

HIỆU QUẢ 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

Nguyễn Quang Hoàng Vũ¹, Hoàng Tấn Quảng¹, Hoàng Thị Kim Hồng^{2*}

¹Viện Công nghệ Sinh học, Đại học Huế

²Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

TÓM TẮT

Nghiên cứu này tiến hành nhằm xác định đối tượng gây bệnh đốm lá trên cây Sen Trắng trồng tại Thừa Thiên Huế và nghiên cứu hiệu quả kháng nấm trong điều kiện *in vitro* của vật liệu nano bạc. Quá trình thu thập mẫu, phân lập trên môi trường Potato Dextrose Agar (PDA) cho thấy tản nấm ban đầu có màu xám nhạt sau đó chuyển thành màu xanh đậm, khuẩn ty mọc thẳng, màu nâu sẫm, có hình vòng cung và không phân nhánh. Bào tử có dạng oliu, hình móc câu, vách nhẵn, màu nâu sẫm, 3 - 4 ngăn, có kích thước khoảng 20 - 25 $\mu\text{m} \times 8,5 - 12 \mu\text{m}$. Định danh bằng kỹ thuật sinh học phân tử với cặp mồi ITS1-ITS4 cho thấy nấm gây hại là *Curvularia lunata*. Theo hiểu biết của chúng tôi, đây là báo cáo đầu tiên về nấm *Curvularia lunata* gây bệnh đốm lá trên cây Sen Trắng (*Nelumbo nucifera*) ở Việt Nam. Kết quả thử nghiệm đánh giá khả năng kháng nấm trong điều kiện *in vitro* bằng cách sử dụng vật liệu nano bạc được tiến hành khảo sát ở 5 nồng độ: 0,1 mg/L, 1 mg/L, 10 mg/L, 20 mg/L và 30 mg/L. Cả 5 nồng độ nano bạc đều cho thấy khả năng ức chế nấm bệnh, với hiệu lực ức chế tăng dần tương ứng với sự gia tăng nồng độ nano bạc. Xử lý nano bạc ở nồng độ 20 mg/L hiệu lực ức chế nấm *Curvularia lunata* lên đến 68,32% và 61,47% tương ứng ở thời điểm 3 ngày và 5 ngày theo dõi, nồng độ 30 mg/L hiệu lực ức chế lên đến 91,37% và 93,21%. Như vậy, vật liệu nano bạc thực sự có hiệu quả trong việc ức chế sự sinh trưởng của loài nấm *Curvularia lunata* gây bệnh đốm lá và có tiềm năng ứng dụng như một giải pháp xanh để kiểm soát bệnh hại thực vật.

Từ khóa: bệnh đốm lá, *Curvularia lunata*, kháng nấm, nano bạc, *Nelumbo nucifera*, Thừa Thiên Huế, sen trắng

MỞ ĐẦU

Cây sen (*Nelumbo nucifera*) là một loài thực vật thủy sinh đa niên, có hoa đẹp, thanh khiết, là biểu tượng gắn liền với Phật Giáo cũng như văn hóa và lịch sử. Bên cạnh giá trị làm cảnh, cây sen còn có nhiều giá trị kinh tế cao với sự đa dạng sản phẩm đặc sản địa phương và các yếu tố liên quan đến cảnh quan sinh thái. Đặc biệt, trong số các giống sen ở Thừa Thiên Huế thì giống Sen Trắng (chủ yếu là giống Sen Trắng Trệt Lỗm), một giống sen bản địa mang thương hiệu đặc trưng với hương thơm đặc trưng, hạt có mùi vị ngon, ngọt, bùi và dẻo [1]. Tuy nhiên, do sự cạnh tranh của các giống sen cao sản được du nhập từ các vùng miền khác vào trồng ở Huế, cũng như sự ô nhiễm của các sông hồ, ruộng trồng sen trắng trong những năm gần đây đã dần dần thu hẹp diện tích trồng. Thêm vào đó, quá trình sinh trưởng và sản lượng thu hoạch sen chịu ảnh hưởng lớn bởi tác động của sâu và nấm bệnh thực vật. Năm 2019, một số diện tích sen ở Thừa Thiên Huế có hiện tượng chết, bệnh với tỷ lệ lớn, có nhiều vùng tỷ lệ chết lên đến 50 - 70 %, trong đó diện tích sen chết tập trung nhiều nhất là ở các xã Phong Sơn, Phong Hiền với diện tích sen chết lần lượt là 51 ha, 40 ha. Để diệt nguồn sâu hại hay nấm, phương thức xử lý được áp dụng phổ biến hiện nay là sử dụng các loại thuốc diệt nấm, thuốc trừ sâu tổng hợp. Các phương thức giải quyết này thường dẫn đến các vấn đề về kháng thuốc và gia tăng chi phí xử lý môi trường do tàn dư lượng thuốc còn lại trong môi trường, ngoài ra còn tác động không mong muốn đến các đối tượng ngoài mục tiêu.

Trong khi đó các vật liệu nano nổi lên gần đây với nhiều báo cáo về những đặc tính kháng khuẩn, kháng nấm và sự hiệu quả trong quản lý bệnh hại, tiêu biểu là vật liệu nano bạc (AgNPs) với đặc tính kháng khuẩn 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 giúp kiểm soát bệnh hại thực vật, thân thiện với môi trường [2]. Từ những lý do trên, chúng tôi nghiên cứu tiến hành phân lập định loại mẫu bệnh, và đánh giá ảnh hưởng của vật liệu nano bạc với nấm *Curvularia lunata* gây bệnh đốm lá sen. Kết quả của nghiên cứu này là cơ sở khoa học cần thiết để có thể xây dựng biện pháp kiểm soát bệnh hại cây trồng khác nhau do nấm gây ra giúp khai thác tối đa tiềm năng kinh tế, văn hóa của giống Sen Trắng trồng ở Thừa Thiên Huế.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu thí nghiệm:

Vật liệu nano bạc được cung cấp bởi bộ môn Vật lý chất rắn, Khoa Vật lý, Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế, hạt nano có đường kính từ 4 - 5 nm. Vật liệu nano được tổng hợp từ bạc nitrat (AgNO_3) và tác nhân khử là dịch chiết từ lá cây nha đam (*Aloe barbadensis* Miller). Nồng độ dung dịch nano bạc gốc là 40 mg/L.

Mẫu bệnh sen được thu tại ruộng trồng Sen Trắng tại xã Phong Hiền, huyện Phong Điền, tỉnh Thừa Thiên Huế.

Địa điểm nghiên cứu:

Các thí nghiệm phân lập được tiến hành tại phòng thí nghiệm Công nghệ Enzyme - Protein. Quá trình tách chiết DNA, định danh phân tử được tiến hành tại phòng thí nghiệm Công nghệ Gen, Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế.

Phương pháp

Phương pháp điều tra, thu thập mẫu

Thu thập: Các mẫu sen có biểu hiện bệnh đốm lá (chọn các mẫu có vết bệnh mới) được thu thập tại các ruộng trồng sen tại xã Phong Hiền, huyện Phong Điền, tỉnh Thừa Thiên Huế. Mẫu bệnh thu nhận được đựng trong túi plastic, dán nhãn, chuyển về phòng thí nghiệm và bảo quản ở 4°C để tiến hành phân lập. Các triệu chứng và biểu hiện bệnh cũng được ghi chép và ghi nhận bằng hình ảnh ngay tại điểm thu mẫu để so sánh, đối chiếu.

Thời gian điều tra: Điều tra định kỳ 7 ngày/lần ở tuyến điều tra trong khu vực điều tra.

Phương pháp phân lập nấm bệnh

Phương pháp phân lập được tiến hành theo Burgess và đồng tác giả (2008) [3]. Các mẫu bệnh thu thập được rửa sạch bằng nước, sau đó tiến hành khử trùng bề mặt mẫu qua các bước: ngâm trong hỗn hợp dung dịch natri hypochlorite 1% và ethanol 10% (1 - 5 phút), rồi rửa lại bằng nước cất vô trùng. Cắt nhỏ mô bệnh thành mảnh nhỏ kích thước 5 mm x 5 mm (chọn vùng rập Gianh giữa mô bệnh và mô khỏe). Đặt các mảnh mô vào môi trường thạch khoai tây PDA (200 g khoai tây, 20 g D- Glucose, 15 g Agar) và tiến hành ủ các đĩa ở nhiệt độ 27 ± 2°C trong vòng 96 giờ để nấm bệnh phát triển. Khi nấm đạt đường kính tản nấm 1 - 2 cm, cấy truyền sang môi trường PDA mới. Làm thuần mẫu nấm bằng cách cấy đỉnh sinh trưởng của một sợi nấm từ môi trường cũ sang môi trường PDA mới.

Phương pháp định danh phân tử bằng kỹ thuật PCR:

Tách chiết DNA: Mẫu được nghiền trong CTAB buffer theo phương pháp của Doyle & Doyle (1987) [4].

Các mẫu nấm thuần phân lập được định danh bằng cách khuếch đại với cặp primer ITS1 và ITS4.

ITS1 (forward): 5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3';

ITS4 (reverse): 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'.

Phản ứng PCR được thực hiện với tổng thể tích là 50 µL, thành phần mỗi phản ứng bao gồm: 25 µL Green Master Mix 2X, 5 µL mỗi ITS 1F (10 pmol), 5 µL mỗi ITS 4R (10 pmol), 5µL DNA tổng số (50 ng), 10 µL nước MilliQ. Thực hiện chu trình nhiệt: 95°C/ 10 phút, tiếp đến là 30 chu kỳ: 95°C/ 1 phút, 55°C/ 1 phút, 72°C/ 1 phút, cuối cùng là 72°C/ 10 phút. Sản phẩm PCR được xác nhận bằng điện di trên gel agarose 1%, tinh sạch và tiến hành giải trình tự. Các trình tự sau đó được xử lý bằng phần mềm BioEdit và so sánh với các trình tự tương ứng của các chủng đã được đăng ký trên GenBank bằng công cụ BLAST trên NCBI - National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Lây nhiễm nhân tạo: Song song, mẫu phân lập đại diện đều được tiến hành lây nhiễm nhân tạo theo quy trình Koch để xác minh lại đối tượng gây hại. Cây sen 20 ngày tuổi được tiến hành gây bệnh nhân tạo bằng cách gây tổn thương bề mặt lá, tiêm dịch nuôi cấy mẫu nấm vào vị trí vết thương, cây đối chứng cũng được xử lý tương tự nhưng thay dịch nấm bằng nước cất. Sử dụng màng nylon bao bọc kín vị trí lây bệnh. Kiểm tra và so sánh những lá sen được lây bệnh với những lá đối chứng. Quan sát và ghi nhận các triệu chứng sau khi lây nhiễm, so sánh với các triệu chứng quan sát được trên đồng ruộng và mẫu bệnh phân lập ban đầu.

Phương pháp xác định ảnh hưởng của vật liệu nano bạc với nấm bệnh *Curvularia lunata*

Cắt một mảnh nấm thuần có kích thước 2 × 2 mm từ rìa của tản nấm sau 48 giờ nuôi cấy ở 28°C, đặt vào tâm các đĩa petri (Φ 9cm) môi trường PDA với nano bạc ở các nồng độ tương ứng khác nhau (0 ppm - đối chứng, 0,1 mg/L, 1 mg/L, 10 mg/L, 20 mg/L, 30 mg/L), rồi tiến hành nuôi cấy ở cùng nhiệt độ. Mỗi nồng độ khảo sát được lặp lại 3 lần. Sử dụng thước kẹp điện tử để đo đường kính tản nấm sau 72 giờ và 96 giờ.

Hiệu lực ức chế của vật liệu nano bạc với nấm được tính theo công thức của Abbott:

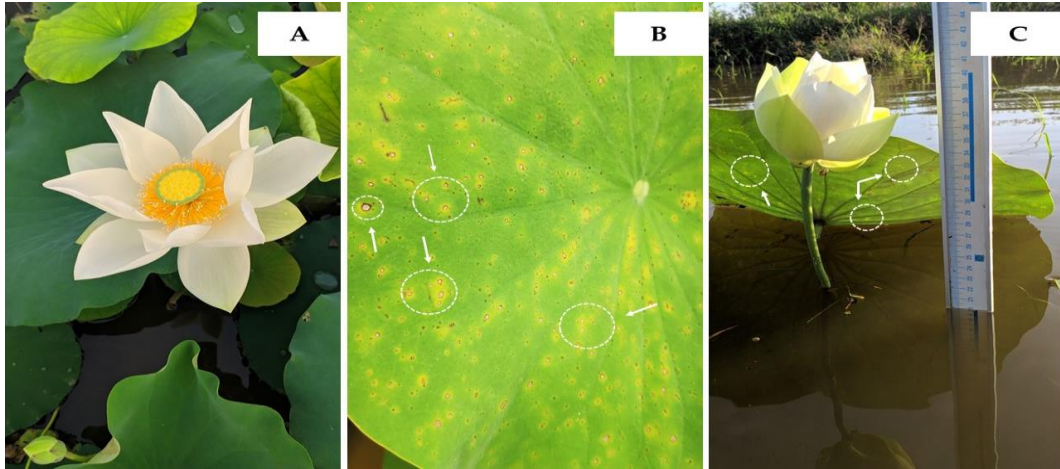
$$HLUC(\%) = \frac{C - T}{C} \times 100$$

Trong đó: HLUC (%): là hiệu lực ức chế của nano bạc tính theo phần trăm, C (mm): đường kính tản nấm trong công thức đối chứng, T (mm): Kích thước tản nấm trong các công thức thí nghiệm xử lý nano bạc

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tình hình và triệu chứng bệnh đốm lá trên cây Sen Trắng

Bệnh được ghi nhận vào tháng 5 đến tháng 6 tại ruộng trồng sen (giống Sen Trắng Trệt Lõm) tại xã Phong Hiền, huyện Phong Điền, tỉnh Thừa Thiên Huế. Diện tích trồng sen có xuất hiện triệu chứng bệnh đốm lá lên đến 30%. Triệu chứng được ghi nhận chủ yếu trên bề mặt lá (xuất hiện ở lá non, lá trưởng thành). Đặc điểm nhận dạng ban đầu là những chấm nhỏ li ti, có dạng hình tròn, gần tròn hoặc bầu dục nhỏ, kích thước vết bệnh khoảng 0,4 - 2,5 mm, trung tâm vết bệnh màu nâu nhạt hoặc nâu, đường rìa bao quanh màu nâu đậm hoặc đỏ. Phần tiếp giáp giữa phần mô bệnh và mô khỏe có quang vàng bao quanh. Các vết bệnh này có thể gia tăng kích thước theo thời gian, có xu hướng liên kết lại với nhau tạo thành vết bệnh rộng (Hình 1).

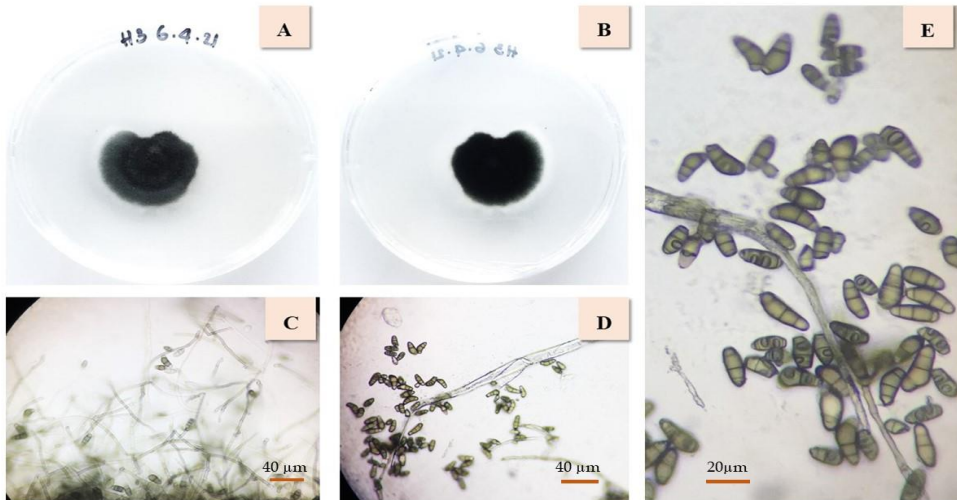


Hình 1. Triệu chứng bệnh đốm lá ghi nhận thực địa tại ruộng trồng sen.

- A. Cây Sen Trắng khỏe không nhiễm bệnh; B. Mặt trên lá Sen Trắng nhiễm bệnh đốm lá;
- C. Mặt dưới lá với các triệu chứng bệnh đốm lá.

Phân lập và xác định hình thái đối tượng gây bệnh đốm lá ở cây Sen Trắng:

Trên môi trường nuôi cấy PDA ở mẫu nấm bệnh (ký hiệu H3), ở mặt trên, tản nấm ban đầu có màu xám đậm sau chuyển thành màu đen rêu đậm khi già đi (Hình 2), không có dấu hiệu của sự khuếch tán của sắc tố vào môi trường, mặt dưới có màu đen rêu đậm. Quan sát dưới kính hiển vi cho thấy, khuẩn ty mọc thẳng, không phân nhánh, có vách ngăn, uốn nếp ở phần đỉnh. Bào tử có có dạng hình trứng dài-cong nhẹ ở phần dưới, màu nâu ô liu, phần đầu và phần cuối có màu hơi nhạt hơn so với trung tâm, có vách ngăn (3 - 4), cong ở tế bào dưới, kích thước dao động trung bình 20 - 25 μm \times 8,5 - 12 μm . Những đặc điểm hình thái này tương tự với những mô tả trước đây về nấm *Curvularia lunata* (Wakker) Boed (Macri và Lenka, 1974). Tiếp theo, kỹ thuật giải trình tự vùng gen ITS được chúng tôi sử dụng để định danh, xác định chính xác tên loài.

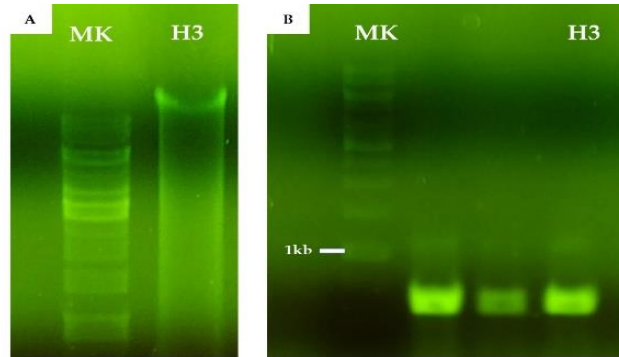


Hình 2. Đặc điểm hình thái của mẫu nấm bệnh H3 trên môi trường PDA.

- A: Mặt trên tản nấm sau 3 ngày nuôi cấy; B: Mặt dưới tản nấm sau 3 ngày nuôi cấy;
- C, D, E: hình ảnh bào tử nấm dưới kính hiển vi ở các độ phóng đại

Định danh nấm bệnh bằng kỹ thuật sinh học phân tử

Các mẫu nấm sau khi được nhận dạng sơ bộ đặc điểm hình thái, đối chiếu và kiểm tra kết quả lây nhiễm nhân tạo được tiến hành định danh chính xác tên loài dựa vào giải trình tự vùng ITS (internal transcribed spacer). Việc tiến hành tách chiết DNA và PCR nhân đoạn ITS theo mô tả trong phương pháp, kết quả điện di sản phẩm PCR cho thấy mẫu nấm bệnh phân lập (ký hiệu H3) xuất hiện băng rõ nét sản phẩm với kích thước khoảng 550-600 bp (Hình 3) so với thang chuẩn DNA (MK). Điều này phù hợp với các nghiên cứu trước khi sử dụng cặp mồi chung ITS1 và ITS4 để khuếch đại vùng ITS1-5.8S-ITS2 trên các dòng nấm là khoảng 500 - 600 bp.



Hình 3. Hình ảnh điện di DNA tổng số và sản phẩm PCR.
 A. Hình ảnh điện di DNA tách chiết từ mẫu nấm gây bệnh đốm lá phân lập.
 B. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR của mẫu nấm gây bệnh đốm lá

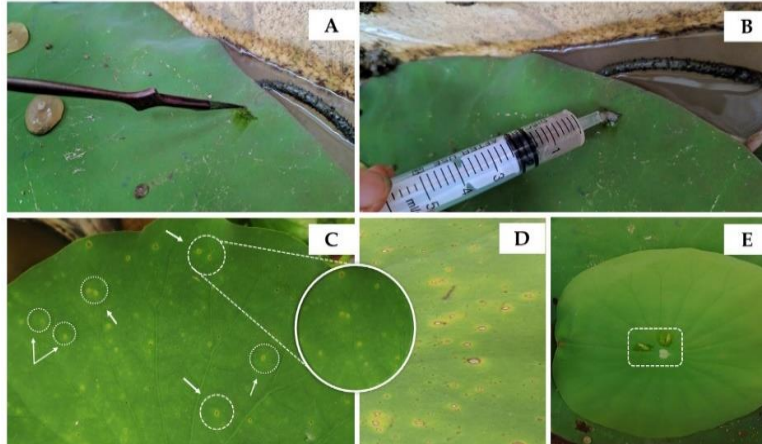
Kết quả giải trình tự gen cho thấy mẫu không bị nhiễu và trình tự đọc được có kích thước là 592bp. Trình tự này được tìm kiếm kiểm tra và so sánh với các chuỗi tương đồng trên Ngân hàng Gen (GenBank) bằng sử dụng phần mềm trực tuyến BLAST của NCBI. Kết quả phân tích BLAST trên GenBank cho thấy trình tự ITS của chủng nấm H3 tương đồng 100% với trình tự vùng ITS của loài nấm *Curvularia lunata* (Accession number: KF924040.1) (Hình 4). Như vậy, kết hợp với các đặc điểm hình thái xác định ở trên, chủng H3 gây bệnh đốm lá trên cây Sen Tráng có thể kết luận đó là nấm *Curvularia lunata*. Những báo cáo ghi nhận về bệnh đốm nâu lá và triệu chứng liên quan do *Curvularia* cũng đã được ghi nhận ở các báo cáo trước đây ở giống lúa IR66 ở Pakistan, Campuchia (Tann, 2016), hay lần đầu tiên ghi nhận trên thanh long ruột đỏ (*Hylocereus polyrhizus*) ở Malaysia [5], sắn (*Manihot esculenta*) ở vùng Tây Phi [6], lúa hoang (*Oryza rufipogon*) ở Trung Quốc [7] và ngô ở Hoa Kỳ [8]. Nghiên cứu của Pei và đồng tác giả (2017) là báo cáo đầu tiên về bệnh đốm lá với những triệu chứng điển hình trên lá ớt (*Capsicum frutescens*) với đối tượng gây hại được xác định là *Curvularia lunata* ở Trung Quốc. *Curvularia lunata* cũng được xác định là đối tượng gây bệnh đốm lá sen khiến 60% diện tích trồng bị nhiễm bệnh tại tỉnh Giang Tây, Trung Quốc trong báo cáo của Cui và Sun năm 2012 [15].

Query	301	TTCCGTAGGGGAACCTGCGGAGGGATCATTACACAATAAAAATATGAAGGCTGTACGCGGC	360
Sbjct	2	TTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACACAATAAAAATATGAAGGCTGTACGCGGC	61
Query	361	TGTGCTCTCGGGCCAGTTTTTGCGGAGGCTGAATTATTTATTACCCCTTGCTTTTTGCGCAC	420
Sbjct	62	TGTGCTCTCGGGCCAGTTTTTGCGGAGGCTGAATTATTTATTACCCCTTGCTTTTTGCGCAC	121
Query	421	TTGTTGTTTCTTGGCCGGGTTTCGCCCGCCACCAGGACCACATCATAAACCTTTTTTATGC	480
Sbjct	122	TTGTTGTTTCTTGGCCGGGTTTCGCCCGCCACCAGGACCACATCATAAACCTTTTTTATGC	181
Query	481	AGTTGCAATCAGCGTCAGTATAACAAATGTAATCATTTACAACCTTCAACAACGGATCT	540
Sbjct	182	AGTTGCAATCAGCGTCAGTATAACAAATGTAATCATTTACAACCTTCAACAACGGATCT	241
Query	541	CTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACCGAGCGAAATGCGATACGTAGTGTGAATTGCAGAA	600
Sbjct	242	CTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACCGAGCGAAATGCGATACGTAGTGTGAATTGCAGAA	301
Query	601	TTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATG	660
Sbjct	302	TTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATG	361
Query	661	CCTGTTTCGAGCGTCAATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTTTTTTGTCTTT	720
Sbjct	362	CCTGTTTCGAGCGTCAATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTTTTTTGTCTTT	421
Query	721	GGTTGCCAAAGACTCGCCTTAAAAGGATTGGCAGCCGGCCTACTGGTTTTCGCAGCGCAGC	780
Sbjct	422	GGTTGCCAAAGACTCGCCTTAAAAGGATTGGCAGCCGGCCTACTGGTTTTCGCAGCGCAGC	481
Query	781	ACATTTTTGCGCTTGCATCAGCAAAAAGAGGACGGCAATCCATCAAGACTCCTTCTCACG	840
Sbjct	482	ACATTTTTGCGCTTGCATCAGCAAAAAGAGGACGGCAATCCATCAAGACTCCTTCTCACG	541
Query	841	TTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAA	891
Sbjct	542	TTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAA	592

Hình 4. Mức độ tương đồng giữa mẫu nấm bệnh H3 với trình tự đã được công bố trên GeneBank (Mã số: KF924040.1)

Lây nhiễm nhân tạo

Quá trình lây nhiễm nhân tạo được tiến hành trên cây sen khỏe để kiểm tra xác minh tác nhân gây bệnh phân lập được. Cây sen khỏe được gây tổn thương bề mặt nhân tạo. Dịch bào tử chứa 3×10^5 bào tử/mL được lây nhiễm lên vết thương. Cây đối chứng được xử lý bằng nước cất tại vị trí lá gây tổn thương. Kết quả cho thấy, sau 5 ngày, tại vị trí vết bệnh xuất hiện những chấm tròn nhỏ bao quanh quầng vàng. Các đặc điểm này tương tự với triệu chứng bệnh điển hình thu nhận tại tự nhiên (Hình 5). Cây đối chứng xử lý bằng nước cất không có dấu hiệu bệnh tại vị trí gây tổn thương (Hình 5.E). Sự tương đồng về hình thái, triệu chứng vết bệnh trên lá sen khỏe lây nhiễm nhân tạo với kết quả ghi nhận bệnh đốm trắng ở điều kiện tự nhiên, có thể kết luận chủng nấm H3 - *Curvularia lunata* là đối tượng gây bệnh đốm lá trên cây Sen Trắng.



Hình 5. Tiến hành lây nhiễm nhân tạo (quy trình Koch).

- A, B. Tiến hành gây tổn thương bề mặt và tiến hành lây nhiễm;
- C. Cây sen khỏe xuất hiện triệu chứng bệnh điển hình;
- D. Đối chiếu vết bệnh tại tự nhiên;
- E. Cây đối chứng không có biểu hiện bệnh

Thử nghiệm hoạt tính kháng nấm *Curvularia lunata* của vật liệu nano bạc trong điều kiện *in vitro*

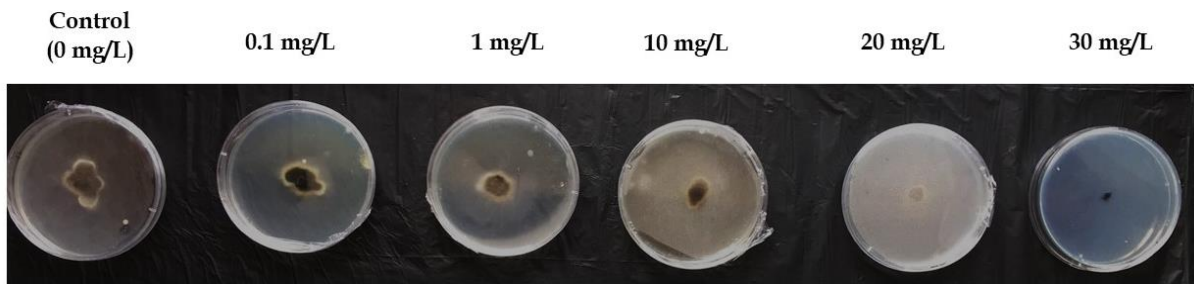
Trong nghiên cứu này, chúng tôi thực hiện thử nghiệm hoạt tính ức chế sự phát triển của nấm bệnh *Curvularia lunata* bằng vật liệu nano bạc. 5 nồng độ nano bạc tăng dần từ 0,1 mg/L, 1 mg/L, 10mg/L, 20mg/L và 30mg/L được sử dụng để tiến hành khảo sát và 0 mg/L được sử dụng như mẫu đối chứng (control). Kết quả thu được cho thấy, đường kính sinh trưởng của tảo nấm *Curvularia lunata* trên môi trường PDA giảm dần tương ứng với gia tăng nồng độ nano bạc, đồng nghĩa hiệu lực ức chế nấm tăng dần tương ứng với sự gia tăng nồng độ nano bạc. Cụ thể, với sự có mặt của nano bạc ở nồng độ 20mg/L cho thấy hiệu lực ức chế lên đến hơn 60%, với 68,32% và 61,47% tương ứng sau 3 ngày và 5 ngày thử nghiệm. Sự có mặt nano bạc ở nồng độ cao 30 mg/L có hiệu lực ức chế đáng kể đến nấm *Curvularia lunata*, với hiệu lực là 91,37% sau 3 ngày và 93,21% sau 5 ngày. Những kết quả này phù hợp với những kết quả thu được của Huang et al. (2018), các tác giả sử dụng vật liệu nano bạc bằng phương pháp tổng hợp “xanh”, với chiết xuất lá của cây Hoàng dương Nhật Bản (*Buxus sinica*) được sử dụng như tác nhân khử với $AgNO_3$ 4mM để thử nghiệm hoạt tính kháng nấm *Curvularia lunata*. Kết quả cho thấy ở nồng độ 200 $\mu g/mL$ ức chế sự phát triển lên đến 85% và giá trị IC_{50} đạt 26 $\mu g/mL$, hình thái sợi nấm cũng bị biến dạng khi được xử lý với nano bạc [9]. Trong nghiên cứu gần đây của Uz-Zamam et al. (2020), tác giả đã tiến hành thử nghiệm hoạt tính kháng nấm trên các đối tượng *Alternaria alternata*, *Paecilomyces*, *Candida albicans*, *Curvularia*, *Aspergillus niger*, và *Rhizopus* với hiệu quả thu được lần tương ứng lần lượt là 54,05%, 42,11%, 41,10%, 40,85%, 30,55%, và 29,73% với nano bạc được tổng hợp từ chiết xuất củ *Trillium govanianum* Wall. Ex. Royle đóng vai trò là chất khử, chất ổn định để khử bạc nitrat [10]. Khả năng kháng nấm của vật liệu nano bạc với hiệu lực ức chế đáng kể đến nấm gây bệnh thực vật như *Bipolaris sorokiniana*, *Colletotrichum*, *Fusarium* sp., *Penicillium* sp cũng đã được báo cáo trong các nghiên cứu của Azarbani và đồng tác giả, Dutta và đồng tác giả [11, 12].

Bảng 1. Khảo sát hiệu lực ức chế của vật liệu nano bạc với nấm *C. lunata* ở các nồng độ khác nhau

	Control	0.1 mg/L	1 mg/L	10 mg/L	20 mg/L	30 mg/L
Sau 3 ngày						
Đường kính tảo nấm (mm)	35,2	31,48 ± 0,08	23,92 ± 0,28	19,03 ± 0,16	11,15 ± 0,15	3,04 ± 0,06
Hiệu lực ức chế (%)	0	10,56 ± 0,22	32,05 ± 0,78	45,92 ± 0,46	68,32 ± 0,42	91,37 ± 0,16

	Control	0.1 mg/L	1 mg/L	10 mg/L	20 mg/L	30 mg/L
Sau 5 ngày						
Đường kính tàn nấm (mm)	48,6	45,10 ± 0,56	38,13 ± 0,32	26,08 ± 0,07	18,73 ± 0,21	3,30 ± 0,26
Hiệu lực ức chế (%)	0	7,20 ± 1,14	21,54 ± 0,66	46,33 ± 0,16	61,47 ± 0,42	93,21 ± 0,54

Khả năng kháng nấm của vật liệu nano bạc có được ở nồng độ cao có thể là do ở nồng độ đó, dung dịch nano bạc có khả năng bão hòa và bám vào các sợi nấm và để kiểm soát các bệnh thực vật. Feng và cộng sự nhận thấy rằng DNA mất khả năng nhân đôi khi môi trường nuôi cấy nấm được xử lý bằng nano bạc [13]. Điều này có thể dẫn đến sự vô hiệu hoá biểu hiện các protein tiểu đơn vị của ribosome, làm gián đoạn quá trình tổng hợp các enzyme và protein quan trọng đối với việc sản xuất adenosine triphosphate. Nghiên cứu của Bragg và Rainnie đưa ra giả thuyết rằng các ion bạc chủ yếu ảnh hưởng đến chức năng của các enzyme liên kết màng, phá vỡ cấu trúc màng, ví dụ như các enzyme trong chuỗi hô hấp [14]. Những cơ sở khoa học này và kết quả nghiên cứu chúng tôi thực hiện, vật liệu nano bạc (AgNPs) có thể được xem như giải pháp tiềm năng để xử lý nấm *Curvularia lunata* gây hại trên cây Sen Trắng và các nấm bệnh thực vật nói chung.



Hình 6. Hiệu lực ức chế của vật liệu nano bạc ở các nồng độ tương ứng sau 72 giờ (3 ngày)

KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã phân lập và định danh bằng hình thái và phân tử đối tượng gây bệnh đốm lá trên cây Sen Trắng trồng tại Thừa Thiên Huế vụ mùa 2021 là *Curvularia lunata* bằng cách sử dụng cặp primer ITS1-ITS4 với độ tương đồng 100%. Theo hiểu biết của chúng tôi, đây là báo cáo đầu tiên về *Curvularia lunata* gây ra bệnh đốm lá trên cây Sen Trắng *Nelumbo nucifera* ở Việt Nam. Bên cạnh đó, xử lý nano bạc ở nồng độ 30 mg/L cho thấy hiệu quả tích cực với hiệu lực ức chế nấm *Curvularia lunata* lên đến 91,37% và 93,21% tương ứng sau 72 giờ (3 ngày) và 120 giờ (5 ngày) so với đối chứng không xử lý.

Lời cảm ơn: “Nguyễn Quang Hoàng Vũ được tài trợ bởi Tập đoàn Vingroup và hỗ trợ bởi chương trình học bổng đào tạo Thạc sĩ, Tiến sĩ trong nước của Quỹ Đổi mới sáng tạo Vingroup (VINIF), Viện Nghiên cứu Dữ liệu lớn (VinBigdata), mã số [VINIF.2020.TS.89]”

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] N. T. Q. Trang, "Nghiên cứu đặc điểm thực vật học, sinh lý hóa sinh và nhân giống invitro một số giống sen (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) trồng ở Thừa Thiên Huế. Luận án Tiến sĩ, Đại học Khoa học Huế, 2021.
- [2] K. Kalwar and D. Shan, "Antimicrobial effect of silver nanoparticles (AgNPs) and their mechanism - A mini Review," *Micro and Nano Letters*, Vol. 13, No. 3. 2018.
- [3] L. W. Burgess, T. E. Knight, T. Len, and P.H. Thuy, "Diagnostic manual for plant diseases in Vietnam," *Aust. Cent. Int. Agric. Res.*, 2008.
- [4] J. J. Doyle and J. L. Doyle, "A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue," *Phytochem. Bulletin*, Vol. 19, pp. 11-15, 1987.
- [5] M. M. Hawa, B. Salleh, and Z. Latifah, "First report of *Curvularia lunata* on red-fleshed dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*) in Malaysia," *Plant Disease*, Vol. 93, No. 9, 2009.
- [6] W. Msikita, H. Baimey, and B. D. James, "Severity of *Curvularia* stem blight disease of cassava in West Africa," *Plant Disease*, Vol. 91, no. 11, pp. 1430-1435, 2007.
- [7] H. K. Zhou, Y.L. Liu, J. R. Tang, et al., "First Report of Leaf Spot caused by *Curvularia lunata* on Wild Rice in China", *Plant Disease*, 2021.
- [8] T. Garcia-Aroca, V. Doyle, R. Singh, et al., "First report of *Curvularia* leaf spot of corn, caused by *Curvularia lunata*, in the United States," *Plant Health Progress*, Vol. 19, No. 2, 2018.

- [9] R. Q. Cui and X. T. Sun, "First report of *curvularia lunata* causing leaf spot on lotus in China," *Plant Disease*, Vol. 96, No.7, 2012
- [10] K. Uz-Zaman, J. Bakht, B. Kudaibergenova et al., "Trillium govianum Wall. Ex. Royle rhizomes extract-medicated silver nanoparticles and their antimicrobial activity," *Green Processing and Synthesis*, Vol. 9, No. 1, 2020.
- [11] T. Dutta, S. K. Chowdhury, N.N. Ghosh, et al., "Journal of environmental chemical engineering greensynthesis of antibacterial and antifungal silver nanoparticles using *Citrus limetta* peel extract: Experimental and theoretical studies", *Journal of Environmental Chemical Engineering*, Vol. 8, No. 4, pp. 1-16, 2020.
- [12] F. Azarbani and S. Shiravand, "Green synthesis of silver nanoparticles by *Ferulago macrocarpa* flowers extract and their antibacterial, antifungal and toxic effects," *Green Chemistry Letters and Reviews*, Vol. 13, No. 1. 2020.
- [13] Q. L. Feng, J. Wu, G. Q. Chen et al., "A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*". *Biomedical Materials Research*, Vol.52, pp.662-668, 2000.
- [14] P. D. Bragg and D. J. Rainnie, "The effect of silver ions on the respiratory chain of *Escherichia coli*," **Canadian Journal of Microbiology**, Vol. 20, No. 6, pp. 883 -889, 1974.
- [15] W. Huang, Y. Bao, H. Duan, Y. Bi et al., "Antifungal effect of *Buxus sinica* leaf extract-mediated silver nanoparticles against *Curvularia lunata*", *International Journal of Agriculture And Biology*, Vol. 20, No. 11, 2018.

ANTIFUNGAL ACTIVITY OF SILVER NANOPARTICLES AGAINST *CURVULARIA LUNATA* CAUSING LEAF SPOT ON WHITE LOTUS (*NELUMBO NUCIFERA*) IN THUA THIEN HUE

Nguyen Quang Hoang Vu¹, Hoang Tan Quang¹, Hoang Thi Kim Hong²

¹Institute of Biotechnology, Hue University

²Department of Biology, Hue University of Sciences, Hue University

SUMMARY

This study was conducted to isolate and identify plant fungal pathogen from leaf spot disease on white lotus cv. (*Nelumbo nucifera*) in Thua Thien Hue. The colonies of the isolates on PDA were initially light gray later becoming dark green. Conidiophores were erect, dark brown, geniculate, and unbranched. Conidia were oval or hook-shaped, smooth-walled, dark-brown, 3-4 septate, with cells about 20-25 $\mu\text{m} \times 6.5-12 \mu\text{m}$ in size. Molecular identification of strain using primer pairs ITS1, ITS4 showed that *Curvularia lunata* were the fungal pathogen. To our knowledge, this is the first report on *Curvularia lunata* causing leaf spots on lotus (*Nelumbo nucifera*) in Vietnam. In this study, we have evaluated the antifungal activity of silver nanoparticles (AgNPs) against *Curvularia lunata*. Fungicidal activity of silver nanoparticle at different concentration: 0.1 mg/L, 1 mg/L, 10 mg/L, 20 mg /L, 30 mg/L tested against fungal. Radial fungal growth was recorded after 3 and 5 days. Different concentrations of AgNPs inhibit colony formation of *C. lunata* at different levels. As the concentration of AgNPs was increased, there was a decrease in colony formation. At 20 mg/L, the silver nanoparticles inhibited the fungus *Curvularia lunata* up to 68.32% and 61.47% at 3 days and 5 days, respectively. The application of 30 mg/L concentration of silver nanoparticles produced maximum inhibition of the growth of fungal hyphae, with 91.37% and 93.21%. Thus, silver nanoparticles are effective in inhibiting the growth of *Curvularia lunata* and these findings may suggest silver nanoparticles (AgNPs) as a green solution with potent antifungal activities against plant pathogenic fungi.

Keywords: leaf spots, *Curvularia lunata*, antifungal, silver nanoparticles, *Nelumbo nucifera*, Thua Thien Hue, white lotus