

## XÁC ĐỊNH NGUYÊN NHÂN GÂY BỆNH TÀN LỤY CÂY SEN TẠI THỪA THIÊN HUẾ NĂM 2022

Hà Viết Cường<sup>1\*</sup>, Trần Thị Thu Hà<sup>2</sup>, Lê Quý Thảo<sup>3</sup>, Huỳnh Thị Tâm Thúy<sup>3</sup>, Lê Văn Vinh<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Bộ môn Bệnh cây, Khoa Nông học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

<sup>2</sup>Khoa Nông học, Đại học Nông Lâm Huế

<sup>3</sup>Chi cục Bảo vệ thực vật tỉnh Thừa Thiên Huế

\*Tác giả liên hệ: [hvcuongnh@vnua.edu.vn](mailto:hvcuongnh@vnua.edu.vn)

Ngày nhận bài: 02.02.2023

Ngày chấp nhận đăng: 18.04.2023

### TÓM TẮT

Bệnh tàn lụi là bệnh mới và nguy hiểm trên cây sen (*Nelumbo nucifera*) tại Thừa Thiên Huế trong những năm gần đây. Mục tiêu của nghiên cứu là xác định nguyên nhân gây bệnh. Vi sinh vật từ cây sen bệnh được phân lập thuần. Tác nhân gây bệnh được xác định bằng lây nhiễm nhân tạo trên cây sen. Đặc điểm hình thái nấm gây bệnh được đánh giá trên môi trường PDA và trên mảnh lá thông. Định danh phân tử nấm gây bệnh được dựa trên trình tự 3 gen mã vạch gồm Internal Transcribed Spacer (ITS), Translation elongation factor 1 gene (*ef1*) và beta-tubulin (*tub2*). Đánh giá triệu chứng biểu hiện bệnh ngoài tự nhiên đã gợi ý tác nhân gây bệnh chủ yếu tấn công phần trên của cây. Lây nhiễm nhân tạo 8 mẫu vi khuẩn và 7 mẫu nấm phân lập được từ cây bệnh trên gân lá và cuống lá sen đã cho thấy chỉ có mẫu nấm N1 có khả năng nhiễm và tạo vết bệnh giống với triệu chứng bệnh ngoài tự nhiên. Đánh giá hình thái gồm đặc điểm tản nấm và đặc điểm bào tử phân sinh cho thấy nấm N1 thuộc chi *Lasioidiplodia*, họ *Botryosphaeriaceae*. Định danh phân tử đã xác định mẫu nấm N1 là loài *Lasioidiplodia theobromae*. Dựa trên thông tin hiện có, đây là báo cáo đầu tiên trên thế giới và Việt Nam xác định *L. theobromae* là nguyên nhân gây bệnh tàn lụi trên cây sen.

Từ khóa: *Nelumbo nucifera*, blight, *Lasioidiplodia theobromae*, ITS, *ef1*, *tub2*.

### Identification of Causative Agent of Lotus Blight Disease in Thua Thien Hue in 2022

### ABSTRACT

Blight is a destructive disease of Lotus (*Nelumbo nucifera*) that has emerged in Thua Thien Hue province in recent years. The objective of this study was to identify the etiological agent responsible for the disease. The pathogenicity of microorganisms isolated from diseased Lotus plants was evaluated by inoculating healthy Lotus plants with these isolates. The pathogenic fungus was evaluated for its morphological characteristics on potato dextrose agar (PDA) medium and on pieces of pine needles. Molecular identification of the pathogenic fungus was performed based on the sequencing of three barcode genes, including Internal Transcribed Spacer (ITS), Translation Elongation Factor 1 gene (*ef1*), and beta-tubulin (*tub2*). Symptom evaluation of diseased Lotus plants in nature suggested that the pathogen primarily attacked the upper part of the plant. Eight morphologically distinct bacterial and seven fungal isolates were obtained from the typical diseased petioles. Artificial inoculation of all bacterial and fungal isolates on leaf veins and petioles of Lotus plants revealed that only one fungal isolate, designated as N1, was pathogenic to Lotus, producing symptoms resembling those of the diseased plants in the field. Morphological evaluation, including the characteristics of fungal mycelia on PDA medium and the characteristics of conidia, identified the N1 isolate as a member of the genus *Lasioidiplodia* of the family *Botryosphaeriaceae*. Molecular identification identified the N1 isolate as *Lasioidiplodia theobromae*. To the best of our knowledge, this is the first report in the world and in Vietnam that identifies *L. theobromae* as the causative agent of blight disease in Lotus plants.

Keywords: *Nelumbo nucifera*, blight, *Lasioidiplodia theobromae*, ITS, *ef1*, *tub2*.

### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây hoa sen (*Nelumbo nucifera*), là cây thủy sinh, thân thảo, có nguồn gốc từ Ấn Độ và

được trồng phổ biến tại Việt Nam. Cây hoa sen có ý nghĩa biểu tượng đặc biệt cho văn hóa và con người Việt Nam nên đã được đề xuất là quốc hoa. Cây sen cũng là cây có giá trị kinh tế cao

nên đang được phát triển trồng khắp cả nước. Tại tỉnh Thừa Thiên Huế, cây sen đã được chú trọng phát triển trong những năm gần đây. Từ năm 2017 đến nay, diện tích trồng sen tại Tỉnh tăng dần theo các năm và tới năm 2021 đạt 584ha, năm 2022 diện tích giảm chỉ còn khoảng 537,4ha bằng 92% so với năm 2021 (UBND tỉnh Thừa Thiên Huế, 2021). Nguyên nhân giảm chủ yếu do bệnh gây hại nặng hai vụ liên tục, một số diện tích phải chuyển đổi.

Gần đây, từ năm 2018, cây sen tại tỉnh Thừa Thiên Huế bị nhiễm một bệnh mới. Trên nhiều diện tích, cây sen sau trồng khoảng 2 tuần đến 1 tháng bắt đầu có hiện tượng chết và tàn lụi dần, đặc biệt sau các trận mưa lớn. Trên vết bệnh, Chi cục BVTV tỉnh Thừa Thiên Huế đã phát hiện thấy nấm thán thư (Quốc Việt, 2018).

Tại Việt Nam, chưa có nghiên cứu về bệnh hại trên cây sen. Trên thế giới, nghiên cứu về bệnh hại cây sen tương đối ít. Gần đây, đã có một số công bố về bệnh hại trên cây sen, chủ yếu tại Nhật Bản và Trung Quốc. Một số bệnh đã công bố trên cây sen gồm bệnh đốm lá do nấm *Nigrospora oryzae* tại Trung Quốc (Zhang & cs., 2018). Chen & Kirschner (2018) đã thực hiện một nghiên cứu sâu về thành phần nấm trên cây sen tại Đài Loan. Kết quả của nghiên cứu này cùng với tất cả các nghiên cứu trên thế giới cho tới năm 2018 đã liệt kê 38 loài nấm thuộc các chi *Arthrinium*, *Alternaria*, *Botrytis*, *Calonectria*, *Cercospora*, *Choanephora*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Corynespora*, *Curvularia*, *Diaporthe*, *Dissoconium*, *Erysiphe*, *Fereydounia*, *Fusarium*, *Globisporangium*, *Golubevia*, *Ilyonectria*, *Thelonectria*, *Nigrospora*, *Ovulariopsis*, *Pestalotiopsis*, *Phoma*, *Physoderma*, *Pseudocercospora*, *Rhodosporidiobolus* và *Sclerotium*, 4 loài vi sinh vật giống nấm thuộc 2 chi *Phytophthora* và *Pythium*. Phần lớn các nấm liệt kê là các loài nội sinh. Một số loài nấm gây hiện tượng thối rễ, chết héo trên cây sen tại Trung Quốc đều thuộc chi *Fusarium* như *F. tricinctum* (Li & cs., 2016), *F. incarnatum* (Wang & cs., 2020) và *F. commune* (Kuang & cs., 2022). Bệnh thối rễ và thân ngâm sen tại Trung Quốc cũng được

công bố do *Phytophthora helicoides* gây ra (Yin & cs., 2016). Ít nhất hai loài tuyến trùng, *Hirschmanniella diversa* và *H. imamuri*, đã được công bố gây bệnh hóa nâu và biến dạng củ cây sen tại Nhật Bản (Mihira, 2002; Kurashita & cs., 2021).

Việc xác định nguyên nhân gây bệnh tàn lụi, thối thân trên cây trồng (trong nghiên cứu này là cuống lá và lá cây sen) thường khó vì các tác nhân gây bệnh và vi sinh vật nội sinh, hoại sinh thường xuất hiện cùng nhau trên cây.

Xuất phát từ thực tế trên, mục tiêu chính của nghiên cứu là bước đầu xác định nguyên nhân chính gây bệnh tàn lụi cây sen tại tỉnh Thừa Thiên Huế, làm cơ sở cho việc nghiên cứu các giải pháp phòng chống bệnh.

## 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Mẫu cây bệnh

Mẫu cây bệnh với triệu chứng điển hình do Chi cục BVTV tỉnh Thừa Thiên Huế thu thập ngày 15/8/2022.

### 2.2. Phân lập vi sinh vật từ mô bệnh

Các đoạn cuống lá, mảnh lá có triệu chứng điển hình được rửa sạch bằng nước lọc, khử trùng bề mặt bằng ethanol 70%, rửa lại bằng nước vô trùng, thấm khô bằng giấy vô trùng trước khi phân lập (Burgess & cs., 2008).

Phân lập nấm, *Phytophthora* và *Pythium* (Burgess & cs., 2008): các mảnh mô chứa cả mô bệnh và mô khỏe được đặt vào đĩa môi trường WA (Water agar: 20 g/l agar, 50 mg/l streptomycin) và môi trường chọn lọc V8 agar loãng (20 g/l agar, 20 ml/l dịch V8, 0,3 g/l CaCO<sub>3</sub>, 10 mg/l pimaricin, 50 mg/l rifampicin). Nấm được phân lập thuần bằng cấy truyền miếng thạch chứa đỉnh sợi nấm sang môi trường PDA (200 g/l khoai tây, 20 g/l dextrose, 20 g/l agar). Các đĩa được ủ ở 28°C.

Phân lập vi khuẩn (Lelliott & Stead, 1987; Burgess & cs., 2008): mảnh mô được nghiền trong nước cất vô trùng và được cấy ria ba chiều trên đĩa môi trường King's B (20 g/l agar; 15 ml/l glycerol; 20 g/l peptone; 1,5 g/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>;

1,5g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O). Vi khuẩn được làm thuần bằng cấy đơn khuẩn lạc sang đĩa môi trường King's B.

### 2.3. Chiết DNA nấm

DNA tổng số nấm được chuẩn bị theo phương pháp chiết nhanh bằng NaOH (Wang & cs., 1993). Khoảng 20mg sợi nấm bề mặt từ đĩa PDA sau cấy 1 tuần được lấy bằng đầu tip pipet và được nghiền trong ống Eppendorf cỡ 0,5ml chứa 20µl NaOH 0,5M. Dịch nghiền được hòa loãng 20 lần với đệm Tris 100mM, pH 8,0. Dịch chiết được sử dụng ngay hoặc bảo quản ở -20°C.

### 2.4. Phản ứng Polymerase Chain Reaction (PCR)

Các phản ứng PCR được thực hiện với tổng thể tích phản ứng 25µl chứa 12,5µl 2X MyTaq HS Mix (Meridian Bioscience), 0,25µl mỗi loại mỗi xuôi dòng và ngược dòng (đều được chuẩn bị ở nồng độ 20µM, Bảng 1) và 0,5µl DNA nấm. Phản ứng PCR được thực hiện với điều kiện sau: khởi đầu biến tính ở 95°C trong 1 phút; tiếp theo là 30 chu trình PCR (biến tính ở 95°C 15 giây, gắn mồi ở 54°C 15 giây và tổng hợp sợi ở 72°C 15 giây). Phản ứng được kết thúc với 3 phút ở 72°C.

### 2.5. Giải trình tự và phân tích trình tự

Sản phẩm PCR được tinh chiết từ gel agarose dùng kit tinh chiết Expin™ Gel SV Kit (GeneAll), theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sản phẩm PCR tinh chiết được giải trình tự trực tiếp bằng mồi PCR tại Viện Công nghệ sinh học (Hà Nội) và tại Công ty PHUSA Genomics (<https://phusagenomics.com/>).

Trình tự mẫu được so sánh với các chuỗi đã công bố từ trước nhờ phần mềm tìm kiếm BLAST tại NCBI (the National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>)).

Các trình tự phân tích được căn trình tự đa chuỗi bằng phần mềm MAFFT (Kato & Standley, 2013) sẵn có tại <https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>. Phân tích phả hệ theo phương pháp Maximum Parsimony và Neighbour Joining được thực hiện bằng phần mềm MEGA11 (Tamura & cs., 2021). Phân tích phả hệ theo phương pháp Maximum Likelihood được thực hiện bằng phần mềm IQ-Tree 2 (Minh & cs., 2020), trong đó, hai thống kê được sử dụng để xác định mức độ hỗ trợ tin cậy của các cụm là bootstrap siêu nhanh (Ultrafast Bootstrap, viết tắt UFBoot) (Hoang & cs., 2018) và tỷ số khả năng xấp xỉ thử nghiệm Shimodaira & Hasegawa (SH-like approximate likelihood-ratio test, viết tắt SH-aLRT) (Guindon & cs., 2010). Trong phân tích trình tự đa gen, các chuỗi đã được căn trình tự đa chuỗi được ghép nối bằng phần mềm MEGA11 và file chứa các chuỗi ghép nối được sử dụng làm dữ liệu đầu vào cho phân tích Maximum Likelihood. Xác định mô hình thay thế chuỗi tối ưu cho mỗi gen trong phân tích trình tự đa gen được thực hiện tự động bằng lệnh -m TEST. Cây Maximum Likelihood được hiển thị bằng phần mềm TreeViewer (<https://treeviewer.org/>) và được vẽ lại bằng phần mềm MEGA11.

### 2.6. Lây nhiễm nhân tạo

Cây lây nhiễm là giống sen nghìn cánh trưởng thành, chưa ra hoa. Mỗi thí nghiệm lây nhiễm được lặp lại ba lần độc lập, mỗi lần trên cùng một lá.

**Bảng 1. Các mồi sử dụng trong nghiên cứu định danh phân tử nấm**

Mồi	Trình tự (5'-3')	Gen đích	Sản phẩm (bp)	Tham khảo
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	Internal Transcribed Spacer (ITS)	~600	White & cs. (1990)
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC			
EF1-728F	CATCGAGAAGTTCGAGAAGG	Translation elongation factor 1 gene ( <i>tef1</i> )	~350	Carbone & Kohn (1999)
EF1-986R	TACTTGAAGGAACCCCTTACC			
T1	AACATGCGTGAGATTGTAAGT	Beta-tubulin ( <i>tub2</i> )	~650	O'donnell & Cigelnik (1997); Glass & Donaldson (1995)
Bt-2b	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGCC			

### 2.6.1. Lây nhiễm vi khuẩn

Vi khuẩn thuần được nuôi cấy trên môi trường King' B ở 28°C trong 48 giờ. Lây nhiễm được thực hiện bằng cách dùng tăm nhọn vô trùng nhúng đầu nhọn vào khuẩn lạc vi khuẩn, sau đó châm vào gân lá và cuống lá trưởng thành. Tất cả các dòng vi khuẩn được lây nhiễm trên cùng một lá và cuống lá. Thí nghiệm lây nhiễm được lặp lại ba lần độc lập trên giống sen nghìn cánh trưởng thành, chưa ra hoa.

### 2.6.2. Lây nhiễm nấm

Mẫu nấm thuần được nuôi cấy trên môi trường PDA trong ba ngày. Viên môi trường đường kính 2,5mm được lấy từ rìa tản nấm. Một tăm vô trùng được đâm xuyên qua một nệm giấy lọc vô trùng (nhằm giữ ẩm) và viên môi trường, tiếp theo được cắm vào gân lá sao cho bề mặt viên môi trường có tản nấm được áp sát bề mặt lá. Nước vô trùng được nhỏ lên nệm giấy để giữ ẩm. Tất cả các mẫu nấm đều được lây trên cùng một lá để so sánh. Thí nghiệm lây nhiễm được lặp lại hai lần độc lập, mỗi lần trên ba lá khác nhau. Nguồn nấm có tính gây bệnh trên cuống lá sẽ được đánh giá tiếp bằng lây nhiễm trên cuống thân. Lây nhiễm trên cuống lá được thực hiện với cả hai phương pháp gây tổn thương và không gây tổn thương. Viên môi trường chứa nấm được áp vào cuống lá và tiếp theo được bọc bằng màng bọc thực phẩm để giữ ẩm. Để gây tổn thương, tăm nhọn vô trùng được đâm xuyên qua viên môi trường và sâu khoảng 0,5mm vào cuống lá.

### 2.7. Kích thích sinh bào tử nấm họ *Botryosphaeriaceae*

Nấm họ *Botryosphaeraceae* được kích thích sinh bào tử trên mảnh lá thông. Các mảnh lá thông (2-3cm) được hấp khử trùng và được đặt trên môi trường WA (khoảng 10 mảnh/đĩa). Các viên môi trường PDA chứa nấm thuần được đặt trên môi trường WA chứa mảnh lá thông. Sự hình thành bào tử nấm được đánh giá sau khi ủ đĩa 1 tháng ở nhiệt độ 28°C (Phillips & cs., 2013; Zhang & cs., 2021).

## 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Đánh giá triệu chứng

Quan sát các mẫu sen bị bệnh thu tại Huế năm 2022 thấy cây bệnh biểu hiện triệu chứng tàn lụi (blight) điển hình (Hình 1).

Trên lá. Vết bệnh là các vết chết hoại không có hình dạng nhất định, có thể xuất hiện tại nhiều vị trí khác nhau trên lá, nhưng phổ biến ở phần sát cuống lá. Vết bệnh có thể lan toàn bộ làm cháy lá. Vết bệnh có màu nâu đậm đến đen. Rìa vết bệnh có thể trong ướt, đôi khi có quầng vàng.

Trên cuống lá, cuống hoa. Mô bị chết hoại màu nâu đến đen có thể lan đến gốc lá và lá. Vết bệnh mới có thể xuất hiện đầu tiên ở phần cuống cách xa gốc lá.

Đáng chú ý, phần bị bệnh phần lớn xuất hiện ở phía trên, có nghĩa phần mô khỏe không triệu chứng ở phía dưới (mũi tên đỏ, Hình 1). Biểu hiện này là quan trọng, gợi ý nguồn bệnh tấn công cây ở phần trên, mặc dù khi bị nặng, vết bệnh có thể lan xuống dưới.

### 3.2. Phân lập vi sinh vật và đánh giá tính gây bệnh

Triệu chứng bệnh gợi ý tác nhân gây bệnh có thể do nấm hoặc vi khuẩn. Do vậy, nấm (kể cả vi sinh vật giống nấm) và vi khuẩn từ vết bệnh được phân lập trên môi trường thích hợp như mô tả trong phần phương pháp.

Đối với vi khuẩn, hai loại mô đã được sử dụng làm nguồn phân lập là đoạn cuống lá không biểu hiện triệu chứng và đoạn cuống lá có biểu hiện triệu chứng. Kết quả cấy rìa ba chiều cho thấy vi khuẩn đều xuất hiện trên đĩa môi trường từ cả hai loại mô. Từ mỗi loại mô, tất cả các khuẩn lạc có hình thái khác nhau có thể cảm nhận bằng mắt đều được tách thuần bằng cấy đơn khuẩn lạc. Năm khuẩn lạc từ mô có triệu chứng và ba khuẩn lạc từ mô không triệu chứng đã được tách thuần (Hình 2). Các dòng vi khuẩn thuần được ký hiệu từ VK1 đến VK8.

Tất cả 8 dòng vi khuẩn ở trên đã được lây nhiễm nhân tạo trên gân lá và cuống lá nhằm xác định tính gây bệnh trên cây sen. Kết quả lây

nhiễm (Bảng 2, Hình 4) cho thấy tất cả các dòng vi khuẩn lây nhiễm đều không tạo triệu chứng trên gân lá và cuống lá cây sen. Dựa trên kết quả này, chúng tôi kết luận vi khuẩn không phải là nguyên nhân gây bệnh tàn lụi sen tại Huế năm 2022.

Đối với nấm, các đoạn cuống lá có biểu hiện triệu chứng bệnh đã được sử dụng để phân lập nấm. Tổng số 7 loại nấm có hình thái tản khác nhau, ký hiệu từ N1 đến N7, đã được phân lập thuần từ vết bệnh (Hình 3).

Tất cả 7 mẫu nấm từ N1 đến N7 ở trên đã được lây nhiễm nhân tạo trên gân lá và cuống lá

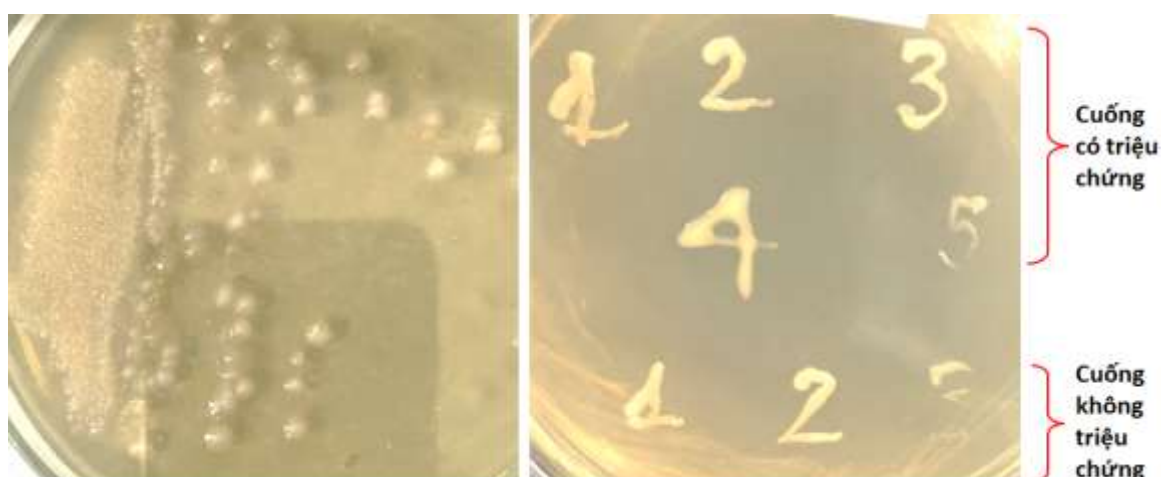
nhằm xác định tính gây bệnh trên cây sen. Kết quả lây nhiễm (Bảng 2) cho thấy chỉ mẫu nấm N1 tạo vết bệnh trên gân lá và cuống lá. Đáng chú ý, mẫu nấm N1 gây chết hoại mô rất nhanh, chỉ sau lây nhiễm 1 ngày, nấm đã tạo vết chết hoại rõ rệt tại vị trí lây nhiễm (Hình 4). Các thí nghiệm lây nhiễm lặp lại cho thấy mẫu nấm N1 tạo triệu chứng tương tự với triệu chứng bệnh ngoài tự nhiên (Hình 5). Nấm N1 cũng được tái phân lập lại từ vết bệnh lây nhiễm.

Dựa trên kết quả lây nhiễm nhân tạo, chúng tôi kết luận mẫu nấm N1 là nguyên nhân gây bệnh tàn lụi cây sen tại Huế.



Ghi chú: Mũi tên đỏ chỉ phần không bị bệnh.

**Hình 1. Triệu chứng thối cuống hoa, cuống lá và lá cây sen tại Huế (năm 2022)**



Ghi chú: Ảnh trái: Cấy rìa 3 chiều từ mô cuống lá. Ảnh phải: Các dòng vi khuẩn được phân lập thuần bằng cấy đơn khuẩn lạc với nguồn gốc mô được chỉ rõ.

**Hình 2. Phân lập vi khuẩn từ cuống lá sen**



**Hình 3.** Các nấm khác nhau về hình thái tản được phân lập từ cuống lá sen bệnh (môi trường PDA, ủ ở 28°C sau 5 ngày)

**Bảng 2.** Xác định tính gây bệnh của các mẫu vi khuẩn và nấm phân lập được từ cây sen bị bệnh tàn lụi tại Thừa Thiên Huế năm 2022 bằng lây nhiễm nhân tạo

Vi sinh vật phân lập được	Nguồn gốc mẫu phân lập	Ký hiệu mẫu vi sinh vật	Triệu chứng biểu hiện sau lây nhiễm nhân tạo tại 2 vị trí trên cây sen <sup>1</sup>	
			Gân lá	Cuống lá
Vi khuẩn	Cuống lá, không triệu chứng, sen trắng	VK1	Không	Không
		VK2	Không	Không
		VK3	Không	Không
	Cuống lá, có triệu chứng, sen trắng	VK4	Không	Không
		VK5	Không	Không
		VK6	Không	Không
		VK7	Không	Không
		VK8	Không	Không
Nấm	Cuống lá, có triệu chứng, sen Cao sản	N1	Có	Có
		N2	Không	Không
		N3	Không	Không
		N4	Không	Không
		N5	Không	Không
		N6	Không	Không
	Cuống lá, có triệu chứng, sen Trắng	(như N1)	Không lây	Không lây
N7		Không	Không	

Ghi chú: <sup>1</sup>: Thí nghiệm được lây nhiễm lặp lại 3 lần độc lập đối với vi khuẩn, 2 lần độc lập đối với nấm.

### 3.3. Đặc điểm hình thái mẫu nấm N1

Kết quả lây nhiễm nhân tạo cho thấy mẫu nấm N1 là nguyên nhân gây bệnh tàn lụi trên

cây sen tại Huế. Các đặc điểm hình thái của nấm được đánh giá nhằm định danh nấm.

Trên môi trường PDA, nấm sinh trưởng nhanh, mọc kín đĩa (đường kính 9cm) sau 2

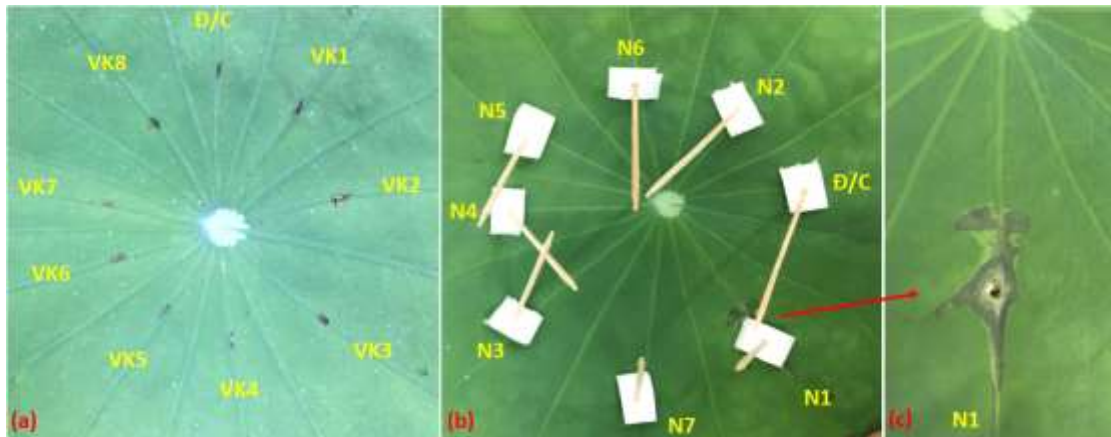
ngày nuôi cấy. Tảo nấm lúc đầu trắng, thưa, chuyển dần thành màu xám tro đậm (Hình 6). Nấm không sinh sản trên môi trường PDA.

Trên mảnh lá thông đặt trên môi trường WA, nấm không sinh sản hữu tính, tạo rất ít bào tử phân sinh mặc dù tạo nhiều cấu trúc giống quả cành (bên trong rỗng không chứa bào tử) (Hình 6).

Bào tử phân sinh thành thực, hình ô van tới

hình trứng, màu nâu vàng, 2 tế bào và có khía dọc bào tử, kích thước (dài × rộng,  $\mu\text{m}$ )  $24,09 \pm 1,33 \times 12,69 \pm 0,7$  với tỷ lệ dài/rộng  $1,9 \pm 0,1$  (Hình 6).

Các đặc điểm hình thái của tảo nấm và bào tử phân sinh cho thấy nấm thuộc họ *Botryosphaeriaceae*. Đặc điểm có khía dọc bào tử phân sinh cho thấy nấm N1 thuộc chi *Lasiodiplodia* hoặc *Barriopsis* (Phillips & cs., 2013; Zhang & cs., 2021).

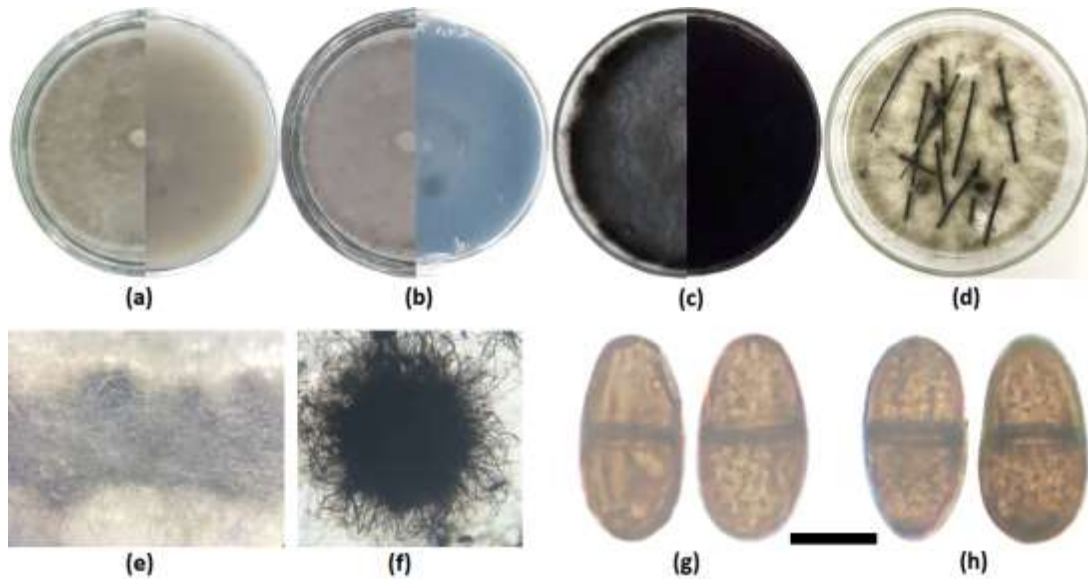


Ghi chú: (a): Lây 8 mẫu vi khuẩn (VK1 đến VK8) trên gân lá (các chấm đen), Đ/C là đối chứng (nước vô trùng), ảnh chụp sau lây nhiễm 1 tuần. (b): Lây 7 mẫu nấm (N1 đến N7) trên gân lá, Đ/C là đối chứng (viên môi trường PDA), ảnh chụp sau lây nhiễm 1 ngày. (c): Cận cảnh vị trí lây nhiễm của mẫu nấm N1 ở (b), được chỉ bằng mũi tên đỏ.

**Hình 4 . Đánh giá tính gây bệnh của các mẫu vi khuẩn và nấm phân lập được từ cây sen bị bệnh tàn lụi**



**Hình 5. Triệu chứng sau lây nhiễm 1 tuần mẫu nấm N1 trên lá (ảnh trái) và cuống lá sen (ảnh phải). Ảnh nhỏ ở góc chỉ vị trí lây nhiễm trên lá, mặt trên, sát cuống lá**



Ghi chú: (a), (b), (c): Tảo nấm (mặt trước và mặt sau) trên môi trường PDA sau cấy lần lượt 3, 7, 30 ngày; (d): Cây nấm trên lá thông. (e), (f): Quả cành hình thành trên lá thông; (g): Bào tử phân sinh trên lá thông; (h): Bào tử phân sinh trên cuống lá sen bệnh. Thanh tỷ lệ tương ứng 10 $\mu$ m.

Hình 6. Đặc điểm hình thái của nấm N1

### 3.4. Định danh phân tử mẫu nấm N1

#### 3.4.1. Giải trình tự và tìm kiếm BLAST

Dựa trên đặc điểm hình thái, định danh phân tử tới mức loài của nấm N1 đã được thực hiện với 3 chỉ thị mã vạch được khuyến cáo đối với chi *Botryosphaeriaceae* là ITS, *tef1* và *tub2* (Jayawardena & cs., 2019).

Sản phẩm PCR các chỉ thị mã vạch của mẫu nấm N1 đã được giải trình tự và được gửi trên GenBank với ký hiệu mẫu là VN-Hue-Lotus1. Các mã truy cập GenBank cho mẫu này là OQ345814 (ITS), OQ359878 (*tub2*) và OQ359879 (*ef1*).

Dựa trên trình tự ITS, tìm kiếm BLAST trên cơ sở dữ liệu Genbank tại NCBI cho thấy nấm N1 gần gũi nhất với loài *Lasiodiplodia theobromae* và *L. brasiliensis* với mức đồng nhất trình tự 100% (Bảng 3).

Dựa trên trình tự *ef1*, tìm kiếm BLAST trên cơ sở dữ liệu Genbank tại NCBI cho thấy nấm N1 gần gũi nhất với loài *L. theobromae* và *L. laeosis* với mức đồng nhất trình tự lần lượt là 99,4 và 99,1% (Bảng 3). Tuy nhiên, loài *L. laeosis* đã được phân loại lại là

*L. theobromae* (Zhang & cs., 2021). Kết quả cũng cho thấy trình tự *ef1* của nấm N1 chỉ đồng nhất 97,8% với trình tự tương ứng của loài *L. brasiliensis* (Bảng 3).

Dựa trên trình tự *tub2*, tìm kiếm BLAST trên cơ sở dữ liệu Genbank tại NCBI cho thấy nấm N1 gần gũi nhất với loài *L. theobromae* và *L. laeosis* với mức đồng nhất trình tự 100% (Bảng 3). Do trình tự *tub2* của chủng chuẩn *L. brasiliensis* không sẵn có trên Genbank nên trình tự *tub2* của mẫu nấm N1 cũng được tìm kiếm với tùy chọn chỉ loài này. Kết quả tìm kiếm cho thấy trình tự *tub2* của mẫu nấm N1 cũng có mức đồng nhất trình tự 100% với trình tự tương ứng của các mẫu *L. brasiliensis* (không trình bày kết quả).

#### 3.4.2. Phân tích phả hệ

Định danh phân tử tới mức loài của các nấm thuộc họ *Botryosphaeriaceae* đã được khuyến cáo dựa trên 3 gen mã vạch ITS, *ef1* và *tub2*. Ba trình tự gen mã vạch của nấm N1 đã được phân tích phả hệ với tất cả các loài *Lasiodiplodia* được công nhận mới nhất gồm 33 loài, gồm cả 9 mẫu *L. theobromae* và 7 mẫu *L. brasiliensis* (Zhang & cs., 2021) (Bảng 4).



**Bảng 3. Kết quả tìm kiếm BLAST dựa trên trình tự mẫu nấm N1<sup>1</sup>**

Gen	Loài	Chủng chuẩn (type strain)	Phần trăm đoạn so sánh (%)	Mức đồng nhất trình tự (%)	Mã GenBank
ITS	<i>L. brasiliensis</i>	CMM4015 ITS	100	100	NR_147338
	<i>L. theobromae</i>	CBS164.96 ITS	100	100	NR_111174
	<i>L. parva</i>	CBS 456.78	100	99,8	MH861166
	<i>L. mahajangana</i>	CBS 124925	100	99,6	MH863425
	<i>L. pseudotheobromae</i>	CBS116459	100	99,2	NR_111264
ef1	<i>L. theobromae</i>	CBS 164.96	99	99,4	AY640258
	<i>L. laosensis</i> <sup>2</sup>	GuoLD01818	99	99,1	KY848609
	<i>L. curvata</i> <sup>3</sup>	GuoLD01906	99	98,1	KY848596
	<i>L. avicenniarum</i>	MFLUCC17-2591	99	98,1	MK340867
	<i>L. brasiliensis</i>	CMM4015	99	97,8	JX464049
tub2	<i>L. theobromae</i>	CBS164.96	71	100	EU673110
	<i>L. laosensis</i> <sup>2</sup>	GuoLD01818	64	100	KY848552
	<i>L. egyptiaca</i> <sup>4</sup>	CBS130992	60	99,7	KU887508
	<i>L. acaciae</i>	CBS136434 b	71	99,3	MT592613
	<i>L. pseudotheobromae</i>	CBS116459	71	99,3	EU673111

Ghi chú: <sup>1</sup>: Tìm kiếm Blast được giới hạn vào tùy chọn chủng chuẩn “Type material” trong cửa sổ tìm kiếm; chỉ trình bày 5 mẫu gần gũi nhất; các trình tự GenBank từ cùng chủng chuẩn được loại bỏ trong trình bày trên; <sup>2</sup>: Loài *L. laosensis* đã được phân loại lại là *L. theobromae* (Zhang & cs., 2021); <sup>3</sup>: Loài *L. curvata* đã được phân loại lại là *L. mahajangana* (Zhang & cs., 2021); <sup>4</sup>: Loài *L. egyptiaca* đã được phân loại lại là *L. laeliocattleyae* (Zhang & cs., 2021).

Phân tích ban đầu đối với gen ITS bằng với phương pháp Neighbour Joining và Maximum Parsimony (phần mềm MEGA 11) cho thấy mẫu nấm N1 phân nhóm với các loài *L. theobromae*, *L. brasiliense*, *L. hormozganensis*, *L. laeliocattleyae* và *L. bruguiera* nhưng giá trị thống kê bootstrap quá thấp (< 35%) cho thấy gen ITS không phân biệt được nấm N1.

Phân tích đối với gen *ef1* (Hình 7) cho thấy mẫu N1 phân nhóm trong cụm gồm 4 loài *L. theobromae*, *L. brasiliense*, *L. viticola*, *L. bruguiera* và *L. mahajangana* với giá trị thống kê UFboot và HS-aLRT đảm bảo tin cậy, lần lượt là 95 và 89%. Trong cụm này, nấm N1 phân nhóm khá rõ với 3 mẫu *L. theobromae* bao gồm cả mẫu chuẩn của loài này là CBS164.96 và đặc biệt rất chặt với mẫu CBS111530 với giá trị thống kê UFboot và HS-aLRT lần lượt là 98 và 92%.

Phân tích đối với gen *tub2* (Hình 8) cho thấy mẫu N1 phân nhóm chặt trong cụm gồm 3 loài

*L. theobromae*, *L. brasiliense* và *L. laeliocattleyae* với giá trị thống kê UFboot và HS-aLRT rất cao, lần lượt là 95 và 96%

Phân tích hệ kết hợp 3 gen ITS, *ef1* và *tub2* (Hình 9) cho thấy nấm N1 phân nhóm trong cụm loài *L. theobromae* với giá trị thống kê UFboot và HS-aLRT cao lần lượt là 91 và 78%. Đáng chú ý, giống như phân tích với 1 gen *ef1*, mẫu nấm N1 phân nhóm rất chặt với mẫu CBS111530 với giá trị thống kê UFboot và HS-aLRT lần lượt là 99 và 90%. Trong phân tích đa gen, các mẫu *L. brasiliensis* tạo thành cụm loài gần gũi nhưng độc lập với các mẫu *L. theobromae*.

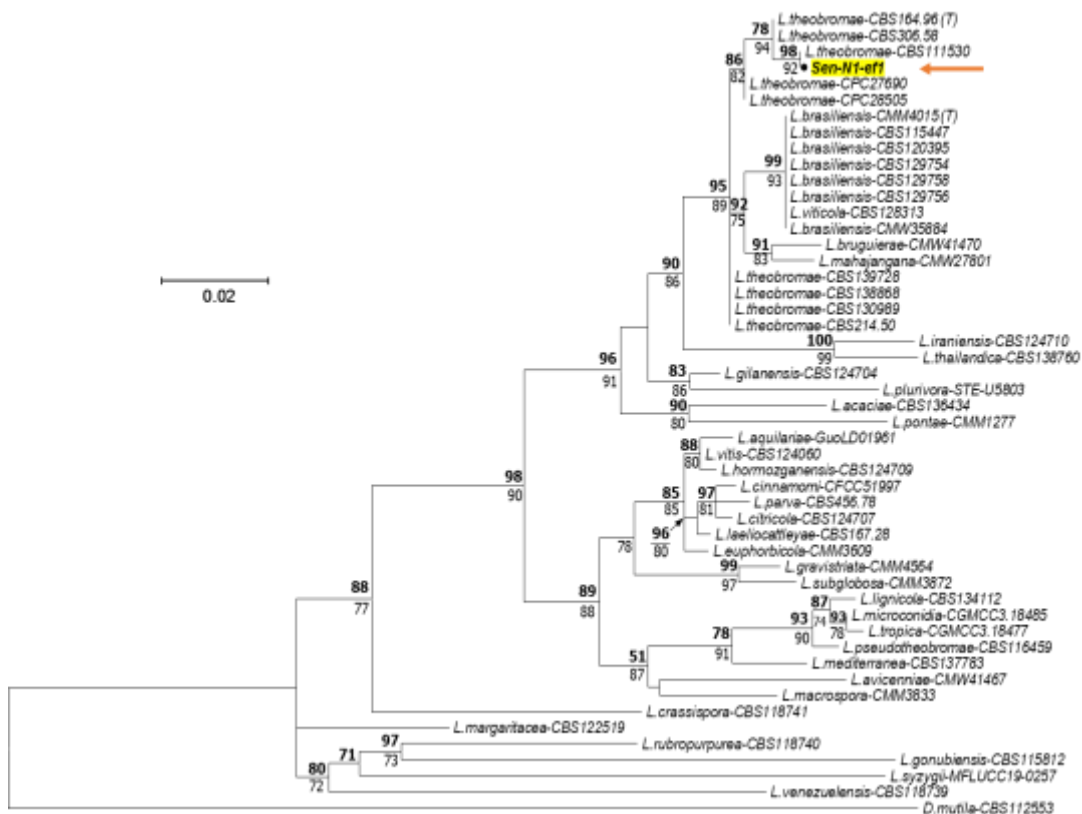
Dựa trên các đặc điểm hình thái và phân tích phân tử, nấm N1 gây bệnh trên cây sen được xác định là loài *L. theobromae*. Các phân tích phân tử trong nghiên cứu cho thấy loài này gần gũi nhất với *L. brasiliensis*, phù hợp với các kết quả đã công bố trên thế giới (Phillips & cs., 2013; Netto & cs., 2014; Zhang & cs., 2021).

**Bảng 4. Các mẫu Genbank được sử dụng trong phân tích phả hệ**

Loài	Chủng <sup>1</sup>	Mã truy cập GenBank		
		ITS	<i>tef1</i>	<i>tub2</i>
<i>L. acaciae</i>	CBS136434	MT587421	MT592133	MT592613
<i>L. aquilariae</i>	GuoLD01961	KY783442	KY848600	
<i>L. avicenniae</i>	CMW41467	KP860835	KP860680	KP860758
<i>L. brasiliensis</i>	CMM4015(T)	JX464063	JX464049	
<i>L. brasiliensis</i>	CBS115447	MT587422	MT592134	MT592614
<i>L. brasiliensis</i>	CBS120395	MT587423	MT592135	MT592615
<i>L. brasiliensis</i>	CBS129754	JX545099	JX545119	JX545139
<i>L. brasiliensis</i>	CBS129756	MH865372	JX545118	JX545138
<i>L. brasiliensis</i>	CBS129758	JX545097	JX545117	JX545137
<i>L. brasiliensis</i>	CMW35884	KU887094	KU886972	KU887466
<i>L. bruguierae</i>	CMW41470	KP860833	KP860678	KP860756
<i>L. cinnamomi</i>	CFCC51997	MG866028	MH236799	MH236797
<i>L. citrioola</i>	CBS124707	GU945354	GU945340	KU887505
<i>L. crassispora</i>	CBS118741	DQ103550	DQ103557	KU887506
<i>L. euphorbiaceicola</i>	CMM3609	KF234543	KF226689	KF254926
<i>L. gilanensis</i>	CBS124704	GU945351	GU945342	KU887511
<i>L. gonubiensis</i>	CBS115812	AY639595	DQ103566	DQ458860
<i>L. gravistriata</i>	CMM4564	KT250949	KT250950	
<i>L. hormozganensis</i>	CBS124709	GU945355	GU945343	KU887515
<i>L. iraniensis</i>	CBS124710	GU945348	GU945336	KU887516
<i>L. laeliocattleyae</i>	CBS167.28	MT587425	MT592136	MT592618
<i>L. lignicola</i>	CBS134112	JX646797	KU887003	JX646845
<i>L. macrospora</i>	CMM3833	KF234557	KF226718	KF254941
<i>L. mahajangana</i>	CMW27801	FJ900595	FJ900641	FJ900630
<i>L. margaritacea</i>	CBS122519	EU144050	EU144065	KU887520
<i>L. mediterranea</i>	CBS137783	KJ638312	KJ638331	KU887521
<i>L. microconidia</i>	CGMCC3.18485	KY783441	KY848614	
<i>L. parva</i>	CBS456.78	ÈF622083	EF622063	KU887523
<i>L. plurivora</i>	STE-U5803	EF445362	EF445395	KP872421
<i>L. pontae</i>	CMM1277	KT151794	KT151791	KT151797
<i>L. pseudotheobromae</i>	CBS116459	EF622077	EF622057	EU673111
<i>L. rubropurpurea</i>	CBS118740	DQ103553	DQ103571	EU673136
<i>L. subglobosa</i>	CMM 3872	KF234558	KF226721	KF254942
<i>L. syzygii</i>	MFLUCC19-0257	MT990531	MW016943	MW014331
<i>L. thailandica</i>	CBS138760	KJ193637	KJ193681	
<i>L. theobromae</i>	CBS111530	EF622074	EF622054	KU887531
<i>L. theobromae</i>	CBS130989	MT587437	MT592149	MT592634
<i>L. theobromae</i>	CBS138868	MT587438	MT592150	MT592635
<i>L. theobromae</i>	CBS139728	MT587439	MT592151	MT592636
<i>L. theobromae</i>	CBS164.96 (T)	AY640255	AY640258	KU887532
<i>L. theobromae</i>	CBS214.50	MT587440	MT592152	MT592637

Loài	Chủng <sup>1</sup>	Mã truy cập GenBank		
		ITS	<i>tef1</i>	<i>tub2</i>
<i>L. theobromae</i>	CBS306.58	EF622071	EF622051	MT592638
<i>L. theobromae</i>	CPC27690	MT587441	MT592153	MT592639
<i>L. theobromae</i>	CPC28505	MT587442	MT592154	MT592640
<i>L. tropica</i>	CGMCC3.18477	KY783454	KY848616	KY848540
<i>L. venezuelensis</i>	CBS118739	DQ103547	DQ103568	KU887533
<i>L. viticola</i>	CBS128313	HQ288227	HQ288269	HQ288306
<i>L. vitis</i>	CBS124060	KX464148	KX464642	KX464917
<i>Diplodia mutila</i>	CBS112553	AY259093	AY573219	DQ458850

Ghi chú: <sup>1</sup>: Tất cả các mẫu phân tích là chủng chuẩn loài (type strain). Riêng đối với *L. theobromae*, chủng chuẩn loài được đánh dấu bằng (T) (Zhang W & cs., 2021); <sup>2</sup>: Loài *Diplodia mutila* được sử dụng như mẫu outgroup.



Ghi chú: Cây được xây dựng bằng phần mềm IQ-TREE, với mô hình thay thế nucleotide tối ưu K2P + I + G4. Cây được hiển thị bằng phần mềm Treeviewer và vẽ lại bằng phần mềm MEGA11. Số ở trên và dưới mỗi nốt lượn là giá trị thống kê UFBoot và SH-aLRT support (%). Thanh Bar trình bày số thay thế nucleotides/vị trí. *D. mutila* được sử dụng làm outgroup.

**Hình 7.** Cây Maximum Likelihood của chi *Lasiodiplodia* dựa trên trình tự gen *ef1*

*L. theobromae* là loài được xác định đầu tiên của chi *Lasiodiplodia* từ cuối thế kỷ XIX. Trong số các loài thuộc họ *Botryosphaeriaceae*, *L. theobromae* là loài có phân bố rộng nhất, đặc

biệt ở khu vực nhiệt đới và á nhiệt đới (xuất hiện ở 103 nước), có phổ ký chủ lớn nhất (phân lập từ 788 loài cây) và dạng dạng nhất (2463 isolate) (Batista & cs., 2021).

Đã có một số công bố về bệnh hại trên cây ở Việt Nam, chủ yếu trên các cây thân gỗ như sầu riêng (Đặng Thị Kim Uyên & cs., 2022), xoài (Nguyễn Vũ Mai Linh & cs., 2021) với nguyên nhân gây bệnh được xác định là *L. theobromae*. Tuy nhiên, cho tới nay, chưa có công bố về định danh phân tử dựa trên phân tích đa gen của loài này. Một số trình tự *L. theobromae* trên GenBank có nguồn gốc từ tàn dư cây rừng tại Đồng Nai (KP074985, KP074984), hoặc từ cây Quế (KP074984) đều là các trình tự ITS.

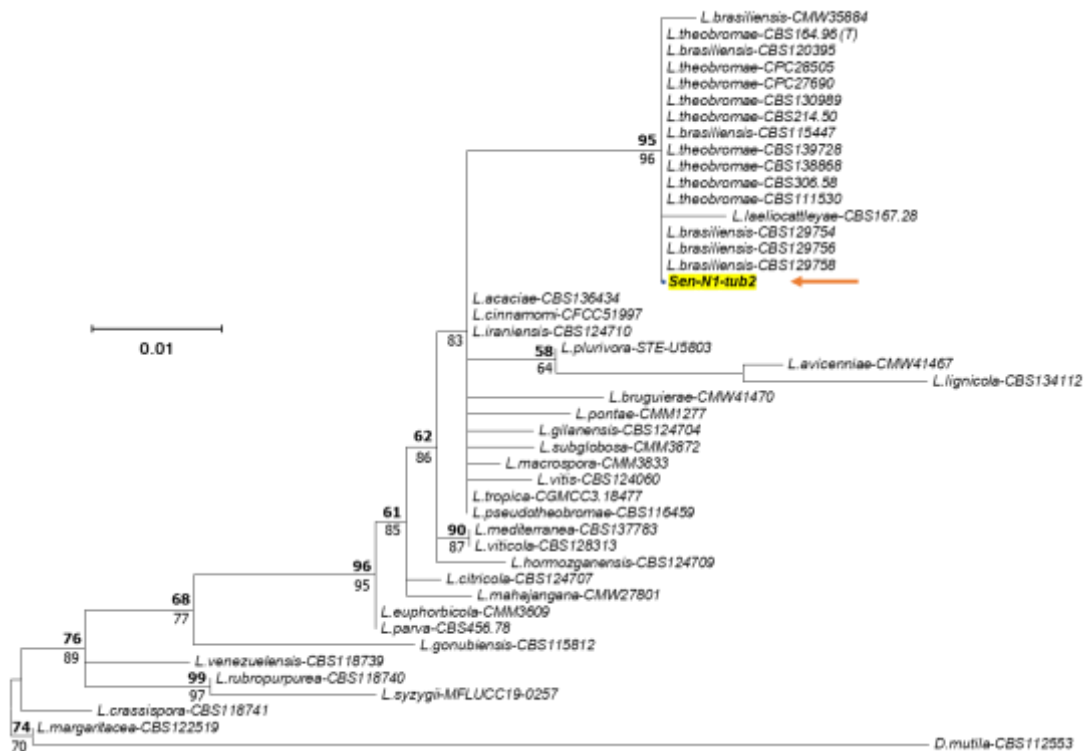
*L. theobromae* cũng như các loài thuộc họ *Botryosphaeriaceae* có một số đặc điểm sinh học và bệnh học khá đặc biệt. Chúng thường sống nội sinh trong cây không gây bệnh. Khi cây chuyển trạng thái sinh lý hoặc bị các ức chế do các yếu tố sinh học hoặc phi sinh học gây ra, nấm sẽ gây bệnh cho cây. Nấm *L. theobromae* và các thành viên của họ *Botryosphaeraceae* chỉ có thể xâm nhập vào cây một cách thụ động, có nghĩa bào tử nấm hoặc sợi nấm chỉ có thể xâm

nhập vào cây qua các tổn thương cơ học (Slippers & Wingfield, 2007; Phillips & cs., 2013; Salvatore & cs., 2020).

Do cây sen là cây thủy sinh và *L. theobromae* là tác nhân gây bệnh mới được xác định trên cây này nên nghiên cứu về đặc điểm dịch tễ học cũng như phòng chống cần được tiếp tục thực hiện nhằm quản lý hiệu quả bệnh.

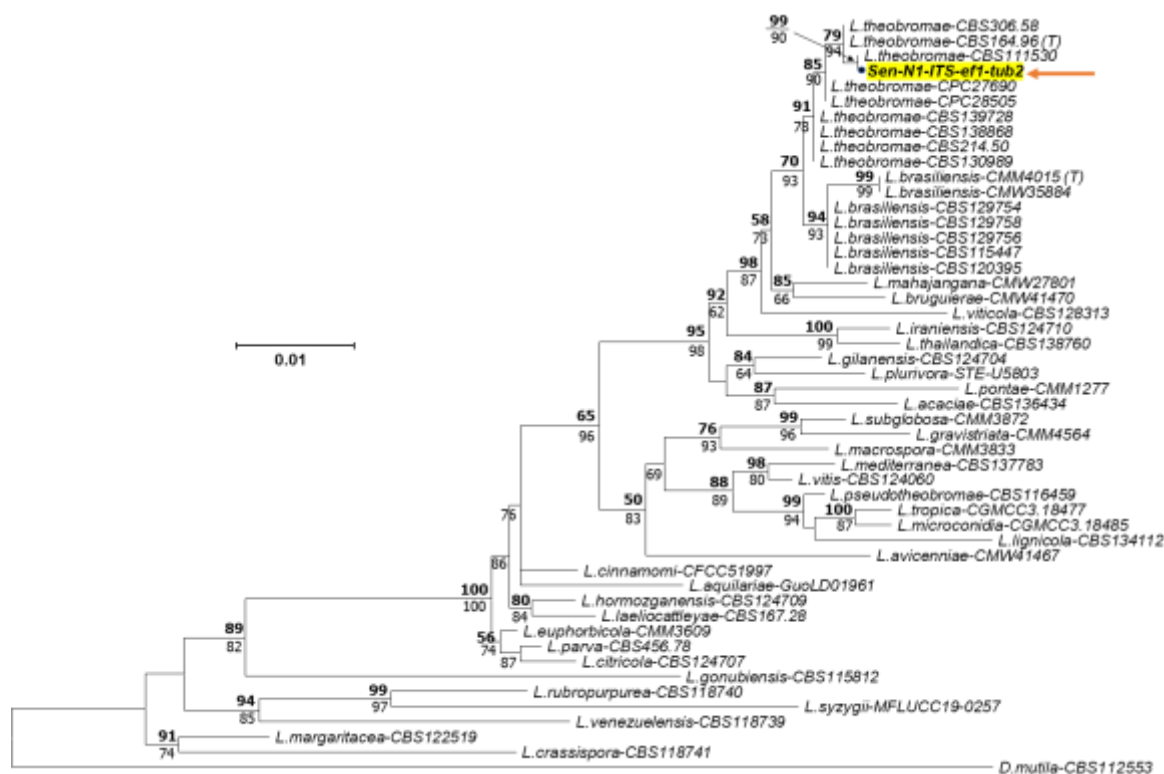
#### 4. KẾT LUẬN

Dựa trên kết quả lấy nhiễm nhân tạo, đặc điểm hình thái và phân tích trình tự đa gen, nguyên nhân gây bệnh tàn lụi cây sen tại Thừa Thiên Huế được xác định là do nấm *L. theobromae* gây ra. Nấm có khả năng gây bệnh rất nhanh trên cuống lá và lá cây sen. Đây là báo cáo đầu tiên trên thế giới và Việt Nam xác định *L. theobromae* là nguyên nhân gây bệnh tàn lụi trên cây sen.



Ghi chú: Cây được xây dựng bằng phần mềm IQ-TREE, với mô hình thay thế nucleotide tối ưu HKY + F + I. Cây được hiển thị bằng phần mềm Treeviewer và vẽ lại bằng phần mềm MEGA11. Số ở trên và dưới mỗi nốt lằn lượt là giá trị thống kê UFBoot và SH-aLRT support (%), IQ-TREE, chỉ hiển thị các giá trị > 50%. Thanh Bar trình bày số thay thế nucleotides/vị trí. *D. mutila* được sử dụng làm outgroup.

Hình 8. Cây Maximum Likelihood của chi *Lasiodiplodia* dựa trên trình tự gen *tub2*



Ghi chú: Cây được xây dựng bằng phần mềm IQ-TREE, với mô hình thay thế nucleotide tối ưu cho ITS là  $K2P + I + G4$ ,  $ef1$  là  $Tne + G4$  và  $tub2$  là  $HKY + F + G4$ . Cây được hiển thị bằng phần mềm Treeviewer và vẽ lại bằng phần mềm MEGA11. Số ở trên và dưới mỗi nốt lượn là giá trị thống kê UFBoot và SH-aLRT support (%). Thanh Bar trình bày số thay thế nucleotides/vị trí. *D. mutila* được sử dụng làm outgroup.

**Hình 9. Cây Maximum Likelihood của chi *Lasiodiplodia* dựa trên trình tự kết hợp ITS, *ef1* và *tub2***

## LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu là kết quả của đề tài Khoa học và Công nghệ cấp tỉnh được cấp ngân sách nhà nước tỉnh Thừa Thiên Huế đầu tư, mã số: TTH.2019.KC.02.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Batista E., Lopes A. & Alves A. (2021). What do we know about Botryosphaeriaceae? An overview of a worldwide curated dataset. *Forests*. 12(3): 313.
- Burgess LW., Knight T.E., Tesoriero L. & Phan H.T. (2008). Diagnostic manual for plant diseases in Vietnam. ACIAR Monograph No. 129. Australian Centre for International Agricultural Research: Canberra.
- Carbone I. & Kohn L.M. (1999). A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*. 91(3): 553-556.
- Chen K.L. & Kirschner R. (2018). Fungi from leaves of lotus (*Nelumbo nucifera*). *Mycological Progress*. 17(1): 275-293.
- Đặng Thị Kim Uyên, Lê Thị Tường & Nguyễn Văn Hòa. (2022). Nghiên cứu xác định nấm *Phomopsis durionis* và *Lasiodiplodia theobromae* gây bệnh cháy lá trên sầu riêng. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*. 5(138): 57-61.
- Glass N.L. & Donaldson G.C. (1995). Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and environmental microbiology*. 61(4): 1323-1330.
- Guindon S., Dufayard J.F., Lefort V., Anisimova M., Hordijk W. & Gascuel O. (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic biology*. 59(3): 307-321.
- Hoang D.T., Chernomor O., Von Haeseler A., Minh B.Q. & Vinh L.S. (2018). UFBoot2: improving the ultrafast bootstrap approximation. *Molecular biology and evolution*. 35(2): 518-522.

- Jayawardena R.S., Hyde K.D., Mckenzie E.H., Jeewon R., Phillips A.J., Perera R.H., De Silva N.I., Maharachchikumburua S.S., Samarakoon M.C. & Ekanayake A.H. (2019). One stop shop III: taxonomic update with molecular phylogeny for important phytopathogenic genera. *Fungal Diversity*. 98(1): 77-160.
- Katoh K. & Standley D.M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular biology and evolution*. 30(4): 772-780.
- Kuang W., Zhang L., Ye L., Ma J., Shi X., Lin Y., Sun X. & Cui R. (2022). Genome and Transcriptome Sequencing Analysis of *Fusarium commune* Provides Insights into the Pathogenic Mechanisms of the Lotus Rhizome Rot. *Microbiology spectrum*. 10(4): e00175-22.
- Kurashita H., Kuroda K., Narihiro T., Takagi M., Goto M., Ikeda S., Hirakata Y., Hatamoto M., Maki S. & Yamaguchi T. (2021). Accurate evaluation of blackening disease in lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) using a quantitative PCR-based assay for *Hirschmanniella diversa* Sher and *H. imamuri* Sher. *Crop Protection*. 139: 105380.
- Lelliott R.A. & Stead D.E. (1987). *Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants*. Blackwell Scientific Publications.
- Li J., Li H., Zheng L., Yan S. & Wang Q. (2016). First report of lotus root disease caused by *Fusarium tricinctum* in China. *Plant Disease*. 100(8): 1784-1784.
- Mihira T. (2002). Browning tuber disease of Indian lotus [*Nelumbo nucifera*], Kurokawa-senchu-byo caused by rice root nematode, *Hirschmanniella imamuri*. *Bulletin of the Chiba Prefectural Agriculture Research Center* (Japan).
- Minh B.Q., Schmidt H.A., Chernomor O., Schrenpf D., Woodhams M.D., Von Haeseler A. & Lanfear R. (2020). IQ-TREE 2: new models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era. *Molecular biology and evolution*. 37(5): 1530-1534.
- Minh B.Q., Trifinopoulos J., Schrenpf D., Schmidt H. & Lanfear R. (2019). IQ-TREE version 2.0: tutorials and Manual Phylogenomic software by maximum likelihood. Retrieved from <http://www.iqtree.org> on Jan 15, 2023.
- Netto M.S., Assunção I.P., Lima G.S., Marques M.W., Lima W.G., Monteiro J.H., De Queiroz Balbino V., Michereff S.J., Phillips A.J. & Câmara M.P. (2014). Species of *Lasiodiplodia* associated with papaya stem-end rot in Brazil. *Fungal Diversity*. 67(1): 127-141.
- Nguyễn Vũ Mai Linh, Phan Thị Hồng Thảo, Nguyễn Thị Hồng Liên, Đào Thị Hồng Vân, Nguyễn Văn Hiếu, Nguyễn Tường Vân & Nguyễn Hoài Châu (2021). Khả năng ức chế nấm *Lasiodiplodia theobromae* gây bệnh thối củồng trên xoài của nano bạc và đồng. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*. 4(19): 735-740.
- O'donnell K. & Cigelnik E. (1997). Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Molecular phylogenetics and evolution*. 7(1): 103-116.
- Phillips A., Alves A., Abdollahzadeh J., Slippers B., Wingfield M., Groenewald J. & Crous P. (2013). The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. *Studies in Mycology*. 76(1): 51-167.
- Quốc Việt (2018). Phòng bệnh thán thư để tăng hiệu quả kinh tế cho việc trồng sen. Truy cập từ <https://dantocmiennui.vn/phong-benh-than-thu-de-tang-hieu-qua-kinh-te-cho-viec-trong-sen/176614.html> ngày 28/3/2023.
- Salvatore M.M., Andolfi A. & Nicoletti R. (2020). The thin line between pathogenicity and endophytism: The case of *Lasiodiplodia theobromae*. *Agriculture*. 10(10): 488.
- Slippers B. & Wingfield M. (2007). Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *Fungal Biology Reviews*. 21: 90-106.
- Tamura K., Stecher G. & Kumar S. (2021). MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular biology and evolution*. 38(7): 3022-3027.
- Ủy ban Nhân dân tỉnh Thừa Thiên Huế (2021). Số 65/KH-UBND ngày 2/3/2021 Kế hoạch trồng Sen giai đoạn 2021-2025. Truy cập từ <https://thuvienphapluat.vn/van-ban/Linh-vuc-khac/Ke-hoach-65-KH-UBND-2021-phat-trien-trong-Sen-tinh-Thua-Thien-Hue-471338.aspx> ngày 28/3/2023.
- Wang G., Tian T., Meng J., Xiao X. & Xiao Y. (2020). First report of *Fusarium incarnatum* causing rot disease on lotus in China. *Journal of Plant Pathology*. 102(2): 595-595.
- Wang H., Qi M. & Cutler A.J. (1993). A simple method of preparing plant samples for PCR. *Nucleic acids research*. 21(17): 4153.
- White T.J., Bruns T., Lee S. & Taylor J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. 18(1): 315-322.
- Yin X., Li X., Yin J. & Wu X. (2016). First report of *Phytophthora helicoides* causing rhizome rot of Asian lotus in China. *Plant Disease*. 100(2): 532.
- Zhang Q., Huang L., Liu Y., Ai Y. & Peng D. (2018). First report of leaf spot of lotus (*Nelumbo nucifera*) caused by *Nigrospora oryzae* in China. *Plant Disease*. 102(5): 1038-1038.
- Zhang W., Groenewald J., Lombard L., Schumacher R., Phillips A. & Crous P. (2021). Evaluating species in Botryosphaeriales. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*. 46(1): 63-115.