

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, 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 of the 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:** Xác định các tác nhân gây hại trên cây sen (*Nelumbo nucifera*) trồng ở Thừa Thiên Huế và đánh giá ảnh hưởng của vật liệu nano bạc đối với sự phát triển của các tác nhân nấm gây hại.

### 2.2. Mục tiêu cụ thể:

- Phân lập, định danh được các tác nhân nấm gây hại trên cây sen ở Thừa Thiên Huế.
- Đánh giá được hiệu lực ức chế và phân tích bước đầu những ảnh hưởng của nano bạc lên quá trình phát triển của các nấm gây hại phân lập được trên cây sen trong điều kiện phòng thí nghiệm.

## 3. NỘI DUNG VÀ PHẠM VI NGHIÊN CỨU

### 3.1. Nội dung nghiên cứu

- **Nội dung 1:** Điều tra, phân lập và xác định các tác nhân nấm liên quan đến các triệu chứng bệnh hại trên cây sen trồng ở Thừa Thiên Huế.
- **Nội dung 2:** Đánh giá ảnh hưởng của nano bạc đến các tác nhân nấm gây bệnh hại trên cây sen trong điều kiện phòng thí nghiệm.

### 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 nấm liên quan đến các triệu chứng bệnh hại trên lá của 2 giống sen: sen trắng Huế, 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 liên quan đến các triệu chứng bệnh hại trên cây sen trồng tại Thành phố Huế, bao gồm thông tin về thành phần loài, 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 nấm liên quan đến các chứng bệnh trên cây sen ở 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 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 dữ liệu về hiệu lực ức chế của nano bạc lên 29 chủng nấm phân lập thử nghiệm đại diện trên môi trường thạch rắn. Nghiên cứu cũng đã ứng dụng 3 mô hình khác nhau để ước tính giá trị  $EC_{50}$ . Trên cơ sở so sánh, mô hình hồi quy phi tuyến tính Probit  $\log_{10}$  được lựa chọn để phân nhóm mức độ đáp ứng, phân loại hiệu quả của nano bạc, mức độ kháng/nhạy cảm của chủng nấm phân lập thử nghiệm thành 4 nhóm dựa trên 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 bước đầu làm rõ trực cơ chế tác động sinh hóa của nano bạc lên 8 chủng nấm phân lập đại diện. Cung cấp bằng chứng khoa học 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. 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.

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 ở Phong Điền, Phú Vang, Phú Lộc, 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. 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).

#### **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 CO<sub>2</sub> 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 *Pseudosporora 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. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

Các tác nhân nấm liên quan đến các triệu chứng bệnh 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. 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 nấm gây bệnh hại trên cây sen

Các mẫu lá có triệu chứng bệnh điển hình được 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.

#### 2.2.2. Phương pháp định danh nấm dựa trên các đặc điểm hình thái

Các đặc điểm tăng trưởng (đường kính tản nấm) được ghi nhận theo các mốc thời gian 3, 5 và 7 ngày nuôi cấy trên môi trường PDA. Sau hai tuần nuôi cấy trên môi trường

PDA, các quan sát về hình thái vi mô (hình dạng, kích thước bào tử, sợi nấm, vách ngăn,...) với các chủng phân lập được thực hiện, màu sắc cũng được mô tả theo thang màu Rayner (McKnight & Rayner, 1972) và tên gọi của màu sắc được xác định theo mã màu của trang web trực tuyến Color Name (<https://www.color-name.com/>).

### 2.2.3. Phương pháp định danh nấm dựa trên kỹ thuật sinh học phân tử

#### 2.2.3.1. Phương pháp tách chiết DNA, khuếch đại và giải trình tự

Sợi nấm 7 ngày tuổi từ các chủng phân lập được thu trực tiếp bằng dao vô trùng từ các đĩa phân lập nuôi cấy trên môi trường PDA. DNA tổng số được tách chiết bằng bộ Kit thương mại Genomic DNA Extraction (ABT, Việt Nam) theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất. Quá trình khuếch đại PCR với tổng thể tích mỗi phản ứng PCR (50  $\mu$ L) bao gồm: 25  $\mu$ L of Go Taq Green 2X Master Mix (Promega, Hoa Kỳ), 5  $\mu$ L (20 - 100 ng) gDNA khuôn mẫu, 5  $\mu$ L mỗi primer (10 pmol/ $\mu$ L) và 15  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O (Promega, Hoa Kỳ). Các môi 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).

#### 2.2.3.2. 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 bằng MEGA 11.

**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	ATGTGCAAGGCCGTTTCGC	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		
$\beta$ -tubulin 2 (TUB2)	T1	AAC ATG CGT GAG ATT GTA AGT	O'Donnell & Cigelnik (1997)	<i>Lasiodiplodia</i> <i>Nigrospora</i> <i>Colletotrichum</i>
	Bt2a	GGTAACCAAAATCGGTGCTGCTTTC	Glass & Donaldson (1995)	<i>Diaporthe</i> <i>Neopestalotiopsis</i>

	Bt2b	ACCCTCAGTGTAGTGACCCCTGGC		
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> <i>Neofusicoccum</i> <i>Nigrospora</i> <i>Colletotrichum</i> <i>Diaporthe</i> <i>Neopestalotiopsis</i>
	EF1-2218R	ATG ACA CCR ACR GCR ACR GTY TG		
Large Subunit ribosomal RNA ( <i>LSU</i> )	LR0R	ACC CGC TGA ACT TAA GC	Rehner & Samuel (1994)	<i>Curvularia</i>
	LR5	TCC TGA GGG AAA CTT CG	Vilgalys & Hester (1990)	

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 được hiển thị bằng 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. Ranh giới loài được xác định theo mô hình GCPSR (Quaedvlieg et al., 2014). Quan hệ giữa các đơn vị phân loại gần liên hệ được suy luận bằng mạng phát sinh gene (Split Network) với biến đổi LogDet và thuật toán NeighborNet/Split Decomposition. Phân tích PTP được triển khai trên ma trận ML của suy luận phát sinh loài.

## 2.2.4. Phương pháp đánh giá ảnh hưởng của nano bạc đến một số nấm gây hại trên cây sen ở điều kiện phòng thí nghiệm

### 2.2.4.1. Phương pháp đánh giá ảnh hưởng của nano bạc đến sự sinh trưởng nấm trên môi trường thạch (rắn)

#### ✿ 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 mg/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.

#### ✿ Phương pháp đánh giá độ nhạy của nano bạc (giá trị EC<sub>50</sub>)

Độ nhạy của nano bạc với các chủng phân lập nấm gây hại được biểu thị thông qua giá trị EC<sub>50</sub> 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<sub>10</sub>. 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.

#### **2.2.4.2. Phương pháp đánh giá ảnh hưởng của nano bạc đến sinh trưởng các tác nhân nấm trong môi trường lỏng**

##### **✿ 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. Dây dung dịch nano bạc thử nghiệm (giếng 2 – giếng 10) được thiết lập và chuẩn bị trong 200  $\mu$ L (môi trường và nano bạc) với nồng độ được tính trước, sao cho sau khi bổ sung 20  $\mu$ L huyền phù bào tử ( $1 \times 10^5$  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  $\mu$ 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  $\mu$ L dung dịch resazurin được thêm vào các giếng (nồng độ hoạt động cuối cùng trong mỗi giếng: 44 $\mu$ 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  $\mu$ 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.

##### **✿ 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.

##### **✿ 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  $\mu$ 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, 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  $\mu$ S/cm. Thí nghiệm được lặp lại ba lần.

Mức độ rò rỉ acid nucleic (được biểu thị bằng giá trị OD<sub>260</sub>). 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 nổi trong được sử dụng để đánh giá sự rò rỉ acid nucleic ngoại bào (OD<sub>260</sub>).

#### ✿ 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.

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

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

Trong đó: A<sub>450</sub>, A<sub>532</sub>, A<sub>600</sub> biểu thị độ hấp thụ ở bước sóng 450 nm, 532 nm, 600 nm. C<sub>MDA</sub>: nồng độ MDA trong dung dịch hỗn hợp (tính theo phương trình 2.1). V<sub>0</sub>, V<sub>t</sub>, V<sub>r</sub> 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)

#### ✿ 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:

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

trong đó: A<sub>282</sub> và A<sub>230</sub> độ hấp thụ ở 282 nm và 230 nm, 518 nm và 290 nm. FW: khối lượng tươi sợi nấm

#### ✿ 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<sub>560</sub>. 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 mM. Mức độ giảm giá trị OD ở bước sóng A<sub>240</sub> của H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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). Các hình ảnh, biểu đồ trực quan hóa dữ liệu khác trong luận án được thực hiện với R (gói ggplot2)

## CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. SỰ ĐA DẠNG CỦA CÁC TÁC NHÂN NẤM LIÊN QUAN ĐẾN CÁC TRIỆU CHỨNG BỆNH HẠI TRÊN CÂY SEN TRỒNG Ở THÀNH PHỐ HUẾ

Tổng cộng 174 chủng nấm đã được phân lập từ 392 mẫu bệnh hại có triệu chứng điển hình trên cây sen, được thu thập qua 65 đợt khảo sát tại các điểm trồng sen khác nhau ở Thành phố Huế từ năm 04/2021 đến tháng 06/2024. 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 trên lá sen. Chi *Curvularia* (Pleosporaceae) phổ biến nhất với 26 chủng, chủ yếu liên quan đến triệu chứng 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. Trong khi đó, 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 nấm 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 dạng sinh cảnh đa dạng nhất về chi và số lượng chủng, với sự 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	<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					
VNHUCC.NEL16						
<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. radicyfolliigena</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					
<b>Tổng cộng</b>			<b>1</b>	<b>13</b>	<b>17</b>	<b>20</b>

### 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  $\leq 1$  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. radicyfolliigena* 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 ( $\geq 10$  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. 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 miễn cảm" cao của phân lập này với tác động của nano bạc. Trạng thái biến đổi 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 bề mặt (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. 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 chất chỉ thị chuyển hóa dựa trên cơ chế oxy hóa-khử, được khử từ dạng oxy hóa có màu xanh (resazurin) sang dạng resorufin có màu hồng bởi hoạt tính hô hấp của tế bào; vì vậy, nó được sử dụng rộng rãi trong các phép thử 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 radicyfoliigena*) và VNHUCC.NEL74 (*C. verruculosa*) đều thể hiện mức độ nhạy cảm cao với giá trị MIC rất thấp (0,3125 mg/L).

**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. radicyfoliigena</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

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

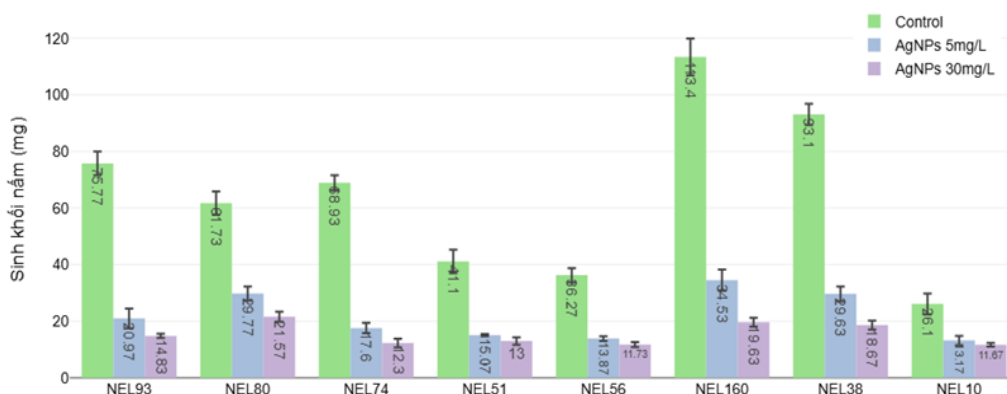
Chủng phân lập ghi nhận mức độ kháng cao VNHUCC.NEL80 (*Curvularia* sp.) trong thử nghiệm ức chế sợi nấm trên môi trường rắn cũng được đánh giá trong thử nghiệm này: mặc dù ghi nhận nồng độ ức chế tối thiểu tương đối thấp 1,25 mg/L nhưng nồng độ diệt nấm tối thiểu (MFC) lại lên đến 10 mg/L. Nồng độ 10 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  $\geq 4$ ) 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.

Dựa trên kết quả xác định nồng độ tối thiểu ức chế (MIC), nghiên cứu đã lựa chọn một giá trị MIC chung (MIC<sub>c</sub>) - 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.

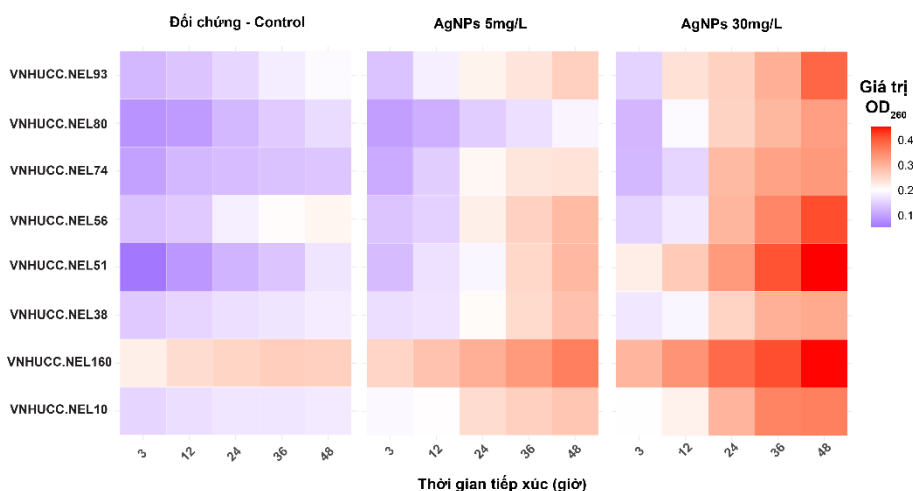
### 3.2.3. Ảnh hưởng nano bạc đến đặc điểm sinh hóa và tính toàn vẹn của màng tế bào

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 – OD<sub>260</sub>)

Để nghiên cứu sâu hơn về tổn thương màng tế bào của nấm, độ dẫn điện ngoại bào và acid nucleic (OD<sub>260</sub>) 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 OD<sub>260</sub> 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 OD<sub>260</sub> 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 OD<sub>260</sub> 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 OD<sub>260</sub> 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 OD<sub>260</sub> 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. radiculicola*) 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.

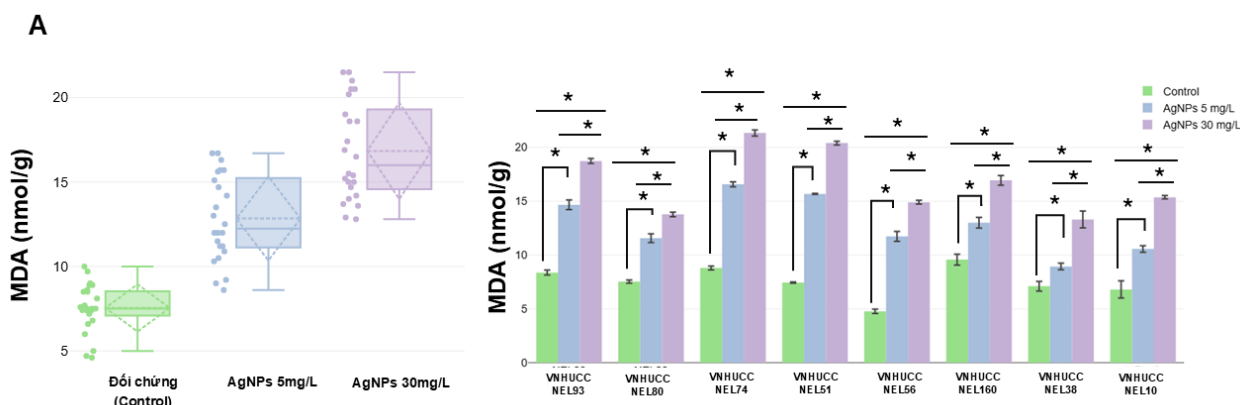
### 3.2.3.3. Hàm lượng Ergosterol

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. radicyfoliigena*) 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

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).



**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.

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.

### 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). SOD là enzyme chủ chốt dọn gốc tự do, hạn chế các phản ứng do gốc tự do trung gian (Mansoor et al., 2022; Yu et al., 2020). (Mansoor et al., 2022; Yu et al., 2020). 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. 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*).

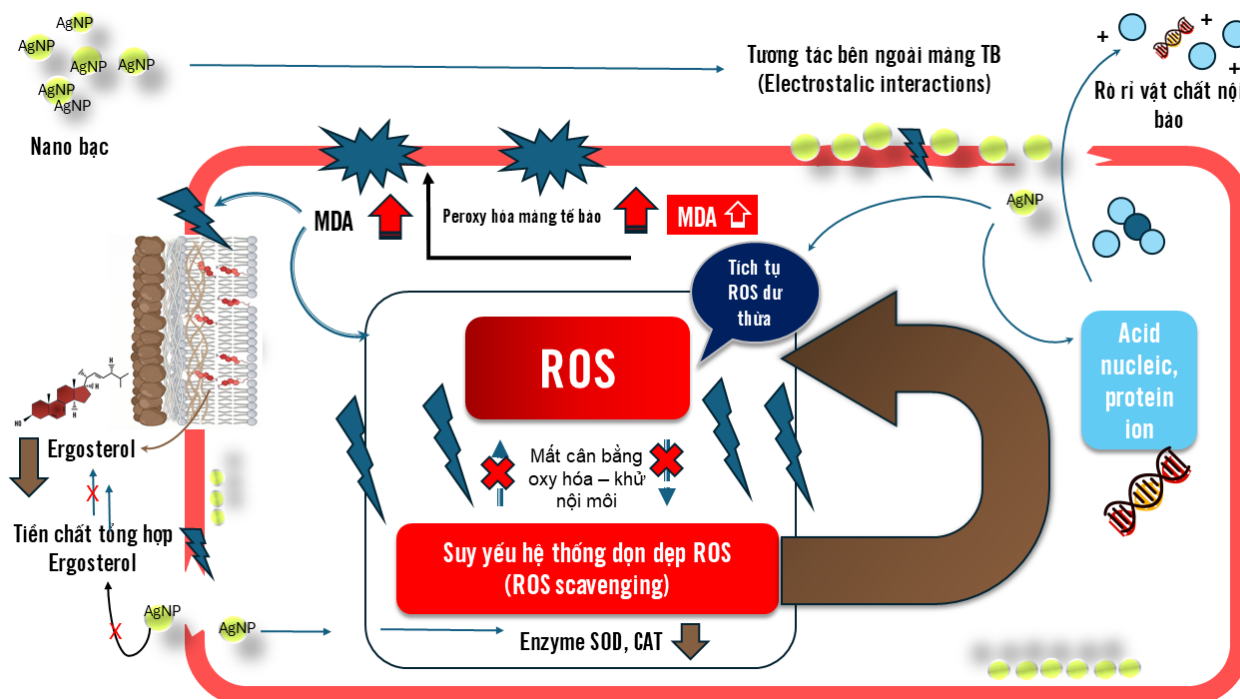
### 3.2.4. Ảnh hưởng vi mô của nano bạc đến sự sinh trưởng của nấm

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). Từ đó, cơ chế kháng nấm giả định của nano bạc dựa trên các dữ liệu thu thập trong nghiên cứu được mô hình hóa trong Hình 3.41.



**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 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 liên quan đến các triệu chứng bệnh 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, 17 lần đầu được ghi nhận liên quan đến triệu chứng bệnh trên cây sen ở phạm vi toàn cầu và 20 loài là ghi nhận mới trên cây sen tại Việt Nam. Nghiên cứu cũng chỉ ra rằng sự phân bố thành phần loài nấm không đồng đều theo địa lý và sinh cảnh, cho thấy cấu trúc cộng đồng nấm gây bệnh trên cây sen tại thành phố Huế có tính đa dạng và phức tạp sinh học rõ rệt.

- Ở điều kiện phòng thí nghiệm, nano bạc thể hiện hoạt tính kháng nấm đáng kể trên cả môi trường thạch và lỏng, với hiệu lực tăng theo nồng độ nhưng khác biệt rõ rệt về mức độ nhạy cảm giữa các loài, chủng phân lập. Giá trị  $EC_{50}$  của các chủng phân lập được ước lượng bằng ba mô hình độc lập, qua đó phân loại mức độ nhạy cảm thành bốn nhóm (rất nhạy, nhạy, kháng, kháng mạnh) theo thống kê tứ phân vị. Nano bạc cũng gây biến đổi hình thái đa dạng ở tản nấm (kết cấu, bề mặt, màu sắc) trên môi trường đĩa thạch. Trong môi trường lỏng, nano bạc ức chế đáng kể sinh khối và tốc độ sinh trưởng của tám chủng nấm, với hiệu quả tăng theo dải nồng độ 5–30 mg/L. Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) được xác định dao động từ 0,3125 đến 5 mg/L. Cơ chế ức chế sự sinh trưởng phát triển nấm của nano bạc thể hiện ở trục bằng chứng sinh hóa: nano bạc gây tổn thương màng tế bào nấm, làm tăng rò rỉ acid nucleic và độ dẫn điện ngoại bào (EEC), suy giảm hàm lượng ergosterol, đồng thời peroxy hóa lipid (MDA) tăng và hoạt tính SOD, CAT giảm, cho thấy stress oxy hóa vượt ngưỡng và suy yếu hệ phòng vệ, dẫn tới ức chế sinh trưởng 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

