây sen.

2. MỤC TIÊU CỦA NGHIÊN CỨU

2.1. Mục tiêu chung:

- Đánh giá được ảnh hưởng nano bạc đến các tác nhân gây hại trên cây sen trồng ở Thành phố Huế.

2.2. Mục tiêu cụ thể:

- Phân lập, định danh được các tác nhân nấm gây hại trên cây sen.
- Đánh giá được hiệu lực ức chế và các tác động ảnh hưởng của nano bạc lên các đối tượng gây hại trên cây sen trồng ở Thành phố Huế trong điều kiện phòng thí nghiệm.

3. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHẠM VI NGHIÊN CỨU

3.1. Đối tượng nghiên cứu: Những tác động của nano bạc lên các đến (hiệu lực ức chế khả năng sinh trưởng, đặc điểm hình thái, tính toàn vẹn màng tế bào, biến động sinh hóa) các tác nhân nấm gây hại trên cây sen trồng ở Thành phố Huế.

3.2. Phạm vi nghiên cứu

- **Phạm vi thời gian:** Luận án được thực hiện từ tháng 01/2021 đến tháng 04/2025
- **Phạm vi đối tượng:** Tập trung vào các tác nhân gây hại (nấm) trên lá của 2 giống sen: sen trắng Huế và sen hồng Cao sản (sen hồng Đồng Tháp).
- **Phạm vi không gian:** Quá trình khảo sát, điều tra, thu mẫu bệnh sen tiến hành tại điểm trồng sen đặc trưng ở Thành phố Huế* (Quận Phú Xuân, Quận Thuận Hóa và các huyện Hương Trà, Hương Thủy, Phong Điền, Phú Lộc). Quá trình phân lập, đánh giá các ảnh hưởng của vật liệu nano bạc được tiến hành tại Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế

4. Ý NGHĨA KHOA HỌC VÀ THỰC TIỄN CỦA ĐỀ TÀI

4.1. Ý nghĩa khoa học

Kết quả nghiên cứu của đề tài sẽ cung cấp dẫn liệu khoa học mới có tính hệ thống và có giá trị về phân loại học của các tác nhân gây hại trên cây sen trồng ở Thành phố Huế, từ đó làm rõ sự đa dạng về chủng loại và phân bố của các tác nhân nấm gây hại trên cây sen, đóng góp bổ sung dữ liệu hệ thống học và sinh thái học cho nhóm nấm gây bệnh trên cây trồng tại Thành phố Huế cũng như Việt Nam. Nghiên cứu cung cấp dữ liệu quan trọng về hiệu quả kháng nấm của nano bạc, cơ chế sinh hóa mà nano bạc tác động lên từng đối tượng nấm gây hại góp phần mở rộng hiểu biết về cơ chế kháng nấm của các nano bạc. Làm nguồn thông tin, tài liệu tham khảo cho việc ứng dụng nano bạc trong phòng chống, quản lý bệnh hại trên cây sen.

4.2. Ý nghĩa thực tiễn

Nghiên cứu cung cấp cơ sở khoa học để ứng dụng nano bạc làm chất kháng nấm hiệu quả trong quản lý bệnh hại trên cây sen, giúp giảm thiểu việc sử dụng thuốc bảo vệ thực vật hóa học truyền thống, từ đó góp phần bảo vệ môi trường. Việc xác định các chỉ số nồng độ ức chế tối thiểu, nồng độ diệt nấm tối thiểu và EC_{50} giúp định hướng lựa chọn liều lượng nano bạc phù hợp, tối ưu hóa hiệu quả phòng chống nấm gây hại và giảm thiểu nguy cơ phát sinh kháng thuốc.

Kết quả nghiên cứu cho thấy nano bạc có tính đặc hiệu cao đối với các chủng nấm gây hại trên cây sen, góp phần nâng cao năng suất và chất lượng cây trồng. Từ đó, mở ra hướng đi mới trong việc ứng dụng công nghệ nano vào nông nghiệp bền vững, đặc biệt trong kiểm soát sinh học các bệnh thực vật, từ đó thúc đẩy phát triển nông nghiệp xanh, sạch và thân thiện với môi trường.

5. NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

- Nghiên cứu trong luận án đã đóng góp một số kết quả mới sau đây:

1. Nghiên cứu đã xây dựng một bộ dữ liệu chi tiết về sự đa dạng các loài nấm gây hại trên cây sen trồng tại Thành phố Huế, bao gồm thông tin về thành phần loài gây hại đặc điểm phân bố địa lý và điều kiện sinh cảnh dựa trên cách tiếp cận tổng hợp đa bằng chứng. Việc kết hợp đồng thời các phương pháp phân tích hình thái, phát sinh loài đa locus cùng với các

phương pháp xác định ranh giới loài GCPSR và PTP, nghiên cứu đã xác định 21 tác nhân gây bệnh đên cấp độ loài, thuộc 9 chi nấm khác nhau. Trong đó 13 loài nấm ghi nhận mới ở Việt Nam, 17 loài là tác nhân bệnh mới trên cây sen trên phạm vi toàn cầu, và 20 loài là ghi nhận mới trên cây sen tại Việt Nam. Những dữ liệu này không chỉ góp phần hoàn thiện hệ thống phân loại học của nhóm nấm gây hại trên cây sen tại Thành phố Huế và Việt Nam, cũng như trên thế giới mà còn tạo nền tảng khoa học vững chắc cho các nghiên cứu tiếp theo.

2. Nghiên cứu đã cung cấp các cơ sở dữ liệu về hiệu lực ức chế của nano bạc lên 29 chủng phân lập thử nghiệm đại diện cho các chi gây hại được xác định. Nghiên cứu cũng đã ứng dụng mô hình hồi quy phi tuyến tính Probit $\log_{10}$ để xác định giá nồng độ hiệu quả (EC_{50}) và phân định hiệu quả của nano bạc – tính kháng của chủng phân lập thử nghiệm làm 4 nhóm theo phương pháp thống kê tứ phân vị. Phương pháp này cung cấp một cách thức hiệu quả giúp đánh giá hiệu lực kháng nấm của nano bạc và khả năng kháng của các chủng nấm.

3. Nghiên cứu đã làm rõ cơ chế tác động của nano bạc lên 8 chủng phân lập đại diện. Cung cấp các bằng chứng nano bạc về các tác động của nano bạc lên tính toàn vẹn của màng tế bào nấm, làm tăng rò rỉ vật chất nội bào, giảm hàm lượng ergosterol, tăng peroxy hóa lipid và làm suy giảm hoạt động enzyme chống oxy hóa nội bào như SOD và CAT, từ đó làm mất cân bằng oxy hóa khử và ức chế sự phát triển của nấm. Bên cạnh đó, nghiên cứu này cũng cung cấp các minh chứng tác động ở cấp độ vi thể lên sợi nấm và bào tử.

CHƯƠNG I. TỔNG QUAN VỀ VẤN ĐỀ NGHIÊN CỨU

1.1. GIỚI THIỆU CHUNG VỀ CÂY SEN

1.1.1. Nguồn gốc, lịch sử và sự phân bố của cây sen

Cây sen (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) thuộc họ Nelumbonaceae, một họ thực vật nhỏ và là loài thực vật hai lá mầm có lịch sử tiến hóa lâu đời. Họ thực vật này chỉ chứa một chi với hai loài: *N. nucifera* Gaertn. và *N. lutea* Willd., với tên gọi tương ứng phổ biến tương ứng là sen châu Á (phân bố chủ yếu ở Châu Á, châu Úc) và sen Mỹ (chủ yếu ở các bang phía Đông, phía Nam Hoa Kỳ). Tầm quan trọng của cây sen không chỉ nằm ở vai trò trong phân loại học và nghiên cứu tiến hóa mà còn ở khả năng tạo cảnh quan sinh thái, ứng dụng trong y học và nghiên cứu nguồn gốc phát sinh loài, từ đó thu hút sự quan tâm ngày càng lớn từ cộng đồng khoa học.

Tại Trung Quốc, diện tích trồng sen lấy củ khoảng hơn 250.000 ha, sản lượng trên 3 triệu tấn củ mỗi năm, tập trung chủ yếu ở hai tỉnh Vân Nam và Hồ Bắc. Thời vụ thu hoạch kéo dài từ tháng 7 đến tháng 3 năm sau.

Ở Việt Nam, sen chủ yếu được trồng trong ao hồ để lấy hoa và hạt, với tổng diện tích khoảng 3.000 ha, phân bố tại các tỉnh như Hưng Yên, Hải Dương, Thái Bình, Nghệ An, Nam Định, Huế và Đồng bằng sông Cửu Long. Tỉnh Đồng Tháp có diện tích trồng sen khoảng 258 ha, sản lượng đạt 286 tấn. Ở khu vực Đại Nội và thành phố Huế, sen được trồng chủ yếu trong các hồ chuyên dụng với diện tích 26,35 ha, chiếm 7,72% tổng diện tích trồng sen. Hầu hết các giống sen địa phương đều được trồng trong các hồ chuyên trồng sen này. Riêng giống Sen Cao Sản, chỉ một số ít được trồng trong các hồ ở thành phố Huế, còn phần lớn giống này được trồng trên các ruộng thuộc khu vực phụ cận như thị xã Hương Trà, huyện Phú Lộc, Phú Vang và Phong Điền (Trang, 2021).

Gần đây, trong báo cáo mới nhất của Chi cục Trồng trọt và Bảo vệ thực vật Thừa Thiên Huế năm 2024, diện tích trồng sen toàn tỉnh đạt khoảng 655 ha tập trung chủ yếu huyện Phong Điền, Phú Vang, Phú Lộc, thị xã Hương Trà và thành phố Huế.

1.1.2. Đặc điểm sinh trưởng của cây sen

Tầm quan trọng của cây sen trong tạo cảnh quan sinh thái, sử dụng làm thuốc và phát sinh loài thực vật, sen ngày càng được giới khoa học quan tâm. Hoa sen là biểu tượng của sự thuần khiết tâm linh và “sự trường tồn” trong cả Phật giáo và Ấn Độ giáo, mang nhiều giá trị về mặt tôn giáo, kinh tế và y học. Về mặt sinh học, cây sen không chỉ có những đặc điểm chung của thực vật thủy sinh mà còn có những đặc điểm độc đáo nhất định giúp phân biệt nó với các loài thực vật khác. Những đặc điểm này bao gồm tuổi thọ của hạt, tính siêu kỵ nước của lá và khả năng điều nhiệt của hoa. Sự hiểu biết về các cơ chế dẫn đến sự hình thành các đặc tính độc đáo này là rất quan trọng, không chỉ đối với sinh học thực vật cơ bản mà còn tiềm năng sử dụng to lớn của chúng thông qua sinh học.

1.1.2.1. Thời gian sinh trưởng

Thời gian sinh trưởng của các giống sen được tính từ lúc trồng đến khi lá khô hoàn toàn (sen tàn). Kết quả nghiên cứu về thời gian sinh trưởng của các giống sen ở Thừa Thiên Huế ghi nhận thời gian từ trồng đến khi sen tàn trung bình của các giống là 159,3 ngày, dao động từ 152-171 ngày (Trang, 2021). Có 3 giống có thời gian sinh trưởng dài nhất là Sen Cao Sản (157 ngày), Sen Trắng Trệt Lồi (169 ngày), Sen Trắng Trệt Lõm (171 ngày). Ba giống còn lại có thời gian sinh trưởng ngắn hơn dao động từ 152-154 ngày.

1.1.2.2. Đặc điểm sinh lý của cây sen

Quang hợp và hô hấp là hai quá trình sinh lý được nghiên cứu nhiều nhất trong khoa học thực vật, bởi vì sự cân bằng giữa hai quá trình này quyết định tỷ lệ rất lớn đến khả năng sinh trưởng và năng suất của hầu hết các loại cây trồng. Quang hợp là một chức năng sinh lý quan trọng của thực vật. Là quá trình biến đổi các chất vô cơ đơn giản là khí CO₂ và nước thành các hợp chất hữu cơ phức tạp nhờ năng lượng ánh sáng mặt trời với sự tham gia của các hệ sắc. Cơ quan làm nhiệm vụ quang hợp chủ yếu ở thực vật là lá.

Quá trình phát triển lá của cây sen gồm ba giai đoạn chính: giai đoạn lá trái, lá nằm trên bề mặt nước với mặt trên tiếp xúc ánh sáng mặt trời và mặt dưới tiếp xúc nước, giúp lá thích nghi với cường độ ánh sáng mạnh và bóng râm, đồng thời thực hiện chức năng quang hợp cung cấp carbon cho cây; giai đoạn lá dù, khi các lá vượt lên trên mặt nước xuất hiện đồng thời với lá trái, hỗ trợ cây trong việc tiếp xúc với không khí và ánh sáng; và giai đoạn tạo hạt, trong đó lá dù vẫn tồn tại còn lá trái có thể bị tiêu giảm hoặc phân hủy một phần. Sự phát triển và biến đổi của các loại lá này phản ánh khả năng thích nghi sinh học của cây sen với môi trường nước và đảm bảo hiệu quả quang hợp cũng như thích nghi với các giai đoạn phát triển khác nhau. Lá sen thể hiện tính kỵ nước cực cao, còn được gọi là “hiệu ứng hoa sen” (Darmanin & Guittard, 2015). Đặc tính siêu kỵ nước này có thể đảm bảo rằng lớp biểu bì trên của lá không bị nước bao phủ, do đó duy trì chức năng bình thường của khí khổng, đồng thời giảm tính nhạy cảm với mầm bệnh (Ensikat et al., 2011).

1.2. TỔNG QUAN VỀ CÁCH TIẾP CẬN VÀ CÁC TIÊU CHÍ NHẬN DIỆN, PHÂN ĐỊNH LOÀI NẤM

Dù là đơn vị cơ bản trong sinh học, “loài” vẫn là khái niệm gây tranh luận kéo dài, đặc biệt trong nấm do đặc trưng sinh sản đa dạng, phổ vô tính rộng và cấu trúc quần thể phức tạp. Từ quan điểm cổ điển của John Ray (1686) nhấn mạnh tính ổn định của các thực thể cùng nguồn gốc, qua hệ thống danh pháp chuẩn hóa của Linnaeus và tư tưởng tiến hóa của Darwin, khái niệm loài liên tục được hiệu chỉnh theo tri thức đương thời. Bước ngoặt quan trọng là khái niệm loài sinh học (Biological Species Concept) của Ernst Mayr (1942), xem loài là các quần thể tự nhiên có khả năng giao phối thực hoặc tiềm năng và được cách ly sinh sản với

các quần thể khác (De Queiroz, 2005). Tuy nhiên, khi áp dụng định nghĩa này cho nấm, khái niệm loài sinh học bộc lộ nhiều giới hạn do nhiều taxon thể hiện sự đa dạng chiến lược sinh sản, phổ lớn các dòng vô tính, chu kỳ sống đa pha, tái tổ hợp không đồng nhất, và rào cản giao phối khó quan sát. Trong phân loại nấm, câu hỏi cốt lõi “khi nào một quần thể xứng đáng được công nhận là loài?” vẫn tiếp tục gây tranh luận (Dupuis et al., 2012; Xu, 2020). Nguồn gốc của các tranh luận phần lớn bắt nguồn từ việc nhầm lẫn hai lớp khái niệm vốn phải được phân biệt rạch ròi: (i) khái niệm loài (species concept) — nền tảng, cơ sở lý thuyết định nghĩa bản chất của “loài”; và (ii) tiêu chí/tiếp cận phân định ranh giới loài (species criteria/species delimitation) — tập hợp bằng chứng và quy trình thực nghiệm nhằm hiện thực hóa khái niệm đó trong thực tiễn. Sự thiếu rạch ròi này dễ dẫn đến kết quả phân định mơ hồ và thiếu tính đồng nhất. Hơn nữa, các khái niệm và tiêu chí có thể mâu thuẫn nhau, tạo ra các ranh giới và số lượng loài khác nhau (De Queiroz, 2007; Stankowski & Ravinet, 2021). Cho đến nay, có khoảng 30 tiêu chí ghi nhận/phân định loài được đề xuất (Chethana et al., 2021). Tuy nhiên, chỉ một số ít được dùng rộng rãi trong thực hành phân loại nấm. Các nhóm tiêu chí phổ biến gồm: (i) sinh học (cách ly sinh sản), (ii) hình thái/phenetic, (iii) sinh thái (hốc sinh thái/khí hậu/ký chủ), (iv) cụm kiểu gen/di truyền quần thể, và (v) phát sinh–đồng quy (đa locus, GCPSR). Việc lựa chọn và kết hợp các tiêu chí này cần phụ thuộc vào dữ liệu sẵn có, lịch sử tiến hóa của từng chi. Song song với hệ thống học phân tử, phân loại tích hợp (integrative taxonomy) đã trở thành động lực chủ đạo cho các nỗ lực phân loại lại nấm, bao gồm cả tác nhân nấm gây hại trong lĩnh vực bệnh hại thực vật. Cách tiếp cận này sử dụng đồng thời và đối chiếu nhiều dòng bằng chứng độc lập — hình thái (vĩ mô/vi mô), sinh thái–sinh địa lý, hình thức sinh sản, lịch sử ký chủ, dữ liệu phân tử đa locus/đa gene, và cả dữ liệu hệ gene — nhằm nhận diện và phân định loài một cách hiệu quả (Cao et al., 2021; Damodara Shenoy, 2025; Jayawardena et al., 2021). Thay vì phụ thuộc một chỉ dấu hay khái niệm đơn lẻ, mục tiêu cách tiếp cận này tìm kiếm sự đồng thuận liên nguồn (cross-evidence concordance), đồng thời nhận diện và xem xét các bất đồng giữa gene, kiểu hình và sinh thái.

1.3. TỔNG QUAN TÌNH HÌNH BỆNH HẠI TRÊN CÂY SEN

Trong những năm gần đây, nhiều nghiên cứu đã được tiến hành nhằm xác định và đánh giá thực trạng các bệnh hại trên cây sen ở nhiều vùng trồng khác nhau trên thế giới, góp phần làm rõ nguyên nhân của các bệnh hại trên cây sen.

1.3.1. Thực trạng và tình hình bệnh hại trên cây sen trên thế giới

Nhiều nghiên cứu tại Trung Quốc và Đài Loan đã xác định các tác nhân gây bệnh quan trọng trên cây sen liên quan đến nấm và virus. Về bệnh đốm lá, Zhang et al. (2019) xác định nấm *Alternaria tenuissima* là nguyên nhân gây bệnh đốm lá tại Quảng Xương, Giang Tây. Triệu chứng ban đầu là các đốm nhỏ màu nâu vàng với tâm đốm đen nhạt và viền vàng nâu, sau đó gây hoại tử rõ rệt trên lá. Ngoài ra, *Curvularia lunata* cũng được xác định gây bệnh đốm lá với các đốm nâu tím, tâm trắng xám và viền nâu đen bao quanh (Cui & Sun, 2012). Nghiên cứu của Zhang et al. (2018) đã ghi nhận nấm *Nigrospora oryzae* là tác nhân gây cháy lá trên giống sen Taikonglian 36 tại Phúc Kiến, với các đốm trắng xám có viền nâu và lan rộng thành vết bệnh màu nâu, đây được xem là báo cáo đầu tiên ghi nhận *N. oryzae* gây bệnh trên cây sen tại Trung Quốc. Gần đây, Gong et al. (2023) xác định thêm loài *N. pyriformis* liên quan đến các triệu chứng đốm đen và hoại tử dạng lưới trên lá sen ở Quảng Xương, gây chết khoảng 20% số lá. Bệnh phấn trắng trên sen cũng được ghi nhận tại Thanh Đảo, Sơn Đông, với tác nhân là nấm *Erysiphe takamatsui*, được xác định qua phân tích gene rDNA ITS và 28S (Zhou et al., 2019). Một nghiên cứu toàn diện tại Đài Loan do Chen và Kirschner (2018) thực hiện đã phân lập 33

loài nấm từ 1002 mẫu bệnh lá sen, chủ yếu thuộc các chi *Colletotrichum*, *Diaporthe* và *Fusarium*. Nghiên cứu này lần đầu tiên ghi nhận sự xuất hiện của *Erysiphe takamatsui* và *Pseudosporopora nymphaeaceae* tại Đài Loan.

Liên quan đến bệnh thối nhũn và héo khô trên cây sen, Wang et al. (2020) xác định nấm *Fusarium innarcatum* là nguyên nhân gây bệnh thối nhũn tại Vũ Hán thông qua phân tích phân tử và thử nghiệm lây nhiễm nhân tạo. Trước đó, các nghiên cứu cũng ghi nhận các loài nấm như *F. tricinctum* (Li et al., 2016), *F. oxysporum* (Tang et al., 2017) và gần đây là *F. proliferatum* (Cai et al., 2022) là các tác nhân gây bệnh tương tự trên sen. Ngoài các tác nhân nấm, một số nghiên cứu còn cho thấy các tác nhân virus được phát hiện trên cây sen: virus khảm Dasheen (DsMV) Cucumber mosaic virus (CMV), sweet potato latent virus (SPLV), badnaviruses (LBV) và apple stem grooving virus (ASGV) cũng đã được báo cáo trên cây sen trong các nghiên cứu gần đây (He et al., 2019, 2020; Wang et al., 2019).

Thực trạng bệnh hại trên cây sen cho thấy sự đa dạng và phức tạp cao của các tác nhân gây bệnh. Phần lớn các nghiên cứu về bệnh hại trên cây sen thường tập trung ghi nhận một hoặc vài loài nấm riêng biệt, dẫn đến việc tiếp cận theo hướng “một bệnh – một loài – một ký chủ”. Điều này tuy có giá trị khoa học nhưng lại tạo ra các kết quả đơn lẻ, thiếu sự tổng hợp và đồng bộ. Sự phân mảnh này phản ánh tính đa dạng sinh học phong phú trong hệ sinh thái bệnh hại trên cây sen, đồng thời chỉ ra rằng vẫn còn nhiều loài gây bệnh tiềm ẩn chưa được phát hiện hoặc nghiên cứu đầy đủ.

1.3.2. Thực trạng và tình hình nghiên cứu bệnh hại trên cây sen ở Việt Nam

Tại Việt Nam, số lượng báo cáo nghiên cứu về bệnh hại trên cây sen còn tương đối hạn chế, và các báo cáo này cũng chỉ tập trung ở một số tỉnh như Thừa Thiên Huế hay ở khu vực Đồng bằng Sông Cửu Long. Năm 2016, ba loài *Colletotrichum*: *C. acutatum*, *C. lagenarium*, *C. gloeosporioides* đã được nhóm nghiên cứu Tường et al. xác định liên quan đến bệnh thán thư trên cây sen từ các mẫu thu thập ở các tỉnh Đồng Tháp, Cần Thơ, Hậu Giang, Vĩnh Long, Bạc Liêu và Cà Mau. Bên cạnh đó, một nghiên cứu độc lập khác tiến hành sử dụng các chủng xạ khuẩn cho thấy có hiệu quả quản lý bệnh thán thư do *Colletotrichum* gây ra (Tường et al., 2022; Tường & Quý, 2016). Sinh vật giống nấm - *Phytophthora* sp. cũng được chỉ định gây bệnh cháy lá và thối thân trong một báo cáo của (Thái & Tường, 2016). Tuy nhiên, nghiên cứu này tập trung vào đánh giá khả năng đối của các chủng xạ khuẩn, nên các tác nhân trên cũng không được làm rõ về mặt hình thái, cách thức phân lập, phân loại và chỉ định với cách gọi chung *Phytophthora* sp.

Tại Thừa Thiên Huế, Chi cục Bảo vệ Thực vật đã ghi nhận hiện tượng cây sen chết và tàn lụi tại một số vùng trồng trong tỉnh ở năm 2018 với nguyên nhân được xác định là do nấm thán thư. Trường & Vương (2020) dựa trên giám định về hình thái và lây nhiễm nhân tạo đã báo cáo *Fusarium* là tác nhân gây bệnh thối thân, thối củ sen và ghi nhận rằng bệnh đặc biệt nghiêm trọng ở giai đoạn thu hoạch. Trong một nghiên cứu khác thực hiện trên ba giống sen Yên Thành, Kim Liên và cao sản đã ghi nhận 7 dịch hại trên cây sen, bao gồm: sâu khoang, bọ trĩ, rầy mềm, sâu róm, ốc bươu vàng, ốc sên nhỏ và bệnh thán thư. Trong đó, sâu khoang, bọ trĩ và rầy mềm là những tác nhân ghi nhận phổ biến với mật độ cao. Bên cạnh đó, nhóm nghiên cứu cũng chỉ ra rằng thuốc Map JOWO 700W có hiệu lực cao với 3 tác nhân này (Phúc et al., 2021). Gần đây, *Lasiodiplodia theobromae* được xác định là tác nhân gây nên triệu chứng tàn lụi trên cây sen trồng ở Thừa Thiên Huế dựa trên thông tin trình tự của 3 locus ITS, *TEF1-a* và *TUB2* trong nghiên cứu của Cường và et al. Tương tự, trong một nghiên cứu

độc lập tại huyện Tháp Mười, Đồng Tháp, *L. theobromae* cũng được chỉ định là tác nhân gây bệnh thối cuống lá cây sen, dựa trên trình tự ITS (Hồng et al., 2024).

Cây sen và nhiều thực vật khác thường bị tấn công bởi các vi sinh vật gây bệnh. Sự lão hóa hoặc tổn thương vật chủ có thể kích hoạt vi sinh vật chuyển sang dạng gây bệnh xâm nhập. Hiện nay, các thuốc bảo vệ thực vật như tebuconazole, azoxystrobin, metalaxyl, mancozeb và carbendazim được sử dụng rộng rãi, nhưng tồn dư hóa chất gây nguy hại cho môi trường và sinh vật không mục tiêu. Do đó, cần phát triển các biện pháp kiểm soát bệnh thực vật hiệu quả và an toàn hơn, phù hợp cho cả giai đoạn trước và sau thu hoạch.

1.4. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU VỀ NANO BẠC VÀ ỨNG DỤNG TRONG QUẢN LÝ BỆNH HẠI CÂY TRỒNG

Cùng với sự phát triển nhanh chóng và các thách thức mới, công nghệ nano đã thu hút sự quan tâm mạnh mẽ của giới khoa học, thể hiện qua số lượng ấn phẩm tăng nhanh hàng năm. Trong đó, hạt nano bạc (AgNPs) nổi bật nhờ độ ổn định, dẫn điện, khả năng xúc tác và đặc biệt là tính kháng vi sinh vật cùng diện tích bề mặt lớn. Những đặc tính này giúp nano bạc được ứng dụng rộng rãi trong lĩnh vực bán dẫn, chất khử trùng, chăm sóc sức khỏe, vật liệu phủ, bao bì thực phẩm, xử lý nước và cảm biến sinh học.

1.4.1. Cơ chế kháng của nano bạc

Nano bạc đã thể hiện tác dụng kháng cao chống lại nhiều loại vi khuẩn, nấm gây hại với nhiều báo cáo khác nhau ghi nhận. Tuy nhiên, cơ chế chính xác mà nano bạc gây ra hoạt tính ức chế tăng trưởng hoặc diệt khuẩn, diệt nấm vẫn chưa được làm rõ hoàn toàn (Cavassin et al., 2015; Polinarski et al., 2021). Nhìn chung, có thể cụ thể các con đường tác động của nano bạc khi ở trong tế bào như sau:

Khi ở trong tế bào, Ag^+ và AgNPs hoạt động ở các cấp độ khác nhau

+ Dẫn đến sự tích tụ các loại oxy phản ứng nội bào (ROS), gây ra quá trình apoptosis (Adam & Khan, 2022; Dong et al., 2019; Hwang et al., 2012; Radhakrishnan, Mudiam, et al., 2018).

+ Sự tích tụ Ag^+ nội bào làm biến đổi cấu trúc màng tế bào, thay đổi hệ thống thẩm thấu. Điều này tạo ra dòng ion kali và làm mất gần như hoàn toàn các ion kali nội bào, dẫn đến ức chế hoạt động H^+ -ATPase của màng (Cyert & Philpott, 2013; Rohde et al., 2021; Vagabov et al., 2008).

+ Ion Ag^+ đi vào ty thể thông qua chất vận chuyển đồng Pic2 của ty thể, chất này có ái lực với Ag^+ cao hơn so với các ion đồng (Cu^+). Điều này dẫn đến giảm nồng độ Cu^+ và tăng tích tụ Ag^+ trong chất nền ty thể, dẫn đến giảm hoạt động của cytochrome c oxidase phụ thuộc đồng và do đó làm giảm tốc độ hô hấp tế bào (Costa et al., 2010; Teodoro et al., 2011; Vest et al., 2013).

+ Ag^+ và AgNPs điều chỉnh hệ phiên mã, hệ gene biểu sinh và hệ chuyển hóa và làm thay đổi đáng kể các chức năng quan trọng của tế bào nấm, tế bào vi khuẩn (Das & Ahmed, 2012; Dubey et al., 2015; Marathe et al., 2021). Sự điều hòa (theo xu hướng giảm) hoạt động các gene liên quan chu trình acid tricarboxylic, các gene liên quan đến chuyển hóa oxy hóa khử và các gene liên quan đến tổng hợp ergosterol và chuyển hóa lipid, dẫn đến những thay đổi cấu trúc chủ yếu ở cấp độ màng sinh học cũng đã được ghi nhận trong nhiều nghiên cứu (Babele et al., 2019; Barros et al., 2021; Horstmann et al., 2019; Marathe et al., 2021; Radhakrishnan, Dwivedi, et al., 2018).

Tóm lại, một số con đường tác động đã được chứng minh, bao gồm phá vỡ protein, sản xuất ROS và suy thoái chất chống oxy hóa, suy giảm cấu trúc màng (phá vỡ màng, thiếu

tính thấm của màng), gây đột biến và điều hòa biểu hiện gene protein vận chuyển (Carrapiço et al., 2023; Lemire et al., 2013). Tính linh động của màng và các hoạt động trao đổi chất bị gián đoạn do sự thay đổi hình thái của màng tế bào bị ảnh hưởng bởi nano bạc và quá trình khử cực màng, cuối cùng dẫn đến tổn thương thành phần tế bào. Sự rò rỉ các phân tử bên trong tế bào, chẳng hạn như enzyme, protein, chất chuyển hóa và DNA, là do sự phá vỡ cấu trúc tế bào.

1.4.2. Các yếu tố ảnh hưởng đến hoạt tính kháng của nano bạc

Cùng với việc làm sáng tỏ các khía cạnh cơ chế kháng của nano bạc, nhiều nghiên cứu cũng đã xác định được tính chất của các hạt nano bạc. Cụ thể là kích thước hóa học, điện tích và bề mặt, ảnh hưởng đến khả năng kháng vi sinh vật. Các tài liệu hiện có cho thấy hoạt tính diệt khuẩn, kháng nấm của nano bạc chủ yếu được xác định bởi kích thước, tính chất bề mặt và nồng độ sử dụng. Các hạt nano bạc có kích thước nhỏ hơn được cho là độc hại hơn (Kong et al., 2020).

1.4.3. Ứng dụng nano bạc trong nông nghiệp và quản lý bệnh hại thực vật.

Nông nghiệp bền vững đang được ưu tiên do thiệt hại lớn từ sâu bệnh và mầm bệnh nấm, nguyên nhân gây 80% bệnh hại thực vật toàn cầu. Thuốc diệt nấm truyền thống tuy hiệu quả nhưng tiềm ẩn rủi ro môi trường và an toàn thực phẩm, dẫn đến việc hạn chế sử dụng. Nano bạc sinh học nổi lên như giải pháp thay thế thân thiện môi trường, hiệu quả và tiết kiệm chi phí trong kiểm soát nấm bệnh trên cây trồng. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh vai trò quan trọng của nano bạc trong phòng chống mầm bệnh thực vật, mở ra hướng đi mới cho nông nghiệp bền vững.

Nghiên cứu tổng quan cho thấy nano bạc không chỉ có khả năng kháng khuẩn mà còn hiệu quả trong kiểm soát nhiều loại nấm gây hại thực vật. Mahdizadeh et al. (2015) chứng minh nano bạc ức chế mạnh sự phát triển của các nấm như *Phytophthora aphanidermatum*, *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotinia sclerotiorum* và *Rhizoctonia solani* với mức ức chế từ 75% đến 100% tùy nồng độ (6–16 mg/L). Haroon et al. (2019) cũng chứng minh nano bạc chiết xuất từ *Azadirachta indica* ức chế hiệu quả các mầm bệnh như *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* và *Ralstonia solanacearum*. Năm 2019, Malandrakis et al. sự khảo sát hiệu quả diệt nấm của các hạt nano đồng, bạc và kẽm trên 7 loài nấm gây bệnh thực vật. Trong điều kiện môi trường thạch PDA, nano đồng và kẽm thể hiện khả năng ức chế tốt hơn so với nano bạc, tuy nhiên trong thí nghiệm in vivo trên quả mận, nano bạc lại cho hiệu quả ức chế cao nhất, lên đến 100% ở nồng độ 1000 µg/mL. Sự khác biệt này được giải thích do môi trường PDA chứa các chất phản ứng làm giảm độc tính của nano bạc so với bề mặt mô thực vật. Ganash et al. (2018) nghiên cứu tác động của nano bạc lên nấm *Fusarium culmorum* và *Alternaria alternata* cho thấy nano bạc làm biến dạng cấu trúc bào tử, ức chế phát triển nấm và kích thích tổng hợp nhiều acid amin quan trọng, vượt trội hơn so với bạc nitrat. Kriti et al. (2020) cũng ghi nhận hoạt tính kháng nấm đáng kể của nano bạc citrate đối với *Bipolaris sorokiniana* và *Alternaria brassicicola*. Tarazona et al. (2019) chứng minh nano bạc citrate ức chế hoàn toàn sự phát triển sợi nấm của nhiều loài *Fusarium* sau 20–30 giờ tiếp xúc. Reyes et al. (2022) báo cáo nano bạc tổng hợp từ *Larrea tridentata* có khả năng ức chế đến 70,76% với *Alternaria solani* và 51,75% với *Botrytis cinerea* ở nồng độ 60 ppm, trong khi tác động lên một số loài khác không rõ ràng. Ribeiro et al. (2023). tổng hợp nano bạc từ các loài nấm rừng ngập mặn ở Brazil và ghi nhận khả năng ức chế nhiều loài nấm gây bệnh thực vật với giá trị MIC từ 4 đến 250 µM. Gần đây, Singh et al. (2024) báo cáo nano bạc chiết xuất lá *A. indica* ức chế hoàn toàn một số nấm gây bệnh ở nồng độ 2000 ppm và thể hiện độc tính tế bào trên dòng tế

bào ung thư U87MG, cho thấy tiềm năng ứng dụng trong y học. Trong 2–3 năm gần đây, công nghệ phân tích phiên mã RNA-seq được ứng dụng để làm rõ cơ chế phân tử của nano bạc trong ức chế

Trên cơ sở những thành tựu này, các nhà khoa học tại Việt Nam cũng đã tích cực triển khai nghiên cứu nhằm ứng dụng nano bạc trong kiểm soát các bệnh nấm gây hại cây trồng đặc trưng trong nước. Những nghiên cứu trong nước không chỉ tập trung vào việc tổng hợp và đánh giá hiệu quả kháng nấm của các chế phẩm/vật liệu nano bạc mà còn phát triển các công nghệ chế tạo vật liệu nano phù hợp với điều kiện thực tiễn, góp phần nâng cao hiệu quả bảo vệ cây trồng và phát triển nông nghiệp bền vững tại Việt Nam.

Nghiên cứu của Luân et al. (2014) cho thấy chế phẩm nano bạc-chitosan kích thước hạt từ 5 đến 15 nm, được chế tạo bằng chiếu xạ gamma, có khả năng ức chế nấm *Phytophthora capsici* trên cây hồ tiêu với hiệu quả tăng khi kích thước hạt giảm; nano bạc 5 nm đạt ức chế 100% ở nồng độ 40 ppm, trong khi nano 10 nm cần 100 ppm để đạt 92,9%. Năm 2017, Nguyễn Hoài Châu và đồng nghiệp tổng hợp thành công nano Ag/CTS/Bentonite kích thước 5-90 nm, với nano bạc 400 ppm ức chế hiệu quả *Fusarium oxysporum* và *Rhizoctonia solani*, đồng thời ngăn chặn hoàn toàn sự hình thành hạch nấm của R. solani ở nồng độ 100-400 ppm. Nghiên cứu Châu et al. (2020) cũng cho thấy hỗn hợp nano bạc-nano đồng (tỷ lệ Ag/Cu 30/18, tương đương 48 ppm) có khả năng ức chế nấm *Neoscytalidium dimidiatum* vượt trội so với nano bạc đơn lẻ, đồng thời đạt hiệu quả tối đa 100% với *Colletotrichum* và 93,3% với *N. dimidiatum* ở nồng độ thấp hơn, khẳng định vai trò quan trọng của kích thước hạt và sự kết hợp kim loại trong nâng cao hiệu quả kháng nấm của vật liệu nano. Một hướng nghiên cứu khác ngoài việc đánh giá hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm đó là đánh giá mối tương tác giữa vật liệu nano và thực vật, hay những ảnh hưởng của nano bạc lên quá trình sinh trưởng, phát triển của thực vật cũng là một hướng thu hút nhiều sự quan tâm của các nhà khoa học.

CHƯƠNG II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU

Các tác nhân gây hại trên cây sen được thu thập và phân lập ở các địa điểm trồng sen khác nhau tại Thành phố Huế. Dung dịch nano bạc được cung cấp bởi Khoa Vật lý, Đại học Khoa học Huế. Hạt nano được tổng hợp sinh học từ cây nha đam *Aloe barbadensis* có đường kính từ 5–40 nm. Nồng độ dung dịch gốc là 40 mg/L.

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Phương pháp thu thập và phân lập tác nhân gây hại trên lá sen

Các mẫu lá có triệu bệnh rửa sạch bằng nước cất vô trùng (SDW), sau đó dùng kéo vô trùng cắt từ rìa mép bệnh thành các mảnh nhỏ (5×5 mm). Các mảnh này được khử trùng bằng cách ngâm tuần tự trong dung dịch natri hypoclorit NaOCl 1% (nồng độ hoạt động) (w/v) trong 1 phút, ethanol 70% (v/v) trong 15 giây sau đó rửa ba lần bằng nước cất vô trùng. Làm khô bằng giấy thấm, đặt lên trên đĩa petri chứa môi trường thạch nước (Water agar - WA) và ủ ở 30°C trong bóng tối. Các sợi nấm mới mọc ra từ mô được chuyển vào các đĩa petri chứa môi trường thạch dextrose khoai tây (Potato dextrose agar - PDA) và ủ ở 30°C trong bóng tối. Làm thuần mẫu nấm bằng cách cấy đỉnh sinh trưởng nấm từ môi trường cũ sang môi trường nuôi cấy PDA mới.

Quá trình khuếch đại PCR với tổng thể tích mỗi phản ứng PCR (50 μ L) bao gồm: 25 μ L of Go Taq Green 2X Master Mix (Promega, Hoa Kỳ), 5 μ L (20 - 100 ng) gDNA khuôn mẫu, 5 μ L mỗi primer (10 pmol/ μ L) và 15 μ L ddH₂O (Promega, Hoa Kỳ). Các môi (primer)

được chọn để khuếch đại PCR các vùng gene/locus tương ứng được trình bày trong Bảng 2.1. Các sản phẩm PCR sau khuếch đại được quan sát dưới gel agarose 1% (w/v) sử dụng đệm TAE 1X (Thermo Fisher Scientific, Lithuania). Quá trình điện di thực hiện ở 75V trong 35 phút. Việc tinh sạch và giải trình tự các sản phẩm PCR được thực hiện thương mại tại Công ty FirstBASE (Malaysia).

Bảng 2.1. Trình tự các môi (primer) sử dụng trong quá trình định danh loài

Vùng gene/locus	Primer	Trình tự (5' – 3')	Nguồn	Sử dụng trong chi
Internal transcribed spacer (ITS)	ITS1	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	White et al. (1990)	Tất cả các chi
	ITS5	GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G		
	ITS4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC		
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	GDF1	GCC GTC AAC GAC CCC TTC ATT GA	Templeton et al. (1992)	<i>Colletotrichum</i>
	GDR1	GGG TGG AGT CGT ACT TGA GCA TGT	Berbee et al. (1999)	<i>Curvularia</i> , <i>Exserohilum</i>
	gpdh1-F gpdh2-R	CAA CGG CTT CGG TCG CAT TG GCC AAG CAG TTG GTT GT GC		
Actin (ACT)	ACT-512F	ATGTGCAAGGCCGGTTTCGC	Carbone & Kohn (1999)	<i>Colletotrichum</i>
	ACT-783R	TAC GAG TCC TTC TGG CCC AT		
Chitin synthase (CHS-1)	CHS-79F	TGG GGC AAG GAT GCT TGG AAG AAG	Carbone & Kohn (1999)	<i>Colletotrichum</i>
	CHS-354R	TGG AAG AAC CAT CTG TGA GAG TTG		
β -tubulin 2 (TUB2)	T1	AAC ATG CGT GAG ATT GTA AGT	O'Donnell & Cigelnik (1997)	<i>Lasiodiplodia</i>
	Bt2a	GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC	Glass & Donaldson, (1995) Glass & Donaldson (1995)	<i>Nigrospora</i>
	Bt2b	ACCCTCAGTG TAGTGACCCTTGGC		<i>Colletotrichum</i> <i>Diaporthe</i> <i>Neopestalotia</i> <i>psis</i>
Apn2-Mat1-2 (ApMat)	ApM-F	TCA TTC TAC GTA TGT GCC CG	Silva et al. (2012)	<i>Colletotrichum</i>
	ApM-R	CCA GAA ATA CAC CGA ACT TGC		
Translation elongation factor 1-alpha (TEF1- α)	EF1-983F	GCY CCY GGH CAY CGT GAY TTY AT	Schoch et al. (2009)	<i>Lasiodiplodia</i>
	EF1-2218R	ATG ACA CCR ACR GCR ACR GTY TG		<i>Neofusicoccum</i> <i>Nigrospora</i> <i>Colletotrichum</i> <i>Diaporthe</i> <i>Neopestalotia</i> <i>psis</i>
Large Subunit ribosomal RNA (LSU)	LR0R	ACC CGC TGA ACT TAA GC	Rehner & Samuel (1994) Vilgalys & Hester (1990)	<i>Curvularia</i>
	LR5	TCC TGA GGG AAA CTT CG		

2.2.3. Phương pháp phân tích phát sinh loài đa locus

Các trình tự thô DNA thu được từ cả hai chuỗi được xử lý bằng phần mềm BioEdit v7.0.5 (Hall, 1999). Căn chỉnh đa chuỗi bằng MUSCLE được thực hiện đồng thời các trình tự phân lập với các trình tự tham chiếu thu thập trong cơ sở dữ liệu NCBI bằng phần mềm MEGA 11 theo các tham số mặc định (Hinchliff & Roalson, 2013; Kumar et al., 2018). Các vùng gene liên kết được điều chỉnh thủ công khi cần thiết. Tất cả các khoảng trống (gap) được xem là dữ liệu thiếu và việc nối các locus trình tự đã căn chỉnh được thực hiện bằng phần mềm MEGA 11. Cây phát sinh đa locus được xây dựng dựa theo phân tích Maximum Likelihood bằng công cụ IQ-TREE v. 2.1.3 (Minh et al., 2020). Hệ số hỗ trợ được xác định bằng cách sử dụng 10.000 ulfabootstrap, xác suất hậu nghiệm aBayesian và 1.000 lặp lại bootstrap SH-aLRT. Các cây phát sinh thu nhận từ phân tích trên được hiển thị bằng FigTree v. 1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>) (Rambaut, 2018) hoặc Interactive Tree of Life (iTOL) v.6 (Letunic & Bork, 2021) và được xử lý đồ họa chi tiết bằng PowerPoint và Adobe Illustrator CC 2021. Tất cả các đơn vị phân loại (taxa) được sử dụng cho các phân tích trong nghiên cứu được trình bày chi tiết trong các bảng tương ứng với từng chi.

Ranh giới loài được xác định bằng mô hình nhận dạng loài phát sinh gene phù hợp phả hệ (GCPSR) để phân tích các loài có phát sinh gene không rõ ràng theo phương pháp được mô tả bởi Quaedvlieg et al. (2014). Mối quan hệ giữa các đơn vị phân loại có liên quan chặt chẽ với nhau được xác định bằng cách xây dựng mạng phát sinh gene (Split Network) từ tập dữ liệu được nối đa locus, sử dụng phép biến đổi LogDet và các tùy chọn thuật toán NeighborNet/Split Decomposition. Phân tích PTP được thực hiện bằng cách sử dụng tệp ma trận phân tích phát sinh loài ML.

2.2.4. Phương pháp đánh giá ảnh hưởng của nano bạc đến các tác nhân gây hại trên cây sen ở điều kiện phòng thí nghiệm

2.2.4.1. Ảnh hưởng của nano bạc đến sự phát triển sợi nấm

Mảnh nấm thuần được cắt từ rìa của tản nấm sau 72 giờ nuôi cấy ở 30°C, đặt vào tâm các đĩa petri (Φ 9cm, đường kính sinh trưởng tối đa 8,5 cm) chứa môi trường PDA (Potato dextrose agar) có các nồng độ nano bạc khác nhau (0 – đối chứng, 0,1 mg/L, 1 4mg/L, 10 mg/L, 20 mg/L, và 30 mg/L). Hexaconazole (Anvil 5SC, Sygenta) với nồng độ khuyến nghị 0,2% (nồng độ hoạt chất ban đầu: 50 g/L) được sử dụng làm đối chứng thương mại. Tiến hành nuôi cấy ở cùng nhiệt độ và thời gian. Mỗi nồng độ khảo sát được lặp lại 3 lần. Đường kính tản nấm được đo sau 3, 5, và 7 ngày bằng thước kẹp điện tử và ghi nhận hình ảnh. Hiệu lực ức chế của nano bạc được tính theo công thức theo mô tả của Abbott

$$HLUC(\%) = \left[\frac{C - T}{C} \right] \times 100$$

Các đặc điểm hình thái đại thể (màu sắc tản nấm, hình dạng rìa tản nấm, hạch nấm, ...) trên các đĩa có bổ sung nano bạc khác nhau được ghi nhận và so sánh với đối chứng. Ghi nhận hình ảnh ở các thời điểm 3, 5, 7 ngày sau khi cấy.

2.2.4.2. Phương pháp đánh giá độ nhạy của nano bạc (giá trị EC_{50})

Độ nhạy của nano bạc với các chủng phân lập nấm gây hại được biểu thị thông qua giá trị EC_{50} và được ước tính theo 3 mô hình khác nhau: hồi quy logarit tuyến tính, nội suy theo trục log nồng độ và hồi quy phi tuyến tính Probit với phép chuyển đổi $\log_{10}$. Mô hình được xây dựng dựa trên cặp dữ liệu đầu vào là liều lượng (dose - nồng độ nano bạc xử lý được chuyển đổi sang logari cơ số 10) – đáp ứng (response – giá trị hiệu lực ức chế được

chuẩn hóa) bằng phần mềm R 4.4.0. Phương pháp thống kê mô tả tứ phân vị được sử dụng để phân nhóm mức độ nhạy cảm.

2.2.4.3. Phương pháp xác định nồng độ ức chế tối thiểu, nồng độ diệt nấm tối thiểu

Thử nghiệm xác định giá trị nồng độ ức chế tối thiểu (Minimum inhibitory concentrations - MIC), nồng độ diệt nấm tối thiểu (minimum fungicidal concentrations - MFC) của nano bạc được thực hiện theo hướng dẫn của Viện Tiêu chuẩn Lâm sàng và Phòng xét nghiệm (CLSI) với một số thay đổi để phù hợp với nồng độ tối đa của nano bạc là 40 mg/L. Dãy dung dịch nano bạc thử nghiệm (giếng 2 – giếng 10) được thiết lập và chuẩn bị trong 200 μ L (môi trường và nano bạc) với nồng độ được tính trước, sao cho sau khi bổ sung 20 μ L huyền phù bào tử (1×10^5 CFU/mL), tạo thành dãy phạm vi nồng độ cuối cùng 0,078125 – 20 mg/L. Riêng hàng giếng 11 được thiết lập bằng cách bổ sung trực tiếp 200 μ L nano bạc stock ở nồng độ gốc 40 mg/L (nồng độ cuối cùng đạt 36,364 mg/L). Trong mỗi lượt thí nghiệm, đối chứng âm tính (DMSO 1%) và đối chứng sinh trưởng (chỉ môi trường và huyền phù bào tử) được đưa vào. Các đĩa được ủ trong 48-72 giờ ở 37°C, tốc độ lắc 150 vòng/phút. Tiếp theo 20 μ L dung dịch resazurin được thêm vào các giếng (nồng độ hoạt động cuối cùng trong mỗi giếng: 44 μ M) và tiếp tục ủ trong tối trong 48 giờ. Sự thay đổi màu từ xanh sang hồng hoặc không màu cho thấy sự phát triển của bào tử sống. MIC được xác định là nồng độ thấp nhất tại đó không quan sát thấy sự phát triển của nấm bằng mắt thường, đồng thời không ghi nhận sự chuyển màu của chỉ thị resazurin (xanh sang hồng). MFC được xác định bằng cách nuôi cấy lại 30 μ L dung dịch từ các giếng MIC, 2 $\times$ MIC và 4 $\times$ MIC lên môi trường thạch PDA; các đĩa không xuất hiện khuẩn lạc sau 48 giờ được xem là MFC. Hiệu quả diệt nấm hoặc ức chế được đánh giá thông qua tỷ lệ MFC/MIC.

2.2.4.4. Phương pháp xác định ảnh hưởng của nano bạc đến sinh khối (khô) nấm

Sinh khối nấm được ước tính bằng cách xác định trọng lượng khô của sợi nấm. Sinh khối sợi nấm sau khi nuôi cấy trong môi trường lỏng (PD Broth – PDB). Sau 3 ngày nuôi cấy ở cùng điều kiện nhiệt độ 30°C, tốc độ lắc 180 vòng/phút, sinh khối được thu nhận và rửa 2 lần bằng nước cất vô trùng (SDW) để loại bỏ môi trường dư thừa. Lượng sinh khối thu được ở các nồng độ khác nhau được sấy khô trong tủ sấy đến trọng lượng không đổi trên giấy lọc Whatman. Lượng sinh khối khô (mg) được xác định bằng cách trừ trọng lượng ban đầu của giấy lọc. Sinh khối nấm (mg) được tính là giá trị trung bình của ba mẫu độc lập.

2.2.4.5. Phương pháp xác định độ dẫn điện ngoại bào và mức độ rò rỉ acid nucleic

Độ dẫn điện ngoại bào (extracellular electrical conductivity - EEC) được xác định theo phương pháp mô tả trước đây của Zhang et al. (2019) với một số sửa đổi nhỏ. 30 μ L huyền phù bào tử (10^5 CFU/mL) được cấy vào môi trường PDB và nuôi cấy ở 30°C, 150 vòng/phút trong 7 ngày. Sau khi rửa hai lần bằng nước cất vô trùng để loại bỏ môi trường dư thừa, phần sợi nấm được thu thập để đánh giá. Sau đó, lấy 0,5g sợi nấm được chuyển vào các bình tam giác 50 mL chứa 25 mL nước cất vô trùng (SDW) làm đối chứng (Control), 25 mL nano bạc nồng độ 5 và 30 mg/L. Tiến hành ủ trong máy lắc ở 30°C, sau đó giá trị độ dẫn điện ngoại bào (EEC) được xác định bằng máy đo độ dẫn điện ở các mốc thời gian: 3 giờ, 12 giờ, 24 giờ, 36 giờ và 48 giờ, kết quả được biểu thị bằng μ S/cm. Thí nghiệm được lặp lại ba lần.

Mức độ rò rỉ acid nucleic (được biểu thị bằng giá trị OD₂₆₀). Sợi nấm sau khi nuôi 7 ngày trên môi trường PDB được thu thập và rửa sạch. Sau đó, lấy 0,5g sợi nấm được đặt vào các ống Falcon 50 mL chứa 25 mL nước cất vô trùng (SDW) làm đối chứng (Control), 25 mL nano bạc nồng độ 5 và 30 mg/L và thu thập dịch môi trường ở các mốc thời gian: 3 giờ, 12 giờ, 24 giờ, 36 giờ và 48 giờ. Tiến hành ly tâm ở tốc độ 4.000 vòng/phút trong 3 phút. Phần dịch

nồi trong được sử dụng để đánh giá sự rò rỉ acid nucleic ngoại bào (OD_{260}) bằng máy quang phổ UV-Vis.

2.2.4.6. Phương pháp xác định hàm lượng MDA (Malondyaldehyde)

Mức độ peroxid hóa lipid được đánh giá thông qua hàm lượng Malondyaldehyde (MDA) và được tiến hành theo phương pháp phản ứng acid 2-thiobarbituric (Senthilkumar et al., 2021). Phần sợi nấm còn lại sau ly tâm ở thời điểm 48 giờ được sử dụng để đồng nhất với nito lỏng trong 5 mL acid trichloroacetic (TCA) 5% (w/v) và dịch đồng nhất được ly tâm ở 12.000 g trong 10 phút ở nhiệt độ phòng. Phần dịch nổi được trộn với một thể tích tương đương (1:1) với hỗn hợp (TBA 0,67% trong TCA 20% (w/v)). Sau đó hỗn hợp được đun sôi trong 30 phút ở 95°C, sau đó được lấy ra, làm nguội và ly tâm trong 10 phút ở 10.000 g. Thu dịch nổi. Độ hấp thụ của phần dịch nổi được đo ở các bước sóng 450 nm, 532 nm và 600 nm. Các giá trị MDA được biểu thị là nmol/g

$$C_{MDA} (\mu\text{mol/L}) = 6,45 \times (A_{532} - A_{600}) - 0,56 \times A_{450}$$

$$MDA (\text{nmol/g FW}) = C_{MDA} \times V_0 \times (V_t / V_r) / (FW \times 10^6)$$

Trong đó: A_{450} , A_{532} , A_{600} biểu thị độ hấp thụ ở bước sóng 450 nm, 532 nm, 600 nm. C_{MDA} : nồng độ MDA trong dung dịch hỗn hợp (tính theo phương trình 2.1). V_0 , V_t , V_r lần lượt biểu thị thể tích phần hỗn hợp dịch tham gia phản ứng, tổng thể tích dịch chiết thô của mẫu, thể tích dung dịch mẫu lấy trong quá trình đo độ hấp thụ ở các bước sóng. FW là khối lượng tươi của sợi nấm (g)

2.2.4.7. Phương pháp xác định hàm lượng ergosterol của sợi nấm

Phương pháp của Arthington-Skaggs et al. (1999) được sử dụng để xác định hàm lượng ergosterol với một số điều chỉnh nhỏ. Sợi nấm được thu thập bằng cách lọc, rửa ba lần bằng nước muối và nước dư được hấp thụ bằng giấy lọc. Sau đó, 1 g sợi nấm ướt được trộn với 5 mL dung dịch kali hydroxide-ethanol 25% (w/v) và hỗn hợp được vortex trong 2 phút. Sau 2 giờ ủ ở 85 °C trong bể ủ nhiệt, 2 mL nước vô trùng và 5 mL n-hexan được thêm vào và hỗn hợp được khuấy trong 2 phút. Sau đó, lớp n-hexan được thu thập và phát hiện dưới máy quang phổ UV-Vis. Công thức sau được sử dụng để xác định hàm lượng ergosterol:

$$\text{Ergosterol (\%)} = (A_{282}/A_{290})/FW - (A_{230}/A_{518})/FW$$

trong đó: A_{282} và A_{230} độ hấp thụ ở 282 nm và 230 nm, 518 nm và 290 nm. FW: khối lượng tươi sợi nấm

2.2.4.8. Phương pháp xác định hoạt độ các enzyme chống oxy hóa

Superoxide Dismutase (SOD) được xác định theo phương pháp được mô tả của Oury et al. (1992). 3mL hỗn hợp phản ứng, bao gồm: đệm phosphat PBS 100 mM, methionine 0,2M, nitro blue tetrazolium chloride (NBT) 2,25 mM, EDTA 30 mM, Riboflavin 60 μM và natri cacbonat 1,5 M được thêm vào 100 μL chiết xuất enzyme và để yên 10 phút sau đó chuyển vào ủ trong tối. SOD được biểu thị dưới dạng đơn vị hoạt động/ μg protein sau khi đo bước sóng A_{560} . Một đơn vị SOD tương đương với lượng enzyme gây ra sự giảm 50% khả năng ức chế NBT.

Enzyme catalase (CAT) được xác định bằng cách sử dụng 0,5 mL chiết xuất enzyme, 2 mL PBS (50 mM, pH = 7). Phản ứng được tiến hành bằng cách bổ sung 0,5 mL hỗn hợp H_2O_2 30 mM. Mức độ giảm giá trị OD ở bước sóng A_{240} của H_2O_2 được ghi nhận khi có chiết xuất enzyme theo giao thức của Aebi (1984) (Aebi, 1984). Mẫu trắng (blank) được thiết lập bằng hỗn hợp dung dịch đệm phosphate và H_2O_2 30 mM (tỷ lệ 2:1). Hoạt động CAT được biểu thị bằng U/mg.

2.2.5. Phương pháp xử lý số liệu

Dữ liệu được phân tích bằng phần mềm IBM SPSS 23.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, Hoa Kỳ) và DATAtab (Graz, Austria). Tất cả dữ liệu thực nghiệm được trình bày dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn (SD). Sự sai khác giữa các nghiệm thức, công thức xử lý được tiến hành bằng kiểm định Turkey. Mức ý nghĩa thống kê cho tất cả các kiểm định được xem xét ở mức xác suất 0,05 ($p < 0,05$) hoặc 0,01 ($p < 0,01$).

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. SỰ ĐA DẠNG CÁC TÁC NHÂN GÂY HẠI TRÊN CÂY SEN TRỒNG Ở THÀNH PHỐ HUẾ

Từ 392 mẫu bệnh trên cây sen thu thập tại 65 điểm trồng ở Thành phố Huế (04/2021–06/2024), đã phân lập tổng cộng 174 chủng nấm. Qua sàng lọc dựa trên đặc điểm hình thái và xác minh bằng lây nhiễm nhân tạo theo quy trình Koch, 81 chủng được xác định là tác nhân gây hại trên cây sen. Trong đó, 48 chủng phân lập ghi nhận từ giống sen hồng Đồng Tháp (sen cao sản) và 33 chủng phân lập từ các giống sen trắng Huế (Hình 3.2B). Các tác nhân gây bệnh trên cây sen thuộc ngành Ascomycota, phân bố trong 3 lớp: Dothideomycetes, Eurotiomycetes và Sordariomycetes, thuộc 7 họ chính: Pleosporaceae, Botryosphaeriaceae, Diaporthaceae, Aspergillaceae, Apiosporaceae, Sporocadaceae và Glomerellaceae.

Ở cấp chi, có 9 chi nấm liên quan đến triệu chứng bệnh lá sen. Chi *Curvularia* (Pleosporaceae) phổ biến nhất với 26 chủng, chủ yếu gây đốm lá; chi *Exserohilum* (Pleosporaceae) gồm 5 chủng liên quan đến các triệu chứng khô nâu, cháy lá. Họ Botryosphaeriaceae ghi nhận 20 chủng thuộc *Neofusicoccum* (9 chủng) và *Lasiodiplodia* (11 chủng) phần lớn liên quan đến các triệu chứng tàn lụi, thối cuống lá. Chi *Colletotrichum* (Glomerellaceae) với 13 chủng là tác nhân chính gây thán thư và thối lá cây sen. *Nigrospora* (Apiosporaceae) và *Neopestalotiopsis* (Sporocadaceae) mỗi chi có 3 chủng. Chi *Diaporthe* (8 chủng) gây đốm nâu với độc lực thấp, không ổn định. *Aspergillus* (Aspergillaceae) cũng được ghi nhận là các mầm bệnh cơ hội, gây thối rữa lá sen khi xuất hiện các tổn thương vật lý.

3.1.1. Đặc điểm phân bố của các tác nhân gây hại trên cây sen theo giống, địa lý và sinh cảnh

Nghiên cứu phân bố địa lý các tác nhân gây hại trên cây sen hồng và sen trắng tại Thành phố Huế cho thấy sự phân bố không đồng đều giữa các quận/huyện. Quận Phú Xuân ghi nhận tần suất và đa dạng tác nhân cao nhất với 40 chủng (gần 50% tổng số), đại diện cho 8/9 chi nấm. Các địa phương khác như Thuận Hóa, Phong Điền và Hương Trà cũng có số lượng chủng đáng kể, trong khi Phú Vang ghi nhận rất ít do số mẫu thu thập thấp và đặc thù phân bố vùng trồng sen.

Chi *Curvularia* phổ biến nhất với 26 chủng, xuất hiện ở 6/7 địa bàn khảo sát, tập trung chủ yếu tại Phú Xuân và Thuận Hóa. Các chi *Colletotrichum* và *Lasiodiplodia* phân bố tập trung tại Phú Xuân, Phong Điền; trong khi một số chi như *Neopestalotiopsis* và *Nigrospora* có phân bố hạn chế, liên quan đến đặc điểm môi trường và giống sen.

Phân tích môi trường sinh cảnh (ruộng, hồ, chàu) cho thấy ruộng là nơi đa dạng nhất về chi và số lượng chủng, với ưu thế của *Curvularia*, *Lasiodiplodia* và *Exserohilum*. *Curvularia* và *Colletotrichum* phân bố rộng trên cả ba dạng sinh cảnh, trong khi *Colletotrichum* ưu thế trên sen trắng, *Lasiodiplodia* chủ yếu trên sen hồng và tập trung ở ruộng. Một số chi như *Neopestalotiopsis*, *Nigrospora* và *Diaporthe* chỉ xuất hiện chủ yếu ở hồ hoặc chàu, không phổ biến ở ruộng. Ngoài ra, *Exserohilum*, *Neopestalotiopsis* và

Aspergillus chỉ ghi nhận trên sen hồng, cho thấy sự thích nghi đặc thù của các chi nấm với từng sinh cảnh và giống sen. Kết quả phản ánh sự đa dạng và phân bố linh hoạt của các tác nhân gây hại tùy thuộc vào điều kiện môi trường và đặc điểm vật chủ tại khu vực nghiên cứu.

Tóm lại, sự phân bố các chi nấm gây hại trên cây sen tại Thành phố Huế chịu ảnh hưởng đáng kể của yếu tố như giống sen, môi trường sinh cảnh và vị trí địa lý. Sen hồng và sen trắng tồn tại sự khác biệt về các chi nấm ưu thế. Trong khi ruộng được xác định là phân dạng sinh cảnh ghi nhận sự phát triển đa dạng của nhiều chi nấm gây hại. Địa điểm phân lập cũng cho thấy sự khác biệt về thành phần loài và số lượng chủng nấm. Sự phân bố không đồng đều giữa các quận/huyện, có thể liên quan đến điều kiện môi trường và kỹ thuật canh tác đặc thù tại từng vùng, từng sinh cảnh và từng giống sen

3.1.2. Đa dạng thành phần loài nấm gây hại trên cây sen dựa trên kỹ thuật sinh học phân tử

Trong nghiên cứu này, các kỹ thuật sinh học phân tử (giải trình tự DNA và phân tích phát sinh loài đa locus) được sử dụng kết hợp dữ liệu phân tử, hình thái, lịch sử phân bố và ký chủ của 8 chi nấm để xác định chính xác tác nhân gây hại và phát hiện phức hợp loài.

Bảng 3.1. Thống kê các chủng phân lập đã được định danh đến loài trong nghiên cứu

Chi	Phân lập	Loài định danh	Loài mới	Loài ghi nhận mới ở Việt Nam	Loài ghi nhận mới trên cây sen	Loài ghi nhận mới trên cây sen ở Việt Nam
<i>Neofusicoccum</i>	VNHUCC.NEL104 VNHUCC.NEL203 VNHUCC.NEL134 VNHUCC.NEL18	<i>N. parvum</i>	-	+	+	+
<i>Lasiodiplodia</i>	VNHUCC.NEL38 VNHUCC.NEL19 VNHUCC.NEL250 VNHUCC.NEL253 VNHUCC.NEL107 VNHUCC.NEL16	<i>L. theobromae</i>	-	-	-	-
<i>Nigrospora</i>	VNHUCC.NEL30 VNHUCC.NEL431 VNHUCC.NEL233	<i>N. lacticola</i>	-	+	+	+
	VNHUCC.NEL282 VNHUCC.NEL92 VNHUCC.NEL39D1	<i>Colletorichum fruticola</i>	-	-	+	+
<i>Colletotrichum</i>	VNHUCC.NEL70 VNHUCC.NEL79 VNHUCC.NEL10 VNHUCC.NEL72 VNHUCC.NEL172	<i>C. siamense</i>	-	-	-	+
	VNHUCC.NEL71	<i>C. tropicale</i>	-	+	-	+
	VNHUCC.NEL52	<i>C. endophyticum</i>	-	-	+	+
	VNHUCC.NEL92 VNHUCC.NEL102	<i>C. plurivorum</i>	-	-	+	+
	VNHUCC.NEL53	<i>Curvularia. asiatica</i>	-	+	+	+
	VNHUCC.NEL301 VNHUCC.NEL95	<i>C. senegalensis</i>	-	+	+	+
<i>Curvularia</i>	VNHUCC.NEL35 VNHUCC.NEL300 VNHUCC.NEL66 VNHUCC.NEL68 VNHUCC.NEL69	<i>C. plantarum</i>	-	+	+	+

	VNHUCC.NEL32					
	VNHUCC.NEL93					
	VNHUCC.NEL100	<i>C. lunata</i>	-	-	-	+
	VNHUCC.NEL57	<i>C. dactyloctenicola</i>	-	+	+	+
	VNHUCC.NEL101					
	VNHUCC.NEL51	<i>C. radicifolligena</i>	-	+	+	+
	VNHUCC.NEL305					
	VNHUCC.NEL42	<i>C. suttoniae</i>	-	+	+	+
<i>Exserohilum</i>	VNHUCC.NEL137					
	VNHUCC.NEL136	<i>E. rostratum</i>	-	+	+	+
	VNHUCC.NEL34					
	VNHUCC.NEL56					
<i>Neopestalotiopsis</i>	VNHUCC.NEL13	<i>Neopestalotiopsis</i> sp.	+	+	+	+
<i>Aspergillus</i>	VNHUCC.NEL03	<i>A. fumigatus</i>	-	-	+	+
	VNHUCC.NEL160	<i>A. niger</i>	-	-	+	+
<i>Diaporthe</i>	VNHUCC.NEL83					
	VNHUCC.NEL89	<i>D. tectonae</i>	-	+	+	+
	VNHUCC.NEL21					
	VNHUCC.NEL20	<i>D. hongkongensis</i>	-	+	+	+
Tổng cộng			1	13	17	20

3.2. ĐÁNH GIÁ ẢNH HƯỞNG CỦA VẬT LIỆU NANO BẠC ĐẾN CÁC TÁC NHÂN GÂY HẠI TRÊN CÂY SEN Ở ĐIỀU KIỆN PHÒNG THÍ NGHIỆM

3.2.1. Ảnh hưởng của nano bạc đến sự phát triển nấm trên môi trường rắn

3.2.1.1. Hiệu lực ức chế sự sinh trưởng sợi nấm của nano bạc

Kết quả cho thấy hầu hết các chủng phân lập đều thể hiện một xu hướng rõ ràng: khi nồng độ nano bạc tăng, mức độ ức chế sự tăng trưởng sợi nấm cũng tăng theo, tương ứng với sự suy giảm đường kính tản nấm. Tiếp xúc ở dãy nồng độ thấp hơn $\leq 1\text{mg/L}$ không cho thấy sự suy giảm đáng kể hay khác biệt với đối chứng - không xử lý. Tuy nhiên, một số chủng phân lập thử nghiệm thuộc chi *Curvularia* như *C. dactyloctenicola* VNHUCC.NEL57, *C. radicifoliigena* VNHUCC.NEL51, *C. verruculosa* VNHUCC.NEL74, *C. suttoniae* VNHUCC.NEL42 và *C. lunata* VNHUCC.NEL100 lại thể hiện mức độ phản ứng “nhạy cảm” hơn đối với nano bạc nồng độ thấp. Cụ thể, mức độ ức chế tăng trưởng của sợi nấm dao động từ 4,17-15,19% khi xử lý nano bạc ở nồng độ 0,1 mg/L, và 3-25,53% ở nồng độ 1 mg/L. Đáng chú ý, kết quả thử nghiệm Hexaconazole cho thấy có tới 16/29 chủng phân lập ghi nhận hiệu lực ức chế dưới 25% sau 7 ngày, cho dù Hexaconazole vẫn ghi nhận hiệu quả (ức chế hoàn toàn) với một số tác nhân như VNHUCC.NEL37, VNHUCC.NEL31 (*Curvularia* sp.), VNHUCC.NEL42 (*C. suttoniae*), VNHUCC.NEL89 (*D. tectonae*).

Trong khi đó, nano bạc lại ghi nhận khả năng ức chế với hiệu quả nhất định, đặc biệt ở nồng độ cao ($\geq 10\text{ mg/L}$). Cụ thể, nano bạc ở các nồng độ 10, 20 và 30 mg/L đều ức chế đáng kể sự phát triển sợi nấm. Ở 10 mg/L, có 5/29 chủng phân lập ghi nhận sự suy giảm tăng trưởng trên 50%; con số này tăng lên 14/29 ở 20 mg/L. Đáng chú ý, ở nồng độ 30 mg/L, nano bạc đạt hiệu quả ức chế cao nhất với 27/29 (chiếm tỷ lệ 93,10%) chủng phân lập ghi nhận hiệu lực ức chế trên 50%, trong đó có đến 17/29 chủng phân lập đạt hiệu lực ức chế trên 70%. Các chủng phân lập thuộc chi *Curvularia*, vốn nhạy cảm ngay cả ở nồng độ thấp, càng thể hiện sự suy giảm mạnh mẽ hơn khi tiếp xúc với nano bạc ở nồng độ cao hơn. Điều này khẳng định tiềm năng của nano bạc trong việc kiểm soát bệnh hại do *Curvularia* gây ra. Ngoài *Curvularia*, hiệu quả ức chế đáng kể (trên 55% so với đối chứng) cũng được ghi nhận ở các tác nhân gây hại thuộc các chi nấm khác như *Diaporthe*, *Nigrospora*, *Exserohilum*,

Neofusicoccum và *Aspergillus* khi xử lý với nano bạc ở nồng độ từ 20 mg/L trở lên. Những kết quả này không chỉ nhấn mạnh vai trò của nano bạc như một giải pháp thay thế hiệu quả mà còn gợi mở chiến lược phổ rộng trong quản lý bệnh nấm trên cây sen, hứa hẹn một hướng đi bền vững và hiệu quả trong nông nghiệp. Sự đáp ứng với nano bạc giữa các chủng nấm rất đa dạng. Mặc dù nhiều chủng nhạy cảm cao, một số phân lập như VNHUCC.NEL80 (*Curvularia* sp.) và VNHUCC.NEL72 (*Colletotrichum siamense*) lại ít hoặc không bị tác động bởi nano bạc.

Không phải chủng phân lập nào cũng ghi nhận hiệu lực ức chế tăng theo mức độ tuyến tính tương ứng sự gia tăng nồng độ/liều lượng nano bạc. Cụ thể, việc tiếp xúc với nano bạc ở nồng độ 0,1 mg/L, chủng phân lập VNHUCC.NEL57 (*C. dactyloctenicola*) ghi nhận sự tăng trưởng nhẹ so với đối chứng. 3 chủng phân lập VNHUCC.NEL37 (*Curvularia* sp.), VNHUCC.NEL32 (*Curvularia plantarum*), VNHUCC.NEL42 (*Curvularia suttoniae*), và 2 chủng phân lập VNHUCC.NEL10 và VNHUCC.NEL70 của loài *Colletotrichum siamense* đã thể hiện một xu hướng phi tuyến tính, với hiệu lực ức chế khi xử lý ở nồng độ nano bạc 1 mg/L thấp hơn khi xử lý với nồng độ 0,1 mg/L.

3.2.1.2. Độ nhạy của nano bạc (Giá trị EC_{50})

Sự khác biệt về độ nhạy cảm kháng nấm của nano bạc phản ánh đa dạng sinh học và đặc tính sinh lý riêng của từng chủng, cũng như cách chúng phản ứng với stress môi trường và tác nhân điều trị. Nghiên cứu xác định chỉ số EC_{50} — nồng độ nano bạc ức chế 50% sự phát triển nấm — bằng cách phân tích đường cong đáp ứng theo liều lượng trên đĩa thạch với các nồng độ khác nhau. Để ước lượng EC_{50} , ba mô hình hồi quy được sử dụng bao gồm mô hình phi tuyến tính Probit với biến đổi $\log_{10}$, nội suy tuyến tính trên trục nồng độ $\log_{10}$, mô hình hồi quy logarit tuyến tính, nhằm đảm bảo tính chính xác và phù hợp trong phân tích dữ liệu. Giá trị EC_{50} của 29 chủng phân lập thử nghiệm sử dụng phương pháp hồi quy Probit (chuyển đổi sang $\log_{10}$) dao động từ 3,422 đến 43,543 mg/L với giá trị trung vị của tập giá trị là 18,88 và trung bình của tập giá trị là 19,75. Trong đó, có 50% giá trị EC_{50} nằm trong khoảng từ 11,98 (Q1) đến 26,70 (Q3). Việc chọn mô hình phù hợp là yếu tố quan trọng giúp nâng cao độ chính xác, tính nhất quán và thuận tiện so sánh kết quả nghiên cứu về hiệu quả nano bạc.

3.2.1.3. Ảnh hưởng của nano bạc đến hình thái tản nấm

- **Thay đổi màu sắc tản nấm:** Sự tiếp xúc với nano bạc trên môi trường đĩa thạch dẫn đến những biến đổi màu sắc đáng kể trên bề mặt tản nấm. Cụ thể:

+ Sự gia tăng, mở rộng của các vùng/pattern màu trắng/sáng trên mặt chính (upper) hay những vết tối màu xuyên tâm ở mặt ngược (reverse)

+ Tiết sắc tố: Một số chủng phân lập, như *Curvularia* VNHUCC.NEL37 ghi nhận tiết sắc tố màu nâu ra môi trường khi tiếp xúc với nano bạc ở nồng độ 20 mg/L.

- **Biến đổi bất thường về hình thái tản nấm:**

+ Gia tăng phát triển sợi nấm khí sinh (aerial mycelia) thay vì xu hướng bình thường lan rộng theo phương ngang để tối ưu hấp thụ chất dinh dưỡng.

+ Biến đổi bất thường ở phần rìa/viên (margin) của tản nấm, thể hiện qua các đường viền dạng gợn sóng, là hiện tượng đáng chú ý khi tiếp xúc với nano bạc. Nguyên nhân chính của hiện tượng này có thể bắt nguồn từ sự thay đổi cấu trúc và biến đổi bên trong tế bào nấm, dẫn đến sự co rút không đồng đều của sợi nấm theo thời gian. Đặc biệt, chủng phân lập *Curvularia lunata* (VNHUCC.NEL100) thể hiện sự nhạy cảm đáng kể với hiện tượng này. Ngay cả ở nồng độ nano bạc thấp (0,1 mg/L), các đường viền gợn sóng đã xuất hiện rõ rệt, phản ánh "tính mất cảm" cao của phân lập này với tác động của nano bạc. Trạng thái biến

đôi này cũng được ghi nhận ở *Neofusicoccum parvum* (VNHUCC.NEL18) và *Colletotrichum plurivorum* (VNHUCC.NEL92) ở nồng độ nano bạc 10 mg/L trở lên

+ Xu hướng thay đổi kết cấu (texture): một số chủng phân lập ghi nhận xu hướng gia tăng kết cấu bông xốp tăng dần tương ứng với sự gia tăng nồng độ nano bạc tiếp xúc (các chủng phân lập của *Curvularia* spp. VNHUCC.NEL74, VNHUCC.NEL 51, VNHUCC.NEL37, VNHUCC.NEL80, *E. rostratum* – VNHUCC.NEL56, *Neopestalotiopsis* sp. – VNHUCC.NEL13, *N. lacticolonica* – VNHUCC.NEL30 và các chủng *Colletotrichum* spp., đặc biệt là *C. fructicola* (VNHUCC.NEL91) và *C. tropicale* (VNHUCC.NEL71). Ngược lại, một số chủng phân lập khác lại chuyển đổi thành dạng kết cấu phẳng hơn khi tiếp xúc với nano bạc *Neofusicoccum parvum* (VNHUCC.NEL18) và *Curvularia senegalensis* (VNHUCC.NEL95).

3.2.2. Ảnh hưởng của nano bạc đến sự sinh trưởng nấm trong môi trường lỏng

Nghiên cứu chọn 8 chủng phân lập đại diện (Bảng 3.3) dựa trên tính đa dạng, độ nhạy với nano bạc (EC_{50}), tốc độ phát triển nhanh và khả năng phát triển không bị ức chế hoàn toàn, thuận lợi cho quan sát ảnh hưởng của nano bạc. Một số chi như *Neofusicoccum*, *Nigrospora*, *Neopestalotiopsis*, *Diaporthe* không được chọn do thời gian hình thành bào tử dài, đa dạng bào tử phức tạp hoặc bị ức chế mạnh, không phù hợp cho đánh giá chi tiết.

3.2.2.1. Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) và nồng độ diệt nấm tối thiểu (MFC)

Resazurin là một thuốc nhuộm có khả năng biểu thị chỉ số màu của hoạt động trao đổi chất dựa trên quá trình trao đổi chất năng lượng được và đã được sử dụng rộng rãi trong các thử nghiệm khả năng sống và độc tính tế bào (Serrano et al., 2023). Kết quả thử nghiệm pha loãng vi giếng được ghi nhận và thể hiện ở Bảng 3.3 cho thấy, giá trị MIC của nano bạc với các chủng phân lập đại diện dao động 0,3125 – 5 mg/L. Ba chủng phân lập VNHUCC.NEL10 (*Colletotrichum siamense*), VNHUCC.NEL51 (*Curvularia radicifoliigena*) và VNHUCC.NEL74 (*C. verruculosa*) đều thể hiện mức độ nhạy cảm cao với giá trị MIC rất thấp (0,3125 mg/L).

Chủng phân lập ghi nhận mức độ kháng cao VNHUCC.NEL80 (*Curvularia* sp.) trong thử nghiệm ức chế sợi nấm trên môi trường rắn cũng được đánh giá trong thử nghiệm này: mặc dù ghi nhận nồng độ ức chế tối thiểu tương đối thấp 1,25 mg/L nhưng nồng độ diệt nấm tối thiểu (MFC) lại lên đến 10 mg/L. Nồng độ 10 mg/L cũng được xác định nồng độ ức chế tối thiểu của *A. niger* (VNHUCC.NEL160). Mặc dù có hiệu quả kháng lại tất cả các chủng phân lập nấm đã thử nghiệm, nhưng nano bạc dường như không có hoạt tính diệt nấm (thể hiện qua chỉ số MFC/MIC ≥ 4) đối với một số phân lập: VNHUCC.NEL38 (*L. theobromae*), VNHUCC.NEL56 (*E. rostratum*), VNHUCC.NEL80 (*Curvularia* sp.). Điều này cũng được xác nhận bằng cách tiến hành nuôi cấy dịch từ các đĩa sau MIC trên môi trường PDA.

Bảng 3.3. Giá trị nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) và giá trị nồng độ diệt nấm tối thiểu (MFC) của các phân lập đại diện thực hiện trên đĩa vi giếng 96

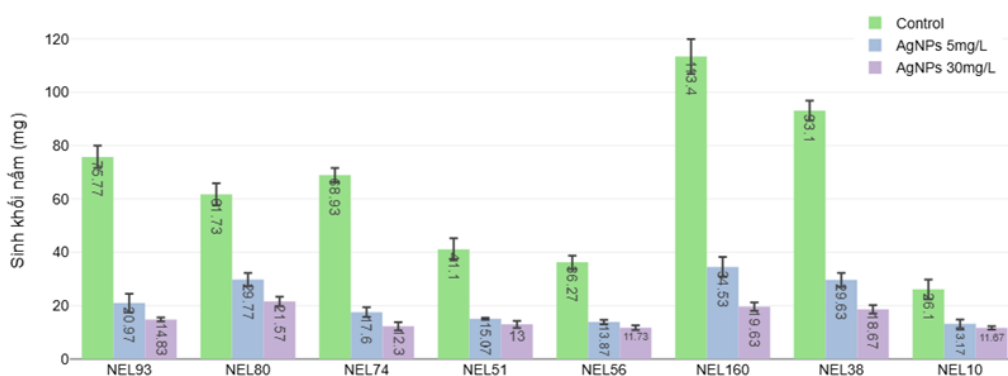
Phân lập đại diện	Chi/Loài	MIC	MFC	MFC/MIC
VNHUCC.NEL93	<i>Curvularia plantarum</i>	2,5	5	2
VNHUCC.NEL80	<i>Curvularia</i> sp.	1,25	10	8
VNHUCC.NEL74	<i>C. verruculosa</i>	0,3125	20	64
VNHUCC.NEL51	<i>C. radicifoliigena</i>	0,3125	0,3125	1
VNHUCC.NEL56	<i>E. rostratum</i>	1,25	5	4
VNHUCC.NEL160	<i>A. niger</i>	5	10	2
VNHUCC.NEL38	<i>L. theobromae</i>	1,25	ND	ND

Chú thích: ND (not detected): không xác định. MFC là giá trị nồng độ của vi giống được trải trên môi trường PDA không ghi nhận sự sinh trưởng sau 48 giờ.

Dựa trên kết quả xác định nồng độ tối thiểu ức chế (MIC) được trình bày trong mục 3.3.2.1, nghiên cứu đã lựa chọn một giá trị MIC chung (MICc) - 5 mg/L làm ngưỡng giới hạn chuẩn để đánh giá tác động của tám chủng phân lập khác nhau. Bên cạnh đó, một nồng độ nano bạc quá ngưỡng - nồng độ 30 mg/L được lựa chọn để tiến hành đồng đánh giá trong các thử nghiệm liên quan đến sinh khối, tính toàn vẹn màng tế bào và enzyme

3.2.2.2. Ảnh hưởng của nano bạc đến sinh khối nấm

Sự phát triển của sợi nấm của các chủng phân lập trong môi trường PDB có chứa nano bạc sau 3 ngày bị ức chế đáng kể và được thể hiện ở Hình 3.27. Tác động của nano bạc ở các nồng độ khác nhau (5 mg/L và 30 mg/L) lên sự suy giảm khả năng tăng trưởng, tạo sinh khối của 8 chủng phân lập thử nghiệm được thể hiện rõ nét so với mẫu đối chứng.



Hình 3.27. Ảnh hưởng của nano bạc đến khả năng tăng sinh khối (khô) sau 3 ngày nuôi cấy.

Ở nồng độ 5 mg/L, nano bạc cho thấy tác động lên sinh khối của hầu hết các chủng phân lập thử nghiệm, ghi nhận sự giảm đáng kể sinh khối được tạo thành so với mẫu đối chứng, dao động trong khoảng từ 13,17 mg (VNHUCC.NEL10 – *Colletotrichum siamense*) đến 34,53 mg (VNHUCC.NEL160 – *A. niger*), tương ứng mức giảm từ 49,5 – 72%. Chủng phân lập VNHUCC.NEL93 (*C. plantarum*) ghi nhận sự suy giảm sinh khối lớn nhất, giảm 72,3% lượng sinh khối so với mẫu đối chứng. Xử lý ở nồng độ 30 mg/L cho thấy sinh khối của hầu hết các chủng phân lập tiếp tục giảm mạnh. Lượng sinh khối thu được sau 3 ngày nuôi cấy chỉ dao động trong khoảng từ 11,73 mg (NEL56) đến 21,57 mg (NEL160). Các chủng phân lập VNHUCC.NEL93 (*C. plantarum*), VNHUCC.NEL74 (*C. verruculosa*) và VNHUCC.NEL160 (*A. niger*) đều ghi nhận mức suy giảm trên 80% so với mẫu đối chứng tương ứng. Đặc biệt, 02 chủng phân lập VNHUCC.NEL160 (*A. niger*), VNHUCC.NEL38 (*L. theobromae*) có khả năng tạo sinh khối ban đầu rất cao trong điều kiện bình thường, nhưng lại rất nhạy cảm với nano bạc, thể hiện qua tỷ lệ ức chế sinh khối rất cao, với sự suy giảm sinh khối ghi nhận lần lượt lên tới hơn 82,7% và 79,9 % ở nồng độ 30 mg/L.

3.2.3. Ảnh hưởng nano bạc đến đặc điểm sinh hóa và tính toàn vẹn của màng tế bào

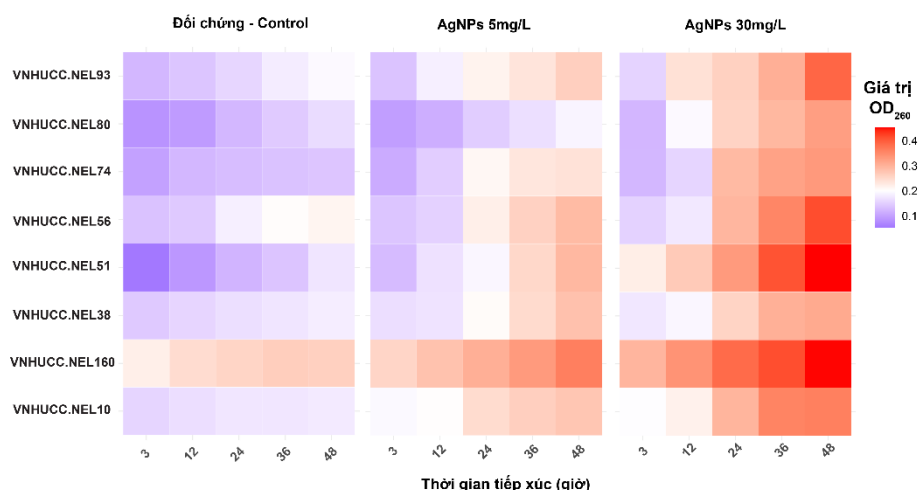
Màng tế bào đóng vai trò quan trọng trong việc duy trì áp suất thẩm thấu và chức năng bình thường. Màng tế bào hoạt động như một rào cản bảo vệ tế bào bằng cách điều chỉnh sự trao đổi các hợp chất bên trong và bên ngoài tế bào và duy trì sự ổn định của môi trường nội bào

3.2.3.1. Rò rỉ thành phần nội bào (acid nucleic – OD₂₆₀)

Để nghiên cứu sâu hơn về tổn thương màng tế bào của nấm, độ dẫn điện ngoại bào và acid nucleic (OD₂₆₀) của môi trường đã được ghi nhận sau khi xử lý với nano bạc. So với nhóm đối chứng, sau khi xử lý nano bạc, các minh chứng cho thấy có những tác động đến

tính thấm của màng sợi nấm, với sự rò rỉ vật chất nội bào tăng lên theo nồng độ và thời gian xử lý (Hình 3.28).

Nghiên cứu đánh giá độ hấp thụ OD₂₆₀ của dịch lọc sợi nấm nuôi cấy với các nồng độ nano bạc khác nhau để phản ánh sự rò rỉ acid nucleic nội bào. Kết quả cho thấy nano bạc ở 5 mg/L và 30 mg/L làm tăng đáng kể OD₂₆₀ so với đối chứng, với mức rò rỉ lớn hơn ở 30 mg/L và tăng theo thời gian tiếp xúc, đặc biệt rõ rệt sau 24 giờ. Chủng VNHUCC.NEL38 (*L. theobromae*) thể hiện sự khác biệt rõ ràng về OD₂₆₀ giữa hai nồng độ nano bạc qua các mốc thời gian từ 12 đến 48 giờ. Một số chủng khác như VNHUCC.NEL74, VNHUCC.NEL51, VNHUCC.NEL10 có tốc độ rò rỉ giảm sau 36-48 giờ, có thể do màng tế bào bị phá hủy hoàn toàn. Kết quả xác nhận nano bạc có khả năng làm tổn thương màng tế bào, gây giải phóng các thành phần nội bào.



Hình 3.28. Biểu đồ Heatmap tác động của nano bạc đến sự xu hướng thay đổi giá trị OD₂₆₀ của 8 chủng phân lập thử nghiệm khác nhau theo các nồng độ xử lý nano bạc. Mỗi nồng độ được thể hiện trong một khối (block) nhất định. Thang tỷ lệ biểu thị giá trị OD₂₆₀ tương ứng.

3.2.3.2. Độ dẫn điện ngoại bào (*Extracellular electrical conductivity – EEC*)

Bên cạnh đó, một bảng chứng cho thấy một khi màng tế bào nấm bị tổn thương, sự giải phóng của ion bên trong tế bào sẽ gia tăng dẫn đến độ dẫn điện của dịch môi trường ngoại bào tăng lên. Xu hướng tăng độ dẫn điện ngoại bào (EEC) của các chủng phân lập được ghi nhận khi xử lý nano bạc theo thời gian. Ở hầu hết nồng độ nano bạc, EEC đều cao hơn nhóm đối chứng ($p < 0,05$), ngoại trừ một số chủng không khác biệt ở nồng độ 5 mg/L sau 3 giờ. Nồng độ cao 30 mg/L tạo ra sự tăng EEC đáng kể hơn, đặc biệt rõ rệt sau 48 giờ ($p < 0,01$), cho thấy tác động mạnh hơn so với 5 mg/L.

Đáng chú ý, khi xét đến tác động của nano bạc theo thời gian tiếp xúc, so với đối chứng, giá trị EEC của 8 tác nhân gây bệnh tăng đáng kể khi kéo dài thời gian xử lý. Ở các mốc thời gian ngắn (3 giờ và 12 giờ) cho thấy giá trị EEC quan sát được có xu hướng tăng, nhưng không quá khác biệt so với nhóm đối chứng. Tuy nhiên, ghi nhận ở các thời điểm dài hơn (36 giờ và 48 giờ), phần lớn các giá trị EEC tăng lên đáng kể so với các khoảng thời gian tiếp xúc sớm trước đó. Kết quả này gợi mở rằng có thể các chủng phân lập vẫn giữ hay duy trì khả năng chống chịu với nano bạc ở một mức độ và thời gian chống chịu nhất định, đặc biệt là trong giai đoạn tiếp xúc sớm, trước 12 giờ. Ngoài xu hướng chung về giá trị EEC ở các chủng phân lập khi tiếp xúc với nano bạc đã được xác định, để tiến hành so sánh mức độ gia tăng giá trị EEC này giữa các phân lập, nghiên cứu này đã tiến hành chuẩn hóa dữ liệu sang dạng mức độ thay đổi tương đối theo tỷ lệ phần trăm để đảm bảo cùng một giá trị đầu vào. VNHUCC.NEL51 (*C. radicifoliigena*) cho thấy

sự gia tăng EEC lớn nhất khi được xử lý bằng nano bạc. Cụ thể, ở nồng độ 30 mg/L, sự gia tăng lần lượt đạt 113,65% sau 36 giờ và 145,27% sau 48 giờ. Đối với nồng độ 5 mg/L, mức tăng tương ứng là 83,18% và 102,59% tại các thời điểm 36 giờ và 48 giờ. Một chủng phân lập *Curvularia* khác - VNHUCC.NEL74 (*C. verruculosa*) cũng ghi nhận tác động mạnh mẽ với mức độ gia tăng EEC quan sát được tăng lần lượt 124,83% và 84,70% ở khi xử lý ở 5 mg/L và 30 mg/L sau 48 giờ. So với các phân lập trong thử nghiệm, VNHUCC.NEL38 (*L. theobromae*) ghi nhận sự thay đổi giá trị EEC thấp nhất so với đối chứng. Cụ thể ở thời điểm 48 giờ sau khi xử lý nano bạc, mức độ gia tăng ghi nhận so với đối chứng lần lượt là 34,33% và 64,33% ở nồng độ 5 mg/L và 30 mg/L.

3.2.3.3. Hàm lượng Ergosterol

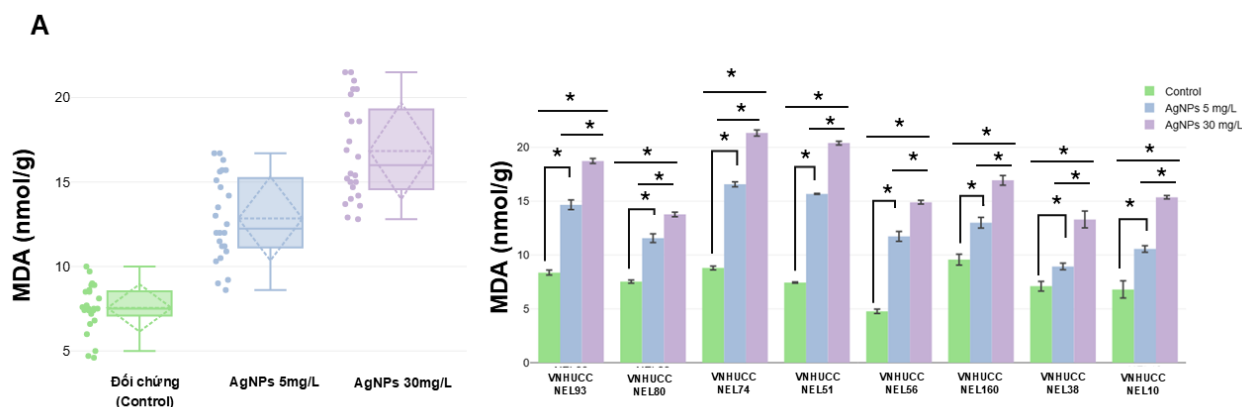
Ergosterol là thành phần sterol chính của màng nấm, đóng vai trò quan trọng vào quá trình điều hòa tính thấm và tính lưu động của màng; điều hòa, hoạt động và phân phối các protein màng tích hợp; và kiểm soát chu kỳ tế bào - đóng vai trò quan trọng đối với tính toàn vẹn về mặt cấu trúc của màng tế bào (Alcazar-Fuoli & Mellado, 2012; Ouyang et al., 2021).

Kết quả nghiên cứu cho thấy, xử lý bằng nano bạc làm giảm đáng kể hàm lượng ergosterol ở các chủng phân lập thử nghiệm ($p < 0,05$), không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa xử lý nano bạc ở nồng độ 5 mg/L và 30 mg/L với hai chủng phân lập VNHUCC.NEL38 (*L. theobromae*) và VNHUCC.NEL80 (*Curvularia* sp.) nhưng có sự khác biệt đáng kể có ý nghĩa thống kê so với đối chứng không xử lý ($p < 0,05$). Các chủng phân lập thuộc chi *Curvularia* sp. như VNHUCC.NEL93, VNHUCC.NEL80, VNHUCC.NEL74, VNHUCC.NEL51 đều ghi nhận hàm lượng ergosterol giảm trên 50% so với đối chứng ở nồng độ 30 mg/L. VNHUCC.NEL93 (*C. plantarum*) là chủng phân lập ghi nhận sự suy giảm hàm lượng ergosterol lớn nhất với mức độ suy giảm 75% so với đối chứng. Đặc biệt, chủng phân lập VNHUCC.NEL51 (*C. radicifoliigena*) khi tiếp xúc với nano bạc ở nồng độ 5 mg/L chỉ ghi nhận sự suy giảm 18,12% hàm lượng ergosterol nhưng thể hiện nhạy cảm cao khi xử lý với nồng độ cao 30 mg/L. Hàm lượng ergosterol của VNHUCC.NEL74 (*C. verruculosa*) cũng cho thấy sự giảm mạnh: 57,32% so với đối chứng và 46,40% so với xử lý nano bạc 5 mg/L. Trong khi đó, ở các phân lập đại diện thuộc các chi khác như VNHUCC.NEL10 (*C. siamense*), VNHUCC.NEL160 (*A. niger*), VNHUCC.NEL38 (*N. parvum*), VNHUCC.NEL56 (*E. rostratum*) ghi nhận một mức suy giảm hàm lượng ergosterol thấp hơn, dao động từ 37 – 52,13% nhưng khác biệt đáng kể so với đối chứng ở nồng độ 30 mg/L ($p < 0,05$).

3.3.3.4. Quá trình peroxy hóa lipid – MDA

Malondialdehyde (MDA) là sản phẩm phân hủy của quá trình peroxy hóa lipid và thường được dùng để theo dõi quá trình peroxy hóa lipid do tổn thương oxy hóa, và được xem như một chỉ số có thể phản ánh gián tiếp mức độ tổn thương peroxy hóa mô (Castro et al., 2015; Zhao et al., 2016).

Những thay đổi về hàm lượng MDA nội bào theo nồng độ xử lý nano bạc khác nhau lên các chủng phân lập thử nghiệm được thể hiện ở Hình 3.33. Bên cạnh những bằng chứng mức độ rò rỉ acid nucleic, độ dẫn điện ngoại bào, nghiên cứu cũng nhận thấy sự gia tăng giá trị MDA ở tất cả các chủng phân lập nấm được thử nghiệm với nano bạc sau 48 giờ (Hình 3.33B). Kết quả cho thấy, xử lý nano bạc làm tăng đáng kể hàm lượng MDA sau 48 giờ tiếp xúc ở tất cả 8 phân lập thử nghiệm ($p < 0,05$). Cụ thể, việc xử lý nano bạc ở nồng độ 5 mg/L và 30 mg/L dẫn đến nồng độ MDA cao hơn từ 1,2 đến 3,1 lần so với đối chứng không xử lý. Điều này chứng minh rằng nano bạc có thể đã thúc đẩy phản ứng lipid và peroxide trong màng tế bào và sự gia tăng này sẽ làm hỏng, dẫn đến việc không thể phục hồi tính toàn vẹn của màng, từ đó gia tăng tính thấm và rò rỉ các thành phần nội bào ra khỏi tế bào.



Hình 3.33. Hàm lượng MDA ($\mu\text{mol/g}$) khi xử lý với nano bạc sau 48 giờ. A. Biểu đồ phân bố (Box plot) các giá trị dữ liệu quan sát được của MDA giữa nhóm đối chứng (Control) và nhóm được xử lý với nano bạc (5 mg/L và 30 mg/L). B. Biểu đồ cho thấy sự khác nhau hàm lượng MDA theo từng phân lập. Sự khác biệt có ý nghĩa ($p < 0,05$) được biểu thị bằng “*”. từng phân lập.

3.2.3.5. Ảnh hưởng của nano bạc đối với hệ thống các enzyme chống oxy hóa

Cân bằng oxy hóa khử trong tế bào đóng vai trò rất quan trọng để duy trì khả năng sống của tế bào và ROS nội bào dư thừa sẽ phá vỡ trạng thái cân bằng oxy hóa khử. Dưới tác động của stress oxy hóa, hệ thống chống oxy hóa của tế bào bao gồm các enzyme chống oxy hóa và các hợp chất không phải enzyme, bảo vệ tế bào khỏi stress oxy hóa bằng cách duy trì cân bằng oxy hóa khử nội bào, và các enzyme chống oxy hóa chuyển đổi ROS hình thành trong tế bào thành các chất ít độc hoặc vô hại, có tác dụng làm chậm tốc độ oxy hóa (Šimončicová et al., 2018; Su et al., 2020).

Enzyme superoxide dismutase (SOD) là một trong những enzyme chính chịu trách nhiệm bảo vệ chống lại stress oxy hóa, đóng vai trò là chất chống oxy hóa hoạt động như chất dọn gốc tự do và ngăn ngừa các quá trình trung gian do gốc tự do (Mansoor et al., 2022; Yu et al., 2020). Dựa trên các kết quả thu được thể hiện ở Hình 3.34, ở thời điểm 48 giờ sau khi xử lý với nano bạc (ở cả 2 nồng độ), hoạt độ enzyme SOD ở phần lớn các chủng phân lập thử nghiệm có xu hướng giảm và khác biệt đáng kể với mẫu đối chứng ($p < 0,05$). Mức độ suy giảm hoạt độ enzyme SOD lớn nhất ghi nhận ở chủng phân lập VNHUCC.NEL74 (*Curvularia verruculosa*), với mức suy giảm 67,98% khi xử lý ở nồng độ 30 mg/L so với đối chứng. Ngược lại, VNHUCC.NEL10 (*Colletotrichum siamense*) và VNHUCC.NEL56 (*E. rostratum*) lại ghi nhận sự gia tăng hoạt độ enzyme SOD khi xử lý nano bạc. Sự gia tăng hoạt động của enzyme chống oxy hóa tăng (SOD) cho thấy bào tử của những phân lập này đã và đang ở trạng thái kích thích oxy hóa mạnh hơn dưới tác động của nano bạc ở thời điểm 48 giờ, và do đó sự gia tăng các enzyme chống oxy hóa ở đây là phòng vệ tự nhiên. Trong khi đó, enzyme catalase (CAT) lại cho thấy mức độ một sự nhạy cảm lớn hơn với việc xử lý nano bạc, với phần lớn ghi nhận được biến động theo chiều hướng giảm và có khác biệt đáng kể so với mẫu đối chứng, đặc biệt là với nồng độ xử lý 30 mg/L ($p < 0,05$, ngoại trừ VNHUCC.NEL10 – *C. siamense*).

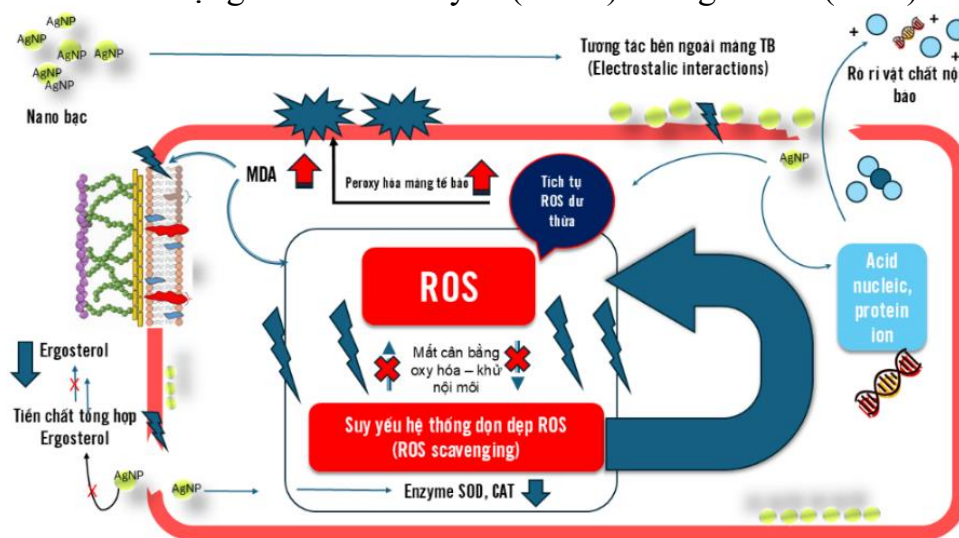
3.2.4. Ảnh hưởng vi mô của nano bạc đến sự sinh trưởng của nấm

Đánh giá vi mô lên bào tử và sợi nấm cũng được ghi nhận thông qua kính hiển vi điện tử để đánh giá những tác động bên trong việc ức chế sự phát triển của tác nhân gây bệnh nấm này. Kết quả ghi nhận cho thấy, nano bạc gây ra nhiều thay đổi hình thái khác nhau trên sợi nấm và bào tử của các tác nhân gây hại. Những bất thường về hình thái nổi bật đã được quan sát thấy, bao gồm:

- i. So với sự phát triển của sợi nấm trong điều kiện bình thường, nano bạc có khả năng gây ra sự biến dạng hay mất vách ngăn ở các tế bào sợi nấm
- ii. Một vật liệu ngoại bào xung quanh sợi nấm trong các nuôi cấy đối chứng trong tất cả các giai đoạn được phân tích, được nhìn thấy như một vật liệu bông trên các tế bào hoặc như một sợi nhỏ gắn các sợi nấm với nhau, giống như một màng sinh học.
- iii. Nhiều chủng phân lập quan sát thấy tình trạng đông tụ tế bào chất đáng kể, sợi nấm bị teo lại hoặc biến dạng (co thắt bất thường).
- iv. Những biến đổi đáng kể như sự biến dạng và giảm độ chặt của hạch nấm, cùng với các sợi nấm không màu và bị phân mảnh, tương quan với nồng độ AgNPs. Diện tích bề mặt lớn hơn của nano bạc cho phép bám dính và khuếch tán chặt hơn vào bề mặt tế bào nấm, dẫn đến tính toàn vẹn của màng bị tổn hại và ức chế nấm hiệu quả
- v. Sự tích lũy của các thành phần ngoại lai ở phía ngoài màng và sự xâm nhập tích tụ vào bên trong cũng được quan sát.
- vi. Sự rò rỉ vật chất nội bào của sợi nấm, bào tử cũng được ghi nhận.
- vi. Sự suy giảm/mất sắc tố hoặc gia tăng hiện tượng nâu hóa

3.2.5. Mô hình hóa và giả thuyết tác động của nano bạc đến khả năng ức chế sinh trưởng phát triển nấm trong điều kiện phòng thí nghiệm

Mô hình giả thuyết về tác động của nano bạc trong nghiên cứu này được xây dựng dựa trên các số liệu về sinh khối và những biến đổi sinh hóa đã ghi nhận. Dưới tác động của nano bạc ở hai nồng độ 5 mg/L và 30 mg/L, hai nhân tố chính ảnh hưởng đến sự biến đổi sinh khối là hàm lượng malondialdehyde (MDA) và ergosterol (ERG).



Hình 3.41. Mô hình giả thuyết con đường tác động của nano bạc lên sự phát triển nấm

Khi nano bạc thâm nhập nội bào, tế bào nấm xem đây như một tác nhân lạ gây stress, kích thích sản sinh các loại oxy phản ứng (ROS). Sự gia tăng và tích tụ ROS vượt quá mức bình thường. Trong điều kiện cân bằng, hệ thống chống oxy hóa nội bào như superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) và các enzyme khác sẽ duy trì và kiểm soát nồng độ ROS, ngăn ngừa tổn thương tế bào. Tuy nhiên, các bằng chứng hóa sinh trong nghiên cứu này cho thấy hoạt độ của các enzyme chống oxy hóa này giảm đáng kể khi xử lý với nano bạc. Một khi sự suy giảm này xảy ra với các enzyme đóng vai trò dọn dẹp này, hệ quả tất yếu là làm suy yếu khả năng loại bỏ ROS dư thừa. Theo thời gian, ROS tích tụ gây mất cân bằng oxy hóa khử trong tế bào. Sự tích tụ ROS dẫn đến những tổn thương nghiêm trọng, tăng cường quá trình peroxy hóa lipid màng tế bào, được biểu thị bằng sự gia tăng nồng độ malondialdehyde (MDA) – một dấu hiệu rõ ràng của sự tổn thương màng

tế bào. Trong trạng thái này, tế bào chịu áp lực kép từ các tác động nội bào và ngoại bào lên màng, gây ra biến dạng và hư hại cấu trúc màng. Hậu quả là màng tế bào bị rò rỉ các thành phần nội bào quan trọng như acid nucleic, protein, ion... dẫn đến suy giảm chức năng sinh trưởng và cuối cùng là chết tế bào

CHƯƠNG 4. KẾT LUẬN & KIẾN NGHỊ

4.1. KẾT LUẬN

Từ kết quả nghiên cứu của đề tài luận án, rút ra được một số kết luận sau:

- Nghiên cứu đã xây dựng bộ dữ liệu về đa dạng và phân bố của thành phần loài nấm gây hại trên cây sen tại Thành phố Huế trên cách tiếp cận tích hợp dựa trên các bằng chứng dữ liệu hình thái, phân tích phát sinh loài đa locus và các tiêu chí xác định ranh giới loài (GCPSR, PTP). Xác định được 21 tác nhân gây bệnh đến cấp độ loài, thuộc 9 chi nấm khác nhau. Trong đó, 13 loài là ghi nhận mới cho khu hệ nấm Việt Nam, 20 loài là ghi nhận mới trên cây sen tại Việt Nam, và 17 loài lần đầu tiên được xác định là tác nhân gây bệnh trên cây sen trên thế giới. Nghiên cứu cũng chỉ ra rằng sự phân bố thành phần loài nấm gây hại không đồng đều theo địa lý và sinh cảnh, cho thấy các loài nấm gây hại trên cây sen tại thành phố Huế có tính đa dạng và phức tạp sinh học rõ rệt.

- Nano bạc có tác dụng ức chế mạnh mẽ sự phát triển của các chủng nấm gây hại trên cây sen trong điều kiện phòng thí nghiệm trên cả môi trường rắn và lỏng. Cụ thể, phần lớn cho thấy hiệu lực ức chế nấm của nano bạc tăng, tương ứng với sự gia tăng nồng độ. Tuy nhiên, mức độ hiệu quả khác nhau giữa các chủng cũng như loài. Giá trị EC_{50} của nano bạc đối với các chủng phân lập đã được xác định thông qua ba mô hình khác nhau, cho phép phân loại mức độ nhạy cảm các chủng nấm gây hại trên cây sen thành bốn mức: rất nhạy cảm, nhạy cảm, kháng và kháng mạnh dựa trên phương pháp thống kê tứ phân vị. Trong môi trường lỏng, nano bạc đã thể hiện hiệu quả ức chế sinh khối và sự phát triển của tám chủng nấm gây hại, với hiệu quả tăng theo nồng độ từ 5 đến 30 mg/L. Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) dao động từ 0,3125 đến 5 mg/L. Cơ chế ức chế sự sinh trưởng phát triển nấm của nano bạc được thể hiện qua việc gây tổn thương màng tế bào nấm, dẫn đến tăng rò rỉ acid nucleic và độ dẫn điện ngoại bào (EEC), cũng như giảm nồng độ ergosterol trong màng tế bào. Đồng thời, mức độ peroxy hóa lipid (MDA) tăng lên, trong khi hoạt động của các enzyme chống oxy hóa như SOD và CAT giảm, cho thấy sự suy yếu khả năng chống chịu của tế bào nấm.

4.2. KIẾN NGHỊ

- Tiếp tục thu thập và xác định đặc điểm sinh học của các chủng phân lập gây bệnh trên cây sen chưa đủ dữ liệu để xác định loài, đồng thời tiến hành khuếch đại và phân tích thêm các locus bổ sung nhằm hoàn thiện việc phân loại và nhận diện chính xác các chủng còn lại. Tiếp tục đánh giá ảnh hưởng của nano bạc đối với các chủng nấm như *Diaporthe*, *Neofusicoccum* và *Neopestalotiopsis*, do các chủng này đòi hỏi thời gian nghiên cứu kéo dài và chưa được thực hiện trong phạm vi nghiên cứu hiện tại.

- Triển khai các nghiên cứu chuyên sâu hơn, bao gồm kỹ thuật SEM, TEM và phân tích phân tử như RNA sequencing, để đánh giá tác động của nano bạc ở các cấp độ tế bào và phân tử một cách toàn diện hơn. Tiến hành các đánh giá độc lực, hoặc độc tính sinh thái của nano bạc khi sử dụng tại các quy mô lớn như đồng ruộng

HUE UNIVERSITY
INSTITUTE OF BIOTECHNOLOGY

NGUYEN QUANG HOANG VU

**STUDY ON THE EFFECTS OF SILVER
NANOPARTICLES ON FOLIAR DISEASES
OF LOTUS (*Nelumbo nucifera*) CULTIVATED
IN THUA THIEN HUE**

SUMMARY OF THE PH.D. THESIS

Major: Biology

Code: 9420101

Huế, 2025

HUE UNIVERSITY
INSTITUTE OF BIOTECHNOLOGY

NGUYEN QUANG HOANG VU

**STUDY ON THE EFFECTS OF SILVER
NANOPARTICLES ON FOLIAR DISEASES
OF LOTUS (*Nelumbo nucifera*) CULTIVATED
IN THUA THIEN HUE**

SUMMARY OF THE PH.D. THESIS

Major: Biology

Code: 9420101

SUPERVISOR

Assoc. Prof. HOANG THI KIM HONG

Dr. HOANG TAN QUANG

Huế, 2025

LIST OF PUBLICATIONS RELATED TO THE DISSERTATION

- [1]. **Nguyen Quang Hoang Vu**, Hoang Tan Quang, Hoang Thi Kim Hong (2021). Antifungal efficacy of silver nanoparticle materials against *Curvularia lunata* causing leaf spot disease isolated from white lotus (*Nelumbo nucifera*) cultivar grown in Thua Thien Hue. *Proceedings of the National Scientific Conference on Biotechnology*, pp. 861–867.
- [2]. **Vu Nguyen Quang Hoang**, Quang Hoang Tan, Hong Hoang Thi Kim, Agarie Sakae (2022). **Microbiology associated with disease on white lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) and application of silver nanoparticles for controlling plant pathogens *in vitro***. *Journal Faculty Agriculture, Kyushu University*, 67 (2), 165–172. <https://doi.org/10.5109/4797823>
- [3]. **Vu Quang Hoang Nguyen**, Tram Thi Ngoc Tran, Lan Thuy Tran, Thi Thi Diem Pham, Quang Tan Hoang, Hong Thi Kim Hoang (2023). ***Neofusicoccum parvum*: a novel pathogen species causing wilted leaves and dieback petioles on lotus (*Nelumbo nucifera*) in Thua Thien Hue, Vietnam**. *Hue University Journal of Science: Agriculture and Rural Development*. Vol. 132, No. 3C, 2023, pp. 51–67, <https://doi.org/10.26459/hueunijard.v132i3C.7275>
- [4]. **Vu Quang Hoang Nguyen**, Quang Tan Hoang, Lan Thuy Tran, Tram Tran Thi Ngoc, Hoang Thi Kim Hong (2024). **Molecular phylogeny of *Lasiodiplodia theobromae* associated with *Nelumbo nucifera* in Thua Thien Hue, Vietnam, and their sensitivity to silver nanoparticles**. *Proceedings of the National Scientific Conference on Biotechnology*, pp. 1135-1141
- [5]. **Vu Quang Hoang Nguyen**, Thi Thi Diem Pham, Lan Thuy Tran, Tram Thi Ngoc Tran, Hoang Tan Quang, Hoang Thi Kim Hong (2025). **First report of *Colletotrichum plurivorum* causing anthracnose on the aquatic plant (*Nelumbo nucifera*) from Vietnam**. *Journal of Phytopathology* 173, No. 5: e70177. <https://doi.org/10.1111/jph.70177>

INTRODUCTION

1. THE NECESSITY AND IMPORTANCE OF THE STUDY

Lotus (*Nelumbo nucifera*) is a beautiful and pure flower, symbolically associated with culture and history. Moreover, the lotus plant holds significant economic value linked to the diversity of local specialty products and ecological landscape factors. All parts of the lotus plant—from flowers, leaves, to lotus rhizomes, seed pods, and seeds—are utilized as food and medicinal ingredients with value in traditional medicine (Pokhrel et al., 2022; Sharma et al., 2017). Lotus seeds and rhizomes are the two most commonly used parts, traditionally employed in food processing and the preparation of herbal beverages, such as herbal tea. Bioactive compounds with high biological activity such as alkaloids, flavonoids, triterpenoids, and vitamins found in lotus flowers, leaves, seeds, and rhizomes have been reported to significantly improve human health issues, including anti-inflammatory and high antioxidant activities, as documented in recent studies (Chen et al., 2018; Lin et al., 2023; Liu et al., 2015; Zheng et al., 2016).

Agricultural production is continually challenged by a wide range of phytopathogens, which cause substantial reductions in crop yield and economic value, with losses estimated at around 25% - 30% (Gai & Wang, 2024). In Hue, lotus is traditionally cultivated intensively in ponds and lakes located both within urban centers and their surrounding suburban areas. Throughout the cultivation period, numerous diseases have been documented, inflicting significant damage to both the quality and quantity of lotus yield, thereby directly impacting farmers' livelihoods and the lotus product industry. In 2019, certain lotus-growing regions experienced severe plant mortality, with death rates reaching between 50% and 70%. The predominant management strategy employed involves the application of chemical fungicides and insecticides. Nevertheless, the frequent and extensive use of synthetic fungicides with narrow target spectra has led to the emergence of pathogen resistance and has escalated environmental and economic costs associated with chemical residues.

Many strategic solutions and advanced technological innovations have been proposed to mitigate these damages. Among them, nanotechnology has emerged, attracting scientific interest with its potential to revolutionize many fields such as science, technology, medicine, and agriculture due to its unique physicochemical properties, large surface area, and high reactivity (Siddiqui et al., 2015). Currently, the development and application of biosynthesized nanoparticles open new avenues in agricultural research toward environmentally friendly and effective plant disease control methods. Among nanomaterials, silver nanoparticles (AgNPs) with characteristic antimicrobial properties and large surface area have demonstrated enhanced efficacy at low doses, promising to provide an appropriate and environmentally friendly alternative (Roy et al., 2013; Zhang et al., 2016). Therefore, the application of nanomaterials is expected to play a promising role in addressing this challenge, aiming to promote efficiency and sustainability in agricultural practices with low input and minimal waste compared to traditional methods.

Based on the above practical needs, the research project titled “*Study on the effects of silver nanoparticles on foliar diseases of lotus (Nelumbo nucifera) cultivated in Thua Thien Hue*” was conducted to identify pathogenic agents and evaluate the efficacy of silver nanoparticles in controlling pathogens on lotus plants.

2. RESEARCH OBJECTIVES

2.1 General Objective: To evaluate the effect of silver nanoparticles on pathogens affecting lotus plants cultivated in Hue City.

2.2 Specific Objectives:

- To isolate and identify pathogens causing diseases on lotus plants.
- To assess the inhibitory efficacy and effects of silver nanoparticles on the pathogens of lotus plants cultivated in Hue City *in vitro*.

3. RESEARCH SUBJECTS AND SCOPE

3.1 Research Subjects:

Pathogenic fungi affecting lotus leaves.

3.2 Research Scope:

- **Time scope:** The study was conducted from January 2021 to April 2025.
- **Subject scope:** Focus on fungal pathogens on leaves of two lotus cultivars: white lotus and pink lotus.
- **Spatial scope:** Survey, investigation, and sampling of lotus diseases were conducted at typical lotus cultivation sites in Hue City (Phu Xuan District, Thuan Hoa District, and the districts of Huong Tra, Huong Thuy, Phong Dien, and Phu Loc). Isolation and evaluation of silver nanoparticle effects were performed at the Institute of Biotechnology, Hue University (HUIB).

4. SCIENTIFIC AND PRACTICAL SIGNIFICANCE OF THE STUDY

4.1 Scientific significance:

The study generates systematic and novel scientific evidence on the taxonomy of fungal pathogens associated with cultivated lotus in Hue City, thereby elucidating species diversity and distribution patterns of pathogenic fungi affecting lotus. These results enrich the taxonomic and ecological datasets for phytopathogenic fungi in Hue and Vietnam more broadly. The integrated application of modern approaches—DNA sequencing, multilocus phylogenetic inference, species boundary delimitation (Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition – GCPSR, and Poisson Tree Processes – PTP), combined with detailed morphological characterization—enabled accurate species identification and increased reliability of the research outcomes.

The study further provides critical data on the antifungal efficacy and biochemical modes of action of silver nanoparticles (AgNPs) against representative pathogenic fungal isolates, thereby expanding current understanding of the antifungal mechanisms of AgNPs. These findings supply a valuable scientific reference for future application of silver nanomaterials in disease prevention and management in lotus cultivation.

4.2 Practical significance:

This study establishes a robust scientific foundation for the application of silver nanoparticles (AgNPs) as an effective antifungal agent in the management of lotus diseases, contributing to the reduction of conventional chemical pesticide use and associated environmental burdens. Determination of key inhibitory metrics—including minimum inhibitory concentration (MIC), minimum fungicidal concentration (MFC), and EC₅₀—supports rational dose selection, optimization of antifungal performance, and mitigation of resistance development risk.

The demonstrated specificity and efficacy of AgNPs against pathogenic fungi of lotus offer potential to improve yield and product quality. These outcomes open a new

direction for integrating nanotechnology into sustainable agriculture, particularly in biologically oriented plant disease control, thereby promoting green, clean, and environmentally friendly production systems.

5. NEW CONTRIBUTIONS OF THE DISSERTATION

The dissertation delivers several new contributions, summarized as follows:

1. This study presents a comprehensive dataset on the diversity of fungal pathogens associated with cultivated lotus in Hue City, Vietnam, developed using an integrative, multi-evidence approach. By combining morphological examination, multilocus phylogenetic analyses, and complementary species delimitation approaches (GCPSR and PTP), we delineated 21 pathogenic species distributed across nine genera. The dataset further contextualizes taxon occurrences by documenting geographic distributions and habitat conditions. Of these, 13 species are newly recorded for Vietnam; 17 represent the first global reports of pathogenicity on lotus; and 20 are newly recorded on lotus in Vietnam. These findings refine the taxonomic framework for lotus-associated fungal pathogens in Hue and Vietnam, advance global knowledge of lotus mycobiota, and provide a robust foundation for future studies on disease ecology, diagnostics, and management.

2. The study generated quantitative data on the inhibitory efficacy of silver nanoparticles (AgNPs) against 29 representative fungal isolates spanning the pathogenic genera identified. Three modeling approaches were applied to estimate EC₅₀ values. Comparative evaluation led to the selection of Probit log₁₀ regression model as the most suitable for classifying isolate responses. Based on quartile (interquartile range) statistics, isolates were stratified into four response categories reflecting differential susceptibility or reduced sensitivity to AgNPs. This provides a standardized framework for future benchmarking of antifungal performance and resistance monitoring.

3. The study elucidated the antifungal mode of action of AgNPs in eight representative isolates. Evidence demonstrated that AgNPs compromise fungal cell membrane integrity, increase leakage of intracellular constituents, reduce ergosterol content, elevate lipid peroxidation (MDA), and suppress the activities of intracellular antioxidant enzymes (SOD, CAT), thereby inducing redox imbalance and inhibiting fungal growth. Additionally, microstructural (hyphal and conidial/spore) alterations corroborated these physiological disruptions, supplying multi-level mechanistic insight into AgNP antifungal activity.

CHAPTER I. LITERATURE OVERVIEW

1.1. OVERVIEW OF LOTUS PLANT

1.1.1. Origin, history, and distribution of lotus

The lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) belongs to the family Nelumbonaceae, dicotyledonous plants with an ancient evolutionary history. This family comprises a single genus with two species: *N. nucifera* Gaertn. and *N. lutea* Willd., commonly known as the Asian (distributed mainly in Asia and Australia) and American lotus (occurring primarily in the eastern and southern United States), respectively. The significance of lotus lies not only in its taxonomic and evolutionary interest but also in its ecological landscaping potential, medicinal applications, and value for studies of plant phylogenetics, thereby attracting increasing attention from the scientific community.

In Vietnam, lotus is cultivated mainly in ponds, lakes, and converted paddy fields primarily for flower and seed production. The national lotus cultivation area is currently

estimated at over 3,000 ha, concentrated in several provinces including Hung Yen, Hai Duong, Thai Binh, Nghe An, Nam Dinh, Hue, and the Mekong Delta provinces (Dong Thap, Vinh Long, Tra Vinh, Long An, and Ben Tre). In 2024, the lotus cultivation area in Dong Thap Province is approximately 1,108 ha, with production by the end of October 2024 estimated at 12,163 tons. According to the survey by Trang (2021) on lotus cultivation in Thua Thien Hue Province, the total lotus cultivation area recorded in the 2017–2018 investigation was 341.12 ha. Of this, lotus grown in converted paddy fields accounted for the majority, reaching 314.77 ha (92.28% of the province's total lotus area), with Phong Dien, Huong Tra, Phu Vang, and Phu Loc being the principal production localities. In contrast, lotus cultivated in lakes—concentrated mainly in the Imperial Citadel area and Hue city—covered 26.35 ha, representing 7.72% of the total area. According to the latest 2024 report by the Sub-Department of Cultivation and Plant Protection of Thua Thien Hue, the total lotus cultivation area in the province reached approximately 655 hectares, predominantly located in Phong Dien, Phu Vang, Phu Loc districts, Huong Tra town, and Hue city.

1.1.2. Growth characteristics of lotus

1.1.2.1. Growth duration

The growth period of lotus cultivars is calculated from planting to complete senescence of leaves (crop termination). Research on lotus cultivars in Thua Thien Hue recorded an average growth duration of 159.3 days, ranging from 152 to 171 days (Trang, 2021).

1.1.2.2. Physiological characteristics of lotus

Photosynthesis and respiration are the two most extensively studied physiological processes in plant science because their balance largely determines growth rate and yield potential in most crops. Photosynthesis converts simple inorganic substrates (CO_2 and water) into complex organic compounds using solar energy and the participation of pigment systems.

Leaf development in lotus comprises three main stages: (i) the floating leaf stage, in which leaf blades rest on the water surface—upper surfaces exposed to light and lower surfaces in contact with water—allowing adaptation to high and low light while supplying carbon via photosynthesis; (ii) the aerial (emergent) leaf (shield leaf) stage, when leaves simultaneously arise above the water alongside floating leaves, enhancing gas exchange and light interception; and (iii) the reproductive (seed-setting) stage, during which aerial leaves persist while floating leaves may regress or partially degrade. The ontogenetic differentiation and transition among these leaf types reflect the adaptive strategies of lotus to the aquatic environment, ensuring efficient photosynthesis and developmental plasticity. Lotus leaves exhibit extreme hydrophobicity, known as the “lotus effect” (Darmanin & Guittard, 2015). This superhydrophobic property ensures that the leaf epidermis remains free of water films, maintaining normal stomatal function and reducing susceptibility to pathogens (Ensikat et al., 2011).

1.2. OVERVIEW OF APPROACHES AND CRITERIA FOR IDENTIFYING AND DELIMITING FUNGAL SPECIES

Despite being a fundamental unit in biology, the concept of “species” remains contentious, especially in fungi due to diverse reproductive characteristics, extensive asexual reproduction, and complex population structures. The classical perspective of John Ray (1686) emphasized the stability of entities of common origin, evolving through Linnaeus's standardized nomenclature and Darwin's evolutionary theory. A pivotal moment was Ernst Mayr's (1942) Biological Species Concept, defining species as natural populations capable of interbreeding and reproductively isolated from others (De Queiroz, 2005). However, applying this definition to fungi reveals limitations due to their diverse reproductive strategies, extensive asexual lineages, complex life cycles, and difficult-to-observe reproductive barriers.

The advancement of molecular biology, sequencing data, and genomics has provided new, higher-resolution identification criteria, prompting alternative proposals. Despite progress in fungal taxonomy, integrating molecular techniques with morphological and ecological approaches has exposed shortcomings in previously proposed species delimitation criteria. Fungi exhibit diverse morphologies, ecological roles, and nutritional modes, making accurate identification crucial. Currently, over 2,000 new species are described annually; however, relying solely on morphology can lead to misidentifications due to hybridization, cryptic species, convergence, and phenotypic plasticity. Conversely, solely molecular-based approaches face challenges from historical dual nomenclature systems and incomplete or erroneous sequence data in databases like NCBI.

In fungal taxonomy, the fundamental question of "when should a population be recognized as a species?" continues to spark debate (Dupuis et al., 2012; Xu, 2020). These discussions largely stem from conflating two distinct concepts: (i) species concept—foundational theoretical definitions of "species"; and (ii) species criteria/species delimitation—evidence and experimental processes to operationalize that concept. This ambiguity can lead to vague and inconsistent delimitation outcomes. Furthermore, concepts and criteria may conflict, resulting in different boundaries and species counts (De Queiroz, 2007; Stankowski & Ravinet, 2021). To date, approximately 30 species recognition/delimitation criteria have been proposed (Chethana et al., 2021). However, only a few are widely used in fungal taxonomy practice. Common criteria groups include: (i) biological (reproductive isolation), (ii) morphological/phenetic, (iii) ecological (niche/climate/host), (iv) genotypic/genetic population clusters, and (v) phylogenetic-coalescent (multi-locus, GCPSR). Alongside molecular taxonomy, integrative taxonomy has become a driving force for efforts to reclassify fungi, including fungal pathogens in plant disease. This approach simultaneously utilizes and cross-references multiple lines of independent evidence—morphological (macro/micro), ecological—biogeographical, reproductive forms, host history, multi-locus/multi-gene molecular data, and gene family data—to effectively identify and delimit species. Instead of relying on a single marker or concept, this approach seeks cross-evidence concordance while identifying and addressing discrepancies among genes, phenotypes, and ecology. ITS remains the most widely used marker and has proven highly effective for broad-scale fungal identification. However, for many fungal genera, the ITS locus resolves taxonomic units only to the genus level. Several secondary DNA barcodes have been proposed for various important fungal genera or species complexes, such as *Colletotrichum*, *Diaporthe*, *Trichoderma*, *Aspergillus*, and rust fungi (Pucciniales). Depending on research objectives and the evolutionary context of each genus, loci such as *TEF1- α* (translation elongation factor 1-alpha), *RPB1/RPB2* (RNA polymerase II largest/second-largest subunit), *TUB2* (β -tubulin), *CAL* (calmodulin), *ACT* (actin), or *GAPDH* have shown value in enhancing resolution at the species and intraspecies levels. For plant pathogens, this approach significantly improves the identification of harmful agents and disease monitoring, assessing invasion risks, and subsequently developing effective prevention strategies.

1.3. OVERVIEW OF DISEASE STATUS ON LOTUS

In recent years, numerous studies have been conducted globally to identify and assess the status of diseases affecting lotus plants, contributing to elucidating disease etiology.

1.3.1. Global disease status and pathogens on lotus

Studies in China and Taiwan have identified key fungal and viral pathogens associated with lotus diseases. Regarding leaf spot, Zhang et al. (2019) identified *Alternaria tenuissima* as the

causal agent in Guangchang, Jiangxi. Initial symptoms were small yellow-brown lesions with a pale black center and yellow-brown margin, later developing pronounced necrosis. *Curvularia lunata* was also reported to cause leaf spots characterized by purple-brown lesions with gray-white centers bordered by dark brown margins (Cui & Sun, 2012). Zhang et al. (2018) documented *Nigrospora oryzae* causing leaf blight on the cultivar Taikonglian 36 in Fujian, with gray-white lesions having brown margins expanding into brown necrotic areas—this was the first report of *N. oryzae* infecting lotus in China. More recently, Gong et al. (2023) identified *N. pyriformis* associated with black net-like necrotic lesions on lotus leaves in Guangchang, resulting in approximately 20% foliar mortality. Powdery mildew was reported in Qingdao, Shandong, with *Erysiphe takamatsui* confirmed via rDNA ITS and 28S sequencing (Zhou et al., 2019). A comprehensive survey in Taiwan by Chen & Kirschner (2018) isolated 33 fungal species from 1002 diseased foliar samples, predominantly from the genera *Colletotrichum*, *Diaporthe*, and *Fusarium*. This study also provided the first records of *E. takamatsui* and *Pseudoscopora nymphaeaceae* in Taiwan.

Concerning soft rot and wilt, *Fusarium incarnatum* (Wang et al., 2020) was identified as the causal agent of soft rot in Wuhan through molecular characterization and artificial inoculation. Previously, *F. tricinctum* (Li et al., 2016), *F. oxysporum* (Tang et al., 2017), and more recently *F. proliferatum* (Cai et al., 2022) were implicated in similar syndromes on lotus. Beyond fungal pathogens, several viruses have been detected in lotus: Dasheen mosaic virus (DsMV), Cucumber mosaic virus (CMV), Sweet potato latent virus (SPLV), badnaviruses (LBV), and Apple stem grooving virus (ASGV) (He et al., 2019, 2020; Wang et al., 2019).

These findings highlight the diverse range of pathogens involved in lotus diseases, emphasizing the need for comprehensive disease management strategies. Most studies adopt a “one disease – one species – one host” framework, often yielding isolated, fragmented outcomes without integrative synthesis. This fragmentation reflects the rich biodiversity within the lotus pathobiome and indicates that numerous latent or cryptic pathogens likely remain undiscovered or insufficiently characterized.

1.3.2. Current status and research on diseases affecting lotus plants in Vietnam

In Vietnam, research on diseases affecting lotus (*Nelumbo nucifera*) remains relatively limited and predominantly concentrated in certain regions, such as Thua Thien Hue and the Mekong Delta. In 2016, Tuong et al. identified three *Colletotrichum* species—*C. acutatum*, *C. lagenarium*, and *C. gloeosporioides*—as causal agents of anthracnose disease on lotus plants. The infected samples were collected from multiple provinces, including Dong Thap, Can Tho, Hau Giang, Vinh Long, Bac Lieu, and Ca Mau. Furthermore, independent studies demonstrated the effective control of anthracnose caused by *Colletotrichum* species using bacterial strains (Tuong et al., 2022; Tuong & Qui, 2016).

Additionally, *Phytophthora* spp. (Oomycetes) have been reported as pathogens responsible for leaf blight and stem rot in lotus, as documented by Thai & Tuong (2016). However, this study primarily focused on assessing the antagonistic potential of bacterial strains, and thus, the pathogens were not comprehensively characterized morphologically. Their isolation, taxonomic classification, and precise identification were limited to the general designation of *Phytophthora* sp. In Thua Thien Hue province, the Plant Protection Sub-Department recorded incidences of lotus plant mortality and wilting in certain cultivation areas in 2018, with *Colletotrichum* spp. identified as the causal agent of anthracnose. Truong and Vuong (2020) reported *Fusarium* spp. as the pathogens causing stem rot and rhizome rot in lotus, based on morphological characterization and pathogenicity assays. The authors noted that these diseases were particularly severe during the harvest period.

A survey conducted on three lotus cultivars: Yen Thanh, Kim Lien, and Dong Thap (high-yield cv.) variety identified seven major pests, including leaf roller caterpillars, thrips, soft scales, bagworms, golden apple snails, small snails, and anthracnose disease. Among these, leaf roller caterpillars, thrips, and soft scales exhibited the highest infestation levels. The study also reported that the pesticide Map JOWO 700W was highly effective against these predominant pests (Phuc et al., 2021). Recently, *Lasiodiplodia theobromae* was identified as the causal agent of decline symptoms in lotus grown in Thua Thien Hue using multilocus sequence data (ITS, *TEF1- α* , *TUB2*) (Cuong et al.). Similarly, in Dong Thap province, *L. theobromae* was reported as the pathogen responsible for lotus leaf petiole rot, based on ITS sequencing data (Hong et al., 2024).

Pathogenic microorganisms pose continual pressure on lotus and comparable horticultural systems. Triggers such as host senescence or tissue injury can convert otherwise latent endophytes into active pathogens, accelerating disease onset. Reliance on synthetic fungicides (tebuconazole, azoxystrobin, metalaxyl, mancozeb, carbendazim) provides short-term suppression but introduces persistent challenges: chemical residues, environmental externalities, non-target impacts, and emerging resistance risks. These constraints delineate a critical gap and motivate the pursuit of alternative, eco-compatible disease management solutions deployable from cultivation through post-harvest handling.

1.4. RESEARCH STATUS ON SILVER NANOPARTICLES AND THEIR APPLICATION IN PLANT DISEASE MANAGEMENT

With rapid technological development and emerging challenges, nanotechnology has attracted intense scientific interest, reflected in the annually increasing volume of publications. Among nanomaterials, silver nanoparticles (AgNPs) stand out due to their stability, electrical conductivity, catalytic properties, broad-spectrum antimicrobial activity, and large surface area. These attributes enable extensive application in semiconductor components, disinfectants, healthcare, coatings, food packaging, water treatment, and biosensing.

1.4.1. Antimicrobial mechanisms of silver nanoparticles

Silver nanoparticles have demonstrated strong antimicrobial activity against various bacteria and pathogenic fungi, with numerous reports documenting these effects. However, the precise mechanisms by which silver nanoparticles inhibit growth or kill bacteria and fungi remain not fully elucidated (Cavassin et al., 2015; Polinarski et al., 2021). Generally, the intracellular pathways affected by silver nanoparticles can be summarized as follows:

When inside the cell, Ag⁺ ions and AgNPs act at different levels:

- + Induction and accumulation of intracellular reactive oxygen species (ROS), triggering apoptosis-like processes (Adam & Khan, 2022; Dong et al., 2019; Hwang et al., 2012; Radhakrishnan, Mudiam, et al., 2018).
- + Intracellular Ag⁺ accumulation disrupts membrane structure and alters osmotic regulation, causing potassium ion efflux and near-complete depletion of intracellular K⁺, concomitantly inhibiting plasma membrane H⁺-ATPase activity (Cyert & Philpott, 2013; Rohde et al., 2021; Vagabov et al., 2008).
- + Ag⁺ enters mitochondria via the mitochondrial copper transporter Pic2, which has a higher affinity for Ag⁺ than for Cu⁺. This reduces Cu⁺ concentrations while increasing Ag⁺ accumulation in the mitochondrial matrix, diminishing copper-dependent cytochrome c oxidase activity and thereby reducing cellular respiration (Costa et al., 2010; Teodoro et al., 2011; Vest et al., 2013).

+ Ag⁺ and AgNPs modulate transcriptional, epigenetic, and metabolic networks, significantly altering essential cellular functions in fungi and bacteria (Das & Ahmed, 2012; Dubey et al., 2015; Marathe et al., 2021). Downregulation of genes involved in the tricarboxylic acid cycle, redox metabolism, ergosterol biosynthesis, and lipid metabolism leads to structural perturbations at the membrane level (Babele et al., 2019; Barros et al., 2021; Horstmann et al., 2019; Marathe et al., 2021; Radhakrishnan, Dwivedi, et al., 2018).

In summary, demonstrated modes of action include protein denaturation, ROS overproduction and antioxidant depletion, membrane structural impairment (disruption and altered permeability), mutagenesis, and modulation of transporter gene expression (Carrapiço et al., 2023; Lemire et al., 2013). Membrane fluidity and metabolic activities are disrupted due to morphological alterations and membrane depolarization, culminating in cellular damage. Leakage of intracellular molecules (enzymes, proteins, metabolites, DNA) results from structural compromise. Furthermore, AgNPs can generate abnormal pores in microbial cell walls, facilitating nanoparticle ingress into extracellular and intracellular compartments.

1.4.2. Factors modulating the antimicrobial activity of silver nanoparticles

Parallel to mechanistic elucidation, many studies have characterized physicochemical properties of AgNPs influencing antimicrobial efficacy—particularly size, surface chemistry, and charge. Available evidence indicates that bactericidal and fungicidal activity is primarily determined by particle size, surface properties, and applied concentration. Smaller AgNPs are generally more toxic (Kong et al., 2020).

1.4.3. Applications of silver nanoparticles in agriculture and plant disease management

Sustainable agriculture is prioritized due to severe yield losses caused by pests and fungal pathogens, which account for roughly 80% of plant disease incidence globally. Although conventional fungicides are effective, environmental and food safety concerns have prompted usage restrictions. Biogenic silver nanoparticles have emerged as environmentally friendly, effective, and cost-efficient alternatives for controlling phytopathogenic fungi. Numerous studies have substantiated the critical role of AgNPs in suppressing plant pathogens, opening new avenues for sustainable crop protection.

A growing body of literature demonstrates that AgNPs possess not only antibacterial but also strong antifungal activity. Mahdizadeh et al. (2015) showed potent inhibition of *Pythium aphanidermatum*, *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotinia sclerotiorum*, and *Rhizoctonia solani* (75–100% inhibition) at concentrations of 6–16 mg/L. Haroon et al. (2019) reported Azadirachta indica-derived AgNPs effectively inhibiting *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, and *Ralstonia solanacearum*. Malandrakis et al. (2019) compared Cu, Ag, and Zn nanoparticles against seven phytopathogenic fungi; on PDA medium, Cu and Zn nanoparticles were more inhibitory than AgNPs, yet *in vivo* on plum fruit AgNPs achieved up to 100% inhibition at 1000 µg/mL—attributed to reduced silver toxicity in nutrient-rich PDA versus plant tissue surfaces. Ganash et al. (2018) observed that AgNPs induced spore deformation, growth inhibition, and altered amino acid synthesis in *Fusarium culmorum* and *Alternaria alternata*, surpassing silver nitrate. Kriti et al. (2020) documented significant antifungal activity of silver citrate nanoparticles against *Bipolaris sorokiniana* and *Alternaria brassicicola*. Tarazona et al. (2019) demonstrated complete inhibition of *Fusarium* hyphal growth by silver citrate nanoparticles after 20–30 h exposure. Reyes et al. (2022) reported Larrea tridentata-derived AgNPs inhibited *Alternaria solani* (70.76%) and *Botrytis cinerea* (51.75%) at 60 ppm, with variable effects on other species. Ribeiro et al. (2023) synthesized AgNPs from mangrove fungi in Brazil, noting inhibition of various phytopathogens with MIC values from 4 to 250 µM. Recently, Singh et al.

(2024) reported neem leaf-derived AgNPs completely inhibited certain phytopathogenic fungi at 2000 ppm and exhibited cytotoxicity toward U87MG cancer cells, suggesting biomedical potential. In the past 2–3 years, RNA-seq transcriptomic analyses have been increasingly applied to elucidate molecular antifungal mechanisms of AgNPs, providing insights into their multifaceted modes of action at cellular and genetic scales.

Numerous global studies have highlighted the significant potential of silver nanoparticles (AgNPs) in inhibiting a diverse array of agriculturally important phytopathogenic fungi, while also elucidating the molecular mechanisms that underpin their antifungal efficacy. Building on these advancements, Vietnamese researchers are actively investigating the application of AgNPs for managing fungal diseases prevalent in local crop production systems. These collective efforts not only enhance the effectiveness of crop protection strategies but also contribute to the promotion of sustainable agricultural practices in Vietnam.

For instance, Luân et al. (2014) evaluated the antifungal properties of silver-chitosan nanoparticles against *Phytophthora capsici*, a pathogen responsible for rapid death in pepper plants. Synthesized via gamma irradiation (Co-60) with 1% chitosan as a stabilizer, these AgNPs exhibited inhibition rates ranging from 22.6% to 92.9% at silver concentrations between 20 and 100 ppm, with the smaller nanoparticles (5 nm) achieving complete inhibition at a concentration of 40 ppm. In another significant study, Ngọc et al. (2015) reported that silver nanoparticles synthesized chemically in the presence of chitosan and citric acid (ranging from 2 to 10 nm) displayed remarkable antifungal activity against several plant pathogenic fungi, notably *Fusarium oxysporum*, with inhibition rates reaching as high as 79.57% at a concentration of 100 mg/L. Châu et al. (2017) successfully synthesized spherical Ag/CTS/Bentonite nanoparticles (5–90 nm) that inhibited *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani* by 66.7% and 92.8%, respectively, at 400 ppm. Châu et al. (2020) showed that a combination of silver and copper nanoparticles (Ag/Cu ratio 30/18) inhibited *Neoscytalidium dimidiatum* by 72.9%, outperforming silver alone. Recent studies by Danh et al. (2024) synthesized 18 nano-bioformulations from turmeric resin combined with silver and chitosan, demonstrating effective antifungal activity against *Colletotrichum spp.*, with inhibition rates between 15.55% and 46.72%, and controlling *Phytophthora spp.* with 13.78% to 65.98% inhibition.

Another research direction—beyond assessing antimicrobial activity—examines interactions between nanomaterials and plants, including potential impacts of AgNPs on plant growth and development.

CHAPTER II. MATERIALS AND METHODS

2.1. MATERIALS

Pathogenic agents on lotus were collected and isolated from cultivation sites across Hue City. The silver nanoparticle solution was provided by the Department of Physics, University of Sciences, Hue University. The nanoparticles were biosynthesized from Aloe (*Aloe barbadensis*) extracts, with particle diameters ranging from 5–40 nm. The stock solution concentration was 40 mg/L.

2.2. METHODS

2.2.1. Collection and Isolation of pathogens from lotus leaves

Symptomatic leaf samples were rinsed with sterile distilled water (SDW), and small tissue segments (5 × 5 mm) were aseptically excised from lesion margins. Segments were

surface-sterilized sequentially in 1% (w/v active) sodium hypochlorite (NaOCl) for 1 min, followed by 70% (v/v) ethanol for 15 s, then rinsed three times in SDW. After blot-drying on sterile filter paper, segments were placed onto water agar (WA) plates and incubated at 30°C in darkness. Emerging hyphae from host tissues were transferred to potato dextrose agar (PDA) plates and incubated at 30°C in darkness. Pure cultures were obtained by subculturing hyphal tips onto fresh PDA.

2.2.2. DNA extraction, PCR amplification, and sequencing

Seven-day-old mycelia from isolated strains grown on PDA were aseptically scraped using a sterile scalpel. Genomic DNA was extracted using a commercial Genomic DNA Extraction Kit (ABT, Vietnam) following the manufacturer's protocol.

Each PCR reaction (50 µL total volume) contained: 25 µL GoTaq Green 2X Master Mix (Promega, USA), 5 µL template gDNA (20–100 ng), 5 µL of each primer (10 pmol/µL), and 15 µL nuclease-free ddH₂O (Promega, USA). Primers selected for amplifying specific gene/locus regions are listed in Table 2.1. Verification of PCR amplification was performed via agarose gel electrophoresis (1% agarose, 1× TAE buffer; Thermo Fisher Scientific, Lithuania) at 75 V for 35 min. DNA bands were visualized under UV transillumination. PCR products were purified and commercially sequenced by FirstBASE (Malaysia).

Table 2.1. Primers and fungal target used in the study

Gene/locus	Primer	Sequence (5' – 3')	References	Target
Internal transcribed spacer (ITS)	ITS1	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	White et al. (1990)	All genus
	ITS5	GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G		
	ITS4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC		
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (<i>GAPDH</i>)	GDF1	GCC GTC AAC GAC CCC TTC ATT GA	Templeton et al. (1992)	<i>Colletotrichum</i>
	GDR1	GGG TGG AGT CGT ACT TGA GCA TGT		
	gpdh1-F	CAA CGG CTT CGG TCG CAT TG	Berbee et al. (1999)	<i>Curvularia</i> , <i>Exserohilum</i>
	gpdh2-R	GCC AAG CAG TTG GTT GT GC		
Actin (<i>ACT</i>)	ACT-512F	ATGTGCAAGGCCGGTTTCGC	Carbone & Kohn (1999)	<i>Colletotrichum</i>
	ACT-783R	TAC GAG TCC TTC TGG CCC AT		
Chitin synthase (<i>CHS-1</i>)	CHS-79F	TGG GGC AAG GAT GCT TGG AAG AAG	Carbone & Kohn (1999)	<i>Colletotrichum</i>
	CHS-354R	TGG AAG AAC CAT CTG TGA GAG TTG		
β-tubulin 2 (<i>TUB2</i>)	T1	AAC ATG CGT GAG ATT GTA AGT	O'Donnell & Cigelnik (1997)	<i>Lasiodiplodia</i> <i>Nigrospora</i>
	Bt2a	GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC	Glass & Donaldson, (1995)	<i>Colletotrichum</i> <i>Diaporthe</i>
	Bt2b	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC	Glass & Donaldson, (1995)	<i>Neopestalotiopsis</i>

Apn2-Mat1-2 (<i>ApMat</i>)	ApM-F	TCA TTC TAC GTA TGT GCC CG	Silva et al. (2012)	<i>Colletotrichum</i>
	ApM-R	CCA GAA ATA CAC CGA ACT TGC		
Translation elongation factor 1-alpha (<i>TEF1-α</i>)	EF1-983F	GCY CCY GGH CAY CGT GAY TTY AT	Schoch et al. (2009)	<i>Lasiodiplodia</i>
	EF1-2218R	ATG ACA CCR ACR GCR ACR GTY TG		<i>Neofusicoccum</i> <i>Nigrospora</i> <i>Colletotrichum</i> <i>Diaporthe</i> <i>Neopestalotiopsis</i>
Large Subunit ribosomal RNA (LSU)	LR0R	ACC CGC TGA ACT TAA GC	Rehner & Samuel (1994)	<i>Curvularia</i>
	LR5	TCC TGA GGG AAA CTT CG	Vilgalys & Hester (1990)	

2.2.3. Phylogenetic analysis

Raw DNA sequences obtained from both strands were processed using BioEdit v7.0.5 software (Hall, 1999). For the phylogenetic analysis, sequences of reference species and related taxa were downloaded from NCBI GenBank. Downloaded sequences were aligned together with the sequences obtained in the present study using MUSCLE within MEGA 11 software under default parameters (Hinchliff & Roalson, 2013; Kumar et al., 2018) and manually corrected using Bioedit. All gaps were treated as missing data. Concatenation of the aligned loci was conducted using MEGA 11.

A multi-locus phylogenetic tree was constructed based on Maximum Likelihood (ML) analysis using IQ-TREE v2.1.3 (Minh et al., 2020). The ModelFinder was used to determine the best-fit model (Kalyaanamoorthy *et al.*, 2017). Branch support was determined using 10,000 ulfabootstraps, a Bayesian posterior probabilities support and 10,000 SH-aLRT bootstrap replicates. Resulting phylogenies were visualized using FigTree v1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>) (Rambaut, 2018) or Interactive Tree of Life (iTOL) v6 (Letunic & Bork, 2021), and processed by PowerPoint and Adobe Illustrator CC 2021. The nucleotide sequence data of the new taxa were deposited in GenBank

Species boundaries were delineated using the Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition (GCPSR) model to analyze species with ambiguous phylogenetic signals, following the approach described by Quaedvlieg et al. (2014). Relationships among closely related taxa were further investigated by constructing a phylogenetic split network from the concatenated multi-locus dataset, employing the LogDet transformation and NeighborNet/Split Decomposition algorithms. The Poisson Tree Processes (PTP) analysis was performed using the ML phylogenetic matrix generated above.

2.2.4. *In vitro* assessment of the antifungal activity of silver nanoparticles against lotus pathogenic fungi

2.2.4.1. Effect of silver nanoparticles on fungal mycelial growth

Pure fungal plugs (diameter 5 mm) were excised from the edge of 3 days old cultures grown at 30°C and placed centrally on Petri dishes (9 cm diameter, maximum growth diameter 8.5 cm) containing potato dextrose agar (PDA) amended with different concentrations of silver nanoparticles (Control, 0.1, 1, 4, 10, 20, and 30 mg/L). Hexaconazole (Anvil 5SC, Syngenta) at the recommended concentration of 0.2% (active ingredient concentration: 50 g/L) was used as a

commercial control. Cultures were incubated under the same conditions. Each concentration was tested in triplicate. Colony diameters were measured at 3, 5, and 7 days post-inoculation (dpi)

The mycelial growth inhibition (MGI, %) was calculated according to a modified formula described by Abbott (1925).

$$HLUC(\%) = \left[\frac{C - T}{C} \right] \times 100$$

Macroscopic morphological characteristics of the fungal colonies—including colony pigmentation, margin morphology, and conidial structures—were systematically observed.

2.2.4.2. Determination of silver nanoparticles sensitivity (EC₅₀)

The sensitivity of the silver nanoparticles (AgNPs) to the isolated fungal strains on solid (agar) medium was expressed as the EC₅₀ value. EC₅₀ was estimated using three approaches: (i) linear logarithmic regression, (ii) log-space interpolation, and (iii) nonlinear Probit regression with log₁₀ transformation. Models were constructed from dose–response data pairs (dose: log₁₀-transformed AgNP concentration; response: normalized inhibition efficacy) in R 4.4.0. Dose–response datasets were obtained from in vitro assays evaluating mycelial growth inhibition on PDA at different AgNP concentrations. A descriptive quartile-based statistical method was used to classify sensitivity groups of the test isolates to AgNPs based on their EC₅₀ values.

2.2.4.3. Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Fungicidal Concentration (MFC)

Determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) of AgNPs followed Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines with modifications to accommodate the maximum stock concentration (40 mg/L). A dilution series (wells 2–10) was prepared in 200 µL (medium + AgNPs) so that, after adding 20 µL of spore suspension 1×10⁵CFU/mL, the final test range was 0.078125–20 mg/L. Well column 11 received 200 µL of the undiluted stock (40 mg/L), yielding a final concentration of 36.364 mg/L. Negative control (1% DMSO) and growth control (medium + spore suspension only) were included in each plate. Plates were incubated for 48–72 h at 37°C, 150 rpm. Then 20 µL of resazurin solution was added to each well (final active concentration: 44 µM) and incubation continued in darkness for 48 h. A color change from blue to pink or colorless indicated metabolic activity of viable spores. MIC was defined as the lowest concentration showing no visible fungal growth and no resazurin color shift. MFC was determined by subculturing 30 µL from MIC, 2×MIC, and 4×MIC wells onto PDA; plates without colony emergence after 48 h were recorded as MFC. Fungicidal or fungistatic efficacy was evaluated by the MFC/MIC ratio: MFC/MIC<4 indicates fungicidal activity; MFC/MIC≥4 indicates fungistatic activity. All tests were performed in duplicate and repeated twice independently. All tests were performed in duplicates and repeated twice independently.

2.2.4.4. Effect of silver nanoparticles on fungal biomass

Fungal biomass was estimated by measuring the dry weight of mycelia grown in liquid culture (Potato Dextrose Broth – PDB). After 3 days of incubation at 30°C and 180 rpm shaking, mycelia were harvested and washed twice with sterile distilled water (SDW) to remove residual medium. Biomass samples were dried to constant weight on Whatman filter paper. Dry weight (mg) was calculated by subtracting the initial filter paper weight. Biomass values represent the mean of three independent replicates.

2.2.4.5. Determination of extracellular electrical conductivity (EEC) and nucleic acid leakage

Extracellular electrical conductivity (EEC) was assessed following Zhang et al. (2019) with minor modifications. A 30 μ L aliquot of spore suspension 10^5 CFU/mL was inoculated into PDB and incubated at 30°C, 150 rpm for 7 days. After washing twice with SDW, mycelia (0.5 g) were transferred into 50 mL Erlenmeyer flasks containing 25 mL SDW (Control) or AgNP solutions at 5 and 30 mg/L. Flasks were incubated at 30°C (shaker), and EEC (μ S/cm) was recorded at 3, 12, 24, 36, and 48 h using a conductivity meter. Experiments were performed in triplicate.

Nucleic acid leakage was quantified as optical density at 260 nm (OD₂₆₀). Mycelia grown 7 days in PDB were harvested, washed, and 0.5 g was placed into 50 mL Falcon tubes containing 25 mL SDW (Control) or AgNPs at 5 and 30 mg/L. Supernatants were collected at 3, 12, 24, 36, and 48 h, centrifuged at 4,000 rpm for 3 min, and clarified supernatants were measured spectrophotometrically (UV-Vis) at 260 nm.

2.2.4.6. Determination of Malondialdehyde (MDA) content

Lipid peroxidation was assessed via malondialdehyde (MDA) content using the thiobarbituric acid (TBA) reaction (Senthilkumar et al., 2021). Mycelial pellets (48 h time point, post-treatment) were homogenized in liquid nitrogen with 5 mL 5% (w/v) trichloroacetic acid (TCA), then centrifuged at 12,000 g for 10 min (room temperature). The supernatant was mixed 1:1 (v/v) with 0.67% TBA in 20% (w/v) TCA, heated at 95°C for 30 min, cooled, and centrifuged at 10,000 g for 10 min. Absorbances were read at 450, 532, and 600 nm.

$$C_{MDA} (\mu\text{mol/L}) = 6,45 \times (A_{532} - A_{600}) - 0,56 \times A_{450}$$

$$MDA (\text{nmol/g FW}) = C_{MDA} \times V_0 \times (V_t / V_r) / (FW \times 10^6)$$

where A_{450} , A_{532} , and A_{600} are absorbances at respective wavelengths, V_0 : volume of reaction mixture, V_t : total volume of crude extract, V_r : volume of sample used for absorbance measurement, and FW: fresh weight of mycelia (g).

2.2.4.7. Determination of ergosterol content in fungal mycelia

Ergosterol content was quantified according to Arthington-Skaggs et al. (1999) with slight modifications. Mycelia were collected by filtration, washed three times with saline solution, and excess liquid was removed by filter paper. One gram of wet mycelia was mixed with 5 mL of 25% (w/v) potassium hydroxide in ethanol and vortexed for 2 minutes. The mixture was incubated at 85°C for 2 hours in a water bath. Then, 2 mL sterile water and 5 mL n-hexane were added and vortexed for 2 minutes. The hexane layer was collected and analyzed by UV-Vis spectrophotometry.

Ergosterol content (%) was calculated as:

$$\text{Ergosterol (\%)} = (A_{282}/290)/FW - (A_{230}/518)/FW$$

where A_{282} and A_{230} are absorbance values at 282 nm and 230 nm, respectively, and FW: wet weight of mycelia.

2.2.4.8. Determination of antioxidant enzyme activities

Superoxide dismutase (SOD) activity was measured following the method described by Oury et al. (1992). A 3 mL reaction mixture containing 100 mM phosphate buffer saline (PBS), 0.2 M methionine, 2.25 mM nitro blue tetrazolium chloride (NBT), 30 mM EDTA, 60 μ M riboflavin, and 1.5 M sodium carbonate was mixed with 100 μ L enzyme extract and incubated for 10 minutes in the dark. SOD activity was expressed as units per μ g protein, where one unit corresponds to the enzyme amount causing 50% inhibition of NBT reduction, measured at 560 nm.

Catalase (CAT) activity was determined by adding 0.5 mL enzyme extract to 2 mL PBS (50 mM, pH 7), followed by 0.5 mL of 30 mM hydrogen peroxide (H_2O_2). The decrease in absorbance at 240 nm due to H_2O_2 decomposition was recorded as per Aebi's protocol (1984).

A blank control containing phosphate buffer and H₂O₂ (2:1) was included. CAT activity was expressed as units per mg protein.

2.2.5. Data analysis

Data were analyzed using IBM SPSS 23.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) and DATAtab (Graz, Austria). All experimental values are presented as mean $\pm$ standard deviation (SD). Differences among treatments were assessed using the Tukey test. Statistical significance was considered at $p < 0.05$ or $p < 0.01$.

CHAPTER III. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. DIVERSITY OF PATHOGENIC AGENTS ON CULTIVATED LOTUS (*N. NUCIFERA*)

From 392 diseased lotus samples collected at 65 cultivation sites in Hue City (April 2021 – June 2024), a total of 174 fungal isolates were obtained. Based on morphological screening and verification by artificial inoculation following Koch's postulates, 81 isolates were confirmed as pathogenic agents on *N. nucifera*. Among these, 48 isolates were recovered from the high-yield pink lotus cultivar (Dong Thap lotus), and 33 isolates originated from white lotus cultivars. The pathogenic fungi on lotus belonged to the phylum Ascomycota, distributed across three classes: Dothideomycetes, Eurotiomycetes, and Sordariomycetes, encompassing seven major families: Pleosporaceae, Botryosphaeriaceae, Diaporthaceae, Aspergillaceae, Apiosporaceae, Sporocadaceae, and Glomerellaceae.

At the genus level, nine fungal genera were associated with lotus leaf disease symptoms. The genus *Curvularia* (Pleosporaceae) was the most prevalent, with 26 isolates primarily causing leaf spot symptoms; *Exserohilum* (Pleosporaceae) included 5 isolates linked to brown leaf blight symptoms. The family Botryosphaeriaceae accounted for 20 isolates belonging to *Neofusicoccum* (9 isolates) and *Lasiodiplodia* (11 isolates), mostly associated with wilting and petiole rot symptoms. The genus *Colletotrichum* (Glomerellaceae) with 13 isolates was the main causal agent of anthracnose and leaf rot. *Nigrospora* (Apiosporaceae) and *Neopestalotiopsis* (Sporocadaceae) were represented by 3 isolates each. The genus *Diaporthe* (8 isolates) caused brown spots with low and unstable virulence. *Aspergillus* (Aspergillaceae) was also recorded as an opportunistic pathogen causing lotus leaf rot when physical injuries were present.

3.1.1. Distribution characteristics of pathogenic agents on lotus by genus, cultivar, geography, and habitat

Geographical analysis of pathogenic fungi on pink and white lotus in Hue City showed uneven distribution among districts. Phu Xuan exhibited the highest frequency and diversity with 40 isolates (~50% of the total), representing 8 of 9 genera. Other localities such as Thuan Hoa, Phong Dien, and Huong Tra also yielded substantial isolate numbers, whereas Phu Vang contributed few isolates due to limited sampling and localized lotus distribution. *Curvularia* was the most widespread genus (26 isolates) present in 6/7 surveyed areas, concentrated in Phu Xuan and Thuan Hoa. *Colletotrichum* and *Lasiodiplodia* were concentrated in Phu Xuan and Phong Dien; genera such as *Neopestalotiopsis* and *Nigrospora* showed restricted occurrence, presumably linked to microenvironmental conditions and host cultivar.

Habitat analysis (field plots, lakes, containers) indicated that field plots harbored the greatest genus richness and isolate numbers, dominated by *Curvularia*, *Lasiodiplodia*, and *Exserohilum*. *Curvularia* and *Colletotrichum* occurred across all three habitat types, with *Colletotrichum*

relatively more prevalent on white lotus, while *Lasiodiplodia* predominated on pink lotus in fields. Some genera (*Neopestalotiopsis*, *Nigrospora*, *Diaporthe*) appeared mainly in lake or container habitats and were uncommon in field settings. Additionally, *Exserohilum*, *Neopestalotiopsis*, and *Aspergillus* were only recorded on pink lotus, suggesting niche- and host-specific adaptation.

Overall, distribution patterns of pathogenic fungi on lotus in Hue City were strongly influenced by cultivar, habitat type, and geographic location. Pink and white lotus differed in dominant fungal genera. Field habitats supported the greatest pathogenic diversity. Spatial heterogeneity among districts likely reflects environmental variation and cultivation practices specific to each habitat and cultivar.

3.1.2. Diversity of pathogenic fungal species on lotus based on molecular biology techniques

In this study, we integrated DNA sequencing and multilocus phylogenetic analysis with morphological traits, distributional data, and host specificity to achieve precise identification of pathogenic fungi. This comprehensive approach resolved cryptic species, species complexes within eight genera and improved the accuracy of pathogen delimitation.

Table 3.1. Fungal isolates identified to species level in this study.

Genus	Isolates	Species	New species	Newly recorded in Vietnam	Newly recorded on lotus	Newly recorded on lotus in Vietnam
<i>Neofusicoccum</i>	VNHUCC.NEL104	<i>N. parvum</i>	-	+	+	+
	VNHUCC.NEL203					
	VNHUCC.NEL134					
	VNHUCC.NEL18					
<i>Lasiodiplodia</i>	VNHUCC.NEL38	<i>L. theobromae</i>	-	-	-	-
	VNHUCC.NEL19					
	VNHUCC.NEL250					
	VNHUCC.NEL253					
	VNHUCC.NEL107					
<i>Nigrospora</i>	VNHUCC.NEL30	<i>N. lacticolonia</i>	-	+	+	+
	VNHUCC.NEL431					
	VNHUCC.NEL233					
<i>Colletotrichum</i>	VNHUCC.NEL282	<i>Colletotrichum fructicola</i>	-	-	+	+
	VNHUCC.NEL92					
	VNHUCC.NEL39D1					
	VNHUCC.NEL70	<i>C. siamense</i>	-	-	-	+
	VNHUCC.NEL79					
	VNHUCC.NEL10					
	VNHUCC.NEL72					
	VNHUCC.NEL172					
	VNHUCC.NEL71	<i>C. tropicale</i>	-	+	-	+
	VNHUCC.NEL52	<i>C. endophyticum</i>	-	-	+	+
	VNHUCC.NEL92	<i>C. plurivorum</i>	-	-	+	+
	VNHUCC.NEL102					
<i>Curvularia</i>	VNHUCC.NEL53	<i>Curvularia asiatica</i>	-	+	+	+
	VNHUCC.NEL301	<i>C. senegalensis</i>	-	+	+	+
	VNHUCC.NEL95					
	VNHUCC.NEL35	<i>C. plantarum</i>	-	+	+	+
	VNHUCC.NEL300					
	VNHUCC.NEL66					

	VNHUCC.NEL68					
	VNHUCC.NEL69					
	VNHUCC.NEL32					
	VNHUCC.NEL93					
	VNHUCC.NEL100	<i>C. lunata</i>	-	-	-	+
	VNHUCC.NEL57	<i>C. dactyloctenicola</i>	-	+	+	+
	VNHUCC.NEL101					
	VNHUCC.NEL51	<i>C. radicifolligena</i>	-	+	+	+
	VNHUCC.NEL305					
VNHUCC.NEL42	<i>C. suttoniae</i>	-	+	+	+	
<i>Exserohilum</i>	VNHUCC.NEL137					
	VNHUCC.NEL136	<i>E. rostratum</i>	-	+	+	+
	VNHUCC.NEL34					
	VNHUCC.NEL56					
<i>Neopestalotiopsis</i>	VNHUCC.NEL13	<i>Neopestalotiopsis</i> sp.	+	+	+	+
<i>Aspergillus</i>	VNHUCC.NEL03	<i>A. fumigatus</i>	-	-	+	+
	VNHUCC.NEL160	<i>A. niger</i>	-	-	+	+
<i>Diaporthe</i>	VNHUCC.NEL83	<i>D. tectonae</i>	-	+	+	+
	VNHUCC.NEL89					
	VNHUCC.NEL21	<i>D. hongkongensis</i>	-	+	+	+
	VNHUCC.NEL20					
Total			1	13	17	20

3.2. EVALUATION OF THE EFFECT OF SILVER NANOPARTICLES ON PATHOGENS CAUSING DISEASES IN LOTUS *IN VIVO*

3.2.1. Effect of silver nanoparticles on fungal growth on solid media

3.2.1.1. Inhibitory effect of silver nanoparticles on fungal mycelial growth

The results showed that most fungal isolates exhibited a clear trend: as the concentration of silver nanoparticles (AgNPs) increased, the inhibition of mycelial growth also increased, reflected by reduced colony diameter. Exposure to lower concentrations (≤ 1 mg/L) did not result in significant inhibition compared to the control. However, several *Curvularia* isolates, such as *C. dactyloctenicola* (VNHUCC.NEL57), *C. radicifoliigena* (VNHUCC.NEL51), *C. verruculosa* (VNHUCC.NEL74), *C. suttoniae* (VNHUCC.NEL42), and *C. lunata* (VNHUCC.NEL100) —displayed high “sensitivity” at low AgNP concentrations. Specifically, mycelial growth inhibition ranged from 4.17–15.19% at 0.1 mg/L and 3–25.53% at 1 mg/L. In contrast, Hexaconazole exhibited limited inhibitory efficacy in many cases: 16/29 isolates showed inhibition below 25% after 7 days, although complete inhibition was still observed for several pathogens, such as VNHUCC.NEL37, VNHUCC.NEL31 (*Curvularia* sp.), VNHUCC.NEL42 (*C. suttoniae*), and VNHUCC.NEL89 (*D. tectonae*).

Silver nanoparticles demonstrated consistent inhibitory activity, particularly at higher concentrations (≥ 10 mg/L). At 10 mg/L, 5/29 isolates exhibited $>50\%$ growth reduction; this increased to 14/29 at 20 mg/L. Notably, at 30 mg/L AgNPs produced the highest efficacy: 27/29 isolates (93.10%) showed $>50\%$ inhibition, and 17/29 exceeded 70% inhibition. *Curvularia* isolates—already sensitive at low concentrations—showed even stronger suppression at elevated AgNP levels, underscoring the potential of AgNPs for managing *Curvularia*-associated diseases. At concentrations ≥ 20 mg/L, silver nanoparticles not only suppressed *Curvularia* but also achieved substantial inhibition ($>55\%$ compared with control) of

pathogenic isolates belonging to *Diaporthe*, *Nigrospora*, *Exserohilum*, *Neofusicoccum*, and *Aspergillus*. Collectively, these findings position AgNPs as a promising, broad-spectrum and sustainable alternative for integrated management of lotus diseases.

Responses to AgNPs were heterogeneous. While many isolates were highly sensitive, certain isolates, such as VNHUCC.NEL80 (*Curvularia* sp.) and VNHUCC.NEL72 (*Colletotrichum siamense*) was minimally or not noticeably affected. Not all isolates exhibited a linear dose–response relationship—for example, exposure of VNHUCC.NEL57 (*C. dactyloctenicola*) to 0.1 mg/L AgNPs resulted in a slight growth increase relative to the control. A non-linear pattern (lower inhibition at 1 mg/L than at 0.1 mg/L) was also observed in VNHUCC.NEL37 (*Curvularia* sp.), VNHUCC.NEL32 (*C. plantarum*), VNHUCC.NEL42 (*C. suttoniae*), and two isolates of *C. siamense* (VNHUCC.NEL10, VNHUCC.NEL70).

3.2.1.2. Sensitivity of fungi to silver nanoparticles (EC_{50} value)

Variation in antifungal sensitivity to AgNPs reflects the biological diversity and unique physiological traits of individual isolates, as well as their adaptive responses to environmental stress and treatment pressure. The EC_{50} (the AgNP concentration producing 50% inhibition of fungal growth) was determined by analyzing dose–response curves on agar with multiple concentrations. Three regression approaches were applied: nonlinear Probit regression with $\log_{10}$ transformation, linear interpolation on the $\log_{10}$ concentration axis, and log-linear regression—to ensure analytical robustness and model suitability.

Using $\log_{10}$ Probit regression, EC_{50} values for the 29 isolates ranged from 3.422 to 43.543 mg/L, with a median of 18.88 mg/L and a mean of 19.75 mg/L. Fifty percent of EC_{50} values (IQR) fell between 11.98 mg/L (Q1) and 26.70 mg/L (Q3). Appropriate model selection was critical for improving accuracy, consistency, and comparability when evaluating AgNP efficacy.

3.2.1.3. Effects of silver nanoparticles on colony morphology

Color changes of fungal colonies: Exposure to AgNPs on agar plates caused significant color changes on colony surfaces, including:

- + Expansion of white/light areas on the upper surface and dark radial streaks on the reverse side.
- + Pigment secretion: Some isolates, such as *Curvularia* VNHUCC.NEL37 secreted brown pigments into the medium at 20 mg/L AgNPs.

Colony morphological abnormalities:

- + Increased development of aerial mycelium instead of typical horizontal radial expansion optimized for nutrient acquisition.
- + Aberrant colony margins: undulate/wavy edges emerged under AgNP exposure, likely due to structural alterations and internal cellular changes causing uneven hyphal contraction over time. *Curvularia lunata* (VNHUCC.NEL100) showed pronounced sensitivity—distinctly wavy margins appeared even at 0.1 mg/L. Similar margin alterations were also observed in *Neofusicoccum parvum* (VNHUCC.NEL18) and *Colletotrichum plurivorum* (VNHUCC.NEL92) at ≥ 10 mg/L.
- + Changes in colony texture: Two distinct colony textures were observed following exposure to silver nanoparticles (AgNP). A majority of the samples developed enhanced aerial mycelium, characterized by cottony to floccose surfaces. This group included *Curvularia* spp. (VNHUCC.NEL74, NEL51, NEL37, NEL80), *Exserohilum rostratum* (VNHUCC.NEL56), *Neopestalotiopsis* sp. (VNHUCC.NEL13), *Nigrospora lacticola* (VNHUCC.NEL30), and *Colletotrichum* spp.

(VNHUCC.NEL91, NEL71). In contrast, a smaller subset displayed a transition toward flatter, more appressed colonies, specifically *Neofusicoccum parvum* (VNHUCC.NEL18) and *Curvularia senegalensis* (VNHUCC.NEL95).

3.2.2. Effect of silver nanoparticles on fungal growth in liquid media

Eight representative isolates (Table 3.3) were selected based on taxonomic diversity, AgNP sensitivity (EC₅₀), rapid growth rate, and partial (not complete) inhibition profiles, facilitating observation of treatment effects. Genera such as *Neofusicoccum*, *Nigrospora*, *Neopestalotiopsis*, and *Diaporthe* were excluded due to prolonged sporulation time, complex spore diversity, or strong suppression limiting detailed evaluation.

3.2.2.1. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Fungicidal Concentration (MFC)

Resazurin is a redox indicator dye widely used to assess metabolic activity and cell viability in cytotoxicity and antifungal susceptibility assays (Serrano et al., 2023). Broth microdilution assay results (Table 3.3) showed AgNP MIC values ranging from 0.3125 to 5 mg/L among the representative isolates. Three isolates—VNHUCC.NEL10 (*Colletotrichum siamense*), VNHUCC.NEL51 (*Curvularia radicifoliigena*), and VNHUCC.NEL74 (*C. verruculosa*)—were highly sensitive with very low MICs (0.3125 mg/L). Although AgNPs inhibited all tested isolates, fungicidal activity was not observed (MFC/MIC ratio ≥ 4) for some isolates, including VNHUCC.NEL38 (*Lasiodiplodia theobromae*), VNHUCC.NEL56 (*Exserohilum rostratum*), and VNHUCC.NEL80 (*Curvularia* sp.). This was confirmed by culturing from MIC-treated plates on PDA medium

Table 3.3. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Fungicidal Concentration (MFC) values of representative isolates determined by 96-well microdilution assay

Isolates	Genus/Species	MIC	MFC	MFC/MIC
VNHUCC.NEL93	<i>Curvularia plantarum</i>	2.5	5	2
VNHUCC.NEL80	<i>Curvularia</i> sp.	1.25	10	8
VNHUCC.NEL74	<i>C. verruculosa</i>	0.3125	20	64
VNHUCC.NEL51	<i>C. radicifoliigena</i>	0.3125	0.3125	1
VNHUCC.NEL56	<i>E. rostratum</i>	1.25	5	4
VNHUCC.NEL160	<i>A. niger</i>	5	10	2
VNHUCC.NEL38	<i>L. theobromae</i>	1.25	ND	ND
VNHUCC.NEL10	<i>Colletotrichum siamense</i>	0.3125	0.625	2

Note: ND (Not Detected): no fungicidal activity detected. MFC is defined as the lowest concentration at which no fungal growth was observed on PDA plates after 48 hours of incubation.

Based on the MIC determinations in Section 3.2.2.1, a common MIC (MIC_c) of 5 mg/L was selected as a reference threshold to evaluate responses across the eight representative isolates. An over-threshold concentration (30 mg/L) was additionally included for concurrent assays on biomass production, membrane integrity, and enzyme activity.

3.2.2.2. Effect of silver nanoparticles on fungal biomass

Mycelial development in PDB supplemented with AgNPs was markedly suppressed after 3 days (Figure 3.27). Both 5 mg/L and 30 mg/L AgNP treatments produced clear biomass reductions compared with the controls

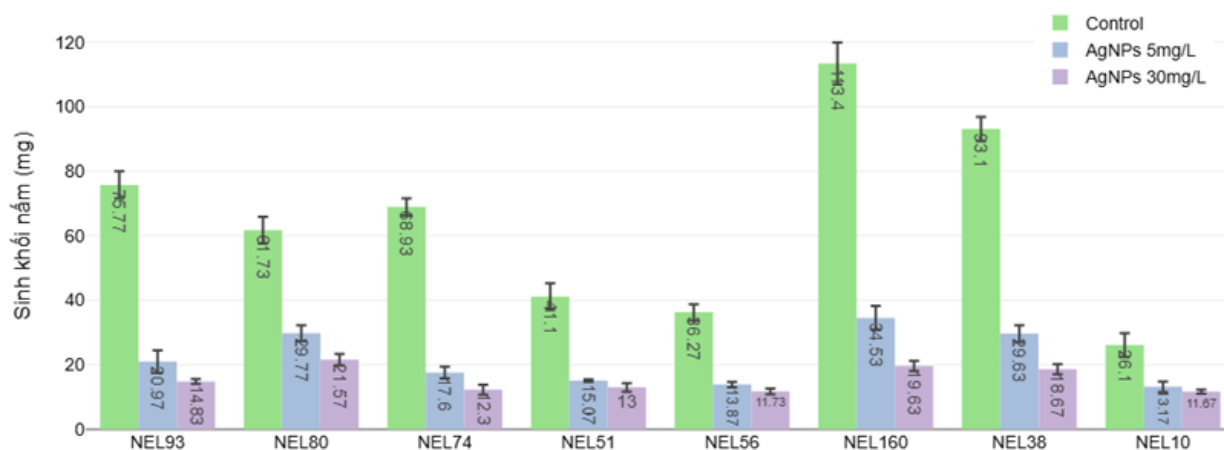


Fig 3.27. Effect of silver nanoparticles on biomass (dry weight) accumulation after 3 days of culture.

At 5 mg/L, AgNPs significantly reduced biomass in almost all isolates, with dry biomass ranging from 13.17 mg (VNHUCC.NEL10 – *Colletotrichum siamense*) to 34.53 mg (VNHUCC.NEL160 – *Aspergillus niger*), corresponding to 49.5–72% inhibition. Isolate VNHUCC.NEL93 (*Curvularia plantarum*) showed the greatest reduction (72.3%). At 30 mg/L, biomass declined further in nearly all isolates, with yields after 3 days ranging only from 11.73 mg (VNHUCC.NEL56) to 21.57 mg (VNHUCC.NEL160). Isolates VNHUCC.NEL93 (*C. plantarum*), VNHUCC.NEL74 (*C. verruculosa*), and VNHUCC.NEL160 (*A. niger*) each exhibited >80% biomass reduction relative to the control. Notably, isolates VNHUCC.NEL160 (*A. niger*) and VNHUCC.NEL38 (*Lasiodiplodia theobromae*), which normally generates abundant biomass, was highly sensitive—showing 82.7% and 79.9% reductions, respectively, at 30 mg/L.

3.2.3. Effect of silver nanoparticles on biochemical characteristics and cell membrane integrity

The cell membrane plays a crucial role in maintaining osmotic pressure and normal cellular functions. It acts as a protective barrier by regulating the exchange of compounds between the intracellular and extracellular environments and maintaining intracellular homeostasis.

3.2.3.1. Leakage of intracellular components (nucleic acid – OD₂₆₀)

To further investigate the damage to the fungal cell membrane, extracellular electrical conductivity and nucleic acid content (OD₂₆₀) in the medium were measured after treatment with silver nanoparticles. Compared to the control group, treatment with silver nanoparticles demonstrated increased permeability of the fungal hyphal membrane, as evidenced by elevated leakage of intracellular substances, which correlated positively with nanoparticle concentration and exposure time (Figure 3.28).

The measurement of OD₂₆₀ in culture filtrates showed that both 5 mg/L and 30 mg/L of silver nanoparticles (AgNPs) significantly increased nucleic acid leakage compared to the control. The leakage was greater at the 30 mg/L concentration and exhibited a progressive increase over time, particularly noticeable after 24 hours. Isolate VNHUCC.NEL38 (*L. theobromae*) demonstrated a distinct differentiation in OD₂₆₀ between the two AgNP concentrations from 12 to 48 hours. Some isolates, including VNHUCC.NEL74, VNHUCC.NEL51, and VNHUCC.NEL10, exhibited a plateau or a decline in leakage after 36

to 48 hours. This pattern may be attributed to extensive membrane disruption, leading to a collapse in metabolic activity. Overall, these data confirm that AgNPs compromise membrane integrity and induce the release of intracellular content.

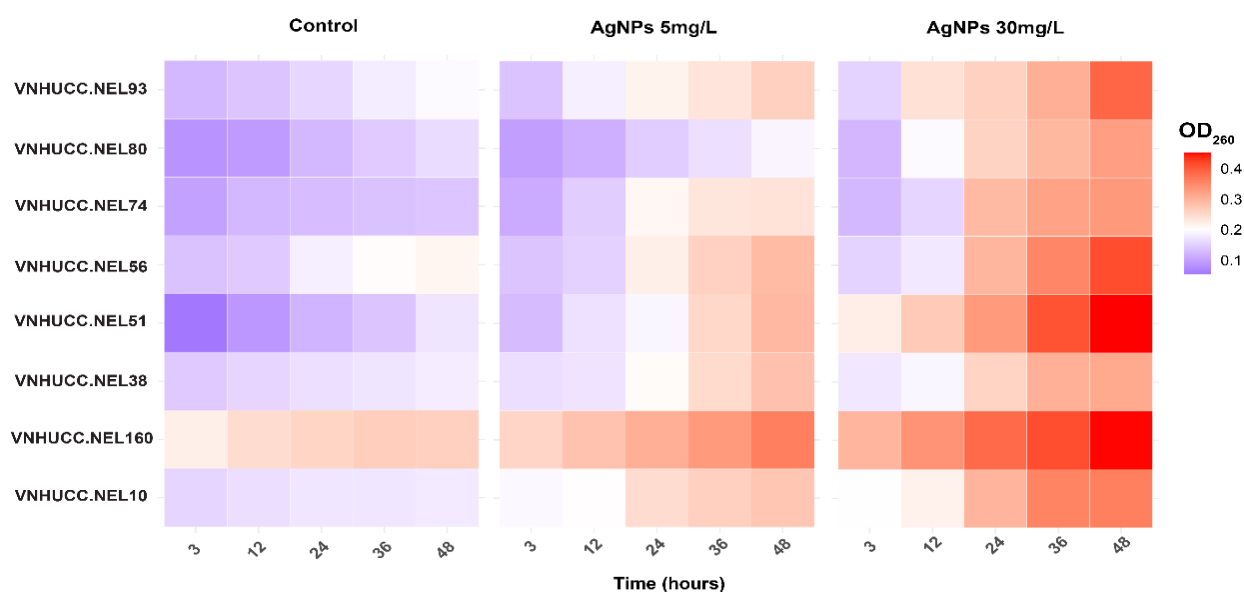


Fig 3.28. Heatmap illustrating the effect of silver nanoparticles on the trend of OD₂₆₀ values of 8 different fungal isolates under various silver nanoparticle treatment concentrations. Each concentration is represented within a specific block. The scale bar indicates OD₂₆₀ values.

3.2.3.2. Extracellular electrical conductivity (EEC)

Increases in extracellular electrical conductivity (EEC) provided functional evidence of membrane damage induced by silver nanoparticles (AgNP) through ion leakage. Significant elevations in EEC compared to the control were observed for most treatments ($p < 0.05$), with only a subset of isolates at 5 mg/L after 3 hours showing no statistically significant divergence. The 30 mg/L concentration elicited the strongest responses, particularly at 48 hours ($p < 0.01$).

The temporal profile revealed minor early changes (3–12 hours) followed by pronounced increases at 36–48 hours, suggesting an initial buffering or adaptive phase before progressive membrane destabilization. Relative (percent) normalization highlighted isolate-specific variability: VNHUCC.NEL51 (*Curvularia radiciifoliigena*) demonstrated the highest increases (113.65% and 145.27% at 36 and 48 hours at 30 mg/L; 83.18% and 102.59% at 36 and 48 hours at 5 mg/L), followed by VNHUCC.NEL74 (*C. verruculosa*) (124.83% at 5 mg/L; 84.70% at 30 mg/L at 48 hours). In contrast, VNHUCC.NEL38 (*Lasioidiplodia theobromae*) exhibited limited elevation (34.33% and 64.33% at 48 hours for 5 and 30 mg/L, respectively).

3.2.3.3. Ergosterol content

Ergosterol is the principal sterol component of fungal membranes, playing a critical role in regulating membrane permeability and fluidity, modulating the function and distribution of integral membrane proteins, and controlling the cell cycle, thereby contributing to the structural integrity of the cell membrane (Ouyang et al., 2021).

AgNP treatment significantly reduced ergosterol content across tested isolates ($p < 0.05$). No significant difference was detected between 5 mg/L and 30 mg/L for isolates

VNHUCC.NEL38 (*L. theobromae*) and VNHUCC.NEL80 (*Curvularia* sp.), although both treatments differed from the control ($p < 0.05$). *Curvularia* isolates VNHUCC.NEL93, VNHUCC.NEL80, VNHUCC.NEL74, and VNHUCC.NEL51 each showed $>50\%$ reduction at 30 mg/L. VNHUCC.NEL93 (*C. plantarum*) exhibited the greatest decrease (75%). Isolate VNHUCC.NEL51 (*C. radicifoliigena*) showed only an 18.12% reduction at 5 mg/L but pronounced sensitivity at 30 mg/L. Ergosterol in VNHUCC.NEL74 (*C. verruculosa*) decreased by 57.32% vs the control and by 46.40% relative to the 5 mg/L treatment. Representative isolates from other genera (VNHUCC.NEL10 (*C. siamense*); VNHUCC.NEL160 (*A. niger*); VNHUCC.NEL38 (*N. parvum*); VNHUCC.NEL56 (*E. rostratum*)) showed moderate reductions (37–52.13%) at 30 mg/L ($p < 0.05$).

3.2.3.4. Lipid peroxidation – Malondialdehyde (MDA)

Malondialdehyde (MDA), a lipid peroxidation end-product, is a conventional marker of oxidative membrane damage (Castro et al., 2015; Zhao et al., 2016).

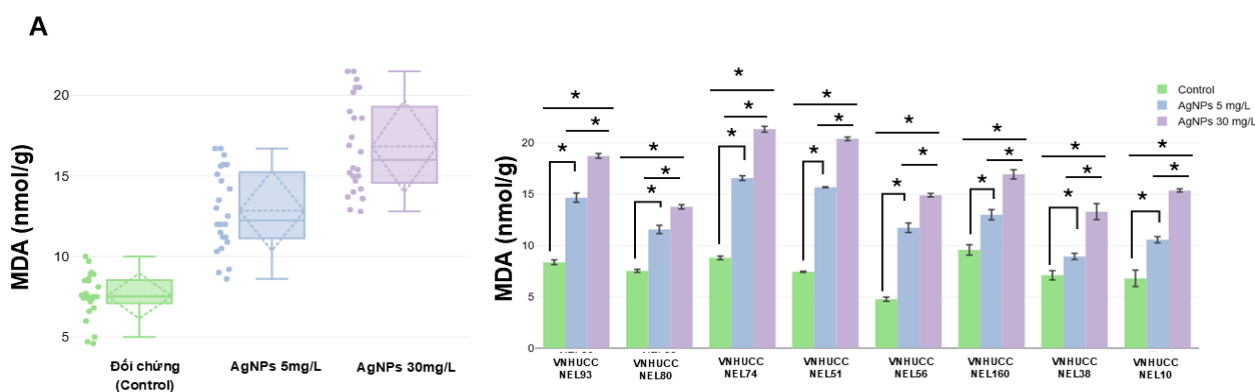


Fig 3.33. MDA content ($\mu\text{mol/g}$) after 48 hours of silver nanoparticle treatment. A. Box plot showing the distribution of observed MDA values between the control group and groups treated with silver nanoparticles (5 mg/L and 30 mg/L). B. Bar chart depicting differences in MDA content among individual isolates. Statistically significant differences ($p < 0.05$) are indicated by “*” for each isolate.

Changes in intracellular MDA under different AgNP concentrations are presented in Figure 3.33. Complementing nucleic acid leakage and EEC data, MDA levels increased in all tested isolates after 48 h of AgNP exposure (Figure 3.33B). Both 5 mg/L and 30 mg/L treatments significantly elevated MDA ($p < 0.05$), producing 1.2–3.1-fold increases over the control. These findings indicate that AgNPs promote lipid peroxidation, undermining membrane repair capacity, increasing permeability, and facilitating leakage of intracellular constituents.

3.2.3.5. Effect of silver nanoparticles on antioxidant enzyme systems

Maintaining intracellular redox balance is crucial for cell viability, as excessive reactive oxygen species (ROS) can disrupt this equilibrium. Under oxidative stress, both enzymatic (e.g., superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT)) and non-enzymatic antioxidants play essential roles in mitigating ROS accumulation (Šimončicová et al., 2018; Su et al., 2020). Superoxide dismutase (SOD) serves as a primary defense enzyme, converting superoxide radicals and preventing radical-mediated cascades (Mansoor et al., 2022).

At the 48-hour, SOD activity significantly declined in most isolates at both concentrations of silver nanoparticles (AgNP) ($p < 0.05$). The most substantial reduction (67.98%) was observed in VNHUCC.NEL74 (*Curvularia verruculosa*) at a concentration of 30 mg/L. Conversely, VNHUCC.NEL10 (*Colletotrichum siamense*) and VNHUCC.NEL56 (*E. rostratum*) exhibited increased SOD activity, suggesting an induced antioxidant defense mechanism in response to persistent oxidative stress.

Catalase (CAT) activity demonstrated greater sensitivity to AgNP treatment, with most isolates showing a significant decrease in activity compared to controls, particularly at the 30 mg/L concentration ($p < 0.05$), with the exception of VNHUCC.NEL10 (*C. siamense*). These observed shifts in enzymatic activity collectively indicate a compromised capacity for ROS scavenging, contributing to the accumulation of oxidative damage.

3.2.4. Effects of silver nanoparticles on fungal growth at the microscopic level

Microscopic evaluation of fungal spores and hyphae was conducted to assess the internal effects of silver nanoparticles on inhibiting the growth of fungal pathogens. The results revealed that silver nanoparticles induced various morphological alterations on the hyphae and spores of pathogenic fungi. Prominent morphological abnormalities observed included:

- i. Hyphal deformation and loss or interruption of septa relative to normal development.
- ii. Presence of an extracellular matrix-like material in controls—observed as fibrous or cottony strands linking hyphae—suggestive of a biofilm layer, which was disrupted or altered after AgNP exposure.
- iii. Many isolates exhibited significant cytoplasmic aggregation, with hyphae showing shrinkage or abnormal deformation (constriction).
- iv. Deformation and loosening of fungal hyphal knots/sclerotium-like structures; hyaline fragmentation increased with higher AgNP concentrations. Enhanced surface area of AgNPs likely promotes adhesion and diffusion across the fungal cell envelope, compromising membrane integrity.
- v. Accumulation of exogenous particulate material adhering externally and evidence of internal deposition.
- vi. Leakage of intracellular contents from hyphae and spores.
- vii. Pigment depletion or, conversely, enhanced melanization/browning phenomena.

3.2.5. Modeling and hypothesized mechanism of silver nanoparticle action on fungal growth inhibition

A hypothetical mechanistic model (Figure 3.41) was constructed, integrating biomass data and biochemical indicators. Pearson correlation coefficients between relative biomass reduction (target variable) and biochemical indicators: OD₂₆₀ nucleic acid leakage, extracellular electrical conductivity – EEC, malondialdehyde – MDA, ergosterol – ERG, and the activities of SOD and CAT (Supplementary Figure 4.12). Among the variables assayed under 5 mg/L and 30 mg/L AgNP exposure, MDA elevation and ergosterol depletion emerged as the two principal factors most strongly associated with biomass decline, supporting their central placement in the mechanistic pathway.

The entry of silver nanoparticles (AgNPs) into fungal cells constitutes the initiating step of a cascade culminating in growth inhibition. The fungal cell wall—composed of a chitin scaffold, β -glucans, mannoproteins, lipids, and structural polysaccharides—

presents multiple functional groups (carboxyl, amino, sulfhydryl) that underpin surface-level interactions (Ruiz-Herrera & Ortiz-Castellanos, 2019; Yoshimi et al., 2022). Prior studies indicate that AgNP binding is mediated by electrostatic and/or coordination interactions between these carboxyl, amino, and sulfhydryl groups in the cell wall matrix and nanoparticle surfaces (Mondéjar-López et al., 2023; Peng & Chen, 2024). Once a critical interaction density or exposure duration is reached, AgNPs may internalize via: (i) wall-plasma membrane that becomes destabilized and loses integrity; (ii) endocytic pathways; or (iii) transport/ion channels. Regardless of the route, their presence and accumulation progressively compromise the micro-elastic (viscoelastic) properties of the wall-membrane continuum. Microscopic observations in the present study documented surface damage to hyphae (voids, concavities, shrinkage, deformation) across all eight representative isolates, concomitant with leakage of intracellular constituents. Nevertheless, initial interactions do not necessarily trigger immediate structural collapse; at low concentrations or short exposure intervals, AgNPs may remain transiently adsorbed to the outer surface or extracellular matrix-like material (Parveen et al., 2023), explaining the absence of overt morphological injury under those conditions.

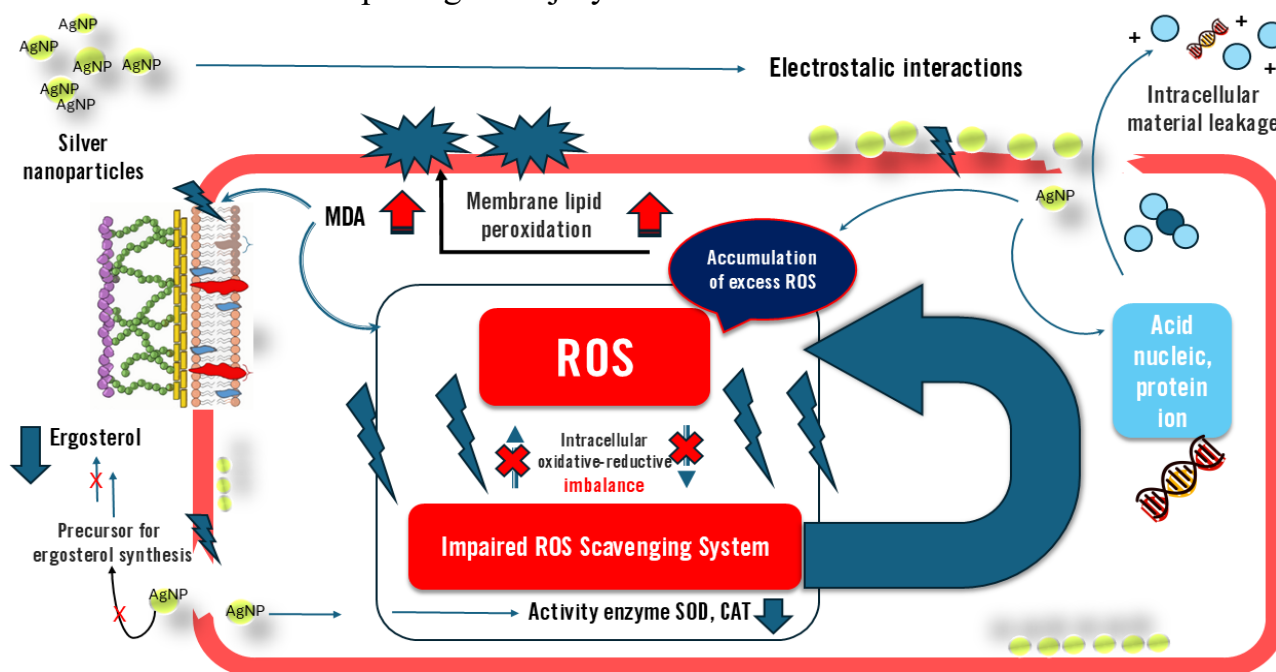


Figure 3.41. Proposed mechanistic model of silver nanoparticle-induced antifungal activity

Upon intracellular entry, AgNPs are perceived as stressors, stimulating overproduction and accumulation of ROS beyond homeostatic levels. Normally, antioxidant enzymes (SOD, CAT, others) regulate ROS and prevent damage. However, biochemical evidence here indicates significant suppression of these enzymes following AgNP treatment. Reduced antioxidant capacity permits ROS accumulation, triggering redox imbalance, intensifying membrane lipid peroxidation (indexed by increased MDA), and structurally weakening the plasma membrane. Concomitant membrane deformation and permeability increase lead to leakage of nucleic acids, proteins, and ions, impairing growth functions and ultimately culminating in cell death.

CHAPTER IV. CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS

4.1. CONCLUSIONS

Based on the findings of this dissertation, the following conclusions:

This study delineates the diversity of fungal pathogens associated with cultivated lotus in Hue City, Vietnam, identifying 21 species across nine genera (*Colletotrichum*, *Neofusicoccum*, *Lasiodiplodia*, *Nigrospora*, *Curvularia*, *Exserohilum*, *Neopestalotiopsis*, *Aspergillus*, and *Diaporthe*). Species were delimited using multilocus phylogenetic analyses integrated with GCPSR and PTP criteria, and corroborated by host association and morphological characters. Of the 21 species, 13 are newly recorded for Vietnam, 17 constitute the first global reports of pathogenicity on lotus, and 20 are newly recorded on lotus in Vietnam. *Curvularia* is the most species-rich genus (8 identified species), followed by *Colletotrichum* (5 identified species). Overall, the pathogenic assemblage exhibits uneven geographic and habitat distributions, underscoring pronounced taxonomic diversity and biological complexity of lotus-associated mycobiota in Hue.

Silver nanoparticles displayed pronounced inhibitory effects on the growth of lotus-associated fungal pathogens in both solid and liquid *in vitro* systems. In most isolates, inhibitory efficacy increased with rising AgNP concentration, although interspecific and inter-isolate variability was evident. EC₅₀ values derived from three modeling approaches enabled classification of isolates into four sensitivity tiers: highly sensitive, sensitive, resistant, and highly resistant (quartile-based). In liquid culture, AgNPs suppressed biomass accumulation of eight representative pathogenic isolates, with stronger inhibition at 5–30 mg/L. MIC values ranged from 0.3125 to 5 mg/L. Fungal growth suppression was mechanistically associated with compromised plasma membrane integrity—evidenced by elevated extracellular nucleic acid leakage, increased electrical conductivity, and reduced ergosterol content—alongside intensified oxidative stress, as indicated by enhanced lipid peroxidation (increased MDA) and diminished activities of the antioxidant enzymes SOD and CAT, culminating in redox imbalance and impaired mycelial development.

4.2. RECOMMENDATIONS

Continue collecting and characterizing pathogenic isolates lacking sufficient data for definitive species assignment; amplify and analyze additional loci to refine taxonomy and identification.

Further assess AgNP effects on genera such as *Diaporthe*, *Neofusicoccum*, and *Neopestalotiopsis*, which require prolonged observation and were not comprehensively evaluated here.

Conduct advanced studies (SEM, TEM, and molecular approaches such as RNA sequencing) to elucidate AgNP impacts at cellular and transcriptomic levels.

Perform virulence and ecotoxicological assessments of AgNP application under larger-scale (field) conditions to evaluate practical deployment and environmental safety.