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

Huế, 2026

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, 2026

LỜI CAM ĐOAN

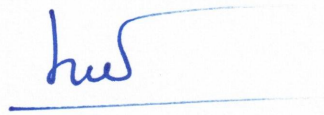
Tôi xin cam đoan rằng luận án này là công trình nghiên cứu độc lập của bản thân tôi và một số kết quả cộng tác với các cộng sự khác. Các kết quả nghiên cứu, số liệu được trình bày trong luận án là trung thực, khách quan và chưa từng được sử dụng để bảo vệ cho bất kỳ học vị nào trước đây. Một phần số liệu đã được công bố trên các Tạp chí, báo cáo Hội nghị chuyên ngành với sự đồng ý và chấp thuận của các đồng tác giả. Phần còn lại chưa được công bố trong bất kỳ công trình nào khác.

Tôi cũng cam kết đã ghi rõ nguồn gốc tất cả các thông tin, số liệu, và tài liệu tham khảo sử dụng trong luận án. Mọi sự hỗ trợ, giúp đỡ trong quá trình thực hiện luận án đều đã được trân trọng ghi nhận và cảm ơn đầy đủ.

Nếu có bất kỳ vi phạm nào liên quan đến tính trung thực và bản quyền của luận án, tôi xin chịu hoàn toàn trách nhiệm theo quy định của đơn vị đào tạo.

Huế, ngày 20 tháng 01 năm 2026

Tác giả luận án



Nguyễn Quang Hoàng Vũ

LỜI CẢM ƠN

Trước hết, tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành và tri ân sâu sắc nhất đến hai cô, thầy hướng dẫn khoa học của tôi – PGS.TS. Hoàng Thị Kim Hồng và TS. Hoàng Tấn Quảng. Đối với Cô PGS.TS. Hoàng Thị Kim Hồng - người Cô đã đồng hành cùng tôi suốt một hành trình dài xấp xỉ 10 năm, từ những ngày đầu tiên của luận văn Thạc sĩ cho đến giờ phút hoàn thiện luận án và đặt bút viết những lời cảm ơn trong luận án này. Những kiến thức kinh nghiệm, những góp ý cũng như sự kiên nhẫn, động viên của Cô đã giúp tôi hoàn thiện luận án cũng như các công trình nghiên cứu liên quan. Sự tận tụy và nhiệt huyết của cô là nguồn động lực lớn lao để tôi vượt qua những thời điểm khó khăn trong quá trình nghiên cứu. Tôi cũng xin gửi lời cảm ơn sâu sắc đến thầy TS. Hoàng Tấn Quảng – một người thầy mà hôm nào cũng gọi là "anh" - người đã luôn sát cánh, chia sẻ kinh nghiệm và tạo điều kiện thuận lợi tại phòng thí nghiệm Công nghệ Gene để tôi có thể phát triển ý tưởng và hoàn thành luận án một cách tốt nhất. Sự hỗ trợ, đồng hành và những lời khuyên quý giá của 2 thầy, Cô đã giúp tôi không chỉ hoàn thiện một công trình nghiên cứu, mà còn trưởng thành hơn trong hành trình khoa học này.

Tôi cũng xin gửi lời biết ơn sâu sắc tới Ban lãnh đạo, Phòng Khoa học Đào tạo và Hợp tác quốc tế (Cô Xuân Thu), Phòng Tổ chức Hành chính (Viện Công nghệ Sinh học, Đại học Huế) tận tình hướng dẫn trong quá trình thực hiện luận án tại Viện CNSH. Đặc biệt, lời cám ơn chân thành xin gửi đến Thầy Tường Lân và cô Xuân Hương (Ban Đào tạo và công tác sinh viên, Đại học Huế) đã tận tình hướng dẫn, tạo điều kiện thuận lợi nhất trong các thủ tục liên quan đến quá trình phản biện độc lập, Hội đồng bảo vệ luận án.

Qua đây, tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành đến các anh chị em thân thương trong phòng thí nghiệm Công nghệ Gene và phòng thí nghiệm Enzyme Protein, Viện Công nghệ Sinh học, Đại học Huế – những người đồng hành gắn bó trong suốt hành trình "quay trở lại" nghiên cứu khoa học của bản thân. Từ những ngày đầu tiên bước vào phòng thí nghiệm, những buổi cấy trải đầu tiên, những lần PCR đầy hồi hộp, cho đến những đêm trắng miệt mài hay những "tâm sự" lúc thí nghiệm mãi không như mong đợi. Sự "đồng hành", chia sẻ và hỗ trợ vô điều kiện đã tạo những kỷ niệm quý giá trong chặng đường làm luận án này, một môi trường nghiên cứu thân thiện, gắn bó và hiệu quả.

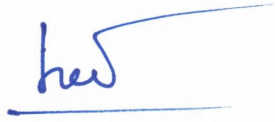
Tôi cũng xin chân thành cảm ơn Quỹ Đổi mới sáng tạo Vingroup (VINIF), Viện Nghiên cứu Dữ liệu lớn (VINBIGDATA), cũng như nguồn kinh phí của đề tài Đại học Huế. Những hỗ trợ tài chính này không chỉ là học bổng đơn thuần, mà còn là nguồn động viên động lực to lớn để tôi có thể bắt đầu và mở rộng các khía cạnh của nghiên cứu và kiên trì theo đuổi mục tiêu đề tài luận án.

Đặc biệt, tôi cũng xin gửi làm cám ơn sâu sắc đến các bà con nông dân – những người luôn vui vẻ, sẵn sàng tạo mọi điều kiện, chia sẻ những kinh nghiệm thực tế khi thu thập mẫu bệnh hại.

Tôi xin gửi lời cảm ơn sâu sắc đến người bạn "đồng hành" Nguyễn Thị Mỹ Nhung, người đã góp phần quan trọng trong quyết định "ở lại" đây, giữ vững quyết tâm hoàn thành luận án này. Cảm ơn những ngày nắng gắt cùng nhau đi thu mẫu trên những thửa ruộng đến mức say nắng, những điều này nguồn động viên tinh thần giữa những chặng đường học thuật gian nan. Cuối cùng, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn cảm ơn gia đình và bạn bè thân thiết khác đã luôn dành cho tôi sự động viên âm thầm và hỗ trợ tinh thần vô giá trong suốt hành trình học tập và nghiên cứu.

Trân trọng & Tri ân sâu sắc

Tác giả luận án



Nguyễn Quang Hoàng Vũ

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN i
LỜI CẢM ƠN ii
MỤC LỤC iv
DANH MỤC VIẾT TẮT vii
DANH MỤC HÌNH, BIỂU ĐỒ x
DANH MỤC BẢNG xiv
MỞ ĐẦU 1
1. TÍNH CẤP THIẾT CỦA ĐỀ TÀI 1
2. MỤC TIÊU CỦA NGHIÊN CỨU 2
2.1. Mục tiêu chung 2
2.2. Mục tiêu cụ thể 2
3. NỘI DUNG NGHIÊN CỨU 2
4. PHẠM VI NGHIÊN CỨU 2
5. Ý NGHĨA KHOA HỌC VÀ THỰC TIỄN CỦA ĐỀ TÀI 3
5.1. Ý nghĩa khoa học 3
5.2. Ý nghĩa thực tiễn 3
6. NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN 4
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN VỀ VẤN ĐỀ NGHIÊN CỨU 5
1.1. GIỚI THIỆU CHUNG VỀ CÂY SEN 5
1.1.1. Nguồn gốc, lịch sử và sự phân bố của cây sen 5
1.1.2. Đặc điểm sinh trưởng của cây sen 6
1.1.2.1. Thời gian sinh trưởng 7
1.1.2.2. Đặc điểm sinh lý của cây sen 8
1.2. TỔNG QUAN VỀ CÁCH TIẾP CẬN VÀ CÁC TIÊU CHÍ NHẬN DIỆN, PHÂN ĐỊNH LOÀI NẤM 9
1.3. TỔNG QUAN TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU BỆNH HẠI TRÊN CÂY SEN 13
1.3.1. Thực trạng và tình hình bệnh hại trên cây sen trên thế giới 14
1.3.2. Thực trạng và tình hình nghiên cứu bệnh hại trên cây sen ở Việt Nam 16
1.4. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU VỀ NANO BẠC VÀ ỨNG DỤNG TRONG QUẢN LÝ BỆNH HẠI CÂY TRỒNG 19
1.4.1. Cơ chế kháng của nano bạc 19

1.4.2. Các yếu tố ảnh hưởng đến hoạt tính kháng của nano bạc 21

1.4.3. Ứng dụng nano bạc trong nông nghiệp và quản lý bệnh hại thực vật 24

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU 34

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU 34

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU 34

2.2.1. Phương pháp thu thập và phân lập nấm gây bệnh hại trên cây sen 34

2.2.2. Phương pháp định danh nấm dựa trên các đặc điểm hình thái 34

2.2.3. Phương pháp định danh nấm dựa trên kỹ thuật sinh học phân tử 35

2.2.3.1. Phương pháp tách chiết DNA, khuếch đại và giải trình tự 35

2.2.3.2. Phương pháp phân tích phát sinh loài đa locus 36

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 38

2.2.4.1. Phương pháp đánh giá ảnh hưởng của nano bạc đến sự sinh trưởng nấm trên môi trường thạch (rắn) 38

2.2.4.2. Phương pháp đánh giá ảnh hưởng của nano bạc đến sinh trưởng các tác nhân nấm trong môi trường lỏng 39

2.2.4.3. Phương pháp đánh giá ảnh hưởng của nano bạc đến đặc điểm sinh hóa và tính toàn vẹn của màng tế bào 40

2.2.5. Phương pháp xử lý số liệu 42

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN 43

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 43

3.1.1. Đặc điểm phân bố của các tác nhân nấm liên quan đến các triệu chứng bệnh hại trên cây sen theo chi, giống sen, địa lý và sinh cảnh 44

3.1.2. Đa dạng thành phần loài nấm liên quan đến các triệu chứng bệnh hại trên cây sen dựa trên kỹ thuật sinh học phân tử 48

3.1.2.1. Neofusicoccum và Lasiodiplodia 48

3.1.2.2. Curvularia và Exserohilum 53

3.1.2.3. Nigrospora 63

3.1.2.4. Colletotrichum 66

3.1.2.5. Neopestalotiopsis 75

3.1.2.6. Aspergillus *77*

3.1.2.7. Diaporthe *80*

3.2. ĐÁNH GIÁ ẢNH HƯỞNG CỦA VẬT LIỆU NANO BẠC ĐẾN MỘT SỐ NẤM GÂY HẠI TRÊN CÂY SEN Ở ĐIỀU KIỆN PHÒNG THÍ NGHIỆM 92

3.2.1. Ảnh hưởng của nano bạc đến sự phát triển nấm trên môi trường rắn 92

3.2.1.1. Hiệu lực ức chế sự sinh trưởng sợi nấm của nano bạc *92*

3.2.1.2. Độ nhạy cảm đối với nano bạc (Giá trị EC_{50}) *95*

3.2.1.3. Ảnh hưởng của nano bạc đến hình thái tản nấm *97*

3.2.2. Ảnh hưởng của nano bạc đến sự sinh trưởng nấm trong môi trường lỏng 107

3.2.2.1. Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) và nồng độ diệt nấm tối thiểu (MFC) *107*

3.2.2.2. Ảnh hưởng của nano bạc đến sinh khối nấm *109*

3.2.3. Ảnh hưởng của nano bạc đến đặc điểm sinh hóa và tính toàn vẹn của màng tế bào 110

3.2.3.1. Rò rỉ thành phần nội bào (acid nucleic – OD_{260}) *110*

3.2.3.2. Độ dẫn điện ngoại bào (Extracellular electrical conductivity – EEC) *113*

3.2.3.3. Hàm lượng Ergosterol *116*

3.2.3.4. Quá trình peroxy hóa lipid – MDA *118*

3.2.3.5. Ảnh hưởng của nano bạc đối với hệ thống các enzyme chống oxy hóa *120*

3.2.4. Ảnh hưởng của nano bạc đến sự sinh trưởng của nấm ở cấp độ vi mô .. 123

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 133

CHƯƠNG 4. KẾT LUẬN & KIẾN NGHỊ 137

DANH MỤC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN 138

TÀI LIỆU THAM KHẢO 139

DANH MỤC VIẾT TẮT

Từ viết tắt	Diễn giải đầy đủ từ viết tắt	Diễn giải nghĩa Tiếng Việt
ACT	Actin	Gene actin
AgNPs	Silver nanoparticles	Nano bạc
ApMAT	Partial mating type (Mat1-2) gene	Locus tổ hợp (chimeric locus) trình tự di truyền kết hợp vùng Apn2–Mat1-2
APX	Ascorbate peroxidase	Enzyme ascorbate peroxidase
bp	Base pair	Cặp base (cặp nucleotide)
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool	Công cụ so sánh trình tự truy vấn với các trình tự có sẵn trên cơ sở dữ liệu NCBI dựa trên thuật toán heuristic tối ưu hóa việc tìm kiếm các vùng tương đồng cục bộ (local similarity)
BPP	Bayesian Phylogenetics & Phylogeography	Phương pháp phân tích phát sinh loài sử dụng suy luận Bayesian để phân định loài và suy luận cây loài dựa trên mô hình đồng quy đa loài
CAL	Calmodulin	Gene calmodulin
CDS	Coding Sequence	Trình tự mã hóa
CFU	Colony Forming Unit	Đơn vị hình thành khuẩn lạc
CHS-1	Chitin synthase	Gene chitin synthase
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute	Viện Tiêu chuẩn Lâm sàng và Phòng thí nghiệm
DEG	differentially expressed gene	Gene có mức độ biểu hiện khác biệt
DMSO	Dimethyl sulfoxide	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid	Acid deoxyribonucleic
EC_{50}	Half maximal effective concentration	Nồng độ có hiệu quả 50% hoạt tính
EEC	Extracellular electrical conductivity	Độ dẫn điện ngoại bào

FRAC	Fungicide Resistance Action Committee	Ủy ban hành động chống kháng thuốc trừ/diệt nấm
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Intron của glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GCPSR	Generalized Consolidated Phylogenetic Species Recognition	Nguyên tắc nhận diện loài, xác định ranh giới loài dựa trên phát sinh chủng loài theo mẫu hình dòng dõi di truyền
GIS	Geographic Information System	Hệ thống thông tin địa lý
GS	Glutamine synthetase	
GYMC	Generalized Mixed Yule Coalescent	Phương pháp để phân định các loài tiến hóa độc lập sử dụng dữ liệu của một locus duy nhất từ cây ultrametric bằng cách tìm các điểm gãy giữa nhánh giả định phân định loài sang đồng quy nội bộ loài (Yule – coalescent)
ITS	internal transcribed spacers	Vùng đệm phiên mã bên trong của cụm gene rRNA - gồm hai vùng biến thiên ITS1 và ITS2 ngăn cách bởi gene rRNA 5.8S, nằm giữa 18S và 28S rRNA
MCMC	Markov chain Monte Carlo	Phương pháp Monte Carlo dựa trên chuỗi Markov
MDA	Malondyaldehyde	Malondyaldehyde
MIC	Minimum Inhibitory Concentration	Nồng độ ức chế tối thiểu
MFC	Minimum Fungicidal Concentration	Nồng độ diệt nấm tối thiểu
NCBI	National Center for Biotechnology Information	Trung tâm Thông tin Công nghệ Sinh học Quốc gia (Hoa Kỳ)
OD	Optical density	Mật độ quang
PCR	Polymerase chain reaction	Phản ứng chuỗi polymerase
PDA	Potato Dextrose Agar	Môi trường thạch khoai tây

PDB	Potato Dextrose Broth	Môi trường khoai tây lỏng
PTP	Poisson Tree Processes	Phương pháp phân định loài dựa trên cây phát sinh chủng loài, sử dụng mô hình thống kê Poisson
TCA	Trichloroacetic acid	Acid trichloroacetic
TBA	Thiobarbituric acid	Acid thiobarbituric
TEF1-α	translation elongation factor 1-α	vùng gene mã hóa protein yếu tố kéo dài dịch mã 1-α
TUB2	Gene beta-tubulin	Gene mã hóa protein beta-tubulin
ROS	Reactive oxygen species	Các gốc oxy hóa tự do có nguồn gốc từ oxy
UV-Vis	UV-Vis	Máy quang phổ hấp thụ phân tử ngoại - khả kiến
SDW	Sterile Distilled Water	Nước cất khử trùng
WA	Water Agar	Môi trường thạch nước

DANH MỤC HÌNH, BIỂU ĐỒ

Hình 1.1. Phân bố của cây sen (*N. nucifera)* trên thế giới 6
Hình 1.2. Sơ đồ quá trình sinh trưởng phát triển của cây sen 7
Hình 3.1. Các địa điểm phân lập và sự phân bố các chi nấm liên quan đến các triệu chứng bệnh hại trên cây sen trồng ở Thành phố Huế.....43
Hình 3.2. Cấu trúc phân bố các chi nấm gây hại trên cây sen trồng ở Thành phố Huế. 47
Hình 3.3. Cây phát sinh loài Maximum likelihood (ML) của chi *Lasiodiplodia* với 6 chủng phân lập đại diện được xây dựng từ tệp dữ liệu trình tự căn chỉnh ghép nối của 3 locus ITS + *TUB2* + *TEF1-α* 50
Hình 3.4. Cây phát sinh loài Maximum likelihood (ML) của chi *Neofusicoccum* với 4 phân lập đại diện từ cây sen *Nelumbo nucifera* trồng ở Thành phố Huế được xây dựng từ tệp dữ liệu trình tự căn chỉnh ghép nối của 2 locus ITS + *TUB2*. 51
Hình 3.5. Cây phát sinh loài Maximum likelihood (ML) của 26 chủng phân lập đại diện và các phân lập tham chiếu thuộc chi *Curvularia* dựa trên tệp dữ liệu kết hợp 2 locus ITS + *GAPDH* 57
Hình 3.6. Cây phát sinh loài Maximum likelihood (ML) của chi *Exserohilum* dựa trên tệp dữ liệu kết hợp 2 locus ITS + *GAPDH.*.....61
Hình 3.7. Cây phát sinh loài Maximum likelihood (ML) của chi *Nigrospora* dựa trên tệp dữ liệu trình tự căn chỉnh ghép nối của 3 locus ITS + *TUB2* + *TEF1-α*.....64
Hình 3.8. Cây phát sinh loài Maximum likelihood (ML) của phức hợp loài gloeosporioides được xây dựng từ tệp dữ liệu trình tự căn chỉnh ghép nối của 6 locus ITS, *GAPDH*, *CHS-1*, *ACT*, *TUB2* và *ApMAT*.....68
Hình 3.9. Cây phát sinh loài Maximum likelihood (ML) của phức hợp loài orchidearum với hai phân lập đại diện VNHUCC.NEL92 và VNHUCC.NEL102 được xây dựng từ tệp dữ liệu trình tự căn chỉnh ghép nối của 5 locus ITS, *GAPDH*, *CHS-1*, *ACT* và *TUB2* 71
Hình 3.10. Cây phát sinh loài Maximum likelihood (ML) của 3 phân lập đại diện và các phân lập tham chiếu thuộc chi *Neopestalotiopsis* dựa trên tệp dữ liệu kết hợp 3 locus ITS + *TUB2* + *TEF1-α* 76
Hình 3.11. Biểu đồ phân tích GCPSR cho thấy kết quả của thử nghiệm PHI đối với các loài *Neopestalotiopsis* mới (VNHUCC.NEL13 làm phân lập đại diện) với các loài có

quan hệ gần gũi nhất bằng cách sử dụng phép biến đổi Log-Det và Splits Decomposition. 77
Hình 3.12. Cây phát sinh loài Maximum likelihood (ML) của 3 chủng phân lập đại diện và các phân lập tham chiếu thuộc chi *Diaporthe* (phân chi *Foeniculina)* dựa trên tệp dữ liệu kết hợp 3 locus ITS + *TUB2* + *TEF1-α*.....81
Hình 3.13. Cây phát sinh loài Maximum likelihood (ML) của phân lập đại diện VNHUCC.NEL40 và các phân lập tham chiếu thuộc chi *Diaporthe* (phân nhóm Longicolla, nhóm Araceae*)* dựa trên tệp dữ liệu kết hợp 3 locus ITS + *TUB2* + *TEF1-α*. 83
Hình 3.14. Cây phát sinh loài Maximum likelihood (ML) của VNHUCC.NEL04 và các chủng phân lập tham chiếu thuộc chi *Diaporthe* (phân nhóm Longicolla*)* dựa trên tệp dữ liệu kết hợp 2 locus *TUB2* + *TEF1-α*.....84
Hình 3.15. Cây phát sinh loài (ML) của VNHUCC.NEL83, VNHUCC.NEL89, VNHUCC.NEL77 và các chủng phân lập tham chiếu thuộc chi *Diaporthe* (phân nhóm Sojae*)* dựa trên tệp dữ liệu kết hợp 2 locus *TUB2* + *TEF1-α* 85
Hình 3.16. Biểu đồ Heatmap thể hiện hiệu lực ức chế sinh trưởng sợi nấm (%) của 29 chủng phân lập đại diện ở các nồng độ nano bạc khác nhau.....94
Hình 3.17. Sự phân bố các giá trị EC_{50} của các chủng phân lập thử nghiệm theo mô hình Probit log_{10} 97
Hình 3.18. Ảnh hưởng của nano bạc đến sự sinh trưởng và hình thái tản nấm của 4 chủng nấm đại diện của 4 chi khác nhau theo thời gian và nồng độ. (A). VNHUCC.NEL18 (*N. parvum)*, (B). VNHUCC.NEL56 (*E. rostratum)*, (C). VNHUCC.NEL13 (*Neopestalotiopsis* sp.), (D). VNHUCC.NEL 30 (*N. lacticolonia)* 99
Hình 3.19. Ảnh hưởng của nano bạc đến sự sinh trưởng và hình thái tản nấm của *L. theobromae* – VNHUCC.NEL38 theo thời gian và nồng độ.....100
Hình 3.20. Ảnh hưởng của nano bạc đến sự sinh trưởng và hình thái tản nấm theo thời gian và nồng độ nano bạc khác nhau trên môi trường PDA của 4 chủng phân lập thuộc chi *Curvularia* (A) C. *plantarum*, (B). *C. dactyloctenicola*, (C). *C. suttoniae*, (D). *C. verruculosa* 101
Hình 3.21. Ảnh hưởng của nano bạc đến sự sinh trưởng và hình thái tản nấm theo thời gian và nồng độ nano bạc khác nhau trên môi trường PDA của 3 chủng phân lập thuộc chi *Curvularia* (A) C. *radicifoliigena*, (B). *C. lunata*, (C). *C. senegalensis*.....102

Hình 3.22. Ảnh hưởng của nano bạc đến sự sinh trưởng và hình thái tản nấm theo thời gian và nồng độ nano bạc khác nhau trên môi trường PDA của 4 chủng phân lập chưa xác định loài thuộc chi *Curvularia*: VNHUCC.NEL37, VNHUCC.NEL31, VNHUCC.NEL80, VNHUCC.NEL94 103
Hình 3.23. Ảnh hưởng của nano bạc đến sự sinh trưởng và hình thái tản nấm theo thời gian và nồng độ nano bạc khác nhau trên môi trường PDA của 4 chủng phân lập thuộc chi *Colletotrichum* (A) C. *tropicale*, (B). *C. fructicola*, (C). *C. endophytica,* (D). *C. plurivorum* 104
Hình 3.24. Ảnh hưởng của nano bạc đến sự sinh trưởng và hình thái tản nấm theo thời gian và nồng độ nano bạc khác nhau trên môi trường PDA của 3 chủng phân lập nấm thuộc loài phức hợp *Colletotrichum siamense:* VNHUCC.NEL10, VNHUCC.NEL70, VNHUCC.NEL72 105
Hình 3.25. Ảnh hưởng của nano bạc đến sự sinh trưởng và hình thái tản nấm theo thời gian và nồng độ nano bạc khác nhau trên môi trường PDA của 4 chủng phân lập nấm thuộc chi *Diaporthe* 106
Hình 3.26. Thử nghiệm resazurin với 8 chủng phân lập đại diện nhằm xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) 108
Hình 3.27. Ảnh hưởng của nano bạc đến khả năng tăng sinh khối (khô) của các chủng phân lập thử nghiệm sau 3 ngày nuôi cấy 110
Hình 3.28. Biểu đồ Heatmap tác động của nano bạc đến sự xu hướng thay đổi giá trị hấp thụ ở bước sóng OD_{260} của 8 chủng phân lập thử nghiệm khác nhau theo các nồng độ xử lý nano bạc 111
Hình 3.29. Biểu đồ cho thấy xu hướng rò ri acid nucleic (OD_{260}) theo thời gian tiếp xúc ở các nồng độ khác nhau. 112
Hình 3.30. Biểu đồ phân tán (Scatter plot) cho thấy xu hướng chung các giá trị độ dẫn điện ngoại bào (EEC) quan sát được ở các chủng phân lập theo thời gian khi xử lý nano bạc ở các nồng độ khác nhau. 114
Hình 3.31. Sự biến động giá trị EEC quan sát được theo thời gian của từng phân lập thử nghiệm.. 115
Hình 3.32. Sự suy giảm hàm lượng ergosterol khi xử lý với nano bạc ở các nồng độ khác nhau. 117
Hình 3.33. Hàm lượng MDA (µmol/g) khi xử lý với nano bạc sau 48 giờ. 119

Hình 3.34. Xu hướng biến động hoạt độ của 2 enzyme superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) ở các nồng độ xử lý khác nhau sau 48 giờ. 120
Hình 3.35. Những tác động vi thể của nano bạc ở các nồng độ khác nhau lên hình thái sợi nấm và bào tử *C. plantarum* (VNHUCC.NEL93) ở vật kính 40X. 124
Hình 3.36. Những tác động vi thể của nano bạc ở các nồng độ khác nhau lên hình thái sợi nấm và bào tử *C. radicifoliigena* ở vật kính 40X.....125
Hình 3.37. Những tác động của nano bạc ở các nồng độ khác nhau lên hình thái ở cấp độ vi thể của sợi nấm và bào tử *E. rostratum* (VNHUCC.NEL56) ở vật kính 40X. 126
Hình 3.38. Những tác động của nano bạc ở các nồng độ khác nhau lên hình thái ở cấp độ vi thể của sợi nấm và bào tử *A. niger* (VNHUCC.NEL160) ở vật kính 40X. 127
Hình 3.39. Những tác động của nano bạc ở các nồng độ khác nhau lên hình thái ở cấp độ vi thể của sợi nấm và bào tử *L. theobromae* (VNHUCC.NEL38) ở vật kính 40X.....128
Hình 3.40. Những tác động của nano bạc ở các nồng độ khác nhau lên hình thái ở cấp độ vi thể của sợi nấm và bào tử *C. siamense* (VNHUCC.NEL10) ở vật kính 40X.....129
Hình 3.41. Mô hình giả thuyết con đường tác động của nano bạc lên sự phát triển nấm 133

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1.Thống kê vi sinh vật (nấm và sinh vật giống nấm) liên quan đến các triệu chứng bệnh hại trên cây sen được báo cáo từ 2008 - 2025 17
Bảng 2.1. Trình tự các mồi (primer) sử dụng trong quá trình định danh loài.....35
Bảng 2.2. Các locus kết hợp được lựa chọn sử dụng tương ứng với từng chi.....37
Bảng 3.1. Thống kê các chủng phân lập nấm đã được định danh đến loài trong nghiên cứu 87
Bảng 3.2. Tổng hợp các chủng đã định danh và thông tin triệu chứng bệnh hại điển hình tương ứng.....89
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 96 109
Bảng 3.4. Tác động vi thể của nano bạc đến bào tử và sợi nấm của tám chủng phân lập nấm đại diện.....130

MỞ ĐẦU

1. TÍNH CẤP THIẾT CỦA ĐỀ TÀI

Sen (*Nelumbo nucifera*) là 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 của các 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, 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 và vitamin có trong hoa, lá, hạt và củ sen đã được chứng minh tiềm năng chống viêm và 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 thường xuyên phải đối mặt với nhiều mối đe dọa khác nhau, trong đó có nhiều loại mầm bệnh thực vật gây ảnh hưởng nghiêm trọng. Những tác động này dẫn đến thiệt hại lớn về năng suất cây trồng và tổn thất kinh tế, với ước tính khoảng 25 – 30% sản lượng bị mất đi hàng năm (Ahmed et al., 2023; Fisher et al., 2020; 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, với các giống bản địa đã tạo thành một thương hiệu "sen Huế" nổi tiếng, đặc biệt là các giống sen trắng cổ bên cạnh giống sen hồng Đồng Tháp (sen cao sản) được trồng phổ biến. Tuy nhiên, trong quá trình trồng, canh tác cây sen ghi nhận nhiều tác nhân gây hại, dẫn đến thiệt hại lớn về cả chất lượng, sản lượng, ảnh hưởng trực tiếp đến các hộ nông dân trồng và kinh doanh về sen (Trang et al., 2017). Đáng chú ý, báo cáo của Sở Tài nguyên và Môi trường tỉnh Thừa Thiên Huế về tình hình vụ mùa 2019-2020 cho thấy một số diện tích trồng sen ở các địa phương ở Huế đã ghi nhận hiện tượng chết và bệnh với tỷ lệ cao, một số khu vực có tỷ lệ ghi nhận lên đến 50-70%. Hay theo thống kê của UBND Phong Điền, có đến 100 ha trồng sen bị chết trên tổng 317 ha trồng sen trồng sen trên toàn huyện (Vi, 2019). Hiện tượng này không chỉ ảnh hưởng đến năng suất và chất lượng của cây sen mà còn tiềm ẩn nguy cơ lan rộng các bệnh hại, đặc biệt trong hệ thống thủy đạo đặc trưng của Thành phố Huế, đe dọa các thiệt hại mang tính dây chuyền trong sản xuất nông nghiệp địa phương. 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 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 và công nghệ tiên tiến được phát triển 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 (Davidovits, 2025; Vijayaram et al., 2024; 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 trở thành một giải pháp tiềm năng để 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, giảm thiểu vật chất thừa so với phương pháp canh tác 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 nấm gây bệnh hại và đánh giá hiệu quả của nano bạc trong việc phòng chống các tác nhân này trên cây sen.

2. MỤC TIÊU CỦA NGHIÊN CỨU

2.1. Mục tiêu chung

Xác định được các tác nhân nấm 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 bệnh hại phân lập được trên cây sen trong điều kiện phòng thí nghiệm.

3. 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.

4. 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 và thu mẫu bệnh hại trên cây sen được ghi nhận và tiến hành tại vùng trồng sen đặc trưng ở Thành phố Huế* (Phú Xuân, Thuận Hóa, Hương Trà, Hương Thủy, Phong Điền, Phú Lộc). Quá trình phân lập, đánh giá các chỉ tiêu ảnh hưởng của vật liệu nano bạc được tiến hành thí nghiệm tại Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế.
* Tên địa danh Thừa Thiên Huế các phường, huyện, thị xã được thay đổi thành Thành phố Huế và các quận, huyện, thị xã tương ứng theo Nghị quyết số 1314/NQ-UBTVQH15, Ủy ban Thường vụ Quốc hội (có hiệu lực từ 1/1/2025).

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

5.1. Ý nghĩa khoa học

Kết quả nghiên cứu của đề tài cung cấp dẫn liệu khoa học mới có tính hệ thống và có giá trị về phân loại học của các tác nhân nấm liên quan đến các triệu chứng bệnh hại trên cây sen trồng ở Thành phố Huế, từ đó làm rõ sự đa dạng về chủng loại và phân bố, 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. Việc áp dụng kết hợp các phương pháp mới, hiện đại như giải trình tự DNA, phân tích phát sinh loài đa locus, phương pháp xác định ranh giới loài (GCPSR và PTP) cùng phân tích hình thái cho phép xác định chính xác loài nấm gây hại, nâng cao độ tin cậy trong nghiên cứu.

Nghiên cứu cung cấp dữ liệu quan trọng về hiệu quả kháng nấm và cơ chế sinh hóa của nano bạc lên các chủng phân lập nấm gây hại, qua đó góp phần mở rộng hiểu biết về cơ chế kháng nấm của vật liệu nano bạc. Kết quả nghiên cứu này cũng là nguồn thông tin và tài liệu tham khảo hữu ích cho việc ứng dụng nano bạc trong phòng chống và quản lý bệnh hại trên cây sen.

5.2. Ý nghĩa thực tiễn

Nghiên cứu cung cấp cơ sở khoa học để bước đầu ứng dụng nano bạc làm chất kháng nấm hiệu quả trong quản lý bệnh hại trên cây sen, 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 được các chỉ tiêu, bao gồm: 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. Đây là cơ sở, mở ra hướng đi mới trong việc ứng dụng công nghệ nano vào nền nông nghiệp

bền vững, đặc biệt trong kiểm soát sinh học các bệnh hại thực vật, góp phần thúc đẩy phát triển nông nghiệp xanh, sạch và thân thiện với môi trường.

6. 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 ghi nhận 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 phân lập thử nghiệm đại diện trên môi trường thạch rắn, đồng thời 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 trục 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.

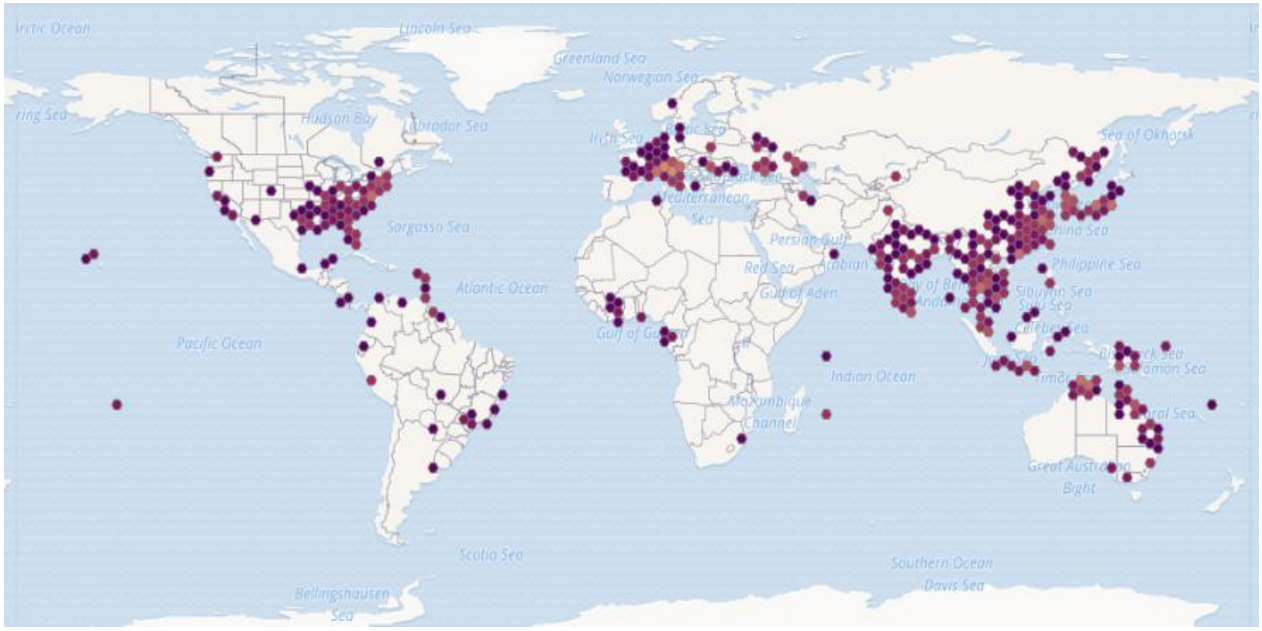
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN VỀ VẤN ĐỀ NGHIÊN CỨU

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, gồm các loài thực vật hai lá mầm (eudicot) có lịch sử tiến hóa lâu đời. Họ thực vật này chỉ chứa một chi với hai loài: *N. nucifera* Gaertn. (danh pháp đồng nghĩa: *N. speciosa* Willd, *Nelumbium speciosum* Willd). và *N. lutea* Willd. (danh pháp đồng nghĩa: *N. pentapetala* (Walter) Fernald và *Nelumbium luteum* Willd.) Pers (Ming et al., 2013), với tên gọi tương ứng phổ biến tương ứng là sen châu Á (phân bố chủ yếu ở Châu Á, châu Úc) và sen Mỹ (chủ yếu ở các bang phía Đông, phía Nam Hoa Kỳ). Cây sen có họ hàng phân loại gần nhất với Proteaceae và Platanaceae (Li, Smith, et al., 2014; Li, Svetlana, et al., 2014; Mukherjee et al., 1996). Mặc dù về mặt lịch sử, chi *Nelumbo* được xem là có quan hệ họ hàng gần với Nymphaeales, các công trình nghiên cứu hệ thống phân loại mới đã nhóm *Nelumbo* với các loài thực vật có lá thấp hơn, đặc biệt là *Platanus.* Do họ Nelumbonaceae giữ vị trí quan trọng trong mối quan hệ phát sinh loài, cây sen trở thành đối tượng có giá trị trong nghiên cứu tiến hóa thực vật (Gandolfo et al., 2004). Tầm quan trọng của cây sen không chỉ nằm ở vai trò trong phân loại học và nghiên cứu tiến hóa mà còn ở khả năng tạo cảnh quan sinh thái, ứng dụng trong y học và nghiên cứu nguồn gốc phát sinh loài, từ đó thu hút sự quan tâm ngày càng lớn từ cộng đồng khoa học.

Tại Trung Quốc, diện tích trồng sen tập trung chủ yếu ở vành đai trung, hạ lưu sông Dương Tử, bao gồm các tỉnh Hồ Bắc, Giang Tô, Chiết Giang, An Huy, Giang Tây và Hồ Nam, với ba phân nhóm công dụng chính: sen lấy củ, sen lấy hạt và sen cảnh. Quy mô canh tác sen lấy củ ước tính khoảng 200.000 ha cho sản lượng hằng năm 3 triệu tấn củ tươi, trong khi sen lấy hạt khoảng 20.000 ha với 15.000 tấn hạt khô (Guo, 2009). Do hạn chế quỹ đất, phần lớn diện tích sen (ước tính khoảng 75% tại Vũ Hán) sử dụng luân phiên hoặc thay thế cho ruộng lúa nước – điều này phản ánh áp lực, cũng như xu hướng chuyển đổi đất nông nghiệp giữa cây lương thực và cây đặc sản giá trị cao (Guo, 2009). Trong khi đó, ở Việt Nam, cây sen được trồng chủ yếu trong các ao, hồ, ruộng chuyển đổi với mục đích chủ yếu là lấy hoa và lấy hạt. Tổng diện tích trồng sen ở nước ta hiện tại ước tính trên 3.000 ha, tập trung ở một số tỉnh như: Hưng Yên, Hải Dương, Thái Bình, Nghệ An, Nam Định, Huế và vùng Đồng bằng sông Cửu Long (Đồng Tháp, Vĩnh Long, Trà Vinh, Long An, Bến Tre). Năm 2024, diện tích trồng sen tại tỉnh Đồng Tháp hiện khoảng 1.108 ha, với sản lượng đến cuối tháng 10/2024 ước đạt 12.163 tấn (Cổng thông tin điện tử Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn).



Hình 1.1. Phân bố của cây sen (*N. nucifera)* trên thế giới. (Dữ liệu được thu thập từ GBIF: https://www.gbif.org/species/2882449, ngày truy cập: 15/09/2023)

Theo khảo sát của Trang (2021) về tình hình trồng sen tại tỉnh Thừa Thiên Huế, tổng diện tích trồng sen tại Thành phố Huế trong cuộc điều tra năm 2017-2018 là 341,12 ha. Theo từng năm, diện tích trồng sen ngày càng được mở rộng, ước tính năm 2020 lên đến 638,92 ha. 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. Diện tích này tập trung chủ yếu ở Phong Điền, Phú Vang, Phú Lộc, Hương Trà (nay là Kim Trà) và thành phố Huế. Đáng chú ý, diện tích trồng sen trên đất ruộng chiếm tỷ lệ lớn, đạt 314,77 ha (tương ứng với 92,28% tổng diện tích trồng sen toàn tỉnh). Trong khi đó, diện tích trồng sen trong các hồ, chủ yếu tập trung tại những vùng, địa điểm gắn liền với quần thể di tích, lịch sử văn hóa của Huế như Đại Nội, các lăng tẩm và và các hệ thống thủy đạo thuộc khu vực nội thành, ước tính chiếm 7-8% tổng diện tích trồng sen toàn tỉnh. Hầu hết các giống sen địa phương, bao gồm sen trắng, được trồng trong các hồ này. Ngoài ra, giống sen cao sản cũng được trồng phổ biến trong toàn tỉnh, chủ yếu tại các ruộng đất phụ cận ở thị xã Hương Trà, huyện Phú Lộc, Phú Vang và Phong Điền, trong khi chỉ một phần nhỏ được trồng trong các hồ ở Thành phố Huế (Trang, 2021). Về phân bố diện tích trồng sen theo địa phương, huyện Phong Điền dẫn đầu với diện tích 196,70 ha, chiếm 57,66% tổng diện tích trồng sen toàn tỉnh. Các địa phương tiếp theo là huyện Phú Vang, Hương Trà, Thành phố Huế (bao gồm cả khu vực bên trong Đại Nội) và huyện Phú Lộc (Trang, 2021).

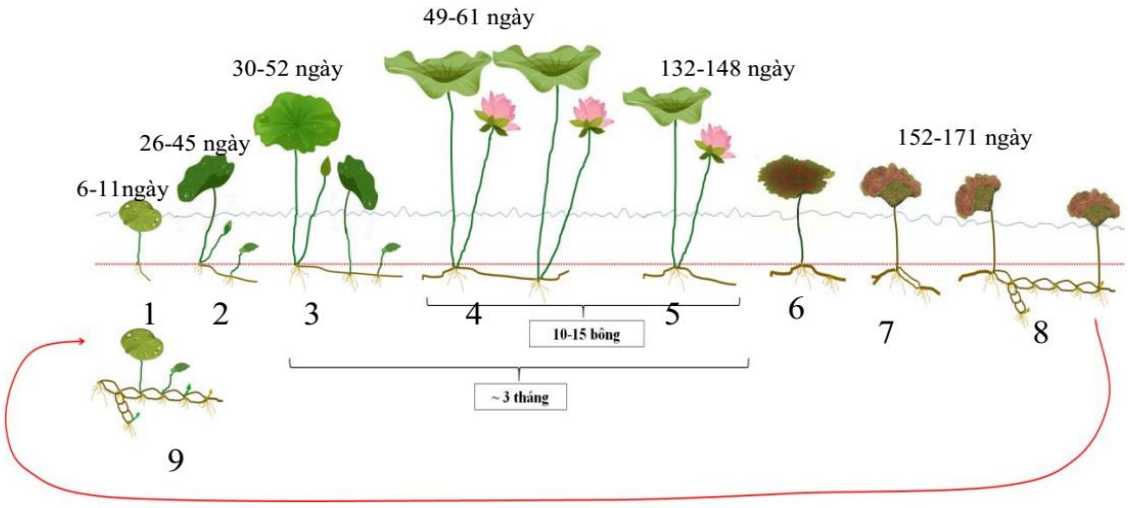
1.1.2. Đặc điểm sinh trưởng của cây sen

Tầm quan trọng của cây sen trong tạo cảnh quan sinh thái, sử dụng làm thuốc và phát sinh loài thực vật, sen ngày càng được giới khoa học quan tâm. Hoa sen là biểu tượng của sự thuần khiết tâm linh và "sự trường tồn" trong cả Phật giáo và Ấn Độ giáo, mang

nhiều giá trị về mặt tôn giáo, kinh tế và y học. Về mặt sinh học, cây sen không chỉ sở hữu các đặc điểm chung của thực vật thủy sinh mà còn có những đặc tính độc đáo giúp phân biệt rõ với các loài thực vật khác, bao gồm: tuổi thọ, hạt vượt trội, đặc tính siêu kỵ nước của lá và cơ chế điều nhiệt độc đáo ở 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. Tính đến nay, đã có gần 1.000 công bố khoa học và nghiên cứu liên quan đến cây sen, tập trung vào nhiều khía cạnh khác nhau, chủ yếu bao gồm các hướng: phân tích các hợp chất chuyển hóa thứ cấp và các hoạt chất có tác dụng dược lý; nghiên cứu đặc điểm hình thái học của cây sen; và các nghiên cứu gần đây về phát sinh loài, mối quan hệ di truyền cũng như giải mã hệ gene của cây sen.

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 tại Thừa Thiên Huế cho thấy, thời gian trung bình từ trồng đến khi sen tàn là 159,3 ngày, dao động từ 152 đến 171 ngày (Trang, 2021).



Hình 1.2. Sơ đồ quá trình sinh trưởng phát triển của cây sen. 1. Lá trải đầu tiên 2. Lá dù đầu tiên 3. Nụ hoa đầu tiên 4. Hoa nở đầu tiên 5. Kết thúc ra hoa 6,7. Hoa tàn 8. Hình thành củ sen 9. Cây con. Nguồn ảnh: Luận án Tiến sĩ của Nguyễn Thị Quỳnh Trang.

Có 3 giống có thời gian sinh trưởng dài nhất là sen cao sản (157 ngày), sen trắng trẹt lồi (169 ngày), sen trắng trẹt lõm (171 ngày). Ba giống còn lại có thời gian sinh trưởng ngắn hơn dao động từ 152-154 ngày. Trong khi đó kết quả nghiên cứu của Nga et al. (2017) các giống sen được trồng tại Hoài Đức - Hà Nội năm 2014 có thời gian từ trồng đến khi sen tàn kéo dài từ 193-208 ngày, lâu hơn các giống sen này trồng ở Thừa Thiên Huế khoảng 1 tháng. Tuy nhiên thời gian từ khi hoa nở đến kết thúc hoa sớm hơn với 63-

70 ngày. Điều đó cho thấy các giống sen trồng trong điều kiện tự nhiên của Thừa Thiên Huế có khả năng sinh trưởng tốt với thời gian xuất hiện của hoa nhanh hơn (53,16 ngày) và thời gian kéo dài của hoa lâu hơn (84-90 ngày).

1.1.2.2. Đặc điểm sinh lý của cây sen

Quang hợp và hô hấp là hai quá trình sinh lý quan trọng và được nghiên cứu nhiều nhất trong khoa học thực vật, bởi sự cân bằng giữa hai quá trình này ảnh hưởng lớn đến khả năng sinh trưởng và năng suất của hầu hết các loại cây trồng (Sharkey, 2024). Quang hợp là quá trình sinh lý giúp thực vật chuyển hóa các chất vô cơ đơn giản như khí CO_2 và nước thành các hợp chất hữu cơ phức tạp, sử dụng năng lượng ánh sáng mặt trời và sự tham gia của các hệ sắc tố quang hợp. Cơ quan chính thực hiện chức năng này ở thực vật là lá. Ở cây sen có 2 dạng lá chính: lá trải và lá dù. Phiến lá của các lá non nhỏ, và cuộn lại ở hai bên. Cấu trúc này giúp lá dễ dàng vươn lên từ thân rễ dưới nước đến bề mặt, dù cây mọc ở vùng nước sâu hay vùng nước nông có bùn.

Quá trình phát triển của lá cây sen diễn ra qua ba giai đoạn chính, mỗi giai đoạn mang những đặc điểm sinh lý và hình thái riêng. Giai đoạn đầu tiên là giai đoạn lá trải, trong đó lá nằm phẳng trên bề mặt nước, tối ưu hóa quá trình quang hợp bằng cách tiếp nhận ánh sáng mặt trời và tối đa hóa diện tích tiếp xúc với nước trong giai đoạn sớm của cây sen. Tiếp theo, cây sen chuyển sang giai đoạn lá dù, đặc trưng với sự ghi nhận dạng lá vươn lên khỏi mặt nước, tạo ra sự xuất hiện đồng thời của cả hai loại lá. Giai đoạn này với sự xuất hiện 2 dạng lá sẽ giúp cây sen tối ưu sinh trưởng trên bề mặt nước, cũng cho quá trình tiếp nhận ánh sáng, tích lũy năng lượng, dinh dưỡng cho giai đoạn ra hoa, tạo hạt. Cuối cùng, trong giai đoạn tạo hạt, lá dù vẫn giữ vai trò quan trọng trong việc duy trì sự sống của cây, trong khi lá trải bắt đầu phân hủy một phần hoặc gần như hoàn toàn, góp phần vào chu trình dinh dưỡng và tạo điều kiện cho sự phát triển của các thế hệ cây sen tiếp theo. Sự phát triển và biến đổi qua các giai đoạn này không chỉ thể hiện khả năng thích nghi sinh học của cây sen với môi trường nước mà còn giúp đảm bảo hiệu quả quang hợp và phù hợp với các giai đoạn phát triển khác nhau của cây sen. Tuổi thọ của hạt, tính kỵ nước của lá và khả năng điều nhiệt của hoa là đặc điểm nổi bật khác của sen, cũng thu hút nhiều nhà khoa học. 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, mà còn về tiềm năng sử dụng lớn của chúng thông qua các thiết bị sinh học (Divakaran et al., 2023, 2024). Một đặc trưng đáng chú ý là 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 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). Do đó, tính siêu kỵ nước được cho là một lợi thế được bảo tồn trong quá trình tiến hóa của cây sen. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng lợi thế này là nhờ một lớp nhú sáp dày đặc trên bề mặt lá sen (Marmur, 2004; Zhang et al., 2012). Các hạt nước khi xuất hiện trên bề mặt lá sen, sẽ dễ dàng lăn có thể giúp loại bỏ các hạt bụi bẩn bám trên bề mặt lá và dẫn đến hiện tượng tự làm sạch và hiện tượng này phụ thuộc lớn vào góc tiếp xúc (Bhushan et al., 2009; Shao et al., 2020). Đặc tính này của cây sen vận hành như một hàng rào ngăn chặn tiền xâm nhiễm, làm gián đoạn chuỗi sự kiện xâm nhiễm của các tác nhân gây hại: bào tử khó lưu lại trên bề mặt, không hình thành màng nước liên tục cho sự nảy mầm và phát triển ống mầm, đồng thời hạn chế vận chuyển thụ động và bám dính của vi sinh vật lên bề mặt lá. Những thông tin này sẽ là cơ sở khoa học vững chắc cho các nghiên cứu chuyên sâu quan đến cây sen trong tương lai.

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.

Sự phát triển của sinh học phân tử, dữ liệu trình tự và bộ gen vì thế đã cung cấp thêm các tiêu chí nhận diện mới có độ phân giải cao hơn, đồng thời thúc đẩy các đề xuất thay thế. Mặc dù đã có nhiều tiến bộ trong phân loại nấm, việc kết hợp kỹ thuật phân tử với cách tiếp cận hình thái và sinh thái đã chỉ ra nhiều thiếu hụt, hay thiếu nhất quán của các tiêu chí phân định loài từng được đề xuất. Nấm có hình thái đa dạng, vai trò sinh thái phong phú và các kiểu dinh dưỡng khác nhau, vừa quan trọng đối với ổn định hệ sinh thái vừa có giá trị công nghiệp, vì vậy định danh chính xác là tối quan trọng. Hiện nay, tốc độ mô tả loài mới ghi nhận hơn 2.000 loài/năm; tuy nhiên, chỉ dựa vào hình thái dễ gây sai lệch do lai hóa, loài tiềm ẩn, hội tụ và tính dẻo kiểu hình. Trong khi, chỉ dựa đơn thuần vào phát sinh phân tử cũng gặp vấn đề do hệ quả của việc sử dụng hệ thống

danh pháp kép trước thời phân tử, thiếu hoặc sai lệch dữ liệu trình tự trong cơ sở dữ liệu NCBI. Cách tiếp cận omics (transcriptome, proteome, metabolome) mang tính bổ trợ nhưng đòi hỏi tiêu chuẩn hóa điều kiện, tái lập và khung phân tích đa biến rõ ràng để tránh suy luận quá mức. Do đó, lựa chọn chiến lược tối ưu vẫn là một thách thức phụ thuộc bối cảnh nghiên cứu, mục tiêu phân giải và nguồn lực sẵn có.

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). Nói cách khác, tranh cãi về loài phần lớn bắt nguồn từ việc đồng nhất hóa định nghĩa lý thuyết với các bằng chứng vận dụng. Cho đến nay, chưa có một định nghĩa thống nhất áp dụng nhất quán cho toàn bộ cây sự sống. Taylor và cộng sự (2000) đã đề xuất sử dụng thuật ngữ "species recognition" cho các tiêu chí thao tác như hình thái, sinh học (cách ly sinh sản), phát sinh và "đồng quy phả hệ phát sinh" (GCPSR), thay vì gọi chung là "species concept". Quá trình hình thành loài là sự phân kỳ động dưới tác động của chọn lọc tự nhiên, đột biến, di nhập gene và trôi dạt di truyền. Bối cảnh địa lý đặc biệt quan trọng: cách ly địa lý (allopatry) thường gặp, nhưng cũng có trường hợp đồng vị trí (sympatry) qua tăng cường hóa cách ly tiền hợp tử. Lai hóa và nhập gene có thể chi phối mạnh cấu trúc di truyền, đặc biệt trong các khu hệ nấm gây bệnh cây trồng chịu áp lực chọn lọc của ký chủ và hoạt động canh tác. Quá trình thuần hóa cây trồng thường kéo theo đồng tiến hóa ký chủ–mầm bệnh, qua đó thúc đẩy phân kỳ ở các dòng nấm hiện diện trên cây. Đa dạng hình thức sinh sản (vô tính, hữu tính) cùng các biến cố thay đổi bội thể góp phần tạo biến dị và thiết lập rào cản sinh sản ở nhiều mức độ.

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. Trong thực

hành ghi nhận và ranh giới loài, các hệ tiêu chí hiện hành bổ sung cho nhau nhưng mỗi hệ đều có giới hạn cần cân nhắc theo dữ liệu và bối cảnh nghiên cứu.

+ Tiêu chí hình thái vẫn là công cụ nhận dạng loài phổ biến, hữu dụng rộng rãi, đặc biệt là khả năng áp dụng trực tiếp tại hiện trường thu mẫu và mẫu nuôi cấy, nhưng dễ bị tác động bởi các yếu tố chủ quan, chịu ảnh hưởng môi trường, sự vắng mặt hoặc hiếm gặp của giai đoạn hữu tính, cùng vòng đời không đầy đủ, làm suy giảm lực phân giải ở cấp loài và che khuất các đơn vị tiến hóa độc lập. Vì vậy, nếu không tích hợp với dữ liệu phân tử, sinh thái hoặc di truyền, tiêu chí hình thái dễ bỏ sót "loài tiềm ẩn" và dẫn đến kết luận thiếu khách quan.

+ Tiêu chí sinh học dựa trên cách ly sinh sản có giá trị khi có thể ghi nhận giao phối hữu tính và kiểm chứng lai thử. Dẫu vậy, cách tiếp cận này không khả dụng cho nhóm vô tính, tự phối, hoặc các quần thể có sự cách ly địa lý - nơi không thể thực hiện thử nghiệm giao phối. Trong bệnh cây, nhiều tác nhân nấm hình thức sinh sản vô tính chiếm ưu thế, khiến tiêu chí này thường chỉ mang tính tham khảo.

+ Tiêu chí sinh thái nhấn mạnh sự thích nghi với hốc sinh thái (chuyên hóa ký chủ, vi môi trường trên mô cây-vật chủ, điều kiện canh tác). Mặc dù hữu ích để nhận diện khác biệt chức năng và tiềm năng dịch tễ học, tiêu chí này hiếm khi đủ mạnh để xác định ranh giới loài một cách độc lập, do hội tụ thích nghi và sự chồng lấp hốc sinh thái giữa các dòng dõi gần gũi.

+ Tiêu chí phát sinh loài dựa trên dữ liệu trình tự DNA hiện là một trụ cột của phân định ranh giới loài. Trên nền tảng này, nhóm phương pháp dựa trên nhận diện đồng quy (coalescent-based species recognition) — các mở rộng của nhận dạng loài theo phả hệ — được áp dụng rộng rãi, với các phương pháp tiêu biểu gồm GMYC (General Mixed Yule Coalescent), PTP (Poisson Tree Processes), BPP (Bayesian Phylogenetics and Phylogeography), mô hình MSC (multispecies coalescent), STACEY (Species Tree and Classification Estimation, Yarely), và split networks. Các phương pháp đồng quy này đặc biệt hữu hiệu trong: (i) phát hiện loài tiềm ẩn (cryptic species), (ii) trực quan hóa và định vị các tín hiệu không tương hợp giữa locus, và (iii) tách biệt các đơn vị tiến hóa độc lập trong các phức hợp loài có phân nhánh nông hoặc tín hiệu hình thái hội tụ. Tuy nhiên, chúng cũng có những hạn chế: nguy cơ "quá chia nhỏ" (over-splitting) khi tín hiệu phân nhánh nông hay khi thiết kế lấy mẫu chưa tối ưu. Trong những bối cảnh cây phát sinh loài có mức độ hỗ trợ yếu hoặc dữ liệu hạn chế, các phương pháp dựa trên khoảng cách (distance-based species recognition) có thể đóng vai trò hỗ trợ. Đáng chú ý, ABGD (Automatic Barcode Gap Discovery) là một phương pháp dựa trên khoảng cách được dùng phổ biến để gợi ý ranh giới loài bằng cách phát hiện "khoảng trống mã vạch" trong phân bố các khoảng cách theo từng cặp. Phương pháp này không yêu cầu

cây phát sinh chủng loại, vì dựa trực tiếp trên ma trận khoảng cách di truyền. ABGD đặc biệt hữu ích để đề xuất ranh giới loài sơ bộ, phát hiện các cụm tiềm năng và hỗ trợ nhận diện sai lệch phân loại (Kekkonen et al., 2015; Puillandre et al., 2012). Dù vậy, phương pháp này thiếu ngữ cảnh tiến hóa (không mô hình hóa quá trình sinh loài) và phụ thuộc mạnh vào ngưỡng khoảng cách. Vì vậy, các kết quả cần được kiểm chứng bằng phương pháp phát sinh/xác suất và đối chiếu với dữ liệu sinh thái–ký chủ và kiểu hình gây bệnh.

Bối cảnh này càng phức tạp hơn ở các nhóm nấm gây bệnh thực vật và các sinh vật giống nấm (oomycetes) – luôn đặt ra yêu cầu về tên gọi chính xác, điều có ý nghĩa thiết yếu đối với chẩn đoán bệnh, kiểm soát, kiểm dịch, thương mại cây trồng và các nghiên cứu liên quan. Tên loài không chỉ phục vụ mục đích chung là truyền đạt ngắn gọn mà còn rất quan trọng cho việc kiểm dịch thực vật hiệu quả, ngăn chặn sự xâm nhập của các mầm bệnh mới vào một khu vực. Đặc biệt ở một số chi, sự bất đồng giữa các định nghĩa khái niệm loài phổ biến dẫn đến nhiều tranh cãi về các loài tiềm ẩn. Đồng thời, nhiều tác nhân gây bệnh thể hiện tính đa hình rõ rệt, tồn tại cả dạng vô tính (anamorph) và hữu tính (teleomorph) khác nhau trong vòng đời. Trước kỷ nguyên phân tử, các dạng này thường được đặt trong hệ thống danh pháp kép (dual nomenclature), gây nhầm lẫn và cản trở quá trình tổng hợp, đối chiếu giữa các nghiên cứu. Sự phát triển của sinh học phân tử, công nghệ DNA đã cho phép liên kết các dạng hình khác nhau về cùng một thực thể tiến hóa, thúc đẩy sự chuyển dịch sang một hệ thống phân loại tự nhiên hơn, trong đó một chi và một loài được gắn với một tên duy nhất "One fungus = One name", và được khẳng định với tuyên bố Amsterdam về danh pháp nấm (Hawksworth et al., 2009). Ứng dụng công nghệ trình tự DNA để liên kết các dạng hữu tính (teleomorph) và vô tính (anamorph) của nấm được khai thác sớm nhất ở các nhóm có ý nghĩa y học và ở nấm men, từ đó thúc đẩy bước tiến mạnh mẽ trong sinh học bệnh cây, thúc đẩy một hướng nghiên cứu mới là sinh học phân tử bệnh cây phát triển: xác định và phân loại nấm gây bệnh thực vật ngày càng dựa trên trình tự của các chỉ thị di truyền chuẩn hóa, còn gọi là mã vạch DNA (DNA barcoding). Nền tảng của cách tiếp cận này dựa vào các kho lưu trữ công cộng như International Nucleotide Sequence Database Collaboration (INSDC; http://www.insdc.org/) và UNITE (cơ sở dữ liệu chuyên dụng cho nhận diện phân tử nấm; http://unite.ut.ee), hay các trang thông tin cơ sở dữ liệu nấm như Mycobank, Index Fungorum nơi cung cấp hàng trăm nghìn trình tự nấm đã được thẩm định về chất lượng và gắn đúng tên khoa học. Đặc biệt, dự án trình tự kiểu mẫu (TYPE sequence) của NCBI cho phép truy xuất các trình tự liên kết với chủng TYPE (TYPE material) – tức mỗi tên loài có một chủng TYPE duy nhất kèm thông tin dữ liệu liên quan (metadata) — nhờ vậy tăng độ tin cậy khi suy luận định danh và đối sánh trình tự (Lücking et al., 2021).

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 bệnh 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 thị phân tử (marker) 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 các vùng gene, kiểu hình và sinh thái. Dù vậy, việc gán tên chính xác cho loài vẫn đối mặt với nhiều thách thức do biến thiên hình thái, tái tổ hợp hiếm, lai hóa, và sự không đồng bộ giữa dữ liệu hình thái, sinh thái và gene (James et al., 2020; Smith, 2024).

Bên cạnh đó, một khía cạnh quan trọng của DNA barcode là chọn đúng locus hoặc dấu hiệu chỉ thị để tiến hành so sánh. Hiệp hội Mã vạch Sự sống (Consortium for the Barcode of Life - CBOL) đã đề xuất vùng liên gene Internal Transcribed Spacer (ITS) của cụm rDNA nhân như mã vạch DNA phổ quát cho giới nấm. Đến nay, ITS vẫn là marker được sử dụng rộng rãi và chứng minh tính phổ quát cao trong nhận diện nấm ở quy mô rộng. Tuy nhiên, đối với nhiều chi nấm, locus ITS chỉ phân giải tốt các đơn vị phân loại đến cấp chi. Do đó, nhiều mã vạch DNA thứ cấp khác nhau từ đó đã được đề xuất, ứng dụng cho một hàng loạt các chi nấm hay phức hợp loài quan trọng khác nhau như *Colletotrichum, Diaporthe*, *Trichoderma*, *Aspergillus* hay các loài nấm gỉ sắt (Pucciniales) (Liu et al., 2022; Norphanphoun et al., 2022; Tedersoo et al., 2025; Tedersoo et al., 2025; Torres-Cruz et al., 2025; Voigt et al., 2021; Wang et al., 2022; Zhao et al., 2023). Tùy mục đích nghiên cứu và bối cảnh tiến hóa của từng chi, các locus như *TEF1-α* (translation elongation factor 1-alpha), *RPB1/RPB2* (RNA polymerase II largest/second-largest subunit), *TUB2* (β-tubulin), *CAL* (calmodulin), *ACT* (actin), hoặc *GAPDH* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) đã chứng minh giá trị tăng cường độ phân giải ở mức loài và dưới loài. Với tác nhân gây bệnh thực vật, cách tiếp cận này trực tiếp cải thiện đáng kể khả năng nhận dạng tác nhân gây hại và giám sát bệnh; đánh giá nguy cơ xâm nhập, từ đó xây dựng các chiến lược phòng chống hiệu quả.

1.3. TỔNG QUAN TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU BỆNH HẠI TRÊN CÂY SEN

Cây sen (*N. nucifera*) là một loại cây thủy sinh có vai trò quan trọng không chỉ về mặt kinh tế mà còn mang đậm giá trị văn hóa tại nhiều quốc gia nhiệt đới và cận nhiệt đới. Tuy nhiên, điều kiện ẩm ướt, nền nhiệt cao phía trên bề mặt lá, điển hình của môi trường thủy sinh bán ngập nước tại các vùng trồng sen đã tạo điều kiện thuận lợi cho sự phát triển và lây lan của nhiều loại tác nhân gây bệnh, bao gồm nấm, vi khuẩn và virus. Những tác nhân này ảnh hưởng tiêu cực đến năng suất, chất lượng của cây sen, gây thiệt

hại kinh tế đáng kể cho người nông đân. Trong những năm gần đây, nhiều nghiên cứu đã được tiến hành nhằm xác định, đánh giá thực trạng và làm rõ nguyên nhân các bệnh hại trên cây sen tại các vùng trồng sen khác nhau trên thế giới.

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

Tại huyện Quảng Xương, tỉnh Giang Tây, Trung Quốc, bệnh đốm lá trên cây sen đã ảnh hưởng khoảng 20% trong tổng diện tích 7500 ha trồng sen. Triệu chứng ban đầu gồm các đốm nhỏ 1-3 mm, màu nâu vàng, tâm đốm đen nhạt và viền vàng nâu, sau đó lá xuất hiện hoại tử rõ rệt. Bệnh phát sinh và phát triển mạnh từ tháng 6 đến tháng 9 hàng năm. Năm 2019, nghiên cứu của Zhang et al. đã phân lập, xác định tác nhân gây bệnh dựa trên đặc điểm hình thái học và định danh tác nhân gây bệnh là nấm *Alternaria tenuissima*. Ngoài *A. tenuissima*, nghiên cứu của Gong et al. (2022) cũng ghi nhận một loài *Alternaria* khác liên quan đến triệu chứng đốm lá trên cây sen là *A. alternata.* Bên cạnh đó, chi *Curvularia* – một chi có phát sinh loài gần gũi với *Alternaria* cũng được xác định có liên quan đến triệu chứng đốm lá trên sen ở Trung Quốc với loài được xác định là *Curvularia lunata*. Cụ thể, ban đầu trên bề mặt lá xuất hiện các đốm có màu nâu tím, kích thước từ 0,5 đến 3 cm. Sau đó, các đốm này phát triển thành các tâm màu trắng xám, bao quanh bởi các dải màu nâu đen ở mép đốm (Cui & Sun, 2012).

Zhang et al. (2018) đã thực hiện khảo sát nguyên nhân gây cháy lá trên giống sen Taikonglian 36 tại Phúc Kiến, Trung Quốc. Kết quả cho thấy hiện tượng này ảnh hưởng đến 40% diện tích lá sen, tương đương 0,75 ha trên tổng số 4 hồ trồng. Triệu chứng ban đầu xuất hiện trên lá là các đốm nhỏ không đều màu trắng xám, kích thước từ 1-3 mm, có đường viền nâu bao quanh. Sau đó, các vết bệnh lan rộng lên 1–2 cm, chuyển sang màu nâu với viền vàng nhạt bao quanh. Nhóm nghiên cứu tiến hành phân lập và định danh phân tử bằng cặp mồi ITS1 – ITS4. Kết quả so sánh trình tự với cơ sở dữ liệu Genbank cho thấy tác nhân gây bệnh là nấm *Nigrospora oryzae* với độ tương đồng 98%. Đây là báo cáo đầu tiên ghi nhận *N. oryzae* gây bệnh trên cây sen tại Trung Quốc. Gần đây, Gong et al., (2023) đã xác định một loài *Nigrospora* khác - *N. pyriformis* liên quan đến các triệu chứng trên lá và gân lá sen tại Quảng Xương, tỉnh Giang Tây, Trung Quốc. Quá trình định danh phân tử dựa trên ba vùng gen ITS, *TUB2* và *TEF1*-α để xác định chính xác tác nhân này. Triệu chứng điển hình của bệnh do *N. pyriformis* gây ra là các đốm đen gần tròn xuất hiện ở giai đoạn đầu của sự lây nhiễm. Ở giai đoạn tiến triển, vết bệnh lan dọc theo gân lá, tạo thành các vùng hoại tử dạng lưới, dẫn đến tình trạng nhiễm bệnh toàn bộ lá và gây chết khoảng 20% số lá.

Bệnh phấn trắng cũng được ghi nhận tại hồ trồng sen ở Thanh Đảo, tỉnh Sơn Đông, Trung Quốc. Tác nhân gây bệnh được xác định là nấm *Erysiphe takamatsui* thông

qua việc phân tích các đặc điểm hình thái và phân tử dựa trên trình tự gene rDNA ITS và rRNA 28S (Zhou et al., 2019).

Năm 2018, Chen & Kirschner tiến hành một nghiên cứu với mục đích phân lập, xác định nấm từ lá sen (*N. nucifera*) ở Đài Loan, bao gồm nấm ngoại ký sinh, ký sinh và nội sinh bằng cách sử dụng kết hợp các đặc điểm phân tử và hình thái. Từ tổng số 1002 mẫu bệnh thực vật, nhóm nghiên cứu đã phân lập nuôi cấy 476 chủng, với 33 loài chính. Các loài chủ yếu thuộc các chi *Colletotrichum* (phần lớn *C. siamense*), *Diaporthe* (*D. tulliensis* và *D. ueckerae*) và *Fusarium* (*F. solani*). Kết quả cũng cho thấy tỷ lệ lớn các chủng nấm được phân lập từ phiến lá (chiếm 71%) so với cuống lá (chiếm 29%). Đáng chú ý, nghiên cứu lần đầu tiên ghi nhận sự xuất hiện của *Erysiphe takamatsui* và *Pseudocercospora nymphaeacea* tại Đài Loan. Trước đó, *E. takamatsui* chỉ được ghi nhận tại Nhật Bản và Trung Quốc. Đây được xem là một trong những nghiên cứu mang tính hệ thống toàn diện đầu tiên về các vi sinh vật (nấm) liên quan đến cây sen (*N. nucifera*) trên thế giới tính đến thời điểm hiện tại.

Các nghiên cứu khác cũng ghi nhận sự hiện diện phong phú và đa dạng của tác nhân nấm *Fusarium*, chủ yếu liên quan đến các bệnh thối nhũn và héo trên cây sen. Năm 2020, Wang et al. đã phân lập được tác nhân gây bệnh thối nhũn trên cây sen tại các ruộng trồng ở Vũ Hán, Trung Quốc với các triệu chứng điển hình như mép lá héo và vết bệnh màu nâu sẫm. Quá trình định danh phân tử được tiến hành với kết quả là *Fusarium incarnatum* với mức độ tương đồng tương ứng 100% và 99%. Trước đó, Li et al. (2016) đã báo cáo tác nhân gây bệnh thối nhũn trên cây sen là *F. tricinctum.* Trong khi, Tang et al. (2017) cũng xác định nấm *F. oxysporum* là tác nhân gây bệnh sau thu hoạch trên củ sen. Gần đây, nhóm nghiên cứu của Cai et al. (2022) dựa trên các đặc điểm hình thái kết hợp định danh phân tử dựa trên các vùng gene ITS, *CAL*, *TEF1-α* và *RPB2* đã xác định được *F. proliferatum* là tác nhân gây héo khô gương sen tại Trung Quốc.

Bên cạnh các loài *Fusarium*, vi sinh vật giống nấm *Phytopythium helicoides* cũng được báo cáo là tác nhân liên quan đến triệu chứng thối ngó sen, mở rộng danh mục các nhóm tác nhân gây bệnh trên cây sen (Yin et al., 2016). Ngoài các tác nhân nấm và sinh vật giống nấm, nghiên cứu tại tỉnh Giang Tây năm 2021 của Kuang và cộng sự đã xác định vi khuẩn *Serratia marcescens* là nguyên nhân gây hoại tử hạt sen với tỷ lệ mắc bệnh từ 12% đến 18%. Việc xác nhận này được thực hiện thông qua phân tích đặc điểm hình thái, giải trình tự DNA và thử nghiệm đánh giá độc lực vi khuẩn. Đây là báo cáo đầu tiên cho đến nay ghi nhận vi khuẩn gây bệnh trên cây sen (Kuang et al., 2023).

Ngoài ra, các nghiên cứu về virus trên cây sen cũng cho thấy mức độ đa dạng đáng kể. Yu et al. (2015) phát hiện sự hiện diện virus khảm Dasheen (DsMV) trong 30 mẫu được khảo sát trên cây sen. Lá sen nhiễm bệnh nặng biểu hiện triệu chứng cong, co

lại và thân rễ phát triển kém, với tỷ lệ nhiễm bệnh trên đồng ruộng lên đến 8%, gây ảnh hưởng tiêu cực đến năng suất và chất lượng cây sen. Cho đến nay, bên cạnh DsMV, ít nhất bốn loại virus khác cũng đã được báo cáo trên cây sen, bao gồm Cucumber mosaic virus (CMV), Sweet potato latent virus (SPLV), badnaviruses (LBV) và Apple stem grooving virus (ASGV) (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 một mặt 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. Do đó, việc mở rộng các khảo sát toàn diện, kết hợp phân lập và xác định chính xác các tác nhân gây bệnh mới là hết sức cần thiết. Những nỗ lực này sẽ giúp xây dựng các chiến lược phòng trừ hiệu quả, góp phần nâng cao năng suất và bảo đảm chất lượng cây sen một cách bền vững trong tương lai.

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

Cây sen (*Nelumbo nucifera*) không chỉ là một biểu tượng văn hóa mà còn là một nguồn tài nguyên nông nghiệp quan trọng, chủ lực tại một số địa phương tại Việt Nam. Tuy nhiên, thực trạng nghiên cứu về bệnh hại trên cây sen hiện nay vẫn còn nhiều hạn chế, đặc biệt là trong bối cảnh các bệnh hại ngày càng gia tăng và có thể ảnh hưởng nghiêm trọng đến năng suất và chất lượng sản phẩm. Số lượng báo cáo nghiên cứu về bệnh hại trên cây sen tại Việt Nam còn tương đối ít, và các báo cáo này cũng chỉ tập trung ở một số tỉnh, khu vực như Thành phố Huế hay các tỉnh ở khu vực đồng bằng Sông Cửu Long, đồng bằng sông Hồng. Điều này cho thấy sự thiếu hụt thông tin và dữ liệu cần thiết để hiểu rõ hơn về phổ các tác nhân gây bệnh cũng như tình hình bệnh hại trên cây sen ở nước ta. Hệ quả là bệnh hại không chỉ làm suy giảm năng suất mà còn ảnh hưởng tiêu cực đến chất lượng sản phẩm cây sen.

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 số nghiên cứu độc lập khác cũng ghi nhận các chủng *Colletotrichum* gây bệnh, và tiến hành thử nghiệm sử dụng các chủng xạ khuẩn trong quản lý bệnh thán thư do tác nhân này gây ra (Tường et al., 2022; Tường & Quí, 2016). Tuy nhiên, hiện nay, với những sửa đổi trong hệ thống phân loại, tên gọi *C. lagenarium* không còn được chấp nhận là tên gọi chính thức (chỉ được xem

là đồng nghĩa danh pháp với C. *orbiculare*) (Damm et al., 2013; Stevens, 1931). Do không có các thông tin trình tự hay tiêu bản mẫu để kiểm tra, nên có thể loài trong nghiên cứu của tác giả là một loài được chỉ định trong phức hợp loài orbiculare (hiện nay có 8 loài được chỉ định thuộc phức hợp này). Sinh vật giống nấm - *Phytophthora* sp. cũng được chỉ định gây bệnh cháy lá và thối thân cây sen trong một báo cáo của Thái & Tường (2016). Tuy nhiên, nghiên cứu này tập trung vào đánh giá khả năng đối kháng của các chủng xạ khuẩn, nên các tác nhân trên cũng không được chỉ 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. Nghiên cứu của nhóm tác giả 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 khi khảo sát 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 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* (Cường et al., 2023). 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).

Bảng 1.0.1.Thống kê vi sinh vật (nấm và sinh vật giống nấm) liên quan đến các triệu chứng bệnh hại trên cây sen được báo cáo từ 2008 - 2025

Loài ghi nhận	**Địa điểm ghi nhận**	**Nguồn tham khảo**
Arthrinium rasikravindrae	Đài Loan, Trung Quốc	Chen & Kirschner (2018)
Alternaria alternata	Trung Quốc	Chen & Kirschner (2018) Gong et al. (2022)
Alternaria tenuissima	Trung Quốc	Zhang et al. (2019)
Agroathelia rolfsii	Quần đảo Andaman và Nicobar, Ấn Độ	Mahadevakumar et al. (2025)
Cladosporium oxysporum	Hồng Kông, Trung Quốc	Farr & Rossman (2024)
Colletotrichum gloeosporioides	Trung Quốc Hồng Kông, Trung Quốc Hàn Quốc	Farr & Rossman (2024) Farr & Rossman (2024) Farr & Rossman (2024)

Colletotrichum siamense	Đài Loan, Trung Quốc	Chen & Kirschner (2018)
Colletotrichum tropicale	Đài Loan, Trung Quốc	Chen & Kirschner (2018)
Colletotrichum acutatum *C. lagernarium* *C.gloeosporioides*	Một số tỉnh tại khu vực đồng bằng sông Cửu Long, Việt Nam	Tường & Quý (2016)
Curvularia lunata	Trung Quốc	Cui & Sun (2012)
Diaporthe nelumbonis	Đài Loan, Trung Quốc	Chen & Kirschner (2018)
Diaporthe ueckerae	Đài Loan, Trung Quốc	Chen & Kirschner, (2018)
Dissoconium nelumbonis	Đài Loan, Trung Quốc	Chen & Kirschner, (2018)
Erysiphe takamatsui	Nhật Bản Đài Loan, Trung Quốc Trung Quốc	Meeboon & Takamatsu (2015) Chen & Kirschner (2018) Zhou et al. (2019)
Fereydounia khargensis	Đài Loan, Trung Quốc	Chen & Kirschner (2018)
Fusarium commune	Trung Quốc Nhật Bản	Deng et al. (2022) Watanabe et al. (2023)
Fusarium solani	Đài Loan, Trung Quốc	Chen & Kirschner (2018)
Fusarium incarnatum	Hồ Bắc, Trung Quốc	Wang et al. (2020)
Fusarium oxysporum	Trung Quốc	Tang et al. (2017); Deng et al. (2022)
Fusarium proliferatum *Fusarium tricinctum*	Giang Tây, Trung Quốc Hồ Bắc, Trung Quốc	Cai et al. (2022) Li et al. (2016)
Fusarium sp.	Huế, Việt Nam	Trường & Vương (2020)
Globisporangium proliferum	Malaysia	Farr & Rossman (2024)
Lasiodiplodia theobromae	Huế, Việt Nam Đồng Tháp, Việt Nam	Cường et al. (2023) Hồng et al. (2024)
Nigrospora oryzae	Đài Loan, Trung Quốc Phúc Kiến, Trung Quốc	Chen & Kirschner (2018) Zhang et al. (2018)
Nigrospora pyriformis	Giang Tây, Trung Quốc	Gong et al. (2023)
Pestalotiopsis nelumbonis	Trung Quốc	Farr & Rossman (2024)
Phytopythium helicoides	Trung Quốc	Yin et al. (2016)
Pseudocercospora nelumbonis	Đài Loan, Trung Quốc	Chen & Kirschner, (2018)
Pythium afertile	Nhật Bản	Farr & Rossman (2024)
Rhodosporidiobolus odoratus	Đài Loan, Trung Quốc	Chen & Kirschner (2018)
Sclerotium hydrophilum	Nhật Bản	Farr & Rossman (2024)

Nhìn chung, cây sen nói riêng và thực vật nói chung chịu ảnh hưởng từ nhiều nhóm vi sinh vật gây hại đa dạng, có thể tồn tại độc lập hoặc ở dạng đồng nhiễm, dẫn

đến sự phát sinh và biểu hiện các triệu chứng bệnh phức tạp, khiến việc xác định chính xác tác nhân gây bệnh trở nên khó khăn. Bên cạnh đó, sự lão hóa hoặc tổn thương cơ học của vật chủ (thực vật) có thể kích hoạt quá trình chuyển đổi lối sống từ dạng nội sinh sang thể xâm nhiễm gây bệnh (Hiruma et al., 2016; Prusky & Lichter, 2007). Các hoạt chất, thuốc diệt nấm khác nhau như tebuconazole, azoxystrobin, metalaxyl hay mancozeb đã được sử dụng để kiểm soát các mầm bệnh thực vật. Tuy nhiên, việc lạm dụng thuốc diệt nấm và các hợp chất hóa học độc hại đã thúc đẩy sự gia tăng đáng kể khả năng kháng thuốc của các mầm bệnh, đồng thời gây tích tụ dư lượng hóa chất trên cây và các sản phẩm từ thực vật. Cả hai yếu tố này đều tiềm ẩn nguy cơ nghiêm trọng đối với sức khỏe cộng đồng và môi trường. (Baćmaga et al., 2022; OuYang et al., 2021; Patrice et al., 2021; Saha et al., 2022). Một trong những tác động nghiêm trọng là dư lượng hóa chất xâm nhập vào chuỗi thức ăn và tích lũy trên các sinh vật không phải mục tiêu. Do đó, điều quan trọng là phải phát triển một giải pháp thay thế hiệu quả và an toàn để kiểm soát bệnh hại thực vật 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 tốc độ phát triển ứng dụng và các thách thức đặt ra, đã có một sự "bùng nổ" mối quan tâm của khoa học đối với công nghệ nano được chứng minh qua cấp số nhân theo từng năm của các ấn phẩm khoa học. Trong các vật liệu nano, các hạt nano bạc (AgNPs) thu hút sự chú ý hơn cả nhờ những đặc tính nổi bật về tính ổn định, độ dẫn điện, hoạt tính xúc tác, đặc biệt là khả năng kháng vi sinh vật và tỷ lệ diện tích bề mặt lớn. Những đặc điểm này đã góp phần đưa đến tính rộng rãi, phổ biến ngày nay của nano bạc trên nhiều sản phẩm ứng dụng như linh kiện bán dẫn, chất khử trùng – kháng khuẩn, sản phẩm chăm sóc sức khỏe, vật liệu phủ - sơn, vật liệu đóng gói thực phẩm, xử lý nước và các cảm biến sinh học (Bouafia et al., 2021; Bruna et al., 2021; Burdușel et al., 2018; Kale et al., 2021; Moond et al., 2022; Mukherjee et al., 2016). Nano bạc cũng có thể được sử dụng như "hệ mang" cho phân bón nano-thuốc trừ sâu, nhắm vào các bào quan tế bào cụ thể trong thực vật để giải phóng "chất mang" bên trong (Tripathi et al., 2017). Vì có đặc tính kháng nổi bật và tiềm năng ứng dụng như một thay thế "xanh cho thuốc hóa học, hướng nghiên cứu này thu hút nhiều sự quan tâm của nhà khoa học với nhiều công bố chuyên sâu ở nhiều đối tượng khác nhau.

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 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).

Nhiều bằng chứng thực nghiệm cho thấy các cơ chế tác động khác nhau của hạt nano bạc chủ yếu dựa trên các đặc tính hóa lý (kích thước và bề mặt), cho phép các hạt nano bạc có thể tương tác hoặc thậm chí đi qua thành hoặc màng tế bào và ảnh hưởng trực tiếp đến các thành phần nội bào. Bên cạnh đó, mức độ đa dạng lớn của hạt nano bạc tổng hợp (sinh học, vật lý, hóa học) gây khó khăn cho việc giải mã một cơ chế hoạt động duy nhất. Hiện nay, các bằng chứng ghi nhận được chủ yếu hỗ trợ ba cơ chế đã được quan sát đồng thời hoặc riêng biệt, qua đó nano bạc phát huy tác dụng kháng khuẩn, kháng nấm (Durán et al., 2016; Marambio-Jones & Hoek, 2010; Roy et al., 2023).

Cơ chế trung tâm được đề xuất là tác động ở cấp màng. Hạt nano bạc có thể xuyên qua lớp màng ngoài và tích lũy tại màng trong, làm suy giảm tính toàn vẹn cấu trúc màng, tăng tính thấm, gây rò rỉ vật chất nội bào (protein, lipid) và cuối cùng dẫn đến chết tế bào(Dakal et al., 2016; Durán et al., 2016; Ivask et al., 2014; Terzioğlu et al., 2022). Cho đến nay, không có thụ thể tế bào hoặc kênh màng nào được mô tả về sự hấp thu bạc. Tuy nhiên, chất vận chuyển đồng có ái lực cao (high-affinity copper transporter - Ctr1) đã được xác định là "kênh" cho phép sự xâm nhập của ion Ag^+ (Mussin et al., 2021; Ruta et al., 2018). Một số nghiên cứu cũng chứng minh rằng các hạt nano bạc có thể tương tác với các protein chứa lưu huỳnh trong thành tế bào và có thể gây ra tổn thương cấu trúc dẫn đến vỡ thành tế bào (McQuillan & Shaw, 2014; Skóra et al., 2021).

Cơ chế thứ hai đề xuất rằng các hạt nano không chỉ có thể phá vỡ và xuyên qua màng tế bào, làm thay đổi cấu trúc và tính thấm mà còn có thể xâm nhập vào tế bào nơi mà AgNPs sẽ có ái lực tương tác với lưu huỳnh hoặc phospho của các nhóm hiện diện trong nội bào như DNA và protein làm thay đổi cấu trúc và chức năng. Theo cách tương tự, nano bạc có thể làm thay đổi chuỗi hô hấp ở màng trong bằng cách tương tác với các nhóm thiol trong các enzyme tạo ra các loại oxy phản ứng (ROS) và các gốc tự do, gây tổn hại cho bộ máy nội bào và kích hoạt con đường chết theo chương trình (apoptosis) (Alborés et al., 2023; Senthil et al., 2018).

Cơ chế thứ ba được đề xuất xảy ra song song với hai cơ chế khác là giải phóng các ion bạc từ các hạt nano, do kích thước và điện tích của chúng, có thể tương tác với các thành phần tế bào làm thay đổi con đường trao đổi chất, màng và thậm chí cả vật liệu di truyền (Agnihotri et al., 2013; Salleh et al., 2020; Shen et al., 2020; Li et al., 2022). Nhìn chung, có thể cụ thể các con đường tác động của nano bạc khi ở trong tế bào như sau:

+ 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 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, chất này có ái lực với Ag^+ cao hơn so với các ion đồng (Cu^+). Điều này dẫn đến giảm nồng độ ion Cu^+ và tăng tích tụ các ion 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 (Teodoro et al., 2011; Vest et al., 2013).

+ Ion Ag^+ và hạt nano bạc (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; Marathe et al., 2021). Sự điều hòa (theo xu hướng giảm) hoạt động các gene liên quan chu trình acid tricarboxylic (TCA), 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 et al., 2018).

Nhìn chung cho đến nay, 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 (AgNPs) 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. Hơn nữa, nano bạc có thể tạo thành các "lỗ" bất thường trên thành tế bào vi sinh vật, cho phép các hạt nano bạc này xâm nhập vào khu vực ngoại bào và nội 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).

Liên quan đến kích thước – hình dạng, nhóm nghiên cứu của Lu et al. (2013) đã xác định và làm rõ vai trò của các đặc điểm hình thái học này trong hiệu quả kháng khuẩn của nano bạc đối với các loài vi khuẩn như *E. coli, Fusobacter nucleatum, Streptococcus mutans, S. sanguis, S. mitis* và *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Nghiên cứu này chỉ ra rằng các hạt nano 5 nm (so với 10 và 15 nm) có tác dụng kháng

khuẩn tốt hơn, với nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) trong khoảng từ 25 đến 50 µg/mL đối với các vi sinh vật được thử nghiệm, ngoại trừ chủng *E. coli* được khảo nghiệm có giá trị MIC là 6 µg/mL. Sự khác biệt lớn này liên quan đến MIC của các vi sinh vật khác được thử nghiệm là do đặc tính hiếu khí của *E. coli* so với các vi khuẩn gây bệnh kỵ khí khác. Trong nghiên cứu cũng đưa ra giả thuyết rằng tác động này có thể là do quá trình oxy hóa của nano bạc trong môi trường nước khi tiếp xúc với không khí, phản ứng làm giảm khả năng kháng khuẩn.

Kích thước hạt nano cũng ảnh hưởng đến sự phân bố trong các cơ quan thực vật khác nhau khi áp dụng trong điều kiện thực tế. Nghiên cứu của Zhang et al. (2021) cho thấy các hạt nano có kích thước nhỏ (~6nm) được ưu tiên chuyển vị đến các lá non, trong khi các hạt nano lớn hơn (~35 nm) chủ yếu tích lũy trong rễ của cây cà chua. Kích thước nhỏ hơn của các hạt nano có thể thuận lợi cho việc chuyển vị vào nhu mô của lá, do đó có lợi cho sự phân phối đến các lá non và lá già hơn, trong khi các hạt nano có kích thước lớn có thể ức chế quá trình chuyển vị, dẫn đến sự tích tụ nhiều hơn của các hạt có kích thước lớn trong rễ. Bên cạnh đó, các hạt nano bạc ảnh hưởng đến sự phát triển của vi sinh vật cũng phụ thuộc lớn vào liều lượng, nồng độ tiếp xúc. Trong một nghiên cứu được thực hiện bởi Agnihotri et al., (2014) , sử dụng nano bạc với nồng độ 10 và 20 µg/mL (10 nm) gây ra mức độ ức chế tương ứng lần lượt là 18 và 53% với vi khuẩn *E. coli*. Trong khi đó, nồng độ nano bạc ở mức 30 và 40 µg/mL đã ức chế hoàn toàn sự phát triển của vi khuẩn này.

Hình thái của vật liệu nano bạc cũng là một yếu tố quan trọng quyết định mức độ ảnh hưởng của chúng đối với sinh lý và sự phát triển của cây trồng. Nhóm nghiên cứu của Syu et al. (2014) đã nghiên cứu tác động của nano bạc ở ba hình dạng khác nhau (hình cầu, hình tứ diện và hình tam giác) đối với cây *Arabidopsis*. Kết quả thu được cho thấy rằng vật liệu nano bạc hình khối thúc đẩy sự phát triển của rễ cao nhất, mức độ tích tụ Cu/Zn superoxide dismutase (CSD2) thấp nhất. Vật liệu nano bạc dạng tam giác cũng cho thấy khả năng kích thích sự phát triển của rễ, trong khi các vật liệu nano bạc dạng hình cầu không thể hiện sự thúc đẩy sự phát triển của rễ, nhưng lại gây ra sự tích tụ anthocyanin ở mức cao nhất. Điều này cho thấy rằng các hình thái, hình dạng khác nhau của vật liệu nano bạc thể hiện các mức độ ảnh hưởng khác nhau đối với cây *Arabidopsis* nói riêng và thực vật nói chung Tương tự, trong công bố gần đây của Osonga et al., (2020) khi thực hiện nghiên cứu khảo sát ảnh hưởng của các hạt nano bạc có nguồn gốc luteolin tetraphosphat mang các hạt nano bạc (LTP-AgNPs) và các hạt nano vàng (LTP-AuNPs) với các kích thước, hình dạng khác nhau (hình cầu, bán cầu và hình khối). Thử nghiệm được thực hiện với các chủng nấm (*Aspergillus nidulans, Trichaptum biforme, Penicillium italicum, Fusarium oxysporum* và *Colletotrichum gloeosporioides*), vi khuẩn Gram âm (*Pseudomonas aeruginosa, Aeromonas hydrophila, E. coli* và

Citrobacter freundii), vi khuẩn Gram dương (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus epidermidis)*. Kết quả cho thấy khả năng kháng nấm và kháng khuẩn phụ thuộc rõ rệt vào kích thước và hình dạng hạt; trong đó, AgNPs hình cầu (9 nm) và bán cầu (21 nm) ức chế 100% tất cả các chủng được thử nghiệm và thể hiện hoạt tính cao hơn LTP-AuNPs. Nghiên cứu này cũng khẳng định rằng hạt nano kích thước nhỏ có xu hướng tích lũy dễ dàng hơn và gây tác động mạnh hơn lên các bào quan đích so với các hạt có kích thước lớn.

Cấu trúc lá cũng ảnh hưởng đến sự hấp thụ và quá trình chuyển vị hạt nano ở thực vật (Hu et al., 2020; Matras et al., 2022; Spielman-Sun et al., 2019). Cây hai lá mầm, so với cây một lá mầm, cho thấy khả năng hấp thu các hạt nano cao hơn do lớp biểu bì có tính thấm lớn hơn. Điều này được chứng minh trong trường hợp cấu trúc nano dạng lỏng phủ lipid, được sử dụng làm phương tiện vận chuyển. Sự khác biệt này là do cấu trúc khác nhau của thành tế bào ở thực vật một lá mầm và thực vật hai lá mầm. Ở thực vật một lá mầm, polymer pectin ít liên kết chặt chẽ hơn với cellulose. Một sự khác biệt đáng kể về mặt giải phẫu là trong cấu trúc của lá, như sự hiện diện của khí khổng hình quả tạ ở khí khổng một lá mầm và khí khổng hình thận ở thực vật hai lá mầm, dẫn đến mức độ hấp thu và hiệu quả dịch chuyển của vật liệu nano. Ngô, thuộc nhóm cây một lá mầm, chủ yếu hấp thụ các hạt nano phun qua lá thông qua khí khổng. Ngược lại, cây bông, thuộc nhóm cây hai lá mầm, hấp thụ các hạt nano không chỉ qua khí khổng mà còn qua lớp biểu bì lá, thể hiện cơ chế hấp thụ đa dạng hơn (Hu et al., 2020). Các loài thực vật khác nhau cũng có phạm vi pH của bề mặt lá khá rộng (5–10), dẫn đến các hệ vi sinh vật khác nhau có khả năng tương tác khác nhau với các vật liệu nano, cũng như thay đổi con đường hấp thu (Zhang et al., 2023). Đặc biệt, nhiều nghiên cứu cho thấy sự hiện diện của vi khuẩn và nấm rễ cộng sinh ảnh hưởng đáng kể đến quá trình hấp thụ hạt nano ở thực vật (Chen & Xiao, 2023; Feng et al., 2013; Noori et al., 2017). Nhìn chung, các hạt nano có mức độ "linh hoạt" lớn về cơ bản dựa vào sự hấp thu, hấp thụ và vận chuyển của chúng bên trong thực vật. Sự tương tác hóa lý của vật liệu nano với thực vật dưới tác động của năng lượng và điện tích bề mặt của chúng có thể dẫn đến biến đổi các thụ thể bề mặt, chất vận chuyển và protein màng đặc hiệu (Bărbieru et al., 2019; Juárez-Maldonado et al., 2019).

Thành tế bào của lá thực vật chứa cả thành phần kỵ nước và ưa nước, dẫn đến sự phân bố điện tích không đồng đều trên bề mặt của các cấu trúc chính như sợi cellulose và lignin. Cụ thể, điện thế bề mặt của sợi cellulose và lignin lần lượt là khoảng −15 mV và −45 mV (Santiago et al., 2013; Zeng et al., 2017). Vì vậy, thành tế bào tích điện âm tạo điều kiện cho sự hấp thụ của các hạt nano tích điện dương vào trong mô. Thành tế bào thực vật tích điện âm đóng vai trò là bề mặt trao đổi ion có khả năng thúc đẩy sự xâm nhập của các cation thay vì anion (Meychik et al., 2005). Ngược lại, hiệu quả vận

chuyển được nâng cao đáng kể đối với các hạt nano tích điện âm. Sự hấp thu và vận chuyển hạt nano vàng (AuNPs) phụ thuộc vào điện tích bề mặt được giải thích bởi nghiên cứu của Zhu et al. (2012) cho thấy khả năng hấp phụ cao hơn nhiều của các hạt nano tích điện dương ở bề mặt rễ. Tuy nhiên, các hạt nano tích điện âm được quan sát thấy có tốc độ nội hóa và chuyển vị cao hơn. Trong bối cảnh này, các hạt nano oxide cerium tích điện dương (CeO_2NPs) hấp phụ mạnh trên bề mặt rễ vốn tích điện âm, trong khi CeO_2NPs tích điện âm cho thấy mức tích lũy ở rễ thấp hơn nhưng khả năng nội hóa và vận chuyển nội thân lên chồi cao hơn, chủ yếu nhờ vượt qua lực đẩy tĩnh điện. Tương tự, một nghiên cứu gần đây của Milewska-Hendel et al. (2019), đã chứng minh một cách toàn diện rằng sự hấp thu của hạt nano vàng (AuNPs) phụ thuộc vào điện tích bề mặt, ảnh hưởng đến quá trình nội hóa bên trong rễ và vận chuyển từ rễ đến chồi.

Sự khác biệt về mặt giải phẫu ở thực vật và điện tích bề mặt của vật liệu nano có liên quan rất chặt chẽ với nhau. Các hạt nano oxide cerium tích điện dương cho thấy khả năng tác động lớn ở các cây hai lá mầm như cà chua và rau diếp với diện tích bề mặt rễ lớn hơn. Tuy nhiên, sự chuyển vị từ gốc sang chồi tốt hơn được quan sát thấy với các hạt nano tích điện âm hoặc trung tính (Spielman-Sun et al., 2019). Điều này gợi ý rằng sự khác biệt về mặt giải phẫu và sinh lý ở thực vật dẫn đến các kiểu hấp thu khác nhau của thực vật đối với các vật liệu nano. Thực tế, nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng các loại cây trồng khác nhau thuộc các loài khác nhau cho thấy mô hình tích lũy và hấp thụ khác nhau của các lớp phủ khác nhau (Cifuentes et al., 2010; Dağhan et al., 2020; Larue et al., 2012; Matras et al., 2022). Ngoài ra, khả năng cây trồng hấp thụ các hạt nano cũng phụ thuộc vào phương thức áp dụng, tức là bộ phận thực vật mà nano bạc tiếp xúc: rễ hấp thụ chất dinh dưỡng từ đất, lá có nhiệm vụ trao đổi khí và lớp biểu bì cản trở sự xâm nhập của bất kỳ chất nào một cách tự do (Schwab et al., 2016). Điều này gợi ý rằng khác biệt về cấu trúc mô (thành tế bào, lớp cutin/biểu bì, khí khổng) và sinh lý (dòng vận chuyển apoplast/symplast, thế điện màng) dẫn đến các kiểu hấp thu–vận chuyển khác nhau của thực vật đối với vật liệu nano (Riederer & Schreiber, 2001) hay một số yếu tố khác như hàm lượng chất hữu cơ và acid humic giúp tăng cường khả dụng sinh học, tính ổn định của nano bạc (Navarro et al., 2012).

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

Tính bền vững trong phát triển nông nghiệp đã nổi lên như một trong những mối quan tâm quan trọng nhất của thời đại hiện nay, do việc giảm đáng kể năng suất cây trồng gây ra bởi nhiều loại mầm bệnh thực vật khác nhau đã làm nảy sinh các vấn đề an ninh lương thực toàn cầu. Trong số các phương pháp phòng chống bệnh hại thực vật, việc sử dụng hạt nano bạc sinh học để kiểm soát sinh học mầm bệnh mang lại giải pháp thân thiện với môi trường, tiết kiệm chi phí và bền vững. Nông nghiệp đóng một vai trò quan trọng trong việc cung cấp dinh dưỡng và phục vụ như một nguồn thu nhập cho

nhiều quốc gia. Ở nhiều quốc gia, một tỷ lệ lớn dân số phụ thuộc vào sản xuất nông nghiệp để duy trì sinh kế (Dinesha et al., 2024; Tuan, 2023). Khoảng 15–18% thiệt hại về cây trồng xảy ra do sâu bệnh hay động vật, trong khi cỏ dại và các bệnh do vi sinh vật gây ra thiệt hại lần lượt là 34 và 16%. Và trong các tác nhân vi sinh gây bệnh hại, nấm là tác nhân chính chịu trách nhiệm cho khoảng 80% bệnh hại ở thực vật (Atiq et al., 2020; Shuping & Eloff, 2017). Khoảng 1,5 triệu loài nấm đã được ghi nhận dưới dạng ký sinh và hoại sinh trong tự nhiên, gây ra các bệnh khác nhau trên cây trồng nông nghiệp. Nấm gây bệnh có thể làm giảm nghiêm trọng năng suất của các loại cây trồng khác nhau trên toàn thế giới mỗi năm (Worrall et al., 2018). Sự phát triển của các loại thuốc diệt nấm hiện đại có sẵn trên thị trường đã góp phần cách mạng hóa nền nông nghiệp, đặc biệt là trong trường hợp các mầm bệnh thực vật khó kiểm soát. Bất chấp những lợi ích không thể nghi ngờ, việc sử dụng rộng rãi thuốc diệt nấm thông thường mang nhiều hệ lụy về vấn đề môi trường và an toàn thực phẩm, đó là lý do tại sao ngày càng có nhiều hoạt chất trong thuốc diệt nấm bị loại bỏ, cấm sử dụng theo quy định vì mục đích an toàn.

Các hạt nano bạc đóng một vai trò quan trọng trong việc kiểm soát nấm bệnh trên nhiều loại cây trồng (Al-Zubaidi et al., 2019; Siddiqui et al., 2015). Việc sử dụng nano bạc thay thế cho thuốc diệt nấm tổng hợp là một cách tiếp cận tương đối mới với hiệu quả cao hơn. Cho đến nay, một số nghiên cứu đã được thực hiện về việc triển khai, ứng dụng nano bạc vào nghiên cứu khả năng phòng chống lại các tác nhân gây hại thực vật.

❋Trên thế giới

Các dạng nano bạc khác nhau đã được ứng dụng để chống lại vi khuẩn Gram âm (*Acinetobacter, Escherichia, Pseudomonas, Salmonella* và *Vibrio*), vi khuẩn Gram dương (*Clostridium, Enterococcus, Listeria, Staphylococcus)* và liên cầu khuẩn (Abo-Shama et al., 2020; Bates et al., 2024; Camargo et al., 2023; Gondil et al., 2019; Rai et al., 2012; Yakoup et al., 2024). Kalishwaralal et al., (2010) đã nghiên cứu và chứng minh khả năng ức chế màng sinh học của các hạt nano bạc đối với vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* và *Staphylococcus cholermidis* — hai tác nhân chính gây ra nhiều bệnh nhiễm trùng mãn tính. Kết quả cho thấy, hơn 95% sự hình thành màng sinh học bị ức chế bằng cách xử lý các vi khuẩn này với nano bạc, từ đó ức chế hiệu quả sự phát triển của vi khuẩn. Ngoài ra, nano bạc cũng thể hiện khả năng ức chế đáng kể đến sự phát triển của vi khuẩn *E. coli* và *S. aureus.* Các ion bạc và các hạt nano ngăn chặn sự sao chép DNA của vi khuẩn bằng cách liên kết và gây biến tính DNA, liên quan đến tương tác ion bạc với protein thiol (-SH), bao gồm sự xuất hiện phosphatidylserine (apoptosis sớm) và tổn thương DNA (apoptosis muộn), dẫn đến apoptosis (Bao et al., 2015; Rai et al., 2012). Một cơ chế khác là sự can thiệp của nano bạc hoặc các ion hòa tan vào chuỗi hô hấp của màng tế bào.

Ngoài khả năng kháng khuẩn đã được biết đến, nghiên cứu này sẽ tập trung tổng quan các nghiên cứu, hướng ứng dụng của nano bạc trong việc kiểm soát các loại nấm gây hại, nhằm mở rộng và đánh giá một cách toàn diện hiệu quả và cơ chế tác động, và tiềm năng của nano bạc đối với các loài nấm gây hại thực vật. Đối với hoạt tính kháng nấm, Gajbhiye et al. (2009) đã ghi nhận hiệu quả kháng nấm rõ rệt khi kết hợp fluconazole và nano bạc trên các tác nhân gây bệnh: *Phoma glomerata, P. herbarum, Fusarium semitectum, Trichoderma* sp. và *Candida albicans* thông qua phương pháp khuếch tán đĩa thạch. Savithramma et al. (2011) đã tổng hợp nano bạc từ các cây dược liệu như *Svensonia hyderobadensis*, *Boswellia ovalifoliolata* và *Shorea tumbuggaia*, chứng minh hiệu quả kháng nấm đối với *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Curvularia* spp., *Fusarium* spp. và *Rhizopus* spp. Trong các chế phẩm, các hạt nano từ *S. hyderobadensis* thể hiện hoạt tính vượt trội hơn cả Một nghiên cứu khác của Ouda (2014), chỉ ra rằng sự kết hợp nano đồng-bạc cho thấy khả năng ức chế sự phát triển của nấm *Alternaria alternata* và *Botrytis cinerea* bằng cách gây ra các biến đổi sinh học về cấu trúc và chức năng của màng tế bào.

Vật liệu nano bạc được điều chế bằng phương pháp khử $AgNO_3$ chiết xuất từ quả mâm xôi, với kích thước 60 nm, đã được nghiên cứu về hiệu quả kháng nấm đối với hai loài *Cladosporium cladosporioides* và *Aspergillus niger*. Nghiên cứu của Pulit et al. (2013) cho thấy nano bạc có hiệu ứng ức chế rõ rệt đối với sự phát triển của cả hai loài nấm này. Kết quả cho thấy, khi nồng độ nano bạc tăng, hiệu quả ức chế nấm cũng tăng theo. Cụ thể, ở nồng độ 12,5 ppm, nano bạc đã ức chế hơn 60% sự phát triển của cả hai loài nấm. Khi nồng độ được nâng lên 50 ppm, hiệu lực ức chế đạt khoảng 90% đối với *C. cladosporioides* và 70% đối với *A. niger.* Một nghiên cứu khác Krishnaraj et al., (2012) cũng chỉ ra rằng nano bạc tổng hợp từ dịch chiết lá *Acalypha indica* có khả năng ức chế sự phát triển của nhiều loại nấm gây bệnh thực vật. Cụ thể, ở nồng độ 15 mg/L, nano bạc đã cho thấy hiệu quả ức chế đáng kể đối với các loài nấm như *Botrytis cinerea, Rhizoctonia solani, Curvularia lunata, Macrophomina phaseolina, Alternaria alternata* và *Sclerotinia sclerotiorum*. Đặc biệt, các hạt nano bạc nguồn gốc từ nấm *Agaricus bisporus* có khả năng ức chế hiệu quả *Sclerotium rolfsii, A. niger* và *R. solani*, những tác nhân gây bệnh thối thân và thối rễ ở cây lạc (Papaiah et al., 2014).

Một nghiên cứu khác của Mahdizadeh et al. (2015) cũng đã chứng minh hiệu quả của nano bạc trong việc kiểm soát các tác nhân gây bệnh thực vật. Sinh vật giống nấm *Pythium aphanidermatum* và nấm *Macrophomina phaseolina* có mức độ nhạy cảm cao với sự tiếp xúc với nano bạc, với sự ức chế tăng trưởng sợi nấm được ghi nhận ở tất cả các nồng độ thử nghiệm (6, 8, 10, 12, 14 và 16 mg/L). Nấm *Sclerotinia sclerotiorum* cũng cho thấy sự nhạy cảm với nano bạc, bị ức chế hoàn toàn ở nồng độ cao hơn 6 mg/L. Sự tăng trưởng của chủng nấm *Rhizoctonia solani* AG4 bị ức chế đến 90% khi tiếp xúc

với nano bạc ở nồng độ 10 mg/L, trong khi nồng độ cao hơn gây ra sự ức chế 100%. Trong khi đó, khả năng tăng trưởng của chủng *R. solani* AG1 giảm 75% và 80% ở nồng độ nao bạc 6 và 8 mg/L, và giảm mạnh hơn với 90% ức chế ở nồng độ 10-14 mg/L, và hoàn toàn ức chế ở nồng độ 16 mg/L. Một báo cáo ghi nhận hiệu ứng tích cực tương tự của nhóm tác giả Ấn Độ Jyothi et al. (2020), khi sử dụng các hạt nano bạc đường kính 16,5 nm chiết xuất từ lá lúa đánh giá khả năng ức chế nấm *R. solani* gây bệnh khô vằn. Kết quả cho thấy xử lý nano bạc có khả năng ức chế dạng thể sợi lên đến 96,7% ở nồng độ 10 µg/mL. Xử lý ở hạt nano bạc ở nồng độ 20 µg/mL ức chế hoàn toàn tỷ lệ bệnh. Nghiên cứu này cũng chỉ ra, xử lý nano bạc ở nồng độ 10 µg/mL làm tăng 1,3 và 1,5 lần chỉ số sức sống (Vigor Index) cây con

Kumari et al. (2017) đã đánh giá hiệu quả ức chế của việc xử lý nano bạc đến sự phát triển của nấm *Alternaria solani* gây bệnh úa sớm (bệnh đốm vòng) trên cây cà chua (*Solanum lycopersicum*). Các cây cà chua bị nhiễm bệnh úa sớm được xử lý bằng nano bạc ở nồng độ 5 µg/mL bằng hình thức phun lên lá. Kết quả ghi nhận sau khi xử lý nano bạc cho những tác động tích cực: giảm 48,57% bào tử nấm, tăng 23,52% và 32,58% lần lượt ở các chỉ tiêu hàm lượng chlorophyll tổng số và trọng lượng tươi khi so với đối chứng không được xử lý. Các chỉ số về hàm lượng proline, enzyme chống oxy hóa đều tăng với lần lượt là 39% và 30% để cải thiện tình trạng đáp ứng "stress sinh học" tổn thương do *A. solani* gây ra. Các báo cáo tương tự khi tiếp xúc với nano bạc cũng được ghi nhận ở các nghiên cứu của Dixit et al. (2018); Jyothi et al. (2020).

Mishra et al. (2017) cũng đã đánh giá tiềm năng của nano bạc tổng hợp từ *Stenotrophomonas* sp. BHU-S7 (MTCC 5978) trong quản lý bệnh hại trên lá và trong đất. Trong một nghiên cứu của Haroon et al. (2019), nano bạc được điều chế bằng chiết xuất *Azadirachta indica* đã ghi nhận ức chế đáng kể đến sự phát triển của mầm bệnh *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., và *Ralstonia solanacearum.*

Năm 2019, nhóm nghiên cứu của Malandrakis đã tiến hành khảo sát đánh giá khả năng diệt nấm của các hạt nano khác nhau: nano đồng (Cu-NPs; CuONP), nano bạc (AgNPs), nano kẽm (ZnONPs) với 7 loài nấm gây bệnh trên lá và các bệnh truyền qua đất đặc trưng: *Alternaria alternata, Botrytis cinerea, Monilia fructicola, Verticillium dahliae, Colletotrichum gloeosporioides, Fusarium oxysporum* fsp *radicis lycopersici* (FORL) và *F. solani*. Trong điều kiện môi trường đĩa thạch PDA, hiệu quả kháng nấm được ghi nhận trên cả 7 loài được khảo sát khi xử lý với Cu-NPs, chỉ số EC_{50} dao động trong khoảng từ 162 µg/mL (*V. dahliae*) đến 310 µg/mL (*F. oxysporum*). Giá trị EC_{50} này tương ứng với ZnONPs dao động từ 235 µg/mL (*A. alternata*) đến 847 µg/mL (FORL). Trong khi, nano bạc (AgNPs) hầu như không có hiệu quả ức chế sự phát triển của các chủng nghiên cứu, chỉ ghi nhận hiệu quả trên *B. cinerea*. Cũng trong nghiên cứu này, một thí nghiệm *in vivo* - ức chế triệu chứng mốc xám (thối xám) trên quả mận cũng

được tiến hành để đánh giá hiệu quả hoạt tính thực tế của các hạt nano so với đối chứng là thuốc diệt nấm bổ sung $Cu(OH)_2$. Kết quả cho thấy, các hạt nano bạc lại cho hiệu quả ức chế lên đến 85% và 100% tương ứng lần lượt ở các nồng độ 100 và 1000 µg/mL. Xử lý với hạt nano đồng cho hiệu quả ức chế thấp (16%) ở nồng độ 100 µg/mL và hiệu quả ức chế cao hơn đáng kể khi được xử lý với nồng độ cao. Trong khi khi xử lý bằng nano kẽm không cho thấy hiệu quả khác biệt so với sử dụng thuốc diệt nấm ở các nồng độ (Malandrakis et al., 2019). Giải thích cho sự gia tăng hiệu quả ức chế như vậy của hạt nano bạc trên quả mận có thể là do sự khác biệt giữa thành phần môi trường sinh trưởng và bề mặt mô thực vật tiếp xúc với chủng nấm. PDA là một môi trường tăng trưởng dinh dưỡng, chứa hàm lượng protein cao hơn, giàu acid amin. Các sulfide được biết là liên kết với $[Ag^+]$, hay phản ứng trực tiếp với AgNPs để tạo thành kết tủa cản trở quá trình hòa tan Ag-NP, do đó có thể dẫn đến giảm độc tính so với bề mặt quả mận, nơi chất nền như vậy không có sẵn.

Một nghiên cứu đánh giá tác động kháng nấm *Fusarium culmorum* và *Alternaria alternata* của hạt nano bạc dựa trên động lực tăng trưởng, hình thái và sinh học phân tử được thực hiện bởi Ganash et al. (2018). Kết quả cho thấy nồng độ nano bạc khác nhau gây ra sự ức chế sự phát triển của nấm và biến dạng cấu trúc của nấm khác nhau, đặc biệt là ở nồng độ cao 40 và 60 mg/L của nano bạc. Các bào tử *A. alternata* ở nồng độ 40 mg/L bị biến dạng mạnh và các mặt cắt dọc không thể ghi nhận. Mặt khác, những loại nấm này không thể tạo ra bào tử bình thường khi có tiếp xúc nano bạc 60 mg/L nhưng lại tạo ra dạng bào tử chống chịu (chlamydospores). Cũng trong nghiên cứu này, ảnh hưởng của hạt nano đến acid amin và acid béo của *F. culmorum* được nghiên cứu so sánh với ảnh hưởng của bạc nitrat ($AgNO_3$). Nano bạc ở các nồng độ áp dụng khác nhau đã kích thích sự tổng hợp các acid amin được phát hiện nhiều nhất bao gồm acid aspartic, threonine, serine, acid glutamic, glycine, alanine, valine, leucine, tyrosine, arginine, proline và lysine. Nồng độ của các acid amin được phát hiện tăng lên khi tăng nồng độ lên tới 60 mg/L. Acid aspartic, serine, glycine, alanine, arginine, leucine và proline là 11,52, 6,53, 21,51, 12,51, 27,34, 9,40 và 22,17 µg/mL so với nồng độ của chúng 5,90, 0,34, 21,51 và 9,91 µg/mL ở nồng độ 40 ppm tương ứng của AgNP và $AgNO_3$

Kriti et al. (2020) đã quan sát thấy hoạt tính kháng nấm đáng kể của vật liệu AgNP - citrate (đặc biệt ở nồng độ 100 mg/L), đối với *Bipolaris sorokiniana* và *Alternaria brassicicola* về sự phát triển sợi nấm thực vật và sự nảy mầm của bào tử.

Đặc biệt, sự ức chế hoàn toàn sự phát triển sợi nấm của các loài *Fusariu*m, bao gồm: *Fusarium graminearum, F. culmorum, F. sporotrichioides, F. langsethiae, F. poae, F. proliferatum* và *F. verticillioides* được ghi nhận sau thời gian tiếp xúc 20–30 giờ với nano bạc kết hợp với chất ổn định citrate ở nồng độ 30 và 45 mg/L (Tarazona et al., 2019). Một nghiên cứu khác của Jo et al. (2009) cũng cho thấy rằng cả ion bạc và hạt

nano bạc (đường kính 20–30 nm) được sử dụng 3 giờ trước khi cấy bào tử *B. sorokiniana* và *Magnaporthe grisea* làm giảm một cách hiệu quả mức độ nghiêm trọng của bệnh đốm lá trên cỏ lúa mạch đen lâu năm. Hiệu quả của các hợp chất bạc giảm đáng kể sau 24 giờ xử lý. Điều này cho thấy sự tiếp xúc trực tiếp, thời gian xử lý của nano bạc với bào tử là rất quan trọng trong việc ức chế khả năng sống sót và hạn chế sự tiến triển của bệnh. Nhiều thí nghiệm hiện trường khẳng định thời gian phun nano bạc có ảnh hưởng đến tác dụng ức chế. Minh chứng tương tự được xác nhận bởi nghiên cứu của Lamsal et al. (2011), khi nghiên cứu tác động của nano bạc (7–25 nm) đối với bệnh phấn trắng ở dưa chuột và bí ngô. Nano bạc ở nồng độ 10, 30 và 50 mg/L được áp dụng khoảng 3-4 tuần trước khi dịch bệnh bùng phát có hiệu quả hơn nhiều so với việc áp dụng chúng sau khi xuất hiện các triệu chứng bệnh trên cây. Trong khi đó, xử lý nano bạc ở nồng độ 100 mg/L đã ức chế đáng kể bệnh phấn trắng trên cả hai cây trước và sau khi bệnh bùng phát, cho thấy rằng việc giảm các mầm bệnh thực vật gây ra các bệnh này phụ thuộc vào thời gian xử lý và nồng độ áp dụng. Trong khi đó, nghiên cứu của Kim et al. (2008) chỉ ra rằng khi phun nano bạc 10 ppm lên hoa hồng 2 ngày trước khi cấy mầm bệnh đã làm giảm tỷ lệ mắc bệnh phấn trắng tới 95%.

Trong nghiên cứu của Vera-Reyes et al. (2022), các hạt nano bạc được tổng hợp từ dịch chiết cây thống đốc (*Larrea tridentata*) cho thấy hiệu lực ức chế đáng kể đến sự phát triển sợi nấm. Cụ thể, mức độ ức chế lên đến 65,43% đối với *Macrophomina* spp., và 39,04% đối với *Fusarium oxysporum* ở nồng độ 120 ppm. Đáng chú ý, *Alternaria solani* và *Botrytis cinerea* có mức độ nhạy cảm cao hơn với nano bạc, khi mức ức chế tăng trưởng lần lượt là 70,76% và 51,75% đã được ghi nhận ở nồng độ thấp hơn là 60 ppm. Trong khi đó, nghiên cứu cũng chỉ ra rằng tác động của hạt nano bạc là không rõ ràng với các nấm *Pestalotia* spp., *Colletotrichum gloeosporioides*, *Phytophthora cinnamomi*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* và *Trichoderma viride.* Kết quả này cho thấy hiệu quả khác biệt của nano bạc đối với từng loài nấm, đồng thời khẳng định tiềm năng ứng dụng của chúng trong kiểm soát các bệnh do nấm gây ra.

Ribeiro et al. (2023) đã nghiên cứu tổng hợp bảy loại nano bạc sinh học khác nhau từ các loài nấm thu thập tại hệ sinh thái rừng ngập mặn ở Brazil. Hoạt tính kháng nấm của các loại nano bạc này được thử nghiệm với các nấm gây bệnh thực vật có ý nghĩa kinh tế như *Fusarium oxysporum, F. phaseoli, F. sacchari, F. subglutinans, F. verticillioides* và *Curvularia lunata*, vốn là nguyên nhân gây thiệt hại nghiêm trọng trong nông nghiệp. Kết quả cho thấy các nano bạc có khả năng ức chế các loài nấm gây hại thực vật này với giá trị MIC từ 4 đến 250 μM.

Gần đây, Singh et al. (2024) đã tổng hợp hạt nano bạc từ chiết xuất lá *Azadirachta indica*. Vật liệu này cho thấy khả năng ức chế hoàn toàn (100%) đối với *Sclerotinia sclerotiorum* và *Colletotrichum falcatum* ở nồng độ 2000 ppm, đồng thời ức chế 68–80%

sự phát triển của *Colletotrichum gloeosporioides* và *Rhizoctonia solani* ở cùng nồng độ. Trong nghiên cứu này, các giá trị EC_{50} cũng được báo cáo dựa trên phân tích hồi quy phi tuyến tính với giá trị ghi nhận lần lượt là 66,42; 157,7; 19,06 và 33,30 ppm cho *S. sclerotiorum*, *C. falcatum, C. gloeosporioides và R. solani*. Ngoài ra, nano bạc thể hiện độc tính tế bào đáng kể trên dòng tế bào u nguyên bào thần kinh đệm U87MG, với tỷ lệ ức chế 74,96% tại 250 ppm và giá trị IC_{50} là 56,87 ppm, cho thấy tiềm năng ứng dụng trong điều trị ung thư.

Trong 3-5 năm gần đây, phân tích phiên mã (RNA-seq) dần được sử dụng phổ biến để làm rõ cơ chế tác động ở cấp độ phân tử của nano bạc, cung cấp sự hiểu biết toàn diện về các gene biểu hiện khác biệt (DEG) tiềm năng liên quan đến các quá trình sinh học cụ thể (Habeeb Rahman et al., 2022; Lu et al., 2020). Cơ chế phân tử của nano bạc ức chế sinh trưởng nấm *Fusarium* sp. (*F. graminearum, F. solani*) đã được nghiên cứu sâu. Nano bạc có thể làm suy giảm cấu trúc tế bào, việc sử dụng năng lượng của tế bào, chuyển hóa năng lượng và chất, đường dẫn truyền tín hiệu và gây ra đáng kể sự biểu hiện của các chất vận chuyển ABC (ATP-binding cassette transporters) (Jian et al., 2022). Nghiên cứu của Li et al. (2022) đã chỉ ra rằng nano bạc ở nồng độ 75 mg/L ức chế hiệu quả sự phát triển sợi nấm và sự nảy mầm bào tử của bốn mầm bệnh gây thối quả Kiwi, bao gồm *Alternaria alternata, Pestalotiopsis microspora, Diaporthe actinidiae* và *Botryosphaeria dothidea*. Bên cạnh đó, nano bạc cũng làm tăng tính thấm của màng tế bào sợi nấm, sự rò rỉ vật chất nội bào. Phân tích trình tự phiên mã của sợi nấm được xử lý bằng nano bạc sau các khoảng thời gian nhất định 24 giờ và 48 giờ, đã tạo ra lần lượt 1.178 và 1.461 gene biểu hiện khác biệt DEG ở *A. alternata*, 517 và 91 DEG ở *P. microspora*, 1.287 và 65 DEG ở *D. actinidiae*, 239 và 55 DEG ở *B. dothidea*. Các DEG được phát hiện có liên quan đến hoạt động xúc tác, liên kết phân tử nhỏ, liên kết ion kim loại, quá trình vận chuyển, tổ chức thành phần tế bào, quá trình trao đổi chất protein, quá trình trao đổi carbohydrate. Phân tích của KEGG cũng tiết lộ rằng "chuyển hóa carbohydrate, chuyển hóa acid amin, chuyển hóa năng lượng và chuyển hóa và phân hủy sinh học xenobiotics là con đường được làm giàu nhiều nhất cho các DEG này trong bốn mầm bệnh khi tiếp xúc với nano bạc.

❁ Trong nước

Các nghiên cứu trên thế giới đã khẳng định tiềm năng lớn của các hạt nano bạc trong việc ức chế nhiều loại nấm gây bệnh quan trọng đối với nông nghiệp, đồng thời làm sáng tỏ các cơ chế phân tử liên quan đến tác động kháng nấm của nano bạc. 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 vi sinh vật gây hại, trong đó nấm gây hại cây trồng. 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 thúc đẩy sự phát triển nông nghiệp bền vững tại Việt Nam.

Điển hình với nghiên cứu đánh giá hiệu quả kháng nấm của chế phẩm nano bạc - chitosan đối với *Phytophthora capsici* (tác nhân gây bệnh chết nhanh ở cây hồ tiêu) đã được thực hiện bởi Luân et al. (2014). Các chế phẩm keo nano bạc với kích thước hạt 5, 10 và 15 nm được tổng hợp bằng phương pháp chiếu xạ tia gamma (Co-60), sử dụng chitosan 1% làm chất ổn định. Kết quả nghiên cứu cho thấy, trong khoảng nồng độ bạc từ 20 đến 100 ppm, hiệu lực ức chế sự phát triển của *P. capsici* ghi nhận tỷ lệ tương ứng từ 22,6% đến 92,9%. Đặc biệt, hiệu lực ức chế này tăng từ 62,5% lên 100% khi kích thước hạt nano bạc giảm từ 15 nm xuống 5 nm. Cụ thể, chế phẩm có kích thước hạt 5 nm đạt hiệu lực ức chế 100% ở nồng độ 40 ppm, trong khi chế phẩm có kích thước hạt 10 nm chỉ đạt 92,9% ở nồng độ 100 ppm. Hay trong nghiên cứu của Ngọc et al. (2015), hiệu quả ức chế của hạt nano bạc được tổng hợp bằng phương pháp khử hóa học với sự hiện diện của chitosan và acid citric (kích thước từ 2 – 10 nm) đã được đánh giá đối với một số chủng nấm gây bệnh thực vật, bao gồm *Fusarium oxysporum, Colletotrichum, Rhizoctonia solani* và *Corynespora cassiicola* trong điều kiện phòng thí nghiệm. Kết quả cho thấy hạt nano bạc có hoạt tính kháng nấm vượt trội so với các thuốc diệt nấm thương mại, với tỷ lệ ức chế đạt đến 79,57% ở nồng độ 100 mg/L.

Tiếp nối nghiên cứu này, Hạnh et al. (2020) đã tiến hành đánh giá hiệu lực kháng nấm của dung dịch nano bạc tổng hợp từ chitosan ở các nồng độ khác nhau. Kết quả cho thấy nano bạc có khả năng ức chế đáng kể đến sự phát triển của nhiều loài nấm gây bệnh phân lập từ các cây trồng địa phương tại Cao Bằng như gừng, ớt, … Bốn loài nấm khác nhau đã được phân lập và thử nghiệm trong nghiên cứu này bao gồm *Proxipyricularia zingiberis, F. oxysporum, Colletotrichum* spp., *Alternaria* spp., và *H. teres* (tác giả không ghi rõ tên chi, có thể là *Helminthosporium teres* – danh pháp cũ của *Pyrenophora teres*). Tuy nhiên, hiệu lực ức chế không đồng nhất giữa các chủng nấm ở các nồng độ khác nhau. Cụ thể, ở nồng độ 20 ppm, nano bạc chỉ đạt 2,9% hoạt tính kháng nấm đối với *P. zingiberis*, trong khi không có hiệu lực ức chế đối với *F. oxysporum*. Ở nồng độ 50 ppm, nano bạc ức chế được 27,8% sự phát triển của nấm *Alternaria* sp., và ở nồng độ 100 ppm, tỷ lệ ức chế tăng lên 33,3%. Đặc biệt, ở nồng độ 60 ppm, nano bạc ức chế 39,5% sự phát triển của *P. zingiberis* và 48,5% đối với *F. oxysporum*. Đối với nấm *H. teres* dung dịch nano bạc ghi nhận hiệu lực kháng nấm ở tất cả các nồng độ thử nghiệm (25, 50 và 100 ppm), với hiệu lực ức chế dao động từ 40 - 53,3% so với đối chứng.

Châu et al. (2017) đã tổng hợp thành công vật liệu nano Ag/CTS/Bentonite dạng hình cầu, kích thước từ 5 đến 90 nm. Các thí nghiệm *in vitro* cho thấy, nano bạc ở nồng độ 400 ppm ức chế hiệu quả *Fusarium oxysporum* và *Rhizoctonia solani* lần lượt 66,7%

và 92,8% sau 2 ngày nuôi cấy. Đặc biệt, nồng độ từ 100 đến 400 ppm ngăn chặn hoàn toàn sự hình thành hạch nấm của *R. solani*. Nghiên cứu khác của Châu et al. (2020) về khả năng ức chế nấm gây bệnh trên cây thanh long, cho thấy hỗn hợp nano bạc và nano đồng (tỷ lệ Ag/Cu 30/18, tương đương 48 ppm) ức chế nấm 72,9% sự phát triển của *Neoscytalidium dimidiatum*, vượt trội so với nano bạc đơn lẻ ở 50 ppm chỉ đạt 69,8%. Ngoài ra, vật liệu nano Ag/Cu với nồng độ 40 ppm đạt hiệu quả ức chế tối đa 100% đối với nấm *Colletotrichum* sau 7 ngày và 93,3% đối với nấm *N. dimidiatum* sau 3 ngày nuôi cấy. Hiệu quả ức chế nấm *Neoscytalidium* sp. cũng được Linh et al. (2022) ghi nhận, với mức ức chế cao nhất 59,61% tại nồng độ 25 ppm, trong khi nano ZnO cho hiệu quả ức chế tối ưu 65,91% ở nồng độ 100 ppm. Gần đây, Danh et al. (2024) đã thành công trong việc tổng hợp 18 mẫu chế phẩm sinh học nano từ nhựa dầu nghệ kết hợp với nano bạc và chitosan. Các chế phẩm này thể hiện hoạt tính kháng nấm hiệu quả đối với nấm *Colletotrichum* spp., tác nhân gây bệnh thán thư, với mức ức chế dao động từ 15,55% đến 46,72% sau 3 ngày thử nghiệm. Đồng thời, các chế phẩm này cũng cho thấy khả năng kiểm soát bệnh thối quả do *Phytophthora* spp., với hiệu quả ức chế từ 13,78% đến 65,98% trong cùng thời gian. Một nghiên cứu tiến hành đánh giá ảnh hưởng của nano bạc đến hiện tượng nhiễm và quá trình tăng trưởng cây cúc trong hệ vi thủy canh cũng được thực hiện bởi Tùng et al. (2016). Kết quả cho thấy bổ sung 7,5 ppm nano bạc vào môi trường nuôi cấy giúp cây cúc phát triển tốt nhất sau 2 tuần, đồng thời giảm đáng kể hàm lượng vi sinh vật gồm 8 loài vi khuẩn và 3 loài nấm gây hại. Ở giai đoạn vườn ươm sau 4 tuần, cây cúc xử lý với 7,5 ppm nano bạc có tỷ lệ sống 100% và tăng trưởng vượt trội về chiều cao, số lá, số rễ, kích thước lá và khối lượng tươi, khô so với các nghiệm thức khác. Những nghiên cứu, báo cáo tương tự, đã cho thấy sự kết hợp chitosan oligosaccharide với các loại nano cho hiệu lực cao trong ức chế vi sinh vật gây bệnh cây trồng. Kết quả của những nghiên cứu này khẳng định tiềm năng ứng dụng của các chế phẩm nano sinh học trong việc kiểm soát nấm bệnh trên cây trồng, mở ra hướng đi mới cho các biện pháp bảo vệ cây trồng bền vững và hiệu quả hơn.

Các nghiên cứu hiện có đã chứng minh rõ ràng tiềm năng lớn của các chế phẩm nano, đặc biệt là nano bạc kết hợp với các vật liệu sinh học như chitosan oligosaccharide và các kim loại khác (đồng, bentonite), hay các lớp phủ bề mặt khác đã tạo ra các chế phẩm có tính hiệu quả trong việc kiểm soát hiệu quả nhiều loại vi sinh vật gây bệnh trên cây trồng. Sự đa dạng, đa năng và tính ứng dụng, thương mại rộng rãi của các hạt nano bạc đã góp phần mở rộng phạm vi nghiên cứu ứng dụng trong nông nghiệp. Tuy nhiên, bên cạnh những lợi ích, nano bạc cũng đã làm dấy lên mối lo ngại với các tác động bất lợi không chỉ đối với thực vật mà còn đối với sinh vật sống, hệ sinh thái, môi trường mà còn với con người thông qua chuỗi thức ăn với thực vật là "đầu tàu" của mạng lưới.

Nhìn chung, qua tổng quan tư liệu các nghiên cứu cho thấy hệ bệnh hại trên cây sen (*Nelumbo nucifera*) có tính đa dạng và phức tạp cao, bao gồm các nhóm nấm, sinh vật giống nấm, vi khuẩn và virus, trong đó các chi nấm gây bệnh phổ biến như *Alternaria, Nigrospora, Curvularia, Fusarium, Lasiodiplodia* cùng một số tác nhân khác như *Erysiphe, Pseudocercospora, Phytopythium* được ghi nhận với tần suất đáng kể tại nhiều quốc gia trồng sen. Ở Trung Quốc, Đài Loan và một số nước Đông Á, nhiều khảo sát có hệ thống kết hợp hình thái và định danh phân tử đã mô tả tình hình bệnh hại tương đối toàn diện, trái lại tại Việt Nam số lượng nghiên cứu còn hạn chế, rời rạc theo khu vực, và không ít báo cáo cũ thiếu dữ liệu trình tự, tiêu bản đối chiếu, dẫn đến độ tin cậy định danh chưa cao. Bên cạnh đó, trong bối cảnh Huế có diện tích canh tác sen lớn, gắn liền sâu sắc với hình ảnh văn hóa địa phương, phân bố cả trên ruộng và hồ, điều kiện vi khí hậu ẩm – nóng thuận lợi cho tác nhân gây bệnh hại phát triển. Tuy nhiên, nghiên cứu trong nước còn phân mảnh, thiếu các khảo sát tích hợp và định danh phân tử đa locus đối với tác nhân bệnh hại trên sen. Tiếp cận định danh các loài nấm gây hại đòi hỏi tích hợp đa nguồn bằng chứng (hình thái, sinh thái – ký chủ, và phát sinh loài phân tử đa locus/đồng quy), trong đó việc chuẩn hóa và sử dụng các marker thứ cấp ngoài ITS (như *TEF1-α, TUB2, GAPDH, CHS1, LSU, RPB1/2*) là cần thiết để nâng cao độ chính xác định danh. Song hành với đó, nano bạc được ghi nhận là vật liệu có tiềm năng ứng dụng cao trong quản lý bệnh hại thực vật nhờ cơ chế tác động đa mục tiêu, bao gồm phá vỡ cấu trúc và tính thấm màng, cảm ứng stress oxy hóa (ROS), tương tác ion. Các kết quả trong và ngoài nước đều cho thấy hiệu lực ức chế đáng kể đối với nhiều loài nấm gây bệnh quan trọng, song mức độ hiệu quả phụ thuộc mạnh vào đặc trưng hóa – lý của hạt (kích thước, hình dạng, điện tích, lớp phủ ổn định), nồng độ sử dụng, thời điểm và phương thức áp dụng cũng như nền mô tiếp xúc và điều kiện môi trường. Mặc dù cho thấy hiệu quả kháng nấm đáng kể, AgNPs đặt ra yêu cầu đánh giá an toàn: tồn lưu Ag/Ag+ trong mô–sản phẩm, tác động lên hệ vi sinh đồng cư và vi sinh có lợi, nguy cơ hình thành tính kháng bạc, và ảnh hưởng sinh lý–năng suất khi ứng dụng dài hạn ngoài thực địa, đồng ruộng.

Rõ ràng, có thể nhận diện một số khoảng trống khoa học – thực tiễn chủ yếu. Thứ nhất, chưa có một khảo sát tích hợp, quy mô đủ lớn về phổ tác nhân nấm gây bệnh trên sen trồng ở Thành phố Huế với quy trình phân lập, mô tả và định danh chuẩn hóa. Thứ hai, thiếu các đánh giá định lượng, so sánh có kiểm soát về hiệu lực của nano bạc trên các tác nhân nấm chủ lực của sen Huế để làm nền tảng lý thuyết ứng dụng nano bạc trong điều kiện đồng ruộng của địa phương. Các khoảng trống này định hướng cho mục tiêu và thiết kế nghiên cứu của luận án nhằm vừa làm rõ đối tượng gây bệnh hại, vừa đánh giá được mức độ hiệu quả của nano bạc trong kiểm soát các tác nhân này trong điều kiện phòng thí nghiệm.

CHƯƠNG 2. 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. Vị trí các địa điểm, bộ phân thu thập mẫu, giống sen được trình bày chi tiết trong Bảng phụ lục 1.1

Dung dịch nano bạc được tổng hợp từ chiết xuất cây nha đam, cung cấp bởi Khoa Vật lý, Đại học Khoa học Huế. Nồng độ dung dịch gốc là 40 mg/L. Các thông tin chi tiết được trình bày ở Phụ lục 2.

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 sen của hai giống sen hồng cao sản và sen trắng Huế xuất hiện triệu chứng bệnh điển hình được ghi nhận và thu thập tại các địa điểm trồng sen khác nhau trên địa bàn Thành phố Huế. Sau khi ghi nhận các triệu chứng và thông tin liên quan, những mẫu thu thập được bảo quản trong túi zip và vận chuyển về phòng thí nghiệm nhằm tiến hành phân lập tác nhân gây bệnh. Các mẫu lá có triệu chứng bệnh rửa sạch bằng nước cất vô trùng (SDW), sau đó dùng kéo 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. Các mẫu nấm được xác định là tác nhân gây bệnh bằng cách xác minh lây nhiễm nhân tạo theo quy trình Koch (Schönbach, 2013).

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. Các dạng môi trường phụ như WA (water agar – môi trường thạch nước), OA (oatmeal agar – môi trường thạch yến mạch), SNA (sucrose nitrate agar) cũng được sử dụng để so sánh, đánh giá. Riêng các chủng phân lập thuộc chi *Neofusicoccum* và *Lasiodiplodia* được thực hiện nuôi cấy phụ trên môi trường PNA (thạch nước agar bổ sung lá thông đã hấp khử trùng) để kích thích sản sinh bào tử. 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.

Bảng 2.1. Trình tự các mồi (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)	*Colletotrichum*
	GDR1	GGG TGG AGT CGT ACT TGA GCA TGT		
	gpdh1-F	CAA CGG CTT CGG TCG CAT TG	Berbee et al. (1999)	*Curvularia, Exserohilum*
	gpdh2-R	GCC AAG CAG TTG GTT GT GC		
Actin *(ACT)*	ACT-512F	ATGTGCAAGGCCGGTTTCGC	Carbone & Kohn (1999)	*Colletotrichum*
	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)	*Colletotrichum*
	CHS-354R	TGG AAG AAC CAT CTG TGA GAG TTG		
β-tubulin 2 *(TUB2)*	T1	AAC ATG CGT GAG ATT GTA AGT	O'Donnell & Cigelnik (1997)	*Lasiodiplodia Nigrospora Colletotrichum Diaporthe Neopestalotiopsis*
	Bt2a	GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC	Glass & Donaldson (1995)	
	Bt2b	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC	Glass & Donaldson (1995)	
Apn2-Mat1-2 intergenic spacer and partial mating type Mat1-2 gene *(ApMAT)*	ApM-F	TCA TTC TAC GTA TGT GCC CG	Silva *et al.* (2012)	*Colletotrichum*
	ApM-R	CCA GAA ATA CAC CGA ACT TGC		
Translation elongation factor 1-alpha *(TEF1-α)*	EF1-728F	CAT CGA GAA GTT CGA GAA GG	Carbone & Kohn (1999)	*Lasiodiplodia Neofusicoccum Nigrospora Colletotrichum Diaporthe Neopestalotiopsis*
	EF1-983F	GCY CCY GGH CAY CGT GAY TTY AT	Schoch (2009)	
	EF1-986R	TAC TTG AAG GAA CCC TTA CC	Carbone & Kohn (1999)	
	EF1-2218R	ATG ACA CCR ACR GCR ACR GTY TG	Schoch (2009)	
Large Subunit ribosomal RNA *(LSU)*	LR0R	ACC CGC TGA ACT TAA GC	Rehner & Samuel (1994)	*Curvularia*
	LR5	TCC TGA GGG AAA CTT CG	Vilgalys & Hester (1990)	

Quá trình khuếch đại PCR được thực hiện bằng máy SimpliAmp™ (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, Hoa Kỳ). Tổng thể tích mỗi phản ứng PCR (50 µL) bao gồm: 25 µL Go Taq Green 2X Master Mix (Promega, Hoa Kỳ), 5 µL (20 - 100 ng) gDNA khuôn mẫu, 5 µL mỗi primer (10 pmol/µL) và 15 µL ddH_2O (Promega, Hoa Kỳ). Thông tin chi tiết các mồi (primer) 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. 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 chiều được xử lý để thu nhận các trình tự đồng thuận cho từng phân lập bằng phần mềm BioEdit v7.0.5 (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, Hoa Kỳ) (Hall, 1999). Căn chỉnh đa chuỗi bằng MUSCLE với từng vùng gene được thực hiện đồng thời các trình tự phân lập với các trình tự tham chiếu có liên quan chặt chẽ được thu thập trong cơ sở dữ liệu NCBI bằng phần mềm MEGA 11 theo các tham số mặc định (Hinchliff & Roalson, 2013; Tamura et al., 2021). Các căn chỉnh thô (raw alignment) này sau đó được tối ưu hóa bằng trimAI (Capella-Gutiérrez et al., 2009) theo phương pháp "gappyout" để loại bỏ các vị trí dư thừa dựa trên phân bố khoảng trống trong mỗi căn chỉnh, nhằm thu nhận tệp trình tự căn chỉnh hoàn chỉnh cuối cùng. Các tệp dữ liệu của các vùng gene liên kết này được điều chỉnh thủ công khi cần thiết. Tất cả các khoảng trống (gap) được xem là dữ liệu thiếu và việc nối các locus trình tự đã căn chỉnh được thực hiện bằng phần mềm MEGA 11 hoặc Mesquite v. 2.75.

Cây phát sinh đa locus được xây dựng dựa trên phương pháp Maximum Likelihood (ML) bằng công cụ IQ-TREE v. 2.1.3 (Minh et al., 2020). ModelFinder được sử dụng để xác định mô hình phù hợp nhất cho việc phân tích phát sinh loài (Kalyaanamoorthy et al., 2017). Hệ số hỗ trợ được xác định bằng cách sử dụng các thông số: ultrafast-bootstrap, xác suất hậu nghiệm aBayesian và SH-aLRT (tối thiểu 1000 lần lặp, tùy theo mức độ phức tạp của từng chi, 1.000 – 10.000). Các cây phát sinh loài thu nhận từ phân tích trên được hiển thị bằng FigTree v. 1.4.4 (http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree) (Rambaut, 2018) hoặc Interactive Tree of Life (iTOL) v.6 (Letunic & Bork, 2021), được xử lý đồ họa chi tiết bằng PowerPoint (Microsoft, CA, Hoa Kỳ) và Adobe Illustrator CC 2021 (Adobe Systems, CA, Hoa Kỳ). Tất cả các đơn vị phân loại (taxa) được sử dụng cho các phân tích trong nghiên cứu được trình bày chi tiết trong các bảng tương ứng với từng chi (Phụ lục 2, Bảng phụ lục 2.1-

2.9). Tất cả các trình tự mới thu được trong nghiên cứu hiện tại đã được gửi tới Genbank NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Bảng 2.2. Các locus kết hợp được lựa chọn sử dụng tương ứng với từng chi

Chi		**Các locus kết hợp được sử dụng**
Neofusicoccum		ITS + *TUB2*
Lasiodiplodia		ITS + *TUB2* + *TEF1-α*
Nigrospora		ITS + *TUB2* + *TEF1-α*
Curvularia		ITS + *GAPDH* + *LSU**
Exserohilum		ITS + *GAPDH*
Colletotrichum	Phức hợp gloeosporioides	ITS + *GAPDH* + *TUB2* + *TEF1-α* + *CHS-1* + *ACT* + ApMAT
	Phức hợp orchidearum	ITS + *GAPDH* + *TUB2* + *TEF1-α* + *CHS-1* + *ACT*
Neopestalotiopsis		ITS + *TUB2* + *TEF1-α*
Diaporthe		ITS + *TUB2* + *TEF1-α* hoặc *TUB2* + *TEF1-α*
Aspergillus		ITS

Ghi chú: LSU được sử dụng như một locus bổ trợ - vì rất nhiều trình tự LSU không được ghi nhận ở rất nhiều loài tham chiếu thuộc chi *Curvularia* trên Genbank

Ranh giới loài được xác định bằng mô hình nhận dạng loài phát sinh gene phù hợp phả hệ (Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition - GCPSR) để phân tích các chủng phân lập/loài có phát sinh gene không rõ ràng theo phương pháp được mô tả bởi Quaedvlieg et al. (2014). Cây phát sinh loài đa locus được sử dụng để xác định sự xuất hiện của sự kiện tái tổ hợp trong các phức hợp loài, thông qua kiểm tra chỉ số tương đồng từng cặp (Φw, PHI) bằng phần mềm SplitsTree v.6.4.14 (Huson & Bryant, 2006). Để phát hiện sự tái tổ hợp nội gene, các locus riêng lẻ cũng được phân tích bằng xét nghiệm PHI. Sự tái hợp đáng kể được ghi nhận khi chỉ số PHI dưới ngưỡng 0,05 (Φw < 0,05). Mối quan hệ giữa các đơn vị phân loại có liên quan chặt chẽ với nhau được xác định bằng cách xây dựng mạng phát sinh gene (Split Network) từ tập dữ liệu được nối đa locus, sử dụng phép biến đổi LogDet và các tùy chọn thuật toán NeighborNet/Split Decomposition.

Phân tích PTP (Poisson Tree Processes) được thực hiện (trong trường hợp cần thiết) bằng cách sử dụng tệp phân tích phát sinh loài ML tạo ra (chuyển đổi định dạng

NEXUS). Phân tích PTP được thực hiện với 100.000 thế hệ Markov chain Monte Carlo (MCMC), các tham số khác bao gồm thinning: 100, burn-in: 10% (0,1) và tiến hành trên web trực tuyến PTP (http://species.h-its.org/ptp/). Sự hội tụ của các lần lặp MCMC được đánh giá bằng cách trực quan hóa biểu đồ log-likelihood.

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

Mẫu nấm thuần được cắt từ rìa của tản nấm sau 72 giờ nuôi cấy ở 30°C, sau đó đặt vào tâm các đĩa petri (đường kính đĩa 9cm, đường kính sinh trưởng tối đa thực tế 8,5 cm) chứa môi trường PDA (Potato dextrose agar – thạch khoai tây) 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, Syngenta) 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 thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Đường kính tản nấm được đo sau 3, 5, và 7 ngày nuôi cấy bằng thước kẹp điện tử và ghi nhận hình ảnh. Hiệu lực ức chế của nano bạc được tính theo công thức được mô tả bởi Abbott (1925).

$$HLUC(\%) = \left[\frac{C - T}{C}\right] x100$$

Trong đó:

HLUC (%): là hiệu lực ức chế của nano bạc tính theo phần trăm

C (mm): Đường kính trung bình tản nấm trong đĩa đối chứng

T (mm): Đường kính trung bình tản nấm trong các đĩa thí nghiệm tương ứng với từng nồng độ xử lý nano bạc.

Các giá trị đường kính được sử dụng để tính toán theo công thức là các giá trị đã được xử lý bằng cách trừ đi đường kính khoanh nấm ban đầu ở thời điểm ban đầu của các đĩa thử nghiệm tương ứng. Ngoài đường kính tản nấm, 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 quan sát, ghi nhận và so sánh với đối chứng. Ghi nhận hình ảnh ở các thời điểm 3, 5, 7 ngày sau cấy.

❁ Phương pháp đánh giá độ nhạy cảm của các chủng nấm đối với nano bạc (giá trị EC_{50})

Độ nhạy của các chủng phân lập nấm đối với nano bạc trên môi trường rắn (thạch) được biểu thị thông qua giá trị EC_{50}. Giá trị EC_{50} được ước tính theo 3 mô hình khác nhau: hồi quy logarit tuyến tính, nội suy tuyến tính trên trục log của nồng độ (log-space

interpolation) và hồi quy phi tuyến tính Probit với phép chuyển đổi $\log_{10}$. Mô hình được xây dựng dựa trên cặp dữ liệu đầu vào là liều lượng (*dose - nồng độ nano bạc xử lý được chuyển đổi sang logarit cơ số 10*) – đáp ứng (*response – giá trị hiệu lực ức chế được chuẩn hóa*) bằng phần mềm R 4.4.0. Cặp dữ liệu liều lượng – đáp ứng được lấy từ số liệu của thử nghiệm đánh giá hiệu lực ức chế trên môi trường thạch PDA của các phân lập ở các nồng độ xử lý nano bạc khác nhau.

Phương pháp thống kê mô tả tứ phân vị được áp dụng để phân nhóm mức độ nhạy cảm của các chủng phân lập thử nghiệm với nano bạc dựa trên các giá trị EC_{50} ghi nhận được.

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. Dãy dung dịch nano bạc thử nghiệm (giếng 2 – giếng 10) được thiết lập và chuẩn bị trong 200 µL (môi trường và nano bạc) với nồng độ được tính trước, sao cho sau khi bổ sung 20 µL huyền phù bào tử (1×10^5 CFU/mL), tạo thành dãy phạm vi nồng độ cuối cùng 0,078125 – 20 mg/L. Riêng hàng giếng 11 được thiết lập bằng cách bổ sung trực tiếp 200 µL 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 30°C, tốc độ lắc 150 vòng/phút. Tiếp theo 20 µL dung dịch resazurin được thêm vào các giếng (nồng độ hoạt động cuối cùng trong mỗi giếng: 44 µM) 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 µL dung dịch từ các giếng MIC, 2×MIC và 4×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. Tỷ lệ < 4 được xem là hoạt tính diệt nấm, trong khi tỷ lệ ≥ 4 cho thấy khả năng ức chế sự phát triển nấm. Tất cả các xét nghiệm được thực hiện theo cặp và lặp lại hai lần độc lập.

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

Sinh khối nấm được ước tính thông qua việc xác định trọng lượng khô của sợi nấm. Sinh khối sợi nấm sau khi nuôi cấy trong môi trường lỏng (Potato Dextrose Broth – PDB). Sau 3 ngày nuôi cấy ở cùng điều kiện nhiệt độ 30°C, với 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 ở nhiệt độ 70°C đến trọng lượng không đổi trên giấy lọc Whatman số 1 (GE Healthcare). Trọng lượng khô của sinh khối (tính bằng mg) được xác định bằng cách trừ trọng lượng ban đầu của giấy lọc (trong trọng lượng tổng của sợi nấm và giấy lọc). Sinh khối nấm (mg) được tính là giá trị trung bình của ba lần lặp lại độc lập.

2.2.4.3. Phương pháp đánh giá ảnh hưởng của nano bạc đến đặc điểm sinh hóa và tính toàn vẹn của màng tế bào

❁ 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 µL huyền phù bào tử (10^5 CFU/mL) được cấy vào môi trường PDB và nuôi cấy ở 30°C, 150 vòng/phút trong 7 ngày. Sau khi rửa hai lần bằng nước cất vô trùng để loại bỏ môi trường dư thừa, phần sợi nấm được thu thập để đánh giá. Sau đó, lấy 0,5g sợi nấm được chuyển vào các bình tam giác 50 mL chứa 25 mL nước cất vô trùng (SDW) làm đối chứng (Control), 25 mL nano bạc nồng độ 5 và 30 mg/L. Tiến hành ủ trong máy lắc ở 30°C, sau đó giá trị độ dẫn điện ngoại bào (EEC) được xác định bằng máy đo độ dẫn điện ở các mốc thời gian: 3 giờ, 12 giờ, 24 giờ, 36 giờ và 48 giờ, kết quả được biểu thị bằng µS/cm. Máy đo độ dẫn điện model: Adwa AD31 (Adwai Instruments, Hungary), phạm vi độ dẫn điện từ 0 – 3999 µS/cm, được hiệu chuẩn với dung dịch chuẩn 1413 µS/cm (25 °C). Thí nghiệm được lặp lại ba lần.

Sự giải phóng các thành phần hấp thụ ở bước sóng 260nm hay mức độ rò rỉ acid nucleic (được biểu thị bằng giá trị OD_{260}) cũng được đánh giá dựa trên thiết kế thử nghiệm tương tự cách tiến hành xác định độ dẫn điện ngoại bào (EEC). 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 (DLAB 0412, Trung Quốc). Phần dịch nổi trong được sử dụng

để đánh giá sự rò rỉ acid nucleic ngoại bào (OD_{260}) bằng máy quang phổ UV-Vis (Spectro UV2650, LABOMED).

❁ Phương pháp xác định hàm lượng MDA (Malondialdehyde)

Mức độ peroxid hóa lipid được đánh giá thông qua hàm lượng malondialdehyde (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 nitơ 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)). Hỗn hợp được ủ ở 95°C trong 30 phút, 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

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

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

Trong đó:

+ A_{450}, A_{532}, A_{600} biểu thị độ hấp thụ ở bước sóng 450 nm, 532 nm, 600 nm

+ C_{MDA}: nồng độ MDA trong dung dịch hỗn hợp. V_0, V_t, V_r lần lượt biểu thị thể tích phần hỗn hợp dịch tham gia phản ứng, tổng thể tích dịch chiết thô của mẫu, thể tích dung dịch mẫu lấy trong quá trình đo độ hấp thụ ở các bước sóng.

+ FW là khối lượng tươi của sợi nấm (g)

❁ 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 lần lượt dung dịch nước muối sinh lý và nước cất vô trùng, tiếp tục làm khô bề mặt bằng giấy thấm. 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. Tiếp theo, ủ hỗn hợp ở nhiệt độ 85 °C trong bể ủ nhiệt trong 2 giờ. Sau khi ủ, 5 mL n-hexan được thêm vào hỗn hợp và tiếp tục vortex đều trong 2 phút. Tiếp theo, lớp n-hexan được thu thập và được xác minh bằng máy quang phổ UV-Vis (230–300 nm). Sự xuất hiện của dehydroergosterol (ở 282 nm và 230 nm) và ergosterol (ở 282 nm) tạo ra các đỉnh hấp thụ đặc trưng. Thí nghiệm được lặp lại ba lần. Công thức sau được sử dụng để xác định hàm lượng ergosterol:

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

trong đó: A_{282} và A_{230} biểu thị độ hấp thụ ở 282 nm và 230 nm. FW: trọng 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_{560}. Một đơn vị SOD tương đương với lượng enzyme gây ra sự giảm 50% khả năng ức chế NBT.

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

2.2.5. Phương pháp xử lý số liệu

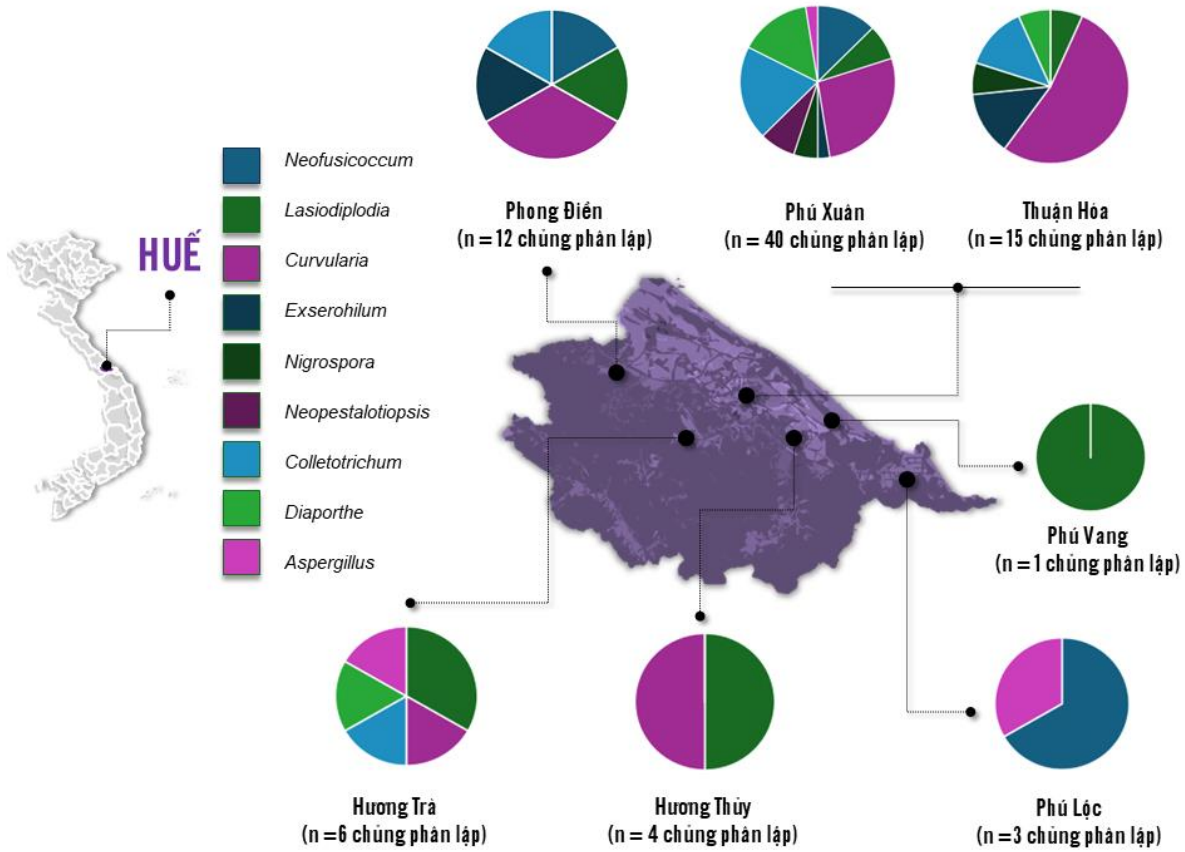
Dữ liệu được phân tích bằng phần mềm IBM SPSS 23.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, Hoa Kỳ) và DATAtab (nay là numiqo, Graz, Austria). Tất cả dữ liệu thực nghiệm được trình bày dưới dạng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn (SD). Sự sai khác giữa các nghiệm thức, công thức xử lý được đánh giá bằng ANOVA, cùng với kiểm định Tukey (Tukey's HSD) cho các so sánh cặp. Mức ý nghĩa thống kê cho các kiểm định được xem xét ở mức xác suất 0,05 ($p < 0,05$) hoặc 0,01 ($p < 0,01$).

Trang web trực tuyến (https://www.chiplot.online/heatmap.html) được sử dụng để thể hiện biểu đồ Heatmap đáp ứng của 29 chủng phân lập với nano bạc. Các hình ảnh, biểu đồ trực quan hóa dữ liệu khác trong luận án được thực hiện với R với gói (package) ggplot2 với các hàm cụ thể như Bản đồ nhiệt (package ggplot2, hàm geom_tile), EC_{50} (ggplot2, dplyr).

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.



Hình 3.1. Các địa điểm phân lập và sự phân bố các chi nấm liên quan đến các triệu chứng bệnh hại trên cây sen trồng ở Thành phố Huế. Bên trái là vị trí địa lý của Thành phố Huế. Bên phải biểu thị sự phân bố (theo quận, huyện) của các chi (genus) ghi nhận trong nghiên cứu

Đầu tiên, quá trình sàng lọc được thực hiện dựa trên các dữ liệu về đặc điểm hình thái (đặc điểm nuôi cấy, hình dạng bào tử) và xác minh bằng lây nhiễm nhân tạo (quy trình Koch): 81 chủng phân lập nấm được xác định là các tác nhân gây hại trên cây sen trồng ở Thành phố Huế (Bảng phụ lục 1.1). 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 này phân bố vào một ngành là: Ascomycota

với 3 lớp khác nhau được ghi nhận – Dothideomycetes, Sordariomycetes và Eurotiomycetes. Những tác nhân này phân bố vào 7 Họ Pleosporaceae, Botryosphaeriaceae, Diaporthaceae, Aspergillaceae, Apiosporaceae, Sporocadaceae và Glomerellaceae. Ở cấp độ chi, có tổng cộng 9 chi nấm được ghi nhận liên quan đến các triệu chứng bệnh hại trên lá sen. Trong đó, *Curvularia* (Họ Pleosporaceae, Bộ Pleosporales) là chi phổ biến nhất với 26 chủng phân lập, phần lớn liên quan đến các triệu chứng đốm lá. Cùng thuộc Họ Pleosporaceae này, chi *Exserohilum* cũng được phát hiện với 5 chủng phân lập, liên quan đến hiện tượng khô nâu trên lá sen. Họ Botryosphaeriaceae ghi nhận 18 chủng phân lập thuộc 2 chi tương ứng là *Neofusicoccum* (9 chủng phân lập) và *Lasiodiplodia* (11 chủng phân lập) – phần lớn liên quan đến các triệu chứng tàn lụi, thối cuống lá ở cây sen. Chi *Colletotrichum* thuộc họ Glomerellaceae, tác nhân chính liên quan đến bệnh thán thư và thối trên lá sen, cũng được ghi nhận với 13 chủng phân lập, phân bố duy nhất trong chi này. Ngoài ra, chi *Nigrospora* (Apiosporaceae) và *Neopestalotiopsis* (Sporocadaceae) được ghi nhận với 3 chủng phân lập tương ứng với mỗi chi. Chi *Diaporthe* ghi nhận 8 chủng phân lập gây bệnh đốm nâu trên lá cây sen, tuy nhiên, độc lực của các chủng này thấp và không nhất quán. Họ Aspergillaceae chỉ ghi nhận một chi là *Aspergillus*, được xác định là tác nhân gây hại thứ cấp hoặc mầm bệnh cơ hội. Các chủng này chủ yếu liên quan đến hiện tượng thối rữa và mục nát của lá sen sau khi bị tổn thương cơ học do mưa giông, hoạt động canh tác, thu hái hoặc tác động côn trùng gây hại.

3.1.1. Đặc điểm phân bố của các tác nhân nấm liên quan đến các triệu chứng bệnh hại trên cây sen theo chi, giống sen, địa lý và sinh cảnh

Trong nghiên cứu này, đánh giá về phân bố địa lý các tác nhân nấm liên quan đến các triệu chứng bệnh hại trên cây sen hồng và cây sen trắng ở Thành phố Huế cũng được tiến hành. Kết quả nghiên cứu cho thấy sự phân bố tác nhân gây hại không đồng đều giữa các quận/huyện (nay là phường) ở Thành phố Huế. Phú Xuân là địa điểm có tần suất ghi nhận tác nhân gây hại trên cây sen lớn nhất (40 chủng phân lập, chiếm gần 50% tổng số phân lập) và thể hiện sự đa dạng nhất, với 8/9 chi được ghi nhận (Hình 3.2B). Các địa phương khác như Thuận Hóa (15 chủng), Phong Điền (12 chủng) và Hương Trà (6 chủng) cũng ghi nhận số lượng chủng phân lập đáng kể (Hình 3.2C). Ngược lại, tại Phú Vang, chỉ ghi nhận 1 mẫu thuộc chi *Lasiodiplodia*, điều này có thể được lý giải bởi 2 nguyên nhân chính: (1) *số lượng mẫu thu thập thấp hơn đáng kể so với các địa phương khác*, (2*) khác biệt trong phân bố vùng trồng sen giữa các địa phương* cũng có

thể là một yếu tố ảnh hưởng đến số lượng và sự đa dạng của các mẫu nấm được thu thập. Những yếu tố này cần được xem xét kỹ lưỡng để đảm bảo tính chính xác và toàn diện trong việc đánh giá sự phân bố và mức độ gây hại của các chi nấm tại khu vực.

Xét tương quan sự phân bố theo từng chi, *Curvularia* là chi phổ biến nhất với 26 chủng phân lập, xuất hiện ở 6/7 quận/huyện/phường được khảo sát của Thành phố Huế (Hình 3.2C-D). Bên cạnh đó, một số chi nấm có sự tập trung rõ rệt ở các địa điểm cụ thể, chi *Curvularia* tập trung nhiều ở Phú Xuân (11 chủng phân lập) và Thuận Hóa (8 chủng phân lập). *Colletotrichum* tập trung tại Phú Xuân (8 chủng) và Phong Điền (2 chủng). *Lasiodiplodia* phân bố tương đối đều ở nhiều địa điểm nhưng tập trung ở Phú Xuân (3 chủng) và Phong Điền (2 chủng). Ngược lại, một số chi nấm khác lại có sự phân bố hạn chế - cục bộ, chẳng hạn như *Neopestalotiopsis*, chỉ xuất hiện ở Phú Xuân, hay *Nigrospora* chỉ được ghi nhận tại hai địa điểm: Phú Xuân và Thuận Hóa (Hình 3.2C-D, Bảng phụ lục 1.2). Sự phân bố hẹp này có thể liên quan đến các yếu tố đặc thù của môi trường hoặc ký chủ (giống sen) tại các địa phương này. Việc xác định chính xác các chi nấm gây hại và hiểu rõ hơn về sự khác biệt trong phân bố của chúng, sẽ góp phần cung cấp thông tin quan trọng để xây dựng chiến lược quản lý dịch hại phù hợp, vừa đảm bảo hiệu quả kiểm soát vừa hạn chế tác động tiêu cực đến môi trường và sản xuất nông nghiệp. Điều này nhấn mạnh tầm quan trọng của việc nghiên cứu sâu hơn về đặc điểm, các thông tin sinh học của chủng phân lập, xác định được chính xác tác nhân gây hại để làm cơ sở nền tảng, phát triển các biện pháp kiểm soát hiệu quả nhằm giảm thiểu tác động tiêu cực đến mùa vụ và sinh kế của nông dân trồng sen tại khu vực.

Nhằm làm rõ mối quan hệ giữa điều kiện sinh cảnh và sự phân bố của các chủng nấm phân lập trên cây sen, nghiên cứu đã tiến hành phân tích theo từng dạng môi trường sinh cảnh nơi mẫu được thu thập. Trong nghiên cứu này, điều kiện môi trường sinh cảnh được phân loại thành ba phân dạng chính: ruộng, hồ và chậu.

- Ruộng: Sinh cảnh ruộng được định nghĩa là các khu vực mặt nền là ruộng nơi cây sen được trồng. Dạng sinh cảnh này chủ yếu bao gồm các ruộng chuyển đổi từ trồng lúa sang trồng sen, đặc trưng bởi mức độ ngập nước thấp và dễ bị ảnh hưởng bởi các hoạt động nông nghiệp liền kề.

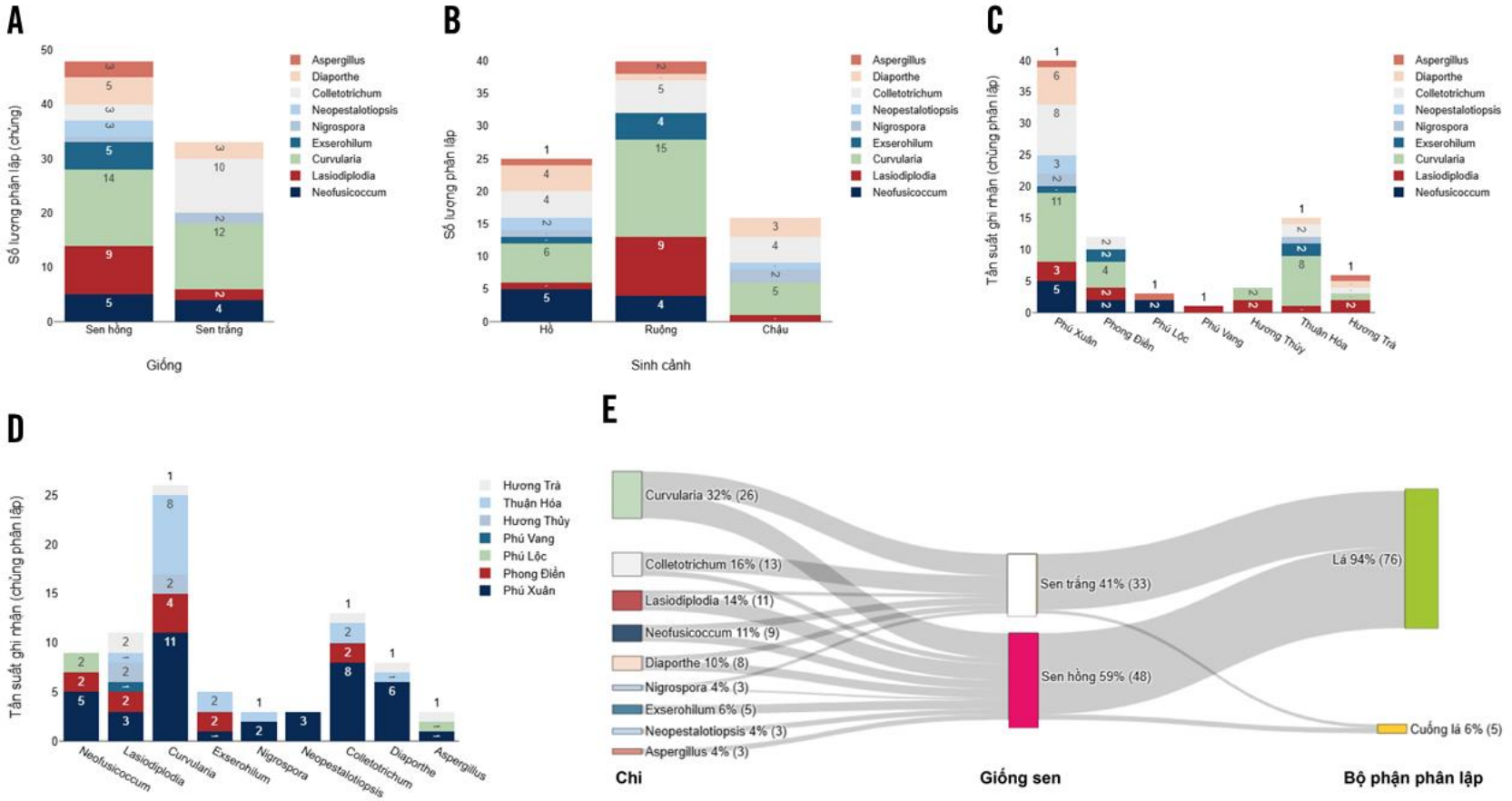
- Hồ: dạng sinh cảnh này được phân loại cho các hồ trong hệ thống thủy đạo (bao gồm hồ tự nhiên, hồ đào và các hồ là vết tích của con sông cũ như Kim Long, Bạch Yến – sông Ngự Hà ngày nay) của Thành Nội và các hồ trước và trong các khuôn viên các lăng tẩm. Đặc trưng của sinh cảnh này là mức độ ngập nước cao, tính ổn định cao hơn.

- Chậu: Dạng sinh cảnh chậu được chỉ định cho các mẫu thu thập từ cây sen được trồng trong chậu, các khu vực cảnh quan nhân tạo hay nhà vườn. Đặc trưng của sinh cảnh này là mức độ ngập nước thấp và tính biến động, di động môi trường cao. Ngoài ra, sinh cảnh chậu có nguy cơ cao trong việc phát tán các tác nhân gây hại khó kiểm soát, đặc biệt trong các hoạt động thương mại và vận chuyển cây trồng.

Kết quả phân tích được thể hiện trong Hình 3.2B và Phụ lục Bảng 1.3 cho thấy môi trường ruộng là sinh cảnh có sự đa dạng về chi và số lượng chủng phân lập cao nhất, với sự ưu thế rõ rệt của các chi như *Curvularia*, *Lasiodiplodia* và *Exserohilum.* Trong đó, *Curvularia và Colletotrichum* là hai chi phổ biến nhất, được ghi nhận trong tất cả các phân dạng điều kiện sinh cảnh (hồ, ruộng, chậu). Tuy nhiên, sự phân bố và ưu thế của các chi nấm lại phụ thuộc vào từng giống sen và từng phân dạng sinh cảnh. Cụ thể, chi *Colletotrichum* ưu thế ở sen trắng (10/13 chủng phân lập) và phân bố đồng đều ở cả 3 dạng sinh cảnh. Ngược lại, *Lasiodiplodia* phân bố chủ yếu trên sen hồng (9/11 chủng phân lập) và tập trung phần lớn ở sinh cảnh ruộng (với 9/11 chủng phân lập). Đáng chú ý, có đến 15/26 chủng phân lập của chi *Curvularia* và 4/5 chủng phân lập của *Exserohilum* được phân lập từ sinh cảnh ruộng. Ngược lại, một số chi như *Neopestalotiopsis* và *Nigrospora* chỉ xuất hiện ở 2 dạng sinh cảnh hồ hoặc chậu, chưa ghi nhận sự hiện diện ở môi trường sinh cảnh: ruộng. Tương tự, phần lớn các chủng phân lập của *Diaporthe* (7/8) được ghi nhận ở hồ hoặc chậu và chỉ duy nhất một chủng phân lập được ghi nhận trong điều kiện đồng ruộng.

Bên cạnh đó, một số chi như *Exserohilum*, *Neopestalotiopsis* và *Aspergillus* có phạm vi phân bố hạn chế, chỉ được ghi nhận xuất hiện trên giống sen hồng (Hình 3.2A, E; Bảng phụ lục 1.3). Những dữ liệu này cho thấy sự thích nghi đặc thù của các chi nấm gây hại với từng dạng sinh cảnh và từng giống sen, phản ánh khả năng phân bố và sinh trưởng đa dạng tùy thuộc vào điều kiện môi trường cũng như đặc điểm vật chủ cụ thể.

Tóm lại, sự phân bố các chi nấm gây hại trên cây sen tại Thành phố Huế chịu ảnh hưởng đáng kể bởi các 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 địa điểm khảo sát 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.



Hình 3.2. Cấu trúc phân bố các chi nấm gây hại trên cây sen trồng ở Thành phố Huế theo giống, sinh cảnh, địa điểm và bộ phận phân lập. **A**: Sự phân bố các chi nấm gây hại theo từng giống; **B**: Sự phân các chi nấm gây hại theo môi trường sinh cảnh ghi nhận; **C**: Sự phân bố các chi nấm gây hại theo từng địa điểm phân lập (quận/huyện); **D**: Sự phân bố của từng chi nấm gây hại theo địa điểm; **E**: Biểu đồ Sankey biểu thị tương quan tỷ lệ phân bố giữa các chi nấm gây hại - giống – bộ phận phân lập trên cây sen.

3.1.2. Đa dạng thành phần loài nấm liên quan đến các triệu chứng bệnh hại trên cây sen dựa trên kỹ thuật sinh học phân tử

Trước thực tế, với sự đa dạng cao trong thành phần chi và sự phân bố không đồng đều của các chi nấm gây hại trên cây sen trồng trên địa bàn Thành phố Huế, việc định danh chính xác đến cấp độ loài gặp nhiều khó khăn khi chỉ dựa vào các đặc điểm hình thái truyền thống. Trong bối cảnh đó, việc áp dụng các kỹ thuật sinh học phân tử hiện đại như giải trình tự DNA tại các locus đặc hiệu và phân tích phát sinh loài đa locus (multi-locus phylogenetic analysis) trở thành một yêu cầu cấp thiết. Các kỹ thuật này không chỉ giúp xác định chính xác tác nhân gây hại đến cấp độ loài, mà còn phát hiện các phức hợp loài (species complexes) tiềm ẩn. Điều này tạo tiền đề quan trọng để xây dựng dữ liệu hệ gene, phân tử của các tác nhân gây hại trên cây sen, hỗ trợ hiệu quả cho công tác giám sát, chiến lược dự báo nguy cơ dịch bệnh, và đặc biệt là phát triển các biện pháp quản lý và phòng chống đặc hiệu, hiệu quả hơn cho từng tác nhân gây hại riêng biệt trong tương lai gần. Để xác định chính xác các tác nhân gây hại ở cấp độ loài, nghiên cứu này đã áp dụng một cách tiếp cận đa phương pháp linh hoạt, phù hợp với từng đối tượng cụ thể. Các phương pháp được sử dụng bao gồm kỹ thuật sinh học phân tử thông qua giải trình tự các vùng gene đặc trưng, kết hợp với phân tích phát sinh loài đa locus nhằm nâng cao độ chính xác trong phân loại. Việc định danh loài được thực hiện dựa trên sự tích hợp chặt chẽ giữa kết quả phân tích phân tử, dữ liệu hình thái học, lịch sử phân bố, thông tin về ký chủ của tất cả 9 chi nấm trong nghiên cứu.

3.1.2.1. Neofusicoccum và Lasiodiplodia

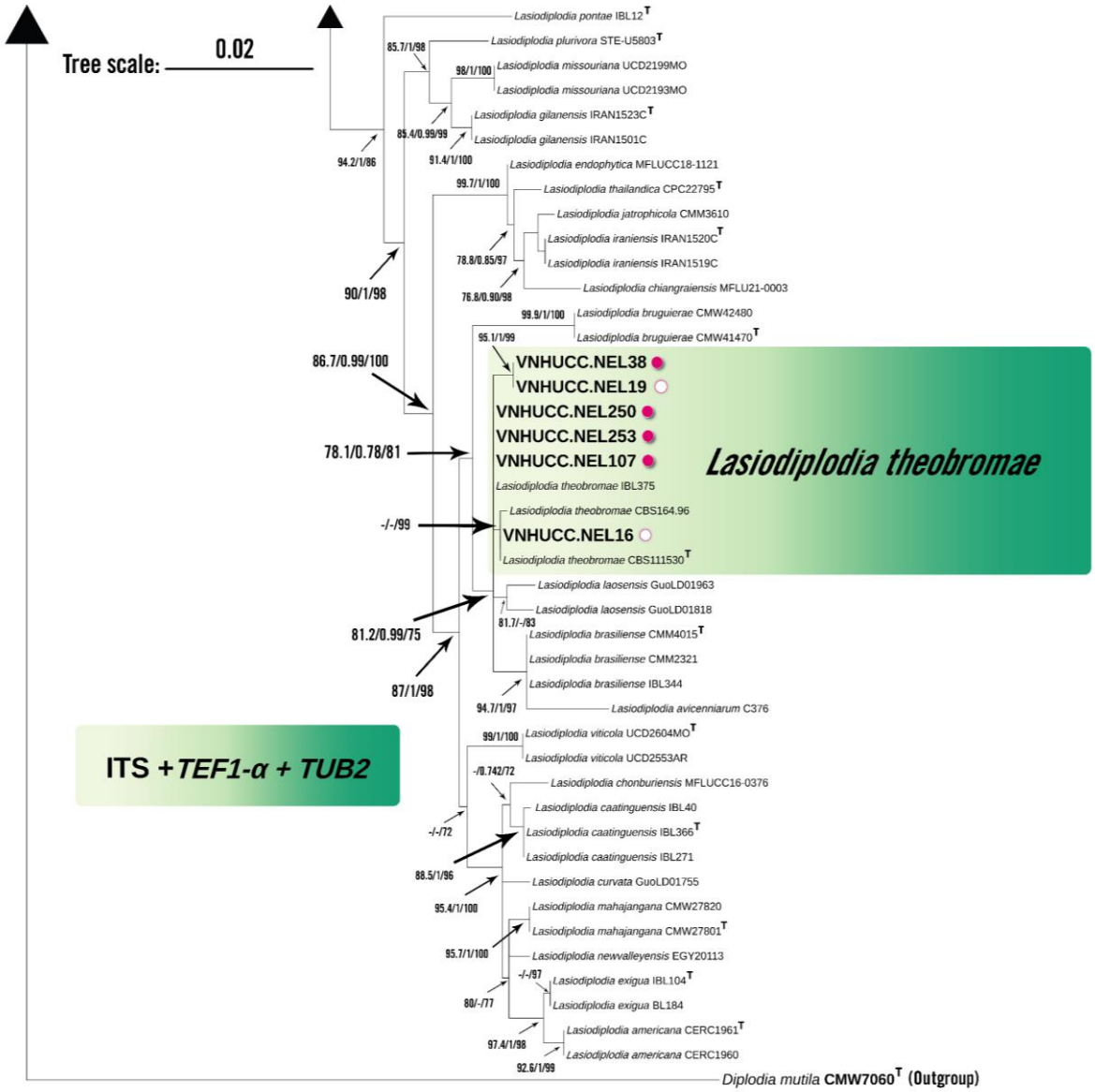
Nghiên cứu phân tích phát sinh loài trong Họ Botryosphaeriaceae (Botryosphaeriales, Dothideomycetes, Ascomycota) được thực hiện với cả 2 chi được ghi nhận: *Neofusicoccum* (9 chủng phân lập, chọn 4 chủng đại diện) và *Lasiodiplodia* (12 chủng phân lập, chọn 6 chủng đại diện). Phần lớn các chủng của 2 chi này liên quan tới triệu chứng tàn lụi, thối cuống trên cây sen, với các triệu chứng điển hình ngoài đồng ruộng, bao gồm: héo rũ, hiện tượng nâu hóa mô đến thối khô vùng cuống kèm nâu đen mạch dẫn khi cắt ngang, hoại tử lan dọc theo cuống làm gãy rũ phiến lá, và trong trường hợp nặng có thể nhanh chóng lan rộng ở địa điểm trồng sen.

Lasiodiplodia là một chi trong họ Botryosphaeriaceae và với đại diện tiêu biểu là *L. theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl. Đối với việc xác định loài trong chi *Lasiodiplodia*, ma trận tập dữ liệu ghép nối 3 locus (ITS, *TEF-1α,* và *TUB2*) chứa tổng cộng 1.261 ký tự nucleotide từ 87 phân lập tham chiếu của 49 loài *Lasiodiplodia* khác nhau. *Diplodia mutila* CMW7060 được sử dụng làm đơn vị phân loại ngoài nhóm

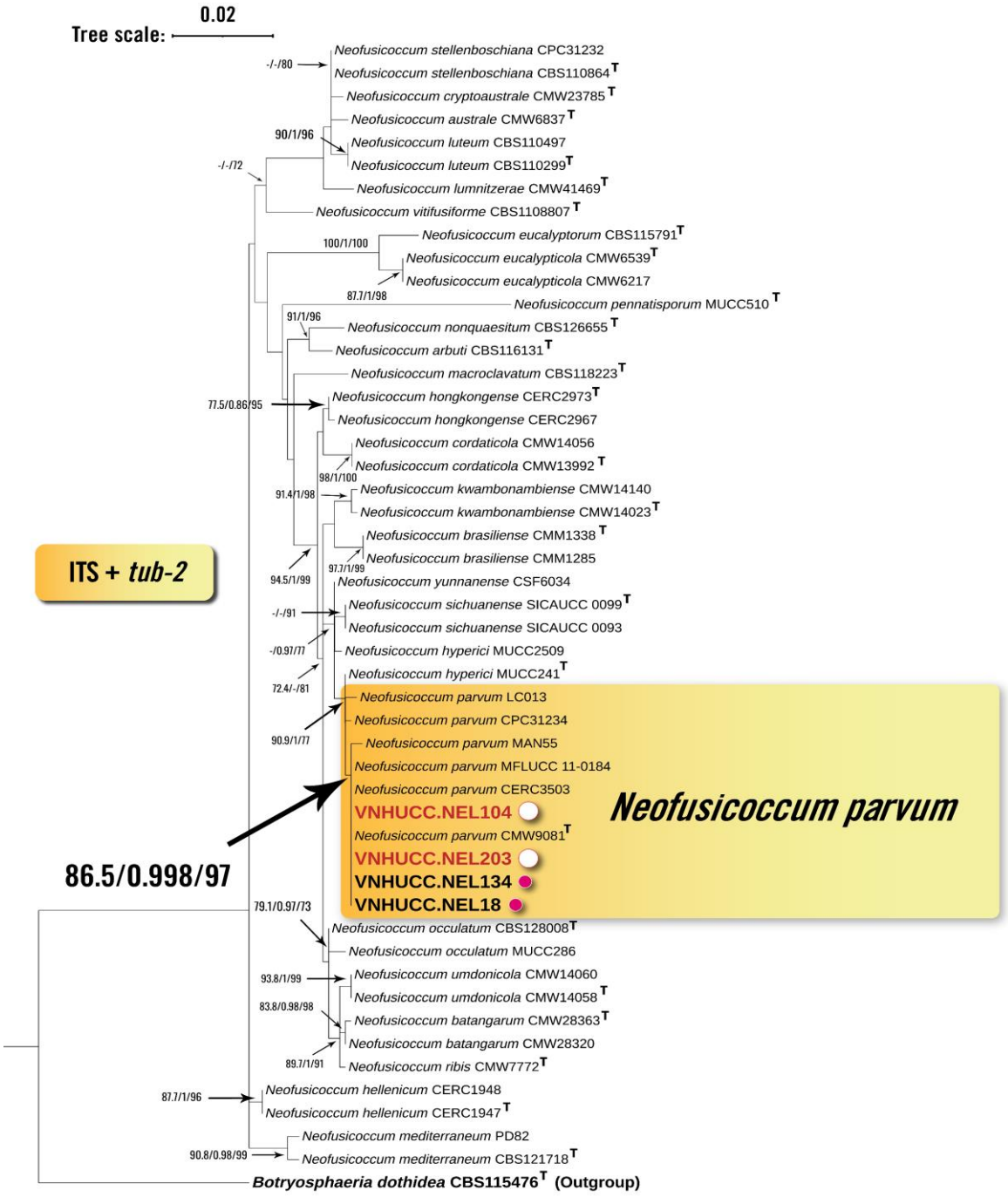
(outgroup) để xây dựng các cây phát sinh loài Maximum likelihood (ML). Ranh giới dữ liệu kết hợp bao gồm 526 ký tự của ITS (1–526), 322 (527–849) ký tự của vùng gene yếu tố kéo dài dịch mã (*TEF1-α*) và 411 (850–1261) ký tự của vùng gene β-tubulin (*TUB2*). Ma trận trình tự kết hợp này chứa 375 mẫu hình khác biệt (distinct patterns), 171 vị trí cung cấp thông tin (parsimony-informative), 102 vị trí đơn lẻ (singleton sites), 988 ký tự bảo tồn. Kết quả phân tích phát sinh loài trên cây ML cho thấy, cả 6 chủng phân lập đại diện (VNHUCC.NEL38, VNHUCC.NEL250, VNHUCC.NEL253, VNHUCC.NEL107, VNHUCC.NEL16 và VNHUCC.NEL19) đều được nhóm với các chủng tham chiếu của loài *L. theobromae (*bao gồm cả chủng TYPE - CBS111530) và có mối quan hệ phát sinh loài chặt chẽ với *L. laosensis* và *L. brasiliense* (Hình 3.3).

Về đặc điểm hình thái, đặc biệt là cấu trúc bào tử, 9 chủng phân lập được sàng lọc sơ bộ thuộc chi *Lasiodiplodia* cũng như các loài thuộc chi này khác biệt với các chi có quan hệ gần gũi trong họ Botryosphaeriaceae nhờ sự hiện diện của các đường sọc dọc trên bào tử trưởng thành. Ngoài ra, các đặc điểm hình thái khác như kích thước bào tử và paraphyses (các cấu trúc tơ nằm phía trên tế bào sinh bào tử) cũng được sử dụng làm tiêu chí quan trọng để phân định loài trong chi này. Tuy nhiên, việc mô tả dựa trên đặc điểm hình thái nuôi cấy (tản nấm) và bào tử thường gây ra sự nhầm lẫn và dẫn đến nhận dạng, định danh không chính xác do sự chồng chéo về mặt hình thái. Trong các nghiên cứu trước đây, phần lớn các phân tích, định danh chỉ dựa trên trình tự nucleotide của đoạn đệm phiên mã bên trong (ITS) để xác định các loài trong chi *Lasiodiplodia*. Phương pháp tiếp cận phát sinh chủng loại đa locus gần đây, ngoài dữ liệu trình tự nucleotide của ITS, các trình tự các gene mã hóa protein như *TEF1-α*, *TUB2* đã giúp giải quyết tốt hơn mối quan hệ phát sinh loài giữa các loài trong chi này (Abdollahzadeh et al., 2010; Alves et al., 2008; de Silva et al., 2022). Các loài nấm trong chi *Lasiodiplodia* phân bố đa dạng, tập trung ở khu vực nhiệt đới và cận nhiệt đới và được ghi nhận trên rất nhiều loại vật chủ khác nhau bao gồm một lá mầm, hai lá mầm và cả thực vật hạt trần. Các loài trong chi *Lasiodiplodia* này thể hiện các lối sống một cách đa dạng, bao gồm dưới dạng nội sinh, hoại sinh trên các mô thực vật (thân gỗ chết), và riêng *L. theobromae* cũng được báo cáo ghi nhận là các tác nhân gây bệnh trên 500 các vật chủ thực vật khác nhau (Rodríguez-Gálvez et al., 2025). Ở Việt Nam, trong một nghiên cứu gần đây của nhóm tác giả Cường et al. (2023), cũng đã xác định và kết luận *L. theobromae* là tác nhân gây bệnh tàn lụi trên cây sen dựa trên trình tự 3 gene mục tiêu bao gồm: ITS, *TEF1-α, TUB2.* Bên cạnh đó, *L. theobromae* cũng là tác nhân đã được báo cáo gây ra nhiều bệnh hại khác ghi nhận ở Việt Nam như thối quả mít, thối gốc thân

ở xoài và bưởi, chảy mủ trên thân cây thanh trà, bệnh cháy lá trên cây sầu riêng, cũng như gây bệnh chết cành trên cây nho (Khuong et al., 2023; Tâm et al., 2024; Thao et al., 2023; Trai et al., 2024; Uyên et al., 2022; Linh et al., 2022).



Hình 3.3. Cây phát sinh loài Maximum likelihood (ML) của chi *Lasiodiplodia* với 6 chủng phân lập đại diện được xây dựng từ tệp dữ liệu trình tự căn chỉnh ghép nối của 3 locus ITS + *TUB2* + *TEF1-α* (hiển thị một phần – cây phát sinh loài đầy đủ được thể hiện ở Phụ lục hình 3.3). Các giá trị hỗ trợ SH-aLRT > 70%/aBayes > 0,75/ML bootstrap (%) > 70% được hiển thị tại mỗi nút SH-aLRT/BPP/MLBS. *Diplodia mutila* CMW7060 được sử dụng làm phân lập ngoài nhóm (outgroup). Các chủng loại TYPE (Ex-TYPE) được biểu thị bằng chữ "**T**" in đậm ở cuối mỗi nhãn phân loại. Thanh tỷ lệ biểu thị số lượng thay thế ước tính trên mỗi vị trí nucleotide. Màu sắc vòng tròn sau mỗi taxa biểu thị tương ứng chủng được phân lập trên giống sen hồng/hay sen trắng.



Hình 3.4. Cây phát sinh loài Maximum likelihood (ML) của chi *Neofusicoccum* với 4 phân lập đại diện từ cây sen *Nelumbo nucifera* trồng ở Thành phố Huế được xây dựng từ tệp dữ liệu trình tự căn chỉnh ghép nối của 2 locus ITS + *TUB2*. Các giá trị hỗ trợ SH-aLRT > 70%/aBayes > 0,75/ML bootstrap (%) > 70% được hiển thị tại mỗi nút SH-aLRT/BPP/MLBS. *Botryoshaeria dothidea* CBS115476 được sử dụng làm phân loại ngoài nhóm (outgroup). Các chủng loại TYPE (Ex-TYPE) được biểu thị bằng chữ "**T**" in đậm ở cuối mỗi nhãn phân loại. Thanh tỷ lệ biểu thị số lượng thay thế ước tính trên mỗi vị trí nucleotide.

Đối với chi *Neofusicoccum*, sàng lọc bước đầu dựa trên đặc điểm hình thái các chủng phân lập đại diện đều ghi nhận các đặc điểm hình thái điển hình của chi: Trên PDA, sợi nấm khí sinh tập trung mạnh ở trung tâm; bề mặt tản ban đầu trắng, sau 4–5 ngày chuyển dần sang xám đen. Mặt trái xanh than sẫm đến đen tại trung tâm; vùng ngoại vi ban đầu trắng xám, sau đó tiến triển từ trắng xám sang xanh than đen theo thời gian. Kết quả phân tích BLASTn cho thấy trình tự của các chủng phân lập VNHUCC.NEL18, VNHUCC.NEL104, VNHUCC.NEL134 và VNHUCC203 có mức độ tương đồng cao với các trình tự tham chiếu đáng tin cậy của loài *Neofusicoccum parvum* trên cơ sở dữ liệu Genbank (NCBI). Cụ thể, các trình tự vùng ITS của các chủng phân lập trong nghiên cứu cho thấy mức độ tương đồng rất cao dao động từ 99,83 - 100% so với các chủng phân lập tham chiếu trên NCBI của *N. parvum:* BRIP66334 (MH183322) và CMW28386 (KU997399). Tương tự, so sánh trình tự vùng gene *TUB2*, các chủng phân lập này đạt mức tương đồng từ 99,78% đến 100% so với các chủng phân lập *N. parvum* CBS 110301 (EU673095), CMW8313 (KF886719), và KARE1198 (MN318108) (Ngày truy cập: 20/04/2023).

Việc xác định loài trong chi *Neofusicoccum* được khẳng định thêm bằng phân tích phát sinh loài đa locus sử dụng tệp dữ liệu kết hợp của 2 locus ITS và *TUB2.* Bộ dữ liệu kết hợp này bao gồm 50 chuỗi trình tự khác nhau có độ dài 981 ký tự nucleotide, trong đó ghi nhận 191 vị trí khác biệt, 74 vị trí cung cấp thông tin, 84 vị trí đơn lẻ và 790 vị trí bảo tồn. Theo kết quả phân tích phát sinh loài, 4 chủng đại diện VNHUCC.NEL18, VNHUCC.NEL104, VNHUCC.NEL134 và VNHUCC.NEL203 đều được cấu trúc trong một nhánh cùng các chủng tham chiếu của loài *Neofusicoccum parvum* với hệ số hỗ trợ tốt SH-aLRT/PP/MLBS: 86,5/1/97 (Hình 3.4).

Loài *N. parvum* phân bố rộng trên toàn thế giới, có phạm vi vật chủ cực kỳ lớn và khả năng gây bệnh đã được chứng minh hại liên quan đến nhiều loài cây gỗ lớn, cây công nghiệp (Guarnaccia et al., 2020), cây ăn quả (Guarnaccia et al. 2020; He et al. 2022; Antony et al. 2023; Lolas et al. 2024) và cây cảnh (Sasia et al. 2023; Zhang et al. 2023b). Đáng chú ý, nhiều nghiên cứu trước đây chỉ ra rằng có một sự liên quan mật thiết giữa các loài trong họ Botryosphaeriaceae (*Lasiodiplodia* spp., *Dothiorella* spp., *Neofusicoccum* spp., *Diplodia* spp., *Botryosphaeria* spp.) trong quá trình lây nhiễm và gây hại ở thực vật, đặc biệt là các bệnh chết khô cành, nứt loét và xì mủ thân cây. Hai loài *L. theobromae* và *N. parvum* đã được xác định là đồng tác nhân liên quan đến bệnh chết khô cành ở 25 vùng trồng nho tại Trung Quốc, chết cành trên cây cacao, cây macca ở Úc, ở Nam Phi và các loài thuộc họ cam quýt tại Malta và Italia (Maduke et al., 2024; Mohankumar et al., 2022; Puig et al., 2021; Yan et al., 2013). Hai loài này cũng là đồng tác nhân gây bệnh loét trên cây việt quất ở Tây Ban Nha hay bệnh bạc lá ở cây thanh

mai (*Myrica rubra*), bệnh thối gốc thân và chết cành ở cây bơ, xoài và vải tại Kenya, Italia và Tây Ban Nha, gây ra bệnh đốm lá và thối các chồi non trên cây kiwi ở Trung Quốc, đốm lá và vết loét trên thân cây gai dầu (*Cannabis sativa*) (Aiello et al., 2022; Bezerra et al., 2021; Li et al., 2020; Wanjiku et al., 2020; Zhou et al., 2015). Bệnh nứt thân xì mủ trên cây Bạch đàn đỏ (*Eucalyptus camaldulensis*) cũng được xác định là do: *L. theobromae*, *N. parvum* cùng với *Aplosporella hesperidica* gây ra (Admasu et al., 2023). Rõ ràng, với tính liên kết được thể hiện như vậy, các loài nấm trong họ Botryosphaeriaceae không chỉ có khả năng gây hại đa dạng các loài cây trồng khác nhau mà còn thể hiện tính đa hình trong cơ chế gây bệnh.

Như vậy, dựa trên sự đối chiếu, tổng hợp các dữ liệu đặc điểm hình thái (Phụ lục Hình 3.1), kết quả lây nhiễm nhân tạo, phân tích phân tử cùng với thông tin về phân bố và ký chủ, đây được xem là báo cáo đầu tiên ghi nhận *N. parvum* là tác nhân liên quan đến triệu chứng thối cuống lá trên cây sen.

3.1.2.2. Curvularia và Exserohilum

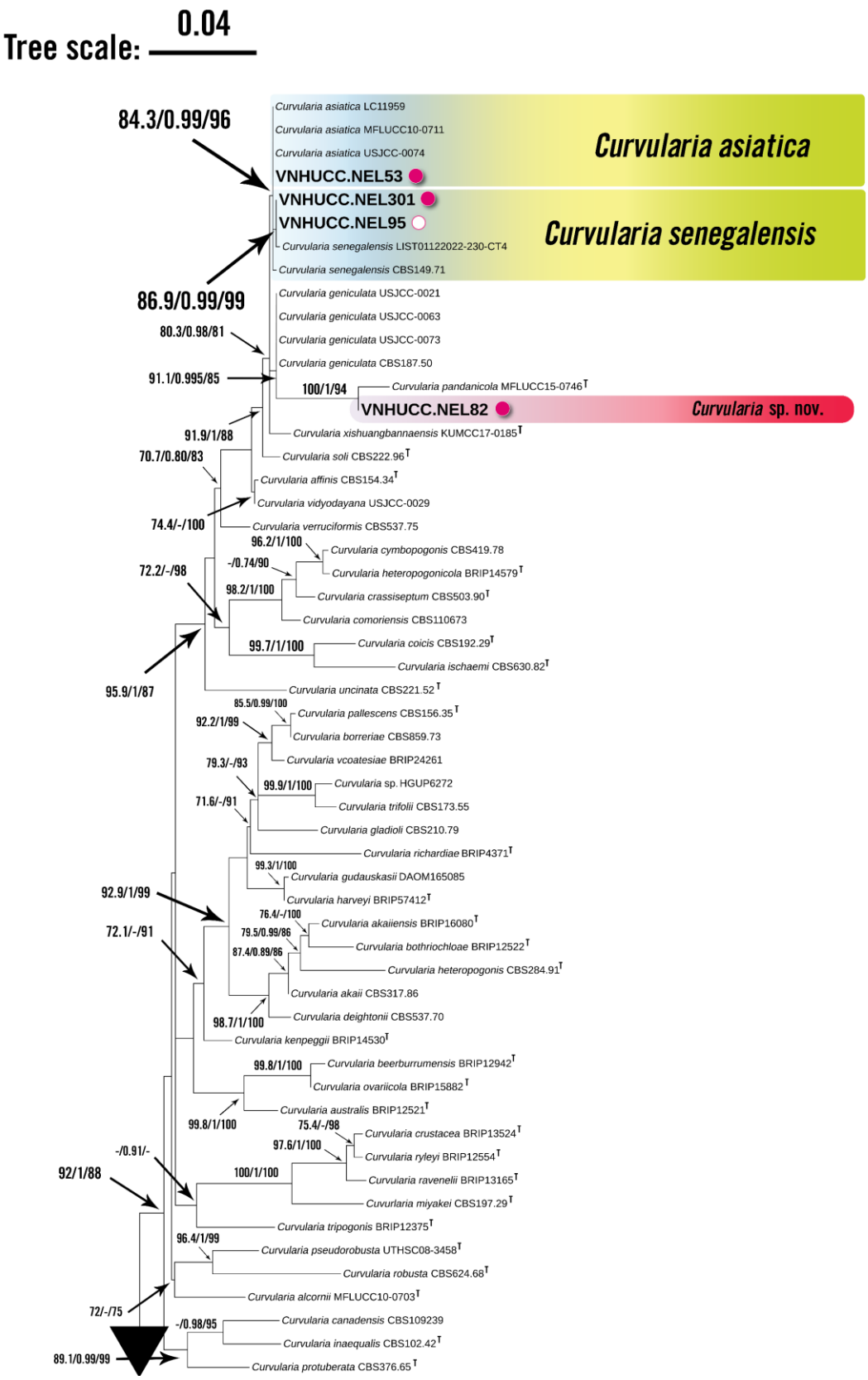
Chi *Curvularia* là một chi nấm phổ biến trên nhiều loại thực vật, đặc biệt là các loài cỏ và các loài thực vật thuộc họ Hòa thảo (Manamgoda et al., 2012; Marin-Felix et al., 2017; Adomako et al., 2025). Hiện nay, chi *Curvularia* bao gồm 232 loài được mô tả trên Mycobank (https://www.mycobank.org). Tuy nhiên, Marin-Felix et al. (2020) trong một báo cáo đánh giá lại hệ thống phân loại của chi *Curvularia* chỉ công nhận 105 loài dựa trên dữ liệu trình tự DNA và phân tích đa locus. Các loài *Curvularia* spp. thường được xác định chủ yếu dựa trên hình thái học, nhưng nhiều trường hợp sự nhận dạng hình thái không trùng khớp với kết quả định danh dựa trên trình tự DNA (Kidd & Westblade, 2024; Ram et al., 2024). Hơn nữa, loài được báo cáo phổ biến nhất là *C. lunata*, được xem là một loài phức hợp (da Cunha et al., 2013; Marin-Felix et al., 2020).

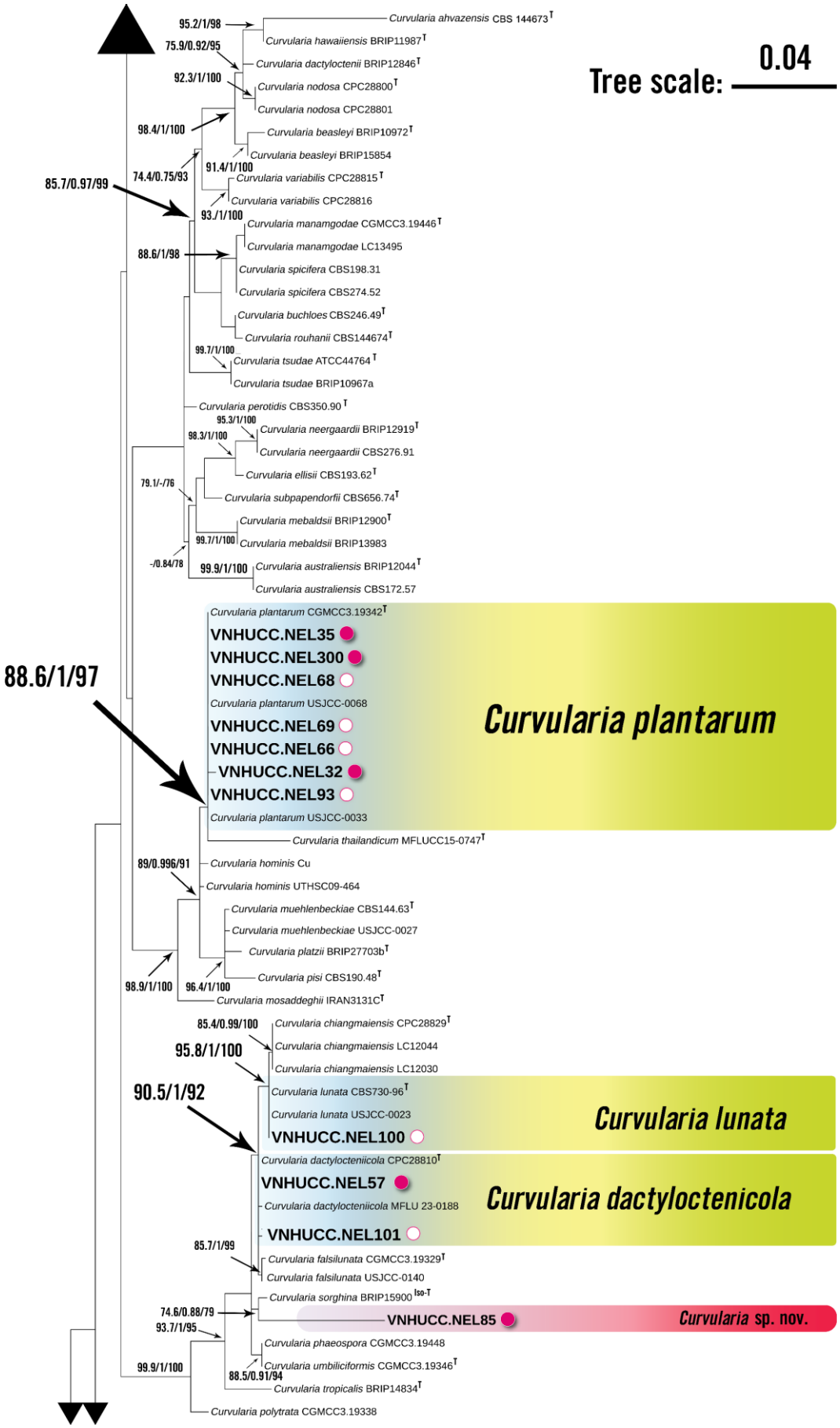
Với sự tiến bộ và thúc đẩy mạnh mẽ của kỹ thuật sinh học phân tử, đặc biệt là gene *GAPDH* cho thấy độ phân giải cao trong việc phân biệt các loài có quan hệ họ hàng gần trong *Curvularia.* Điều này đã thúc đẩy mạnh mẽ, mở rộng kiến thức và làm rõ được hệ thống phân loại về chi *Curvularia*, với nhiều loài mới được xác định gần đây (Ahmadpour et al., 2025; Ferdinandez et al., 2021; Iturrieta-González et al., 2020; van Vuuren et al., 2024). Tuy nhiên, nhìn chung rất ít các báo cáo về các loài gây hại thuộc chi *Curvularia* được báo cáo tại Việt Nam, và thường được dùng với thuật ngữ *Curvularia* sp./spp. và chỉ một số ít được chỉ định là *C. lunata* gây bệnh đốm nâu, lem lép hạt lúa dựa trên trình tự ITS (Toàn & Nam, 2021; Toàn & Sử, 2024; Trung et al., 2019). Ngoài *C. lunata*, chỉ có 3 loài *Curvularia* khác được báo cáo ở Việt Nam, bao gồm *C. australiensis, C. oryzae, C. uncinata* - đều trên cây lúa *Oryza sativa* theo cơ sở dữ liệu nấm USDA (https://fungi.ars.usda.gov/; truy cập ngày 14/06/2025). Mặc dù vậy,

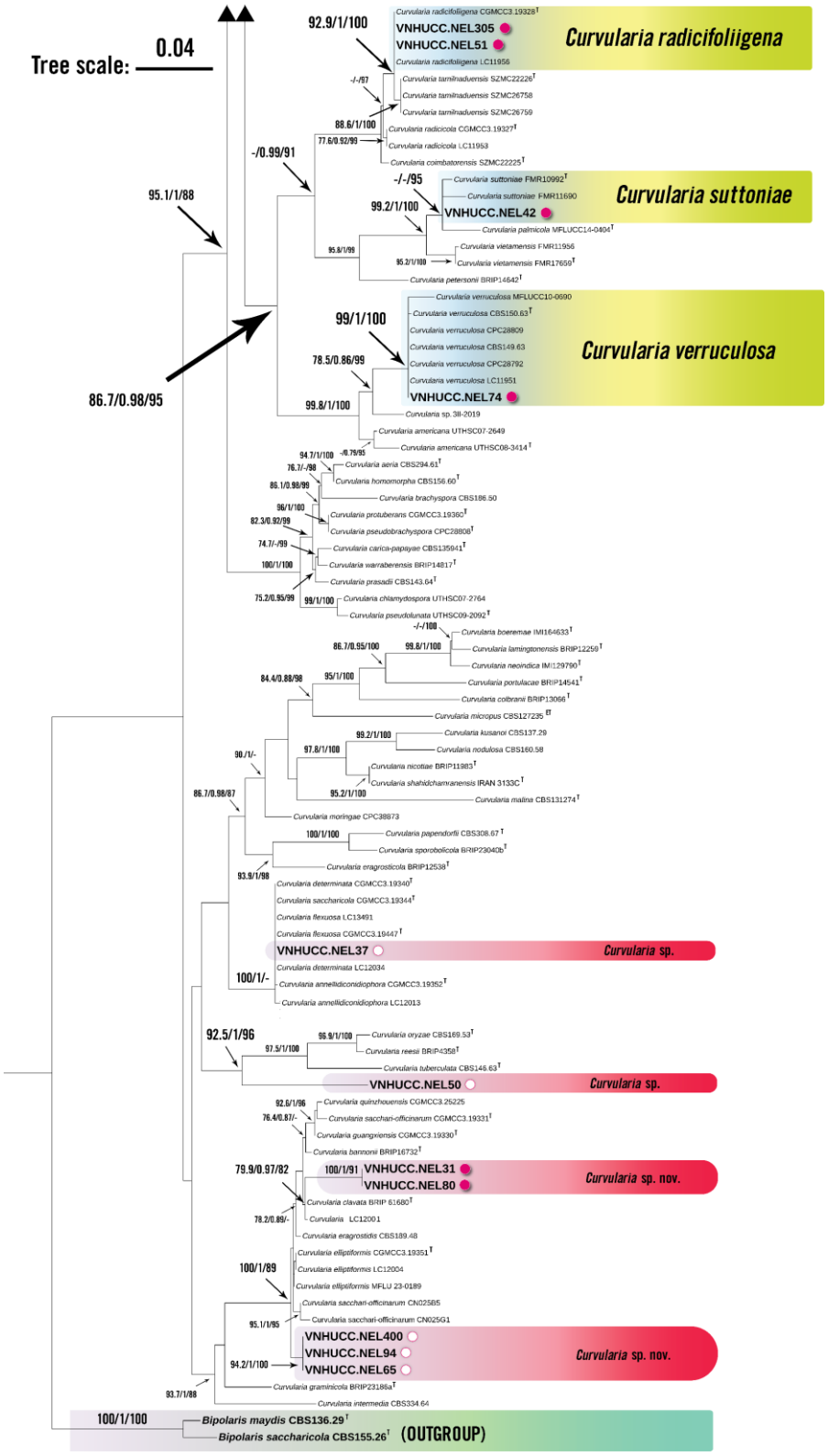
không có sự khác biệt giữa trình tự ITS của các loài *C. lunata, C. falsilunata, C. chiangmaiensis, C. dactyloctenicola*, cho nên cần thận trọng và đối chiếu với các đặc điểm hình thái hoặc kết hợp các locus khác khi xác minh, định danh các loài này.

Ở Việt Nam, một nghiên cứu gần đây khi điều tra ở 3 tỉnh Bình Dương, Tây Ninh, Thành phố Hồ Chí Minh cũng đã xác định *C. lunata* là tác nhân gây bệnh đốm lá trên cây dưa lưới (*Cucumis melo*) dựa vào đặc điểm hình thái, phân tích phân tử các vùng gene ITS*, TUB2* và *TEF1-α* (Hoang et al., 2025). Trên thế giới, *C. lunata* đã được báo cáo gây đốm lá trên nhiều vật chủ khác nhau: hoa hướng dương ở Trung Quốc, các loài cỏ thuộc chi *Andropogon* ở Brazil*,* cây ngô (Hoa Kỳ), gây bệnh úa sớm trên cây cà chua ở Ai Cập, gây bệnh đốm lá và thối quả sau thu hoạch trên cây chuối ở Ấn Độ và Pakistan, gây hại trên quả thanh long ruột đỏ ở Malaysia (AbdElfatah et al., 2021; Addrah et al., 2021; Chang et al., 2019; Chowhan & Chakraborty, 2023; dos Santos et al., 2018; Garcia-Aroca et al., 2018; Hawa et al., 2009; Sharma et al., 2021).

Trong số các loài thuộc chi *Curvularia* thu thập được trong nghiên cứu này, *C. plantarum* là loài phổ biến (ưu thế) nhất - với số lượng phân lập được ghi nhận nhiều nhất, với tổng cộng 7 phân lập (3 phân lập trên giống sen hồng và 4 phân lập trên giống sen trắng). Cả 7 chủng phân lập này đều được nhóm với các tham chiếu tin cậy của loài *C. plantarum* như USJCC0068 (đốm lá trên *Echinochloa crus-galli*), USJCC0333 (bông lúa *O. sativa*) và chủng loại TYPE CGMCC 3.19342 (mía, *S. officinarum*) với hệ số hỗ trợ đáng tin cậy: 88,6/1/97. Trong này, dù vẫn được chỉ định trong *C. plantarum* nhưng chủng VNHUCC.NEL32 khác biệt ở một nucleotide (1/500 bp) ở trình tự *GAPDH* so với các 6 chủng phân lập còn lại trong loài. Trình tự *GAPDH* của các chủng phân lập này cũng cho thấy sự tách biệt tốt với các loài chị em có mối quan hệ gần như *C. hominis, C. muehlenbeckiae* với sự khác biệt lần lượt ở 4 (4/500bp) và 8 (8/500bp) nucleotide. Loài *C. plantarum* được Raza và cộng sự ghi nhận và mô tả lần đầu tiên trên lá cây mía (*Saccharum officinarum*) tại Trung Quốc (Raza et al., 2019). Phạm vi ký chủ sau đó của loài này được mở rộng qua các nghiên cứu của Ferdinandez vào các năm 2021 và 2023 ở Sri Lanka, với các ghi nhận chủ yếu trên các cây lương thực quan trọng và cỏ. Đã có ít nhất 6 ký chủ khác nhau của *C. plantarum* được báo cáo, bao gồm lúa (*O. sativa*), ngô (*Z. mays*), kê chân vịt (*Eleusine coracana*), cỏ lồng vực (*Echinochloa crus-galli*), cỏ kê Mỹ (*Panicum virgatum*), và một loài cỏ thuộc chi *Paspalum* (Ferdinandez et al., 2021, 2023). Đáng chú ý, trong cùng cụm phân nhóm này với *C. plantarum*, một báo cáo gần đây ở Trung Quốc đã mô tả một loài *Curvularia* mới liên quan đến triệu chứng đốm nâu trên lá cây sen, với danh pháp chỉ định *C. nuciferae* (YzU231509, YzU231510), và cho thấy có quan hệ họ hàng gần với các loài *C. mosaddeghii, C. muehlenbeckiae* và *C. hominis* (Guo et al., 2025).


Tree scale: 0.04
Curvularia asiatica
Curvularia senegalensis
Curvularia sp. nov.
Curvularia asiatica LC11959
Curvularia asiatica MFLUCC10-0711
Curvularia asiatica USJCC-0074
VNHUCC.NEL53
VNHUCC.NEL301
VNHUCC.NEL95
Curvularia senegalensis LIST01122022-230-CT4
Curvularia senegalensis CBS149.71
Curvularia geniculata USJCC-0021
Curvularia geniculata USJCC-0063
Curvularia geniculata USJCC-0073
Curvularia geniculata CBS187.50
Curvularia pandanicola MFLUCC15-0746T
VNHUCC.NEL82
Curvularia xishuangbannaensis KUMCC17-0185T
Curvularia soli CBS222.96T
Curvularia affinis CBS154.34T
Curvularia vidyodayana USJCC-0029
Curvularia verruciformis CBS537.75
Curvularia cymbopogonis CBS419.78
Curvularia heteropogonicola BRIP14579T
Curvularia crassiseptum CBS503.90T
Curvularia comoriensis CBS110673
Curvularia coicis CBS192.29T
Curvularia ischaemi CBS630.82T
Curvularia uncinata CBS221.52T
Curvularia pallescens CBS156.35T
Curvularia borreriae CBS859.73
Curvularia vcoatesiae BRIP24261
Curvularia sp. HGUP6272
Curvularia trifolii CBS173.55
Curvularia gladioli CBS210.79
Curvularia richardiae BRIP4371T
Curvularia gudauskasii DAOM165085
Curvularia harveyi BRIP57412T
Curvularia akaiiensis BRIP16080T
Curvularia bothriochloae BRIP12522T
Curvularia heteropogonis CBS284.91T
Curvularia akaii CBS317.86
Curvularia deightonii CBS537.70
Curvularia kenpeggii BRIP14530T
Curvularia beerburrumensis BRIP12942T
Curvularia ovariicola BRIP15882T
Curvularia australis BRIP12521T
Curvularia crustacea BRIP13524T
Curvularia ryleyi BRIP12554T
Curvularia ravenelii BRIP13165T
Cuvurlaria miyakei CBS197.29T
Curvularia tripogonis BRIP12375T
Curvularia pseudorobusta UTHSC08-3458T
Curvularia robusta CBS624.68T
Curvularia alcornii MFLUCC10-0703T
Curvularia canadensis CBS109239
Curvularia inaequalis CBS102.42T
Curvularia protuberata CBS376.65T
84.3/0.99/96
86.9/0.99/99
80.3/0.98/81
91.1/0.995/85
100/1/94
91.9/1/88
70.7/0.80/83
74.4/-/100
96.2/1/100
-/0.74/90
72.2/-/98
98.2/1/100
99.7/1/100
95.9/1/87
85.5/0.99/100
92.2/1/99
79.3/-/93
99.9/1/100
71.6/-/91
99.3/1/100
92.9/1/99
76.4/-/100
72.1/-/91
79.5/0.99/86
87.4/0.89/86
98.7/1/100
99.8/1/1/100
99.8/1/100
75.4/-/98
97.6/1/100
-/0.91/-
92/1/88
100/1/100
96.4/1/99
72/-/75
-/0.98/95
89.1/0.99/99


Tree scale: 0.04
95.2/1/98
Curvularia ahvazensis CBS 144673T
Curvularia hawaiiensis BRIP11987T
75.9/0.92/95
Curvularia dactyloctenii BRIP12846T
92.3/1/100
Curvularia nodosa CPC28800T
Curvularia nodosa CPC28801
98.4/1/100
Curvularia beasleyi BRIP10972T
Curvularia beasleyi BRIP15854
91.4/1/100
74.4/0.75/93
85.7/0.97/99
Curvularia variabilis CPC28815T
Curvularia variabilis CPC28816
93./1/100
Curvularia manamgodae CGMCC3.19446T
Curvularia manamgodae LC13495
88.6/1/98
Curvularia spicifera CBS198.31
Curvularia spicifera CBS274.52
Curvularia buchloes CBS246.49T
Curvularia rouhanii CBS144674T
99.7/1/100
Curvularia tsudae ATCC44764T
Curvularia tsudae BRIP10967a
Curvularia perotidis CBS350.90T
95.3/1/100
Curvularia neergaardii BRIP12919T
98.3/1/100
Curvularia neergaardii CBS276.91
Curvularia ellisii CBS193.62T
79.1/-/76
Curvularia subpapendorfii CBS656.74T
Curvularia mebaldsii BRIP12900T
99.7/1/100
Curvularia mebaldsii BRIP13983
-/0.84/78
99.9/1/100
Curvularia australiensis BRIP12044T
Curvularia australiensis CBS172.57
88.6/1/97
Curvularia plantarum CGMCC3.19342T
VNHUCC.NEL35
VNHUCC.NEL300
VNHUCC.NEL68
Curvularia plantarum USJCC-0068
VNHUCC.NEL69
VNHUCC.NEL66
VNHUCC.NEL32
VNHUCC.NEL93
Curvularia plantarum USJCC-0033
Curvularia plantarum
Curvularia thailandicum MFLUCC15-0747T
89/0.996/91
Curvularia hominis Cu
Curvularia hominis UTHSC09-464
Curvularia muehlenbeckiae CBS144.63T
Curvularia muehlenbeckiae USJCC-0027
Curvularia platzii BRIP27703bT
98.9/1/100
96.4/1/100
Curvularia pisi CBS190.48T
Curvularia mosaddeghii IRAN3131CT
85.4/0.99/100
Curvularia chiangmaiensis CPC28829T
95.8/1/100
Curvularia chiangmaiensis LC12044
Curvularia chiangmaiensis LC12030
90.5/1/92
Curvularia lunata CBS730-96T
Curvularia lunata USJCC-0023
VNHUCC.NEL100
Curvularia lunata
Curvularia dactyloctenicola CPC28810T
VNHUCC.NEL57
Curvularia dactyloctenicola MFLU 23-0188
VNHUCC.NEL101
Curvularia dactyloctenicola
85.7/1/99
Curvularia falsilunata CGMCC3.19329T
Curvularia falsilunata USJCC-0140
Curvularia sorghina BRIP15900 Iso-T
74.6/0.88/79
VNHUCC.NEL85
Curvularia sp. nov.
93.7/1/95
Curvularia phaeospora CGMCC3.19448
Curvularia umbiliciformis CGMCC3.19346T
99.9/1/100
88.5/0.91/94
Curvularia tropicalis BRIP14834T
Curvularia polytrata CGMCC3.19338



Hình 3.5. Cây phát sinh loài (ML) của 26 chủng phân lập đại diện và các phân lập tham chiếu thuộc chi *Curvularia* dựa trên tệp dữ liệu kết hợp 2 locus ITS + *GAPDH*. Các giá trị hỗ trợ SH-aLRT > 70%/aBayes > 0,75/ML bootstrap (%) > 70% được hiển thị tại mỗi nút SH-aLRT/BPP/MLBS. Màu sắc vòng tròn sau mỗi taxa biểu thị tương ứng chủng được phân lập trên giống sen hồng/hay sen trắng.

Trong khi đó, *C. dactyloctenicola* là một loài *Curvularia* được mô tả lần đầu bởi Marin-Felix et al. (2017) từ mẫu triệu chứng đốm lá trên *Dactyloctenium aegyptium* tại Thái Lan. Có thể do mới được ghi nhận, các báo cáo về loài này hiện còn khá hạn chế. Trong nghiên cứu hiện tại, thông qua phân tích phát sinh loài, *C. dactyloctenicola* cũng được ghi nhận với 2 chủng phân lập được thu nhận (VNHUCC.NEL57 và VNHUCC.NEL101) và chỉ phân biệt dựa với *C. lunata* trên trình tự gene *GAPDH*. Cụ thể, trình tự *GAPDH* của chủng phân lập VNHUCC.NEL100 của loài *C. lunata* trong nghiên cứu này khác biệt với hai chủng phân lập *của C. dactyloctenicola* liên quan đến triệu chứng các đốm nâu: VNHUCC.NEL57 (sen hồng), VNHUCC.NEL101 (sen trắng) lần lượt ở 3 và với 6 vị trí nucleotide. Về phạm vi ký chủ, gần đây, *C. dactyloctenicola* đã được ghi nhận liên quan đến các triệu chứng đốm lá trên cây đậu đũa (*Vigna unguiculata*) và cây mía dò (*Costus speciosus*) tại Ấn Độ bởi hai nghiên cứu độc lập của Bhuyan et al. (2024); Nimbarte et al. (2025), cùng với kết quả ghi nhận trên cây sen (*N. nucifera*) đã cho thấy sự mở rộng phạm vi ký chủ và địa lý của loài nấm này.

Chủng phân lập VNHUCC.NEL74 trong nghiên cứu này được thu thập từ một ruộng sen tại Hương Toàn, Hương Trà, nơi ghi nhận các triệu chứng thối nâu và xoăn lá (Phụ lục Hình 3.13). Dựa trên kết quả phân tích phát sinh loài, chủng VNHUCC.NEL74 được xác định nằm trong cùng nhánh với các chủng tham chiếu của loài *Curvularia verruculosa*, trong đó có chủng TYPE CBS150.63, với mức độ hỗ trợ rất cao (SH-aLRT/BPP/MLBS: 99/1/100). Đáng chú ý, hai loài *C. americana* và *C. verruculosa* rất khó phân biệt dựa trên đặc điểm hình thái, chỉ có thể xác định chính xác thông qua trình tự gene ITS và *GAPDH*. Trên thế giới, *C. verruculosa* đã được báo cáo là tác nhân gây bệnh đốm lá trên cây lúa, cây đậu nành (Wei et al., 2022), đậu cô ve ở Trung Quốc, cây ngô và cây bông ở Ấn Độ (Shirsath et al., 2018), nho ở Afghanistan (Rajput et al., 2020), và một số loài cỏ như cỏ nhung Nhật Bản (*Zoysia japonica*) (Choi et al., 2018), cỏ mần trầu *Eleusine indica* ở Thái Lan (Marin-Felix et al., 2017). Gần đây, *C. verruculosa* cũng được ghi nhận gây đốm lá và cháy lá trên cây mã tiền (*Strychnos potatorum*) - một loài dược liệu ở Ấn Độ (Kripa et al., 2024).

Phân tích phát sinh loài trong chi *Curvularia* cũng xác định sự hiện diện của loài *C. asiatica* – tương ứng với chủng phân lập VNHUCC.NEL53 với các hệ số hỗ trợ cao lần lượt là 84,3/0,99/96. Theo các báo cáo hiện có, *C. asiatica* đã được ghi nhận tại sáu quốc gia trên thế giới, bao gồm Úc, Trung Quốc, Malaysia, Thái Lan, Hoa Kỳ và Sri Lanka (Farr & Rossman, 2024). Loài nấm này có phạm vi ký chủ đa dạng và thường được báo cáo liên quan với các triệu chứng đốm lá trên nhiều loài thực vật khác nhau.

Cụ thể, *C. asiatica* được phát hiện gây bệnh đốm lá trên cây lúa (*O. sativa)* tại Úc (Khemmuk et al., 2016), Thái Lan (Manamgoda, 2012) và Sri Lanka (Ferdinandez et al., 2023). Loài này còn được ghi nhận trên *Epipremnum pinnatum* (Wang et al., 2018) và mía (*S. officinarum)* ở Trung Quốc (Raza et al., 2019); trên cây lưỡi hổ (*Sansevieria trifasciata)* tại Malaysia (Kee et al., 2020); cũng như trên các loài cỏ *Panicum* spp. tại Thái Lan; và các loài *Festuca* sp., *Microstegium* sp. cùng *Paspalum* sp. ở Hoa Kỳ (Manamgoda et al., 2012, 2015). Theo dữ liệu hiện có, đây là lần đầu tiên *C. asiatica* được ghi nhận tại Việt Nam cũng như trên cây sen. Ngoài ra, một loài nấm có quan hệ phát sinh loài gần gũi với *C. asiatica* là *C. senegalensis* cũng được ghi nhận trong nghiên cứu này với 2 chủng phân lập (VNHUCC.NEL91, VNHUCC.NEL305) liên quan đến triệu chứng đốm nâu trên lá (hệ số hỗ trợ: 86,9/0,99/99). So với *C. asiatica, C. senegalensis* có phạm vi ký chủ hạn chế hơn. Loài này chỉ được ghi nhận gần đây là tác nhân ra các triệu chứng đốm lá và hoa trên cây cúc cánh giấy (*Zinnia elegans)* tại Sri Lanka, bệnh cháy lá trên cà chua ở Hoa Kỳ, cùng một số ghi nhận cũ trên cây đay (Bandara et al., 2022; Huang et al., 2023; Mullin, 1993). Về mặt phân tử, hai loài này không thể phân biệt chỉ dựa trên trình tự vùng ITS, mà sự khác biệt chỉ được phát hiện qua hai vị trí nucleotide khác nhau trong trình tự gene *GAPDH* (2/594 nucleotide).

Hai chủng phân lập VNHUCC.NEL51 và VNHUCC.NEL305, được thu thập từ giống sen hồng tại 2 ruộng sen khác nhau ở huyện Phong Điền và cùng liên quan đến triệu chứng thối nâu trên lá sen, đã được xác định thuộc loài *C. radicifoliigena* thông qua phân tích phát sinh loài đa gene và các so sánh hình thái (Hình 3.5 và Phụ lục Hình 3.15). Cả hai chủng này nhóm chặt với các chủng tham chiếu của *C. radicifoliigena* và tách biệt rõ ràng với nhánh của *C. tamilnaduensis*. Hệ số hỗ trợ tại các nút phân tách và nút gốc của nhóm đạt mức tin cậy cao, lần lượt là 88,6/1/100 và 92,9/1/100. Trước đây, *C. radicifoliigena* được báo cáo lần đầu tiên bởi Raza et al. (2019) trên các phân lập thu thập từ lá và rễ cây mía (*S. officinarum*) tại tỉnh Quảng Châu, Trung Quốc. Tuy nhiên, cho đến nay, chưa có báo cáo nào về sự xuất hiện của loài này trên các ký chủ khác nào ngoài mía. Nghiên cứu này đánh dấu lần đầu tiên *C. radicifoliigena* được phát hiện liên quan đến cây sen (*N. nucifera*), đồng thời cũng là ghi nhận đầu tiên về sự hiện diện của loài này tại Việt Nam. Đây không chỉ là phát hiện mới về mặt địa lý mà còn mở rộng phạm vi ký chủ của loài này của tại Việt Nam, đặc biệt trên cây sen – một loài thực vật thủy sinh có giá trị kinh tế và văn hóa quan trọng.

Trong nghiên cứu này, *Curvularia* không chỉ được xem là tác nhân gây hại ghi nhận phổ biến nhất (26 chủng phân lập đại diện) mà còn thể hiện mức độ đa dạng loài rất

cao, với 8 loài đã được định danh dựa trên đặc điểm hình thái và phân tích phát sinh loài đa locus (Hình 3.5). Ngoại trừ *C. lunata* đã được báo cáo trước đây trên cây sen ở Đài Loan, Trung Quốc (Chen & Kirschner, 2018; Cui & Sun, 2012), trong luận án này là các báo cáo đầu tiên của 7 loài *Curvularia* mới tại Việt Nam. Đồng thời, đây cũng lần đầu tiên 7 loài này được ghi nhận trên cây sen ở Việt Nam, cụ thể *C. asiatica, C. senegalensis, C. plantarum, C. dactyloctenicola và C. radicifolligena, C. suttoniae* và *C. verruculosa,* tất cả đều liên quan đến các triệu chứng đốm nâu lá trên cây sen. Đáng chú ý, 3 loài *C. senegalensis, C. dactyloctenicola* và *C. plantarum* là các loài được ghi nhận gây hại trên cả 2 giống sen: sen hồng và sen trắng trồng ở Thành phố Huế (Hình 3.5).

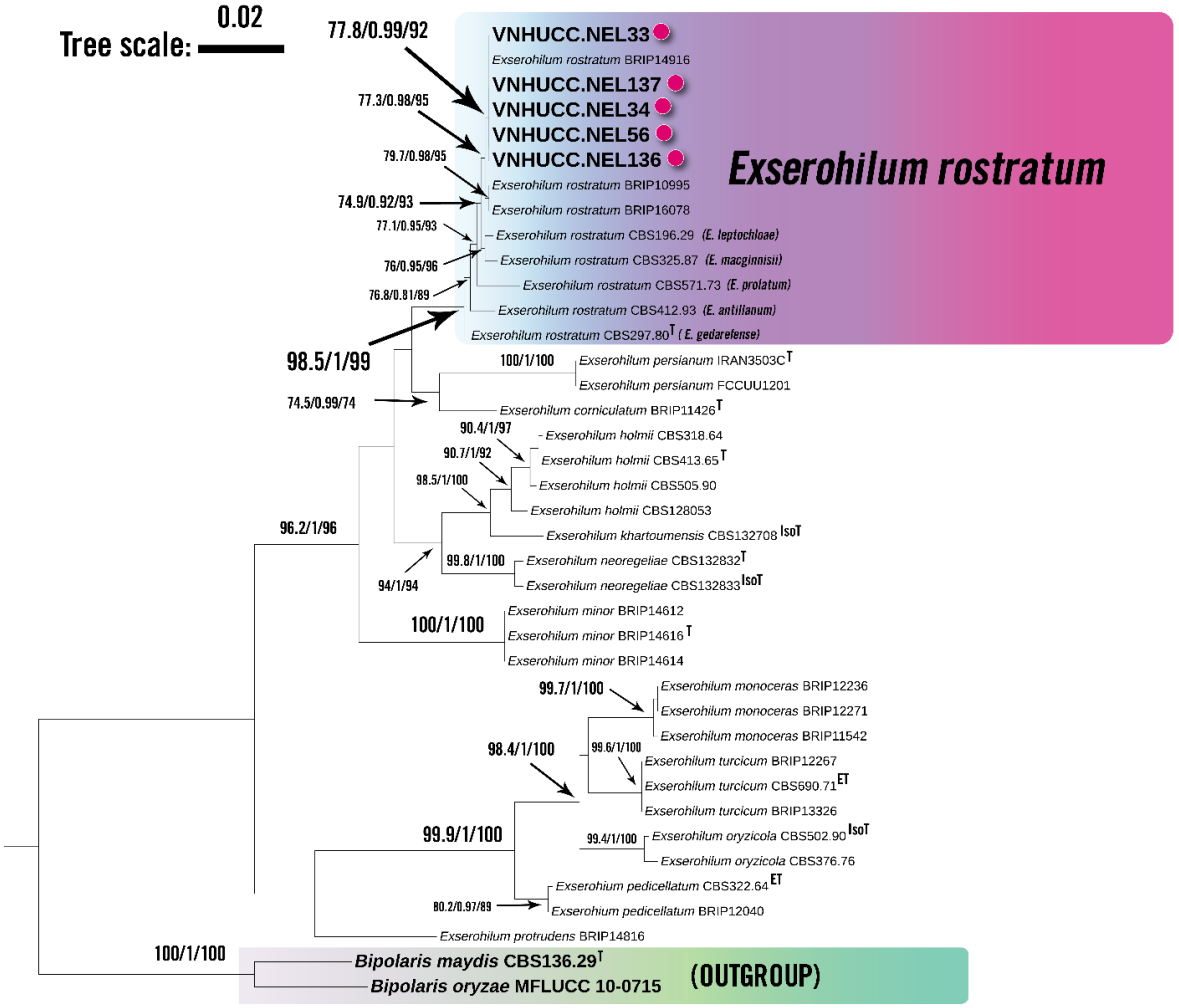
Tuy nhiên, trong kết quả này một số chủng phân lập *Curvularia* khác như: VNHUCC.NEL82, VNHUCC.NEL85, VNHUCC.NEL37, VNHUCC.NEL50, VNHUCC.NEL31, VNHUCC.NEL80, VNHUCC.NEL400, VNHUCC.NEL94, và VNHUCC.NEL65 vẫn chưa được giải quyết thật sự rõ ràng về mặt phát sinh loài và có thể cần thêm các so sánh, thông tin từ locus bổ trợ khác (*TEF1-a, LSU*) để xác định rõ ràng hơn trong tương lai.

Trong khi đó ở chi *Exserohilum*, năm chủng phân lập trên cây sen của chi này được thu nhận từ các địa điểm khác nhau: Thủy Vân, Thủy Bằng – Thuận Hóa, Đông Ba – Phú Xuân, Phong Hiền – Phong Điền. Các triệu chứng điển hình do các chủng *Exserohilum* là đốm không đều và có màu nâu sẫm đến đen, đặc trưng với quầng vàng rõ rệt, theo thời gian ghi nhận cháy lá và khô héo với rất nhiều vết nhăn ở bề mặt lá (Phụ lục Hình 3.18).

Các chủng này đã được bước đầu xác định dựa trên đặc điểm hình thái và phân tích phân tử bằng cách khuếch đại và giải trình tự 2 locus ITS và *GAPDH* nhằm xác định chính xác loài. Kết quả phân tích BLASTn cho thấy mức độ tương đồng cao giữa các chủng phân lập đại diện với các phân lập tham chiếu (Ex-TYPE): *E. mcginnisii* CBS 325.87, *E. gedarefense* CBS 297.80 và *E. antillanum* CBS 412.93. Cụ thể, mức độ tương đồng đạt 99,81 – 99,83% đối với locus ITS và 98,74 – 99,10% đối với locus *GAPDH* (truy cập ngày 15/10/2024).

Phân tích phát sinh loài trong nghiên cứu này với chi *Exserohilum* được thực hiện bằng kết hợp trình tự 2 locus ITS + *GAPDH* của 34 phân lập tham chiếu (bao gồm 2 phân lập đóng vai trò phân lập ngoài nhóm – outgroup: *Bipolaris maydis* CBS 136.29 và *B. oryzae* MFULUCC 10-0715) và 5 chủng phân lập đại diện (Hình 3.6). Kết quả cho thấy hệ thống phát sinh loài trong chi *Exserohilum* được phân chia thành 2 nhánh/nhóm đơn ngành (clade) rõ rệt. Nhóm (clade) thứ nhất bao gồm các loài: *E. monoceras, E. oryzicola, E. pedicellatum, E. protrudens và E. turcicum*. Nhóm còn lại bao gồm các

loài: *E. corniculatum, E. holmii, E. khartoumensis, E. minor, E. neoregeliae và E. rostratum*. Trong đó, *E. rostratum* và *E. corniculatum* hình thành một phân nhóm (subclade) trong nhóm này. Tất cả 5 chủng phân lập đại diện (ghi nhận trên giống sen hồng) đều được chỉ định là loài *E. rostratum* trong phân nhóm này.



Hình 3.6. Cây phát sinh loài (ML) của chi *Exserohilum* dựa trên tệp dữ liệu kết hợp 2 locus ITS + *GAPDH*. Các giá trị hỗ trợ SH-aLRT > 70%/aBayes > 0,75/ML bootstrap (%) > 70% được hiển thị tại mỗi nút SH-aLRT/BPP/MLBS. *Bipolaris maydis* CBS 136.29 và *B. oryzae* MFLUCC 10-0715 được sử dụng làm phân lập ngoài nhóm (Outgroup). Các dạng chủng loại (TYPE, Ex-TYPE, Iso-TYPE) được biểu thị bằng chữ "T", "ET", IsoT ở phía cuối mỗi taxa phân loại. Thanh tỷ lệ biểu thị số lượng thay thế ước tính trên mỗi vị trí nucleotide. Màu sắc vòng tròn sau mỗi taxa biểu thị tương ứng chủng được phân lập trên giống sen tương ứng.

E. corniculatum là một taxon mới được xác định gần đây trong hệ thống đánh giá xác định phát sinh loài với 9 locus của Hernández-Restrepo và cộng sự (2018) và có thể dễ dàng phân biệt nhờ đặc trưng phần mở rộng của đỉnh chóp rất hẹp khi so sánh với

các phân lập của *E. rostratum* với phần đỉnh chóp rộng hơn (Hernández-Restrepo et al., 2018). Đáng chú ý trong phân nhóm này, kết quả phân tích phát sinh loài cho thấy ngoài các phân lập *E. rostratum* thuần túy, cây cũng bao gồm một số phân lập: *E. longirostratum* và các Ex-TYPE *E. antillanum, E. gedarefense, E. macginnisii, E. prolatum* và *Helminthosporium leptochloae* – các phân lập này hiện nay được xem là đồng nghĩa danh pháp với *E. rostratum*. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với các báo cáo hệ thống phân loại mới nhất của *Exserohilum*.

Ở Việt Nam, rất khan hiếm các báo cáo liên quan về *E. rostratum*, chỉ có một số ít báo cáo với cách sử dụng tên cũ của loài này - *Helminthosporium rostratum* gây hại trên cây đu đủ và cây ngô. Tuy nhiên, trên thế giới với những cập nhật trong hệ thống phân loại và trong các kỹ thuật phân tử, *E. rostratum* đã được xác định là tác nhân gây hại trên nhiều loài thực vật khác nhau: đốm lá hay thối bông trên cây lúa ở Malaysia, Burkina Faso, Trung Quốc (He et al., 2023; Kaboré et al., 2022; Mahmad Toher et al., 2016; Mahmad-Toher et al., 2022). *E. rostratum* được xác định là tác nhân gây đốm lá trên nhiều ký chủ khác nhau: cây mía ở Iran, Ấn Độ (Ahmadpour et al., 2013; Selvakumar et al., 2023), ngô ở Trung Quốc và Algeria (Ma et al., 2023; Xie et al., 2022; Zibani et al., 2022), lúa mì (Korra et al., 2023), cỏ *Acer negundo* (Liu et al., 2021), cỏ Buffel *Cenchrus ciliaris* ở các trang trại tại Tanzania (Mlay et al., 2022). Ngoài phổ ký chủ phổ biến thuộc họ Hòa thảo (Poaceae), *E. rostratum* là tác nhân liên quan đến các triệu chứng bệnh trên bầu, dâu tây, dưa lưới ở Trung Quốc, gừng và dưa chuột (*Cucumis sativus*) ở Ấn Độ hay gây bệnh cháy lá trên súp lơ *(Brassica oleracea* var. *italica)* ở Trung Quốc, ké đầu ngựa *(Xanthium strumarium)* ở Sudan (Ahmed et al., 2023; Chen et al., 2023; Choudhary et al., 2018; Dhara et al., 2020; Praveena et al., 2022; Tang et al., 2023; Yu et al., 2022).

Dựa vào dữ liệu báo cáo trên, nghiên cứu này lần đầu tiên xác định cây sen (*N. nucifera*) là ký chủ mới của *E. rostratum* – liên quan đến các triệu chứng khô nâu và cháy lá. Với phổ ký chủ rộng và thích nghi điều kiện sinh thái nhiệt đới, *E. rostratum* có khả năng gia tăng áp lực bệnh hại, đe dọa năng suất cây trồng và ổn định sản xuất nông nghiệp trong tương lai gần.

Theo hồ sơ phân bố ghi nhận trong nghiên cứu này, có đến 4/5 chủng *E. rostratum*, 15/26 chủng *Curvularia* được thu thập từ các hệ thống sinh cảnh - ruộng trồng sen (xấp xỉ 61% tổng số phân lập của 2 chi này). Rõ ràng có một sự liên hệ mật thiết của các loài trong 2 chi này đối với dạng sinh cảnh ruộng, cũng như họ Pleosporaceae khi tính đến các loài *Alternaria* đã được báo cáo trên cây sen trước đây (Gong et al., 2022; Zhang et

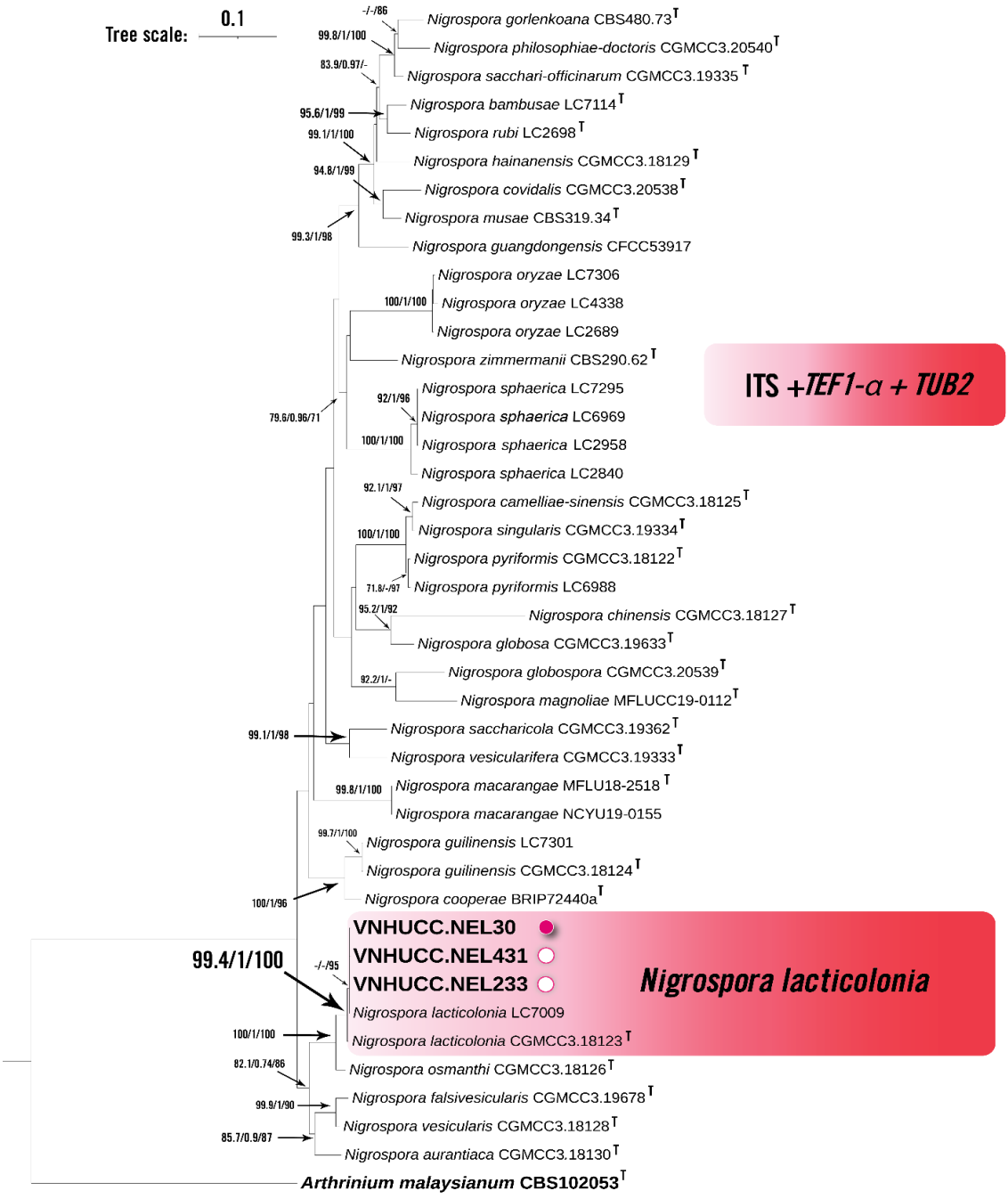
al., 2019). Hệ thống canh tác sen trên đồng ruộng ở Việt Nam được đặc trưng bởi sự hiện diện đa dạng của các loài cỏ dại thuộc họ Hòa thảo (Poaceae) như cỏ lồng vực (*Echinochloa crus-galli*) và cỏ đuôi phụng (*Leptochloa chinensis*), điều này tạo thành nguồn ký chủ phụ trợ cho sự phát triển và duy trì mầm bệnh. Thêm vào đó, vị trí của các ruộng sen thường liền kề các ruộng trồng lúa và ngô (các loài này thuộc Họ Hòa thảo - Poaceae), đồng thời có nhiều diện tích ruộng trước đây sử dụng để trồng, canh tác lúa cũng đã được chuyển đổi sang trồng sen (đặc biệt tại khu vực ruộng sen Phong Hiền, Phong Điền, ruộng sen ở Lăng Triệu Trị, Thủy Bằng). Tàn dư bệnh hại trên ký chủ cũ cũng như điều kiện môi trường điển hình của hệ thống canh tác cây sen: nền mặt nước ổn định và nhiệt độ cao, độ ẩm tương đối lớn, có thể đã tạo điều kiện thuận lợi cho sự tồn tại, phát tán và thích nghi, lây lan mầm bệnh của của các loài thuộc các chi *Curvularia, Exserohilum* trên ký chủ mới.

3.1.2.3. Nigrospora

Chi *Nigrospora* (Apiosporaceae, Xylariales, Sordariomycetes) bao gồm nhiều loài đã được xác định là các tác nhân gây bệnh thực vật, phân bố trên toàn thế giới với mức độ đa dạng ký chủ cao. *Nigrospora oryzae* và *N. sphaerica* là những loài thuộc chi này được báo cáo thường xuyên nhất (Kee et al., 2019; Zheng et al., 2021). Trong các nghiên cứu trước đây, *Nigrospora* spp. được phân loại chủ yếu dựa vào đặc điểm hình thái, đặc biệt là kích thước bào tử. Tuy nhiên, các đặc điểm hình thái chồng chéo thường được quan sát thấy ở các loài *Nigrospora*, dẫn đến sự mơ hồ trong cách phân loại truyền thống của chi này (Wang et al., 2017).

Từ các mẫu có triệu chứng bệnh cháy lá trên cây sen, ba chủng VNHUCC.NEL30, VNHUCC.NEL233 và VNHUCC.NEL431 đã được phân lập. Quá trình định danh sơ bộ dựa trên đặc điểm hình thái tản nấm và bào tử cho thấy cả ba chủng phân lập này cả ba chủng đều phù hợp với đặc trưng của chi *Nigrospora* (khuẩn lạc sẫm màu; bào tử đính dạng cầu đến cận cầu, màu đen, vách dày, Phụ lục Hình 3.5). Và việc định danh đến loài 3 chủng phân lập *Nigrospora* được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp phân tích phát sinh loài đa gene kết hợp các thông tin đặc điểm hình thái ghi nhận và thông tin ký chủ. Phân tích BLASTn của 3 chủng phân lập đại diện VNHUCC.NEL30, VNHUCC.NEL 233 và VNHUCC.NEL431 cho thấy mức độ tương đồng cao 100%, 99,74%, 98,94% tương ứng lần lượt ở các vùng ITS, *TUB2* and *TEF1-α* của *Nigrospora lacticolonia* CGMCC 3.18123 (chủng loại TYPE). Bên cạnh đó, các báo cáo trước đây chỉ ra rằng không thể phân biệt *N. osmanthi* (CGMCC 3.18126) và *N. lacticolonia*

(CGMCC 3.18123) nếu chỉ dựa vào thông tin trình tự của vùng ITS, điều này dẫn tới nguy cơ xác định sai tác nhân gây bệnh. Trong khi đó, kết quả xác minh cho thấy vùng gene *TEF1-α, TUB2* lại giúp giải quyết tốt để phân biệt với 2 loài này.



Hình 3.7. Cây phát sinh loài Maximum likelihood (ML) của chi *Nigrospora* dựa trên tệp dữ liệu trình tự căn chỉnh ghép nối của 3 locus ITS + *TUB2* + *TEF1-α*. Các giá trị hỗ trợ SH-aLRT > 70%/aBayes > 0,75/ML bootstrap (%) > 70% được hiển thị tại mỗi nút SH-aLRT/BPP/MLBS. *Arthrinium malaysianum* CBS102053 được sử dụng như nhóm ngoài (outgroup). Màu sắc vòng tròn sau mỗi taxa biểu thị tương ứng chủng được phân lập trên giống sen hồng hay sen trắng

Ba chủng phân lập đại diện thuộc chi *Nigrospora* trong nghiên cứu này đã được tách chiết và khuếch đại ba vùng gene đặc trưng gồm ITS, *TEF1-α* và *TUB2*. Kết quả giải trình tự cho thấy độ dài các sản phẩm PCR của vùng ITS dao động từ 531 đến 559 bp, vùng *TEF1-α* từ 470 đến 487 bp, và vùng *TUB2* từ 410 đến 423 bp đối với ba chủng phân lập này. Kết quả dựa trên vùng gene *TEF1-α,* 3 chủng phân lập trong nghiên cứu này ghi nhận mức độ tương đồng 98,94% với chủng phân lập *N. lacticolonia* CGMCC 3.18123 và 99,40% với *N. lacticolonia* PC KS6B1 A R2 - chủng gây bệnh đốm nâu đỏ trên thân thanh long tại Malaysia, 100% với các chủng phân lập LC7009 (chuối, Trung Quốc) và chủng LC12060 (mía, Trung Quốc). Tương tự, các 03 chủng phân lập *Nigrospora* trong nghiên cứu này ghi nhận mức độ tương đồng cao từ 99,30 – 100% với vùng *TUB2* của các chủng tham chiếu *N. lacticolonia* trên Genbank, so với chỉ 98,31% với trình tự của chủng phân lập *N. osmanthi* CGMCC 3.18126 (truy cập 28-09-2023).

Để xác định mối quan hệ phát sinh loài, các chuỗi trình tự của ba locus (ITS, *TEF1-α* và *TUB2*) từ tổng cộng 42 chủng phân lập, bao gồm cả 3 chủng phân lập trong nghiên cứu này, đã được căn chỉnh và phân tích (Bảng phụ lục 2.3). Trong tập dữ liệu kết hợp và ba tập dữ liệu riêng lẻ được sử dụng để phân tích, cấu trúc liên kết của cây phát sinh loài phần lớn phù hợp với nhau, cho thấy mối quan hệ tiến hóa nhất quán của các mẫu phân lập *Nigrospora* spp.

Kết quả phân tích phát sinh loài kết hợp của 3 locus (ITS + *TUB2* + *TEF1-α*) của chi *Nigrospora* được thể hiện ở Hình 3.7 cho thấy, ba chủng đại diện (VNHUCC.NEL30, VNHUCC.NEL233 và VNHUCC.NEL431) phân lập từ các mẫu có triệu chứng cháy lá trên cây sen được nhóm lại trong một nhánh được hỗ trợ tốt SH-aLRT/PP/MLBS: 99,4/1/100 với sự có mặt của chủng tham chiếu *N. lacticolonia* CGMCC3.18123 (chủng TYPE), cùng với chủng tham chiếu khác cùng loài là LC7009 – ghi nhận trên lá chuối tiêu *Musa paradisiaca* ở Trung Quốc. Loài *N. lacticolonia* được giới thiệu và mô tả lần đầu tiên trên *Camellia sinensis* và *Musa paradisiaca* từ Trung Quốc (Wang et al., 2017).

Cho đến nay, chỉ có 7 loài thực vật đã được ghi nhận là ký chủ của *N. lacticolonia* trên toàn cầu, bao gồm: lá cây chè (*Camellia sinensis)*, lá chuối (*Musa paradisiaca)*, lá mía (*Saccharum officinarum),* trên cây bông giấy (*Bougainvillea spectabilis)* với triệu chứng đốm lá ở Trung Quốc, đốm nâu đỏ trên thanh long ruột đỏ (*Hylocereus polyrhizus)* ở Malaysia, chà là (*Phoenix dactylifera*) ở Oman và sắn (*Manihot esculenta*) ở Brazil (Al-Nadabi et al., 2020; de Queiroz Brito et al., 2023; Kee et al., 2019; Li et al., 2022; Raza et al., 2019; Wang et al., 2017). Trong khi đó, dựa trên dữ liệu và các báo cáo ghi nhận cho đến hiện tại, có đến 5 loài khác nhau thuộc chi *Nigrospora* đã được xác định

là tác nhân gây bệnh trên cây sen, bao gồm: *N. oryzae, N. aurantiaca, N. sphaerica, N. guilinensis* và *N. pyriformis* (Gong et al., 2023; Wang et al., 2017; Zhang et al., 2018). Như vậy, đây được xem là báo cáo đầu tiên ghi nhận về *N. lacticolonia* là tác nhân gây bệnh cháy lá trên cây sen.

Một số loài *Nigrospora* đã được báo cáo là nấm gây bệnh trên lá với nhiều ký chủ khác nhau, điển hình như *N. sphaerica* gây hại ở 40 ký chủ và vùng địa lý khác nhau (Alam et al., 2020; Arunakumar et al., 2019; de Queiroz Brito et al., 2023; Hoang et al., 2025; Kee et al., 2019; Luo et al., 2022). Đặc biệt, gần đây, một nghiên cứu đã đưa ra báo cáo lần đầu tiên ghi nhận sự xuất hiện của các loài *Nigrospora*: *N. cooperae, N. covidalis, N. guilinensis, N. osmanthi, N. pyriformism, N. rubi* và *N. lacticolonia* môi trường biển (3 loại tảo) tại các hòn đảo ở Hàn Quốc (Lee et al., 2023). Rõ ràng, các loài thuộc chi *Nigrospora* có phạm vi phổ ký chủ cực kỳ rộng lớn, phạm vi đa dạng, cả môi trường trên cạn lẫn dưới nước.

Việc ghi nhận *N. lacticolonia* gây bệnh trên cây sen (*Nelumbo nucifera*) tại Việt Nam không chỉ mở rộng phổ ký chủ của loài nấm này mà còn cung cấp bằng chứng về sự đa dạng sinh thái và khả năng thích nghi của chúng với nhiều loài thực vật khác nhau. Đáng chú ý, sự xuất hiện đồng thời của nhiều loài *Nigrospora* trên cây sen, bao gồm cả *N. lacticolonia* trong nghiên cứu này, và đều được xác định là tác nhân gây bệnh, với triệu chứng phổ biến nhất là các vết đốm lá, cháy lá. Điều này cho thấy chi *Nigrospora* không chỉ có khả năng ký sinh, gây bệnh trên sen mà còn tiềm ẩn vai trò sinh thái đặc biệt trong hệ sinh thái thủy sinh. Những phát hiện này gợi mở giả thuyết về một mối quan hệ thích nghi giữa chi *Nigrospora* và cây sen cần được nghiên cứu sâu hơn để làm rõ hơn vai trò sinh thái, cơ chế gây bệnh, cũng như tác động của chi nấm này đối với sự phát triển của cây sen.

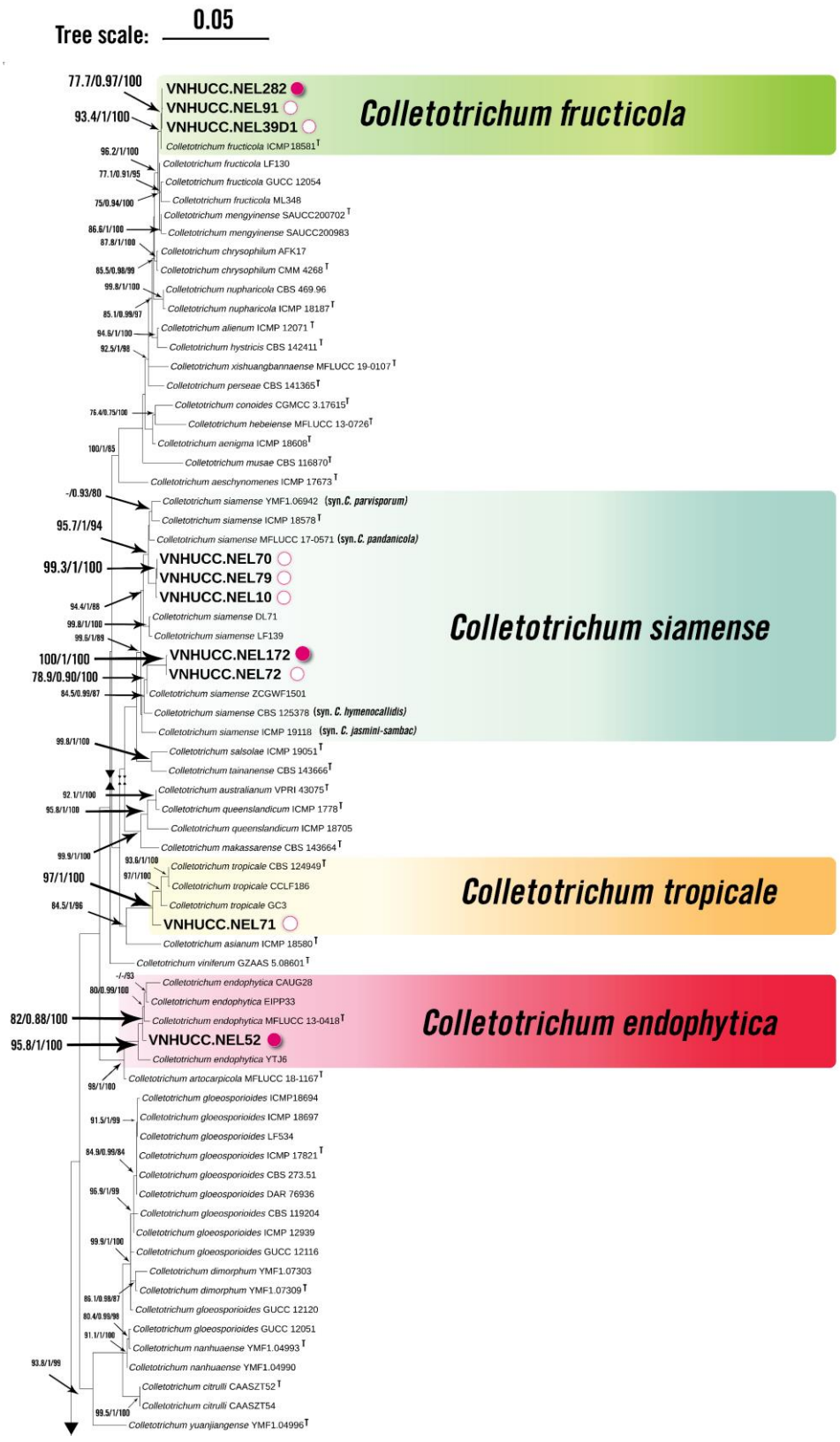
3.1.2.4. Colletotrichum

Chi *Colletotrichum* (Glomerellaceae, Sordariomycetes) được xem là một trong 10 chi nấm gây hại thực vật nhất trên toàn cầu (Dean et al., 2012). Với cách tiếp cận truyền thống, *Colletotrichum* spp. được phân loại dựa trên hình dạng của bào tử đính (conidia) và sợi áp/đĩa áp (appressorium) và một số các đặc điểm hình thái nuôi cấy khác. Tuy nhiên, phần lớn các *Colletotrichum* spp. có các đặc điểm hình thái tương tự nhau và các đặc điểm này lại có thể bị ảnh hưởng mạnh bởi các yếu tố khác nhau bao gồm môi trường nuôi cấy, thời gian nuôi cấy, điều kiện ánh sáng và nhiệt độ (Cai et al., 2009; Vieira et al., 2017). Với mức độ đa dạng loài rất cao (1078 danh pháp đã được chỉ định cho các loài *Colletotrichum* trong Index Fungorum, truy cập ngày: 05/04/2025),

việc chỉ phân loại dựa trên các đặc điểm hình thái, hoặc kể cả sử dụng các kỹ thuật và các phân tích phân tử đơn gene – gần như không thể giải quyết hay tách biệt tốt các loài trong chi này. Đáng chú ý, những kết luận "vội vàng" từ cách tiếp cận trên đã để lại "đầy rẫy" dữ liệu chú thích không chắc chắn, nhầm lẫn về các loài *Colletotrichum* trên Genbank. Điều này đặt ra "tính khẩn cấp" trong việc cấp thiết xây dựng lại một hệ thống phân loại chính xác của chi *Colletotrichum* - một trong những tác nhân gây bệnh nghiêm trọng cho ngành nông nghiệp trên thế giới, cũng như nhiều loài thực vật có giá trị kinh tế cao ở Việt Nam. Trên thế giới, nhiều nhà nghiên cứu bệnh học và nhà sinh vật học với cách tiếp cận phát sinh loài đa locus đã mở rộng, định vị lại đáng kể kiến thức về hệ thống phân loại của chi *Colletotrichum* (Armand & Jayawardena, 2024; Hyde et al., 2009; Jayawardena, Bhunjun, et al., 2021; Liu et al., 2022; Talhinhas & Baroncelli, 2021; Zapata et al., 2024).

Hiện tại, tổng cộng 257 loài *Colletotrichum* được phân thành 16 phức hợp loài và 13 loài đơn lẻ bổ sung đã được chấp nhận trong chi này, với gloeosporioides và acutatum là hai phức hợp hàng đầu bao gồm lần lượt 57 và 41 loài (Talhinhas & Baroncelli, 2021). Trong khi hệ thống phân loại của *Colletotrichum* thay đổi và cập nhật thường xuyên như vậy, nhưng các nghiên cứu phân loại nhằm xác định chính xác thành phần gây hại thực vật ở Việt Nam vẫn khá hạn chế, thiếu tính hệ thống, tính cập nhật và phần lớn mang tính đơn lẻ.

Dựa trên các kết quả sàng lọc sơ bộ dựa trên các phân tích đặc điểm hình thái (Phụ lục Hình 3.8 – 3.12), lây nhiễm nhân tạo, 13 chủng phân lập đại diện của chi *Colletotrichum* gây bệnh trên cây sen ở Thành phố Huế được lựa chọn tiến hành định danh phân tử và các phân tích phát sinh loài liên quan. Đầu tiên, 13 chủng này được tiến hành định danh với 2 locus: ITS và *TUB2* để xác định cấp độ phức hợp loài (species complex). Kết quả cho thấy, trong số 13 phân lập *Colletotrichum* spp. được thu thập và xác định là tác nhân gây bệnh thán thư hoặc các triệu chứng thối lá từ các vùng canh tác trồng sen của Thành phố Huế, 11 phân lập thuộc về phức hợp loài gloeosporioides (84,6%) và chỉ 2 phân lập (15,3%) thuộc về phức hợp loài orchidearum. Tuy nhiên, nghiên cứu không thành công trong việc khuếch đại hai vùng gene ApMAT, *CHS-1*, cũng như trình tự vùng *GAPDH* có kích thước ngắn hơn dự kiến ở chủng phân lập VNHUCC.NEL98. Do đó, chủng phân lập này đã bị loại khỏi các phân tích tiếp theo nhằm đảm bảo tính ổn định và độ tin cậy của ma trận dữ liệu.



Hình 3.8. Cây phát sinh loài Maximum likelihood (ML) của phức hợp loài gloeosporioides được xây dựng từ tệp dữ liệu trình tự căn chỉnh ghép nối của 6 locus ITS, *GAPDH*, *CHS-1*, *ACT*, *TUB2* và *ApMAT*. Các giá trị hỗ trợ SH-aLRT > 70%/aBayes > 0,75/ML bootstrap (%) > 70% được hiển thị tại mỗi nút SH-aLRT/BPP/MLBS. Hai phân lập tham chiếu *C. merremiae* và *C. magnum* được sử dụng làm nhóm ngoài (outgroup).

Để phân tích sâu hơn phức hợp loài gloeosporioides, 10 chủng phân lập thu thập trong nghiên cứu này cùng với 123 chủng phân lập tham chiếu, bao gồm cả nhóm ngoài (outgroup) với 3 phân lập đại diện thuộc 2 phức hợp loài lớn khác là *C. truncatum* (truncatum species complex) và *C. boninense* (boninense species complex) đã được sử dụng để xây dựng cây phát sinh loài với sáu locus (ITS, *GAPDH, CAL, ACT, TUB2* và *ApMAT*) (Hình 3.8, Bảng phụ lục 2.4). Ma trận dữ liệu cuối cùng bao gồm tổng cộng 2770 ký tự, kể cả các ký tự trống – gap (ITS: 1–541, *GAPDH*: 542–792, *CHS-1*: 800–1.081, *ACT*: 1.082–1.329, *TUB2*: 1.330–1.821). Trong đó 737 vị trí cung cấp thông tin (parsimony-informative sites), 487 vị trí đơn lẻ (singleton sites), 1546 vị trí bảo tồn (constant sites). Trong khi đó, để xác định các loài trong phức hợp loài orchidearum, sự kết hợp trình tự gene của 5 locus (ITS, *GAPDH*, *CHS-1*, *ACT*, *TUB2)* từ 2 phân lập đại diện cùng với 18 phân lập tham chiếu của 14 loài khác nhau, bao gồm trình tự của các phân lập ngoài nhóm (outgroup): CBS 124955 (*C. merremiae)* và CBS 51997 (*C. magnum*), đã được sử dụng để xây dựng cây phát sinh loài (Hình 3.7, Bảng phụ lục 2.5)

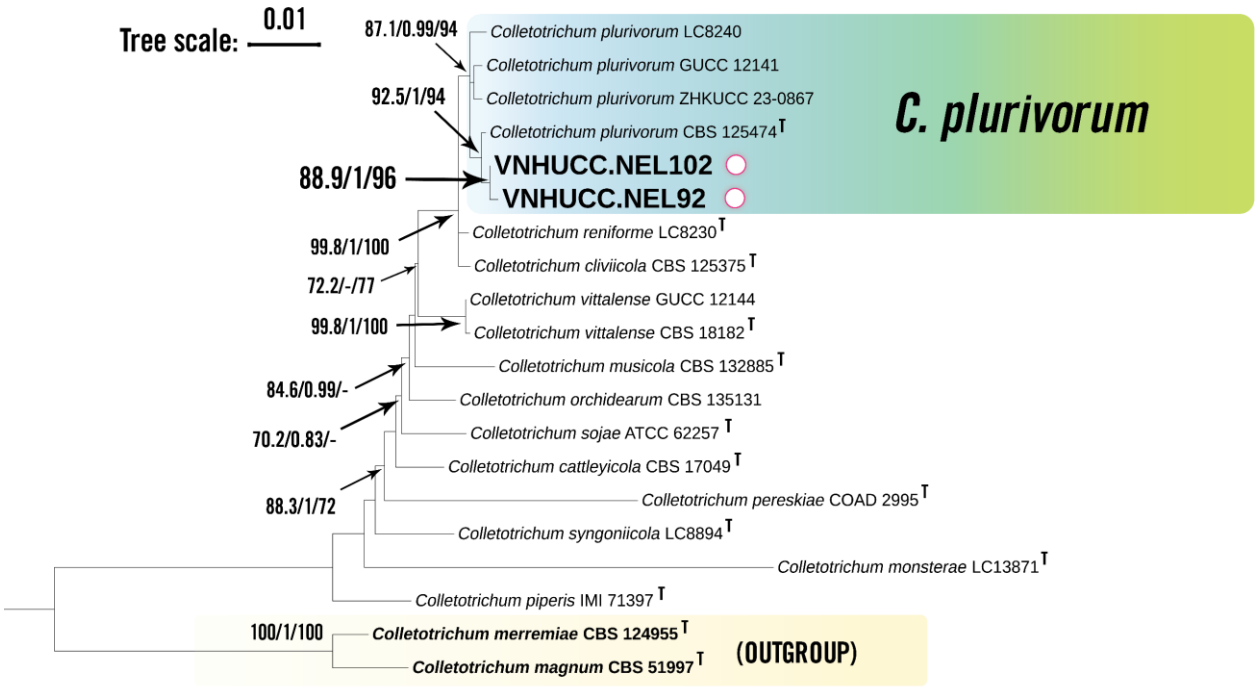
Quan sát cây phát sinh loài 6 locus trong nhánh *C. siamense* (phức hợp gloeosporioides) cho thấy sự xuất hiện của các nhánh phụ (có ít nhất 8 nhánh phụ trong cây phát sinh loài 6 locus), nơi mà 3 chủng phân lập VNHUCC.NEL10, VNHUCC.NEL70 và VNHUCC.NEL79 tạo ra một nhánh phụ đơn tách biệt với nhánh phụ được tạo bởi 2 chủng phân lập VNHUCC.NEL72 và VNHUCC.NEL172 (Hình 3.8). Cùng với đó, các phân lập *C. siamense* trong nghiên cứu này cho thấy các đặc điểm hình thái nuôi cấy khác nhau với tốc độ tăng trưởng khác nhau. Sự thay đổi không nhất quán trong các đặc điểm hình thái này chỉ ra rằng đơn vị phân loại này có tính đa dạng trong loài rất cao. Trước đây, đã có nhiều tranh luận liệu rằng các nhánh phụ ở loài phức hợp *C. siamense* có nên được tách ra thành loài riêng biệt trong một phức hợp loài giả định *C. siamense* hay không. Nhưng nghiên cứu của Liu et al. (2016). đã kết luận *C. siamense* là một loài phức hợp chứ không thể là một phức hợp loài vì không ghi nhận dòng dõi (nhánh) tiến hóa độc lập trong tiến hóa của loài này. Do vậy, 5 chủng phân lập này đều được chỉ định với danh pháp *C. siamense* – và đây cũng là loài ưu thế xét trong chi *Colletotrichum* gây hại trên cây sen trồng ở Thành phố Huế. Nhiều nghiên cứu trước đây cũng đã chỉ ra rằng *C. siamense* là loài ưu thế trong số các loài *Colletotrichum* được ghi nhận liên quan đến nhiều bệnh thực vật khác nhau trên thế giới. Cụ thể, *C. siamense* là loài chủ yếu trong 6 loài *Colletotrichum* gây ra bệnh thối đắng và đốm lá trên cây táo (Chen et al., 2022). Tương tự, tại Trung Quốc, *C. siamense* cũng được xác định là một trong 4 loài gây bệnh trên cây liễu rủ, 13 loài *Colletotrichum* gây bệnh trên xoài (Li et al., 2019; Zhang et al., 2023). Bên cạnh đó, loài này còn chiếm ưu thế trong các loài

Colletotrichum gây bệnh thán thư trên dâu tây ở Đài Loan, Trung Quốc và các vùng canh tác điều ở Brazil (Chung et al., 2020; Veloso et al., 2018).

Ba chủng phân lập VNHUCC.NEL91, VNHUCC.NEL39D1, VNHUCC.NEL282 được nhóm với các phân lập tham chiếu của loài *C. fructicola,* trong đó có chủng ex-TYPE ICMP18581. Sự liên kết này cũng đã được quan sát thấy trong cả phân tích sơ bộ các locus đơn lẻ (ITS, *TUB2*) và phân tích tập dữ liệu kết hợp 6 locus của phức hợp loài gloeosporioides. Kết quả phân tích so sánh chi tiết trình tự nucleotide khẳng định mức độ đồng nhất cao giữa ba chủng phân lập trong nghiên cứu này. Cụ thể, các chủng này hoàn toàn tương đồng 100% tại 5 locus (ITS, *GAPDH, CHS1, ACT, TUB2*) và chỉ ghi nhận sự biến động duy nhất tại 1 nucleotide (1/763 bp) ở vùng gen *ApMAT* giữa chủng VNHUCC.NEL91 so với hai chủng còn lại (VNHUCC.NEL39D1 và VNHUCC.NEL282). Khi đối chiếu với các chủng tham chiếu của loài *C. fructicola*, mức độ sai khác di truyền được xác định cụ thể như sau: so với chủng TYPE ICMP 18581, ba chủng này khác biệt 1 nucleotide tại vùng *TUB2* và dao động từ 1–2 nucleotide tại vùng *ApMAT*; so với chủng GUCC10254, sự khác biệt là ở 4 vị trí nucleotide (1 tại vùng *TUB2* và 3 tại vùng *ACT*); và so với chủng LF130, sự sai khác lên tới 13–14 nucleotide (bao gồm 1 vị trí tại vùng *TUB2*, 2 tại vùng *GAPDH*, 9 tại vùng *ACT* và 1–2 vị trí tại vùng *ApMAT*). Đáng chú ý, cả 3 chủng trong nghiên cứu đều tách biệt rõ ràng với với 2 đại diện tham chiếu SAUCC00702, SAUCC200983 của loài lân cận *C. mengyinense* với sự khác biệt đáng kể: lần lượt 4 và 3 nucleotide tại vùng *GAPDH*, 9 vị trí nucleotide tại vùng *ACT* và 1 vị trí nucleotide tại vùng *TUB2* (Phụ lục Hình 3.27). Mặc dù cây phát sinh loài chưa phân giải triệt để ranh giới giữa nhánh *C. fructicola* và *C. mengyinense*, điều này có thể được lý giải bởi sự khác biệt trong cấu trúc dữ liệu đầu vào. Cụ thể, nghiên cứu này sử dụng tổ hợp 6 locus (ITS, *GAPDH, CHS1, ACT, TUB2, ApMAT*), trong khi nghiên cứu gốc định danh *C. mengyinense* của Mu et al. (2021) dựa trên hệ 7 locus (5 locus tương tự ITS, *GAPDH, CHS1, ACT, TUB2,* bổ sung *CAL* và *GS*). Bên cạnh đó, sự thiếu hụt dữ liệu tham chiếu (missing data) ở một số vùng gene (*GAPDH, ApMAT* ở chủng GUCC10254; CHS1 ở chủng LF130) cũng là nguyên nhân dẫn đến sự thiếu ổn định của một số nhánh trong cây phát sinh loài ở nhánh fructicola. Tuy nhiên, tổ hợp các bằng chứng bao gồm: (i) độ tương đồng cao về trình tự gene với chủng TYPE ICMP 18581 của loài *C. fructicola*, và (ii) đặc điểm hình thái tương thích (kích thước bào tử thuôn, ngắn hơn so với *C. mengyinense*), là cơ sở vững chắc để kết luận 3 chủng phân lập trong nghiên cứu này này được chỉ định với danh pháp *C. fructicola*.

Trong nghiên cứu này, hai chủng phân lập đơn lẻ VNHUCC.NEL71 (liên quan đến triệu chứng thối nâu với đặc trưng mặt dưới vết bệnh màu nâu sáng hơn) và VNHUCC.NEL52 (phân lập từ mẫu bệnh khô nâu – đặc trưng vết bệnh lan theo hướng đồng tâm) đã được chỉ định phân loại lần lượt vào các nhánh chứa các phân lập tham chiếu

của *C. tropicale* và *C. endophytica* với hệ số hỗ trợ cao (SH-aLRT/BPP/MLBS): 97/1/100 đối với *C. tropicale* và 95,8/1/100 đối với *C. endophytica* (Hình 3.8).



Hình 3.9. Cây phát sinh loài Maximum likelihood (ML) của phức hợp loài orchidearum với hai phân lập đại diện VNHUCC.NEL92 và VNHUCC.NEL102 được xây dựng từ tệp dữ liệu trình tự căn chỉnh ghép nối của 5 locus ITS, *GAPDH*, *CHS-1*, *ACT* và *TUB2*. Các giá trị hỗ trợ SH-aLRT > 70%/aBayes > 0,75/ML bootstrap (%) > 70% được hiển thị tại mỗi nút SH-aLRT/BPP/MLBS. Hai phân lập tham chiếu *C. merremiae* và *C. magnum* được sử dụng làm nhóm ngoài (outgroup). Thanh tỷ lệ biểu thị số lượng thay thế ước tính trên mỗi vị trí nucleotide. Màu sắc vòng tròn sau mỗi taxa biểu thị tương ứng chủng được phân lập trên giống sen hồng/hay sen trắng

Đối với 2 chủng phân lập thuộc phức hợp orchidearum, việc định danh đến loài được thực hiện dựa trên phân tích phát sinh loài kết hợp của 5 locus khác nhau (ITS, *GAPDH*, *CHS-1*, *ACT* và *TUB2*). Kết quả phân tích ở Hình 3.9 cho thấy, 2 chủng phân lập này đều được nhóm với các chủng phân lập tham chiếu khác nhau của loài *C. plurivorum,* trong đó có chủng ex-TYPE CBS125474 (ghi nhận trên cây cà phê, Việt Nam) với các hệ số hỗ trợ đáng tin cậy với SH-aLRT/BPP/MLBS: 92,5/1/94 ở nút giao với chủng phân lập CBS12574 và 87,4/0,99/94 ở nút gốc của nhánh chứa tất cả chủng phân lập tham chiếu của loài *C. plurivorum* được sử dụng trong nghiên cứu này, bao gồm LC8240 (cây mơ lông *Paederia foetida*), GUCC12141 (cây lá lốt *Piper sarmentosum*) và ZHKUCC 23-0867 (bụp giấm *Impatiens balsamina*) ghi nhận ở Trung Quốc (Hình 3.9). Bên cạnh đó, các đặc điểm hình thái quan sát được của hai chủng phân lập VNHUCC.NEL92 và VNHUCC.NEL102 cho thấy sự tương đồng rõ rệt với các mô

tả ban đầu của loài *C. plurivorum* (Damm et al., 2019) (Phụ lục Hình 3.12). Do đó, dựa trên các thông tin tổng hợp về đặc điểm hình thái và phân tích phân tử kết hợp của 5 locus, hai chủng phân lập VNHUCC.NEL92 và VNHUCC.NEL102 được xác định là loài *C. plurivorum*.

Về phạm vi phân bố địa lý và lịch sử ký chủ, *C. plurivorum* được ghi nhận chủ yếu ở các quốc gia thuộc khu vực nhiệt đới, với ít nhất 13 quốc gia và vùng lãnh thổ, trong đó phần lớn tập trung ở 3 khu vực Đông Á, Nam Á và Đông Nam Á (11 trong số 13) (Bragard et al., 2021; Dai et al., 2024; García-Estrada et al., 2020; Kurera et al., 2023; Liu et al., 2023). Dựa theo các thông tin ký chủ và các nghiên cứu liên quan, đây cũng là báo cáo đầu tiên xác nhận loài *Colletotrichum plurivorum* liên quan đến các triệu chứng thối nâu trên ký chủ mới là cây sen trắng ở Việt Nam, qua đó mở rộng phạm vi ký chủ của loài này. Tóm lại, dựa trên kết quả phân tích phát sinh loài đa locus và các đặc điểm hình thái, nghiên cứu này đã xác định các 5 loài *Colletotrichum* khác nhau liên quan đến các triệu chứng bệnh trên cây sen. Trong đó, có 4 loài thuộc phức hợp gloeosporioides: *C. fructicola* (3 chủng phân lập), *C. tropicale* (1 chủng phân lập), *C. endophytica* (1 chủng phân lập) và loài phức hợp *C. siamense* (5 chủng phân lập). Loài *C. plurivorum* với 2 chủng phân lập (đều ghi nhận trên cây sen trắng) được xác định tác nhân nấm gây bệnh trên cây sen thuộc phức hợp loài orchidearum.

Trước đây, trong báo cáo của Chen & Kirschner năm 2018 cũng đã ghi nhận sự xuất hiện của hai loài *C. siamense, C. tropicale* trên lá cây sen ở Đài Loan. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này tác giả chưa chứng minh được vai trò sinh thái các loài phân lập từ các tổn thương trên lá sen là những loài nội sinh, ký sinh hay là các mầm bệnh cơ hội, nấm bám ngoài (epiphytic) mà sử dụng chung thuật ngữ "ectendophytic" (Chen & Kirschner, 2018). Thuật ngữ *C. gloeosporioides* sensu lato (loài theo nghĩa rộng) cũng được đề cập trong báo cáo trước đây trên cây sen và được chỉ định cho một loài với danh pháp *Gloeosporium nelumbii*, tuy nhiên tên gọi *G. nelumbii* không còn được chấp nhận và kể cả khái niệm và các loài thành viên của *C. gloeosporioides* s. l. cũng đã được cập nhật và thay đổi rất nhiều trong những năm qua. Như vậy, trong luận án này đây là báo cáo đầu tiên ghi nhận *C. fructicola, C. endophytica* và *C. plurivorum* trên cây sen, bên cạnh các loài đã được ghi nhận trước đó như *C. siamense* và *C. tropicale*, mở rộng danh mục loài *Colletotrichum* gây hại ở loài ký chủ này.

Chi *Colletotrichum* là một nhóm mầm bệnh thực vật quan trọng, có khả năng lây nhiễm cho hơn 3.200 loài thực vật khác nhau, gây hại đáng kể cho nhiều loại cây trồng kinh tế trên toàn thế giới. Ngoài sự đa dạng về các loại ký chủ, sự hiện diện đồng thời của nhiều loài *Colletotrichum* gây bệnh trên cùng một loài ký chủ đã được chỉ ra trong nhiều báo cáo trước đây. Một nghiên cứu khảo sát tại các vùng trồng ổi khác nhau tại

Brazil, 16 loài *Colletotrichum* khác nhau đã được xác định là tác nhân gây bệnh thán thư trên quả, lá và hoa (Soares et al., 2024). Sự đa dạng của *Colletotrichum* trên cùng một ký chủ cũng được ghi nhận trong nhiều nghiên cứu ở Trung Quốc, ít nhất 9 loài gây bệnh đã được phát hiện trên cây sồi (*Quercus* spp.), 4 loài gây bệnh đốm lá trên *Carpinus betulus*, và 13 loài liên quan đến đốm lá trên cây cherry tại các tỉnh Liễu Ninh, Bắc Kinh, Sơn Đông và Tứ Xuyên (Qiao et al., 2023; Wang et al., 2023; Zhou et al., 2023). Tại tỉnh Quảng Tây, 5 loài *Colletotrichum* đã được xác định là gây bệnh trên quả hồng giòn. Ít nhất 8 loài *Colletotrichum* gây bệnh thán thư ở loài dược liệu *Cyclocarya paliurus* đã xác định trong các báo cáo dựa trên phân tích các locus khác nhau (ITS, *GAPDH, ACT, CHS-1, TUB, CAL, HIS3, GS* và ApMAT) (Zheng et al., 2021, 2024). Hay một nghiên cứu trên một loài dược liệu khác thuộc họ Gừng - *Etlingera elatior* dựa trên phân tích đa locus đã xác định 8 loài *Colletotrichum* khác nhau liên quan đến bệnh thán thư (Duarte et al., 2023). Riêng bệnh đốm lá trên cây táo, các nghiên cứu đã ghi nhận sự liên quan của ít nhất 9 loài *Colletotrichum* khác nhau. Cụ thể, tại Brazil có các loài *C. fructicola*, *C. nymphaeae* và *C. karstii*; tại Trung Quốc ghi nhận *C. fructicola* và *C. aenigma*; ở Nhật Bản xuất hiện *C. fructicola*, *C. aenigma* và *C. siamense*; tại Hoa Kỳ có sự hiện diện của *C. fructicola*, *C. alienum*, *C. gloeosporioides*, *C. siamense*, *C. tropicale* và *C. fioriniae*; trong khi đó, tại Uruguay chỉ ghi nhận sự xuất hiện của *C. fructicola* (Velho et al., 2019). Tại Hàn Quốc, trong một nghiên cứu định danh và hệ thống lại 71 chủng nấm gây bệnh trước đây bằng phân tích trình tự 6 locus trên đã phát hiện ít nhất 12 loài *Colletotrichum*, trong đó có 3 loài mới chưa từng được ghi nhận (Thao et al., 2024). Ba loài *C. tropicale, C. fructicola* và *C. siamense* được xác định là đồng tác nhân gây bệnh thán thư lá sắn ở Philippines và thán thư xoài ở Mexico (Tovar-Pedraza et al. 2020; Aumentado & Balendres, 2025). Đặc biệt, *C. siamense* và C. *fructicola* là 2 tác nhân có tần suất ghi nhận thường xuyên nhất, đặc biệt ở vùng nhiệt đới. Trong khi đó, *C. endophytica* – loài này được mô tả lần đầu tiên bởi Manamgoda và cộng sự vào năm 2013 là một loài nội sinh trên lá *Pennisetum purpureum*. Tuy nhiên, ngoài lối sống nội sinh, gần đây *C. endophytica* đã được báo cáo là tác nhân gây bệnh thán thư trên nhiều loài cây có giá trị kinh tế quan trọng như cây bơ, xoài, ớt, cà phê, tiêu hay một loài cây làm cảnh như trầu bà thanh xuân (Cao et al., 2019; Chethana et al., 2015; de Silva et al., 2019; Diao et al., 2017; Dissanayake et al., 2021; Li et al., 2019; Zhang et al., 2023). Đáng chú ý, *C. endophytica* cũng được báo cáo là một trong những loài có độc lực mạnh trên lá trà *Camellia sinensis* ở Trung Quốc (Wang et al., 2016). Loài *C. tropicale* được giới thiệu lần đầu tiên vào năm 2010 trong nghiên cứu của Rojas và cộng sự, từ đó loài này đã được báo cáo là tác nhân gây bệnh phổ biến trên các loài thực vật ở khu vực nhiệt

đới – đúng với nội hàm của tên gọi "tropicale" (Duan & Chen, 2022; Inokuti et al., 2024; Rojas et al., 2010; Souza et al., 2023; Yi et al., 2023).

Những nghiên cứu này cho thấy sự phức tạp và đa dạng của các loài *Colletotrichum* trong việc gây bệnh hại cho thực vật. Trước đây, các nghiên cứu về các loài *Colletotrichum* tại Việt Nam chủ yếu dựa trên các đặc điểm hình thái kết hợp với giải trình tự vùng gene ITS (Long et al., 2024; Thảnh et al., 2018; Uyên et al., 2018; Ha et al., 2012). Gần đây, với cách thức tiếp cận tích hợp giữa phân tích đa locus kết hợp với các thông tin ký chủ, phân bố, về hình thái, nhiều loài *Colletotrichum* (khoảng 750 loài mới) đã được xác định trên các loài thực vật khác nhau (Jiang et al. 2025; Liu et al. 2022). Hai loài *C. siamense* và *C. endophytica* được xác định liên quan đến bệnh thán thư trên cây bơ (*Persea americana*) tại Việt Nam bằng cách sử dụng tệp dữ liệu kết hợp của 6 vùng gene ITS, *ACT, CAL, CHS-1, GAPDH và TUB2* (Thanh et al., 2025). *C. siamense* cũng được xác định gây bệnh thán thư trên lá cây trà hoa vàng (*Camellia tamdaoensis),* thán thư trên lá và hoa của cây nhài *(Jasminum sambac)*. Nhiều loài nấm thuộc chi *Colletotrichum* được xác định là nguyên nhân gây bệnh thán thư trên cây ớt ở các vùng miền khác nhau của Việt Nam. Tại miền Trung, sự kết hợp phân tích ba vùng gene ITS, *GAPDH* và *ACT* đã phát hiện 4 loài gây bệnh trên quả ớt, bao gồm: *C. scovillei, C. siamense, C. fructicola và C. brevisporum* (Vu et al., 2024). Hay tại Bình Thuận, Tây Ninh, nghiên cứu dựa trên các đặc điểm hình thái và kết quả của các 5 vùng gene khác nhau, đã xác định được hai loài là *C. gloeosporioides* và *C. capsici* liên quan đến triệu chứng bệnh trên cây mãng cầu ta (*Annona squamosa*) (Anh et al., 2019). Trong khi đó, ở miền Nam, cụ thể tại Trà Vinh, hai tác nhân chính là *C. scovillei* và *C. acutatum* được xác nhận qua các chỉ thị phân tử đặc hiệu (Ly et al., 2020). Ở miền Bắc, sự xuất hiện của *C. truncatum, C. fructicola, C. siamense* và *C. gloeosporioides* đã được xác nhận, tuy nhiên mỗi loài lại có sự phân bố và tần suất khác nhau tùy theo từng địa phương (Hưng et al., 2018). Rõ ràng, sự đa dạng này không chỉ phản ánh đặc điểm sinh học phức tạp mà còn đặt ra thách thức lớn trong việc kiểm soát bệnh thán thư do nấm *Colletotrichum* gây ra tại Việt Nam.

Nghiên cứu hiện tại cung cấp những thông tin quan trọng về hệ thống các tác nhân gây bệnh thuộc chi *Colletotrichum* liên quan đến các triệu chứng thối lá, đốm lá, thán thư trên cây sen ở Thành phố Huế, đồng thời làm nổi bật tầm quan trọng của việc phân định loài trong các nghiên cứu sinh thái về nấm. Việc xác định chính xác các loài không chỉ giúp hiểu rõ hơn về câu hỏi cái gì đang gây bệnh mà còn đóng vai trò then chốt trong việc phát triển các chiến lược phòng chống hiệu quả và hỗ trợ, định hướng cho công tác lai tạo các giống sen kháng các tác nhân *Colletotrichum* này trong tương lai.

3.1.2.5. Neopestalotiopsis

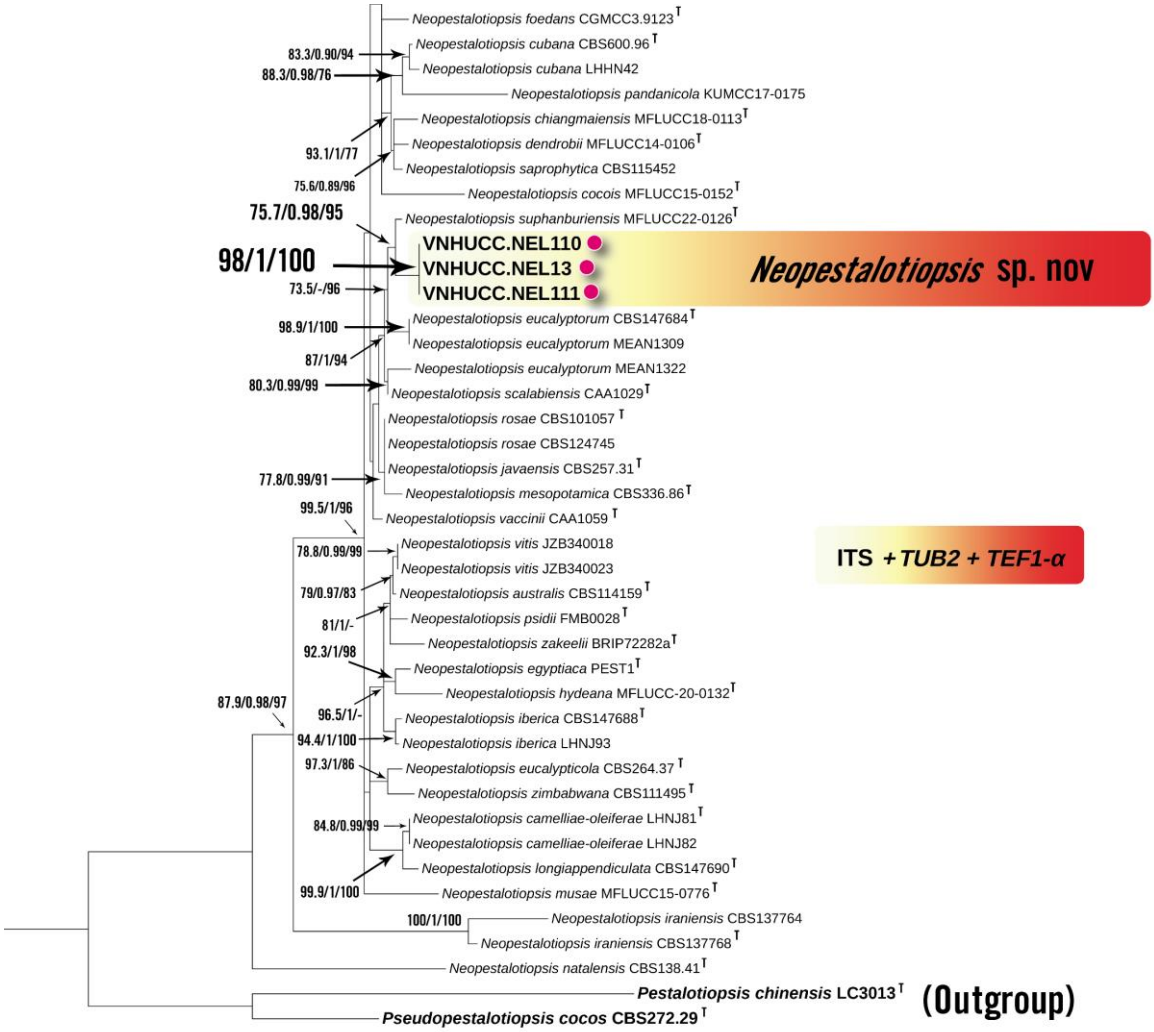
Chi *Pestalotiopsis* ban đầu được mô tả bởi Steyaert (1949) bao gồm các loài có bào tử có 5 tế bào (Liu et al., 2019). Theo phương pháp phân loại truyền thống, các thành viên thuộc nhóm nấm này được xác định dựa trên mức độ sắc tố của các tế bào bào tử trung gian, các phần phụ đỉnh (apical appendages) và các tế bào sinh bào tử (conidiogenous cell). Tuy nhiên, Maharachchikumbura et al. (2014) đã đề xuất chia *Pestalotiopsis* thành ba chi gồm *Pestalotiopsis, Pseudopestalotiopsis* và *Neopestalotiopsis*, dựa trên kết quả phân tích phát sinh loài đa locus được suy ra bằng cách sử dụng 3 vùng gene ITS, β-tubulin (*TUB2*) và yếu tố kéo dài dịch mã một phần (*TEF1-α*), kết hợp với các đặc điểm hình thái và xem hệ thống này là *Pestalotiopsis sensu lato* (Pestalotioid). Theo đó, *Neopestalotiopsis* khác với *Pseudopestalotiopsis* và *Pestalotiopsis* ở chỗ các tế bào trung gian có nhiều màu (hai tế bào trung gian ở phía trên thường sẫm màu hơn tế bào trung gian ở phía dưới), trong khi *Pseudopestalotiopsis* có thể dễ dàng phân biệt với *Pestalotiopsis* ở chỗ các tế bào trung gian sẫm màu hơn.

Trong nghiên cứu này, các mẫu lá sen hồng có triệu chứng đốm lá được thu thập từ một vườn ươm và khu vực hệ thống hồ trước mặt Đông Khuyết Đài, cửa Hiển Nhơn, cùng thuộc phường Đông Ba. Từ các mẫu này, ba chủng nấm đã được phân lập và nhận định sơ bộ thuộc chi *Neopestalotiopsis* dựa trên các nhận dạng bước đầu bằng đặc điểm hình thái điển hình (Phụ lục hình 3.6). Để làm rõ và xác định chính xác loài, cũng như các mối quan hệ phát sinh loài giữa các chủng phân lập và các loài liên quan, nghiên cứu sử dụng phương pháp phân tích phát sinh loài dựa trên sự kết hợp của ba vùng gene: ITS*, TUB2* và *TEF1-α*.

Phân tích phát sinh loài trong nghiên cứu này được xây dựng dựa trên tệp dữ liệu trình tự kết hợp 3 locus ITS + *TUB2* + *TEF1-α* của 78 chủng phân lập tham chiếu, bao gồm 3 phân lập đại diện thu thập từ các vết bệnh có triệu chứng đốm lá trên cây sen, 73 chủng phân lập tham chiếu của chi *Neopestalotiopsis* và 2 chủng phân lập tham chiếu ngoài nhóm (*Pestalotiopsis, Pseudopestalotiopsis*). Ma trận tệp dữ liệu kết hợp sau căn chỉnh chứa 1.597 ký tự (bao gồm các khoảng trống căn chỉnh được mã hóa), trong đó có 263 vị trí cung cấp thông tin (parsimony-informative site), 218 vị trí đơn lẻ (singleton sites), 1116 vị trí bảo tồn (constant sites).

Kết quả cấu trúc cây dựa trên phương pháp ML ở Hình 3.10 cho thấy, ba chủng phân lập VNHUCC.NEL13, VNHUCC.NEL110, VNHUCC.NEL111 hình thành một nhánh độc lập với hệ số hỗ trợ đáng tin cậy SH-aLRT/PP/MLBS: 98/1/100. Ba chủng phân lập *Neopestalotiopsis* này có mối quan hệ phát sinh loài chị em với *N. suphanburiensis* MFLUCC22-0126 (một loài *Neopestalotiopsis* mới được công bố gần đây vào năm 2023, chủng phân lập này được thu thập năm 2020 tại tỉnh Suphan Buri,

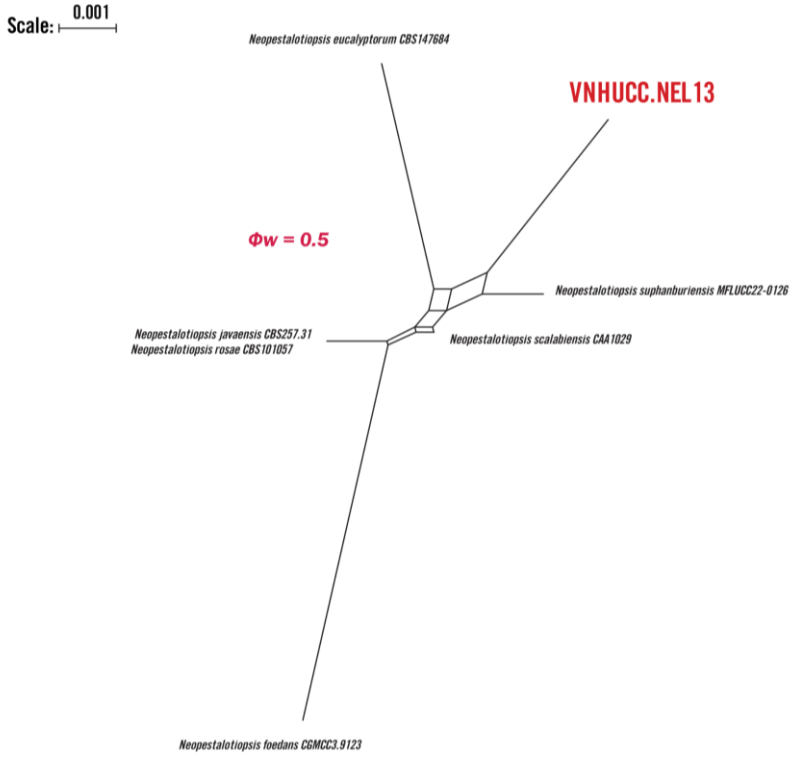
Thái Lan) và với các chủng phân lập của loài *N. eucalyptorum*, được phân lập từ lá và thân của *Eucalyptus globulus* ở Bồ Đào Nha (Diogo et al., 2021; Sun et al., 2023).



Hình 3.10. Cây phát sinh loài Maximum likelihood (ML) của 3 phân lập đại diện và các phân lập tham chiếu thuộc chi *Neopestalotiopsis* dựa trên tệp dữ liệu kết hợp 3 locus ITS + *TUB2* + *TEF1-α* (hiển thị một phần – cây đầy đủ được trình bày ở Phụ lục Hình 3.7). Các giá trị hỗ trợ SH-aLRT > 70%/aBayes > 0,75/ML bootstrap (%) > 70% được hiển thị tại mỗi nút SH-aLRT/BPP/MLBS. *Pestalotiopsis chinensis* LC3013 và *Pseudopestalotiopis cocos* CBS272.29 được sử dụng làm phân lập ngoài nhóm (Outgroup). Màu sắc vòng tròn sau mỗi taxa biểu thị chủng được phân lập trên giống sen tương ứng

Ngoài ra, khi phân tích chi tiết trình tự vùng gene *TEF1—α*, các chủng phân lập của loài *Neopestalotiopsis* mới (VNHUCC.NEL13, VNHUCC.NEL110, VNHUCC.NEL111) trong nghiên cứu này cho thấy có lần lượt 6 và 8 vị trí nucleotide khác biệt (không tính các khoảng trống căn chỉnh, tổng độ dài 446 bp) trong trình tự so với các chủng *N. suphanburiensis* MFLUCC 22-0126 và *N. eucalyptorum* CBS147684.

Thử nghiệm PHI (Pairwise Homoplasy Index) được thực hiện dựa trên phương pháp GCPSR cũng cho thấy không có dấu hiệu tái tổ hợp đáng kể giữa chủng phân lập đại diện VNHUCC.NEL13 và các đơn vị phân loại có quan hệ họ hàng gần, với giá trị Φw = 0,5 (Hình 3.11).



Hình 3.11. Biểu đồ phân tích GCPSR cho thấy kết quả của thử nghiệm PHI đối với các loài *Neopestalotiopsis* mới (VNHUCC.NEL13 làm phân lập đại diện) với các loài có quan hệ gần gũi nhất bằng cách sử dụng phép biến đổi Log-Det và Splits Decomposition. Đơn vị phân loại mới trong mạng biểu đồ được hiển thị bằng font chữ màu đỏ.

Chỉ số đồng hình từng cặp (Φw) là một tham số quan trọng dùng để đánh giá mức độ tái tổ hợp di truyền trong một tập dữ liệu, trong đó giá trị Φw dưới 0,05 cho thấy sự tái tổ hợp đáng kể. Trong nghiên cứu này, phân tích GCPSR cho kết quả chỉ số PHI (Φw) là 0,5 đối với tất cả các loài có quan hệ họ hàng gần. Kết quả này cho thấy không tồn tại sự pha trộn di truyền đáng kể giữa các chủng và các loài chị em của chủng VNHUCC.NEL13. Do đó, loài *Neopestalotiopsis* mới được nghiên cứu này chưa trải qua quá trình tái tổ hợp đáng kể, khẳng định rõ ràng trạng thái loài riêng biệt của các chủng phân lập ghi nhận đại diện cho loài này. Kết quả này cũng gợi mở về sự đa dạng cao chưa được mô tả về các loài nấm *Neopestalotiopsis* cũng như sự đa dạng vật chủ ở thực vật ở Việt Nam.

3.1.2.6. Aspergillus

Aspergillus là một trong những chi nấm đa dạng và phân bố rộng rãi nhất trên toàn thế giới. Gần đây, đặc biệt là sau một loạt thay đổi về một số khái niệm và sửa đổi phân loại trong hệ thống phân loại của chi *Aspergillus*, nhiều loài khác đã được báo cáo

là tác nhân gây bệnh thực vật (Bian et al., 2022; Samson et al., 2014; Sklenář et al., 2017). Trong các nghiên cứu trước đây về *Aspergillus* gây bệnh cho thực vật, *A. niger* và *A. flavus* là hai loài ghi nhận phổ biến. Trong nghiên cứu này, 3 chủng phân lập *Aspergillus* đã được xác định liên quan đến các tổn thương thứ cấp và triệu chứng thối rữa (do các tác động từ mưa, hoạt động canh tác gây nên những tổn thương trên bề mặt lá), bao gồm: VNHUCC.NEL01, VNHUCC.NEL03 và VNHUCC.NEL160.

Phân tích BLASTn vùng gene ITS của các chủng phân lập cho thấy: Chủng VNHUCC.NEL01 có trình tự ITS hoàn toàn tương đồng (100%) với các chủng tham chiếu của loài *Aspergillus aculeatus*, bao gồm WZ-112 (MN856264), 2-8F (MW077053) và AF29 (OP787510). Mức độ tương đồng với các chủng TYPE của loài này lần lượt là 99,60% với IHEM 5796 và 99,30% với CBS 172.66. Tuy nhiên, chủng VNHUCC.NEL01 cũng thể hiện sự tương đồng rất cao với một số loài *Aspergillus* khác, như 100% với các chủng TYPE AUMC 5748 (*A. assiutensis*), KUMCC18-0196 (*A. hydei*), CBS 121060 (*A. aculeatinus*) và 99,82% với NRRL 4912 (*A. brunneoviolaceus*). Điều này cho thấy sự không nhất quán trong trình tự ITS (kể cả 2 chủng loại TYPE IHEM 5796 và CBS 172.66) và có thể tồn tại nhầm lẫn trong việc chỉ định danh pháp các chủng tham chiếu trên cơ sở dữ liệu GenBank. Do vậy, cần bổ sung thêm các dữ liệu thông tin hoặc các phương pháp xác minh khác để khẳng định chính xác loài trong các nghiên cứu tiếp theo.

Chủng VNHUCC.NEL160 có trình tự ITS hoàn toàn tương đồng (100%) với chủng B3-01 (OP946385) của loài *Aspergillus niger,* một chủng đã được ghi nhận liên quan đến gạo sau thu hoạch tại Thái Lan. So sánh với các chủng loại TYPE, chủng này có mức độ tương đồng lần lượt là 99,65% với Ex-TYPE NRRL326 (EF661186) của *A. niger* và 99,64% với CBS139.54 (NR_137513) của loài *A. welwitschiae* — loài có quan hệ phát sinh gần nhất với *A. niger* (sensu stricto – nghĩa hẹp) trong nhánh *A. niger* (sensu lato – nghĩa rộng) (một trong bảy nhánh của nhóm (section) Nigri – *Aspergillus* mốc đen).

Chủng VNHUCC.NEL03 cho thấy trình tự ITS tương đồng 100% với các chủng phân lập MEBP0074 (MT597427) và CMXY30056 (MG991669) thuộc loài *A. fumigatus*. So sánh với trình tự ITS của các chủng loại TYPE, mức độ tương đồng cao nhất là 99,34% với ATCC 1022 (HQ026746). Đồng thời, chủng này phân biệt rõ với loài gần gũi *A. oerlinghausenensis* CBS139183 (98,51%), cho thấy sự phân biệt rõ ràng giữa hai loài. Như vậy, trong nghiên cứu này, hai loài *Aspergillus*: *A. niger* (chủng VNHUCC.NEL160) và *A. fumigatus* (chủng VNHUCC.NEL03) được xác định liên quan đến các triệu chứng thối rữa trên cây sen dựa trên phân tích trình tự gene ITS. Đối với chủng VNHUCC.NEL01, do sự không nhất quán trong dữ liệu ITS và sự tương đồng

cao với nhiều loài khác nhau khi so sánh trên Genbank, có thể cần có thêm các phân tích bổ sung để xác định chính xác danh tính loài trong các nghiên cứu sau.

Các báo cáo trước đây cũng chỉ ra rằng các loài *Aspergillus* được tìm thấy phổ biến trong nhiều loại chất nền và điều kiện môi trường khác nhau trên toàn thế giới. Bào tử của chi *Aspergillus* có khả năng di chuyển theo dòng không khí, giúp lan truyền rộng rãi trên khoảng cách đến các bề mặt thực vật khác nhau. Khi bào tử tiếp xúc với chất nền thích hợp và điều kiện thuận lợi, chúng sẽ nảy mầm và xâm nhập, gây phân hủy chất nền. Trong lĩnh vực nông nghiệp, các loài *Aspergillus* đặc biệt phổ biến trên cây trồng và các sản phẩm nông nghiệp như thực phẩm và thức ăn, gây ra các hiện tượng thối rữa và hư hỏng. Đáng chú ý, nhóm *Aspergillus* mốc đen (nhóm Nigri) bao gồm nhiều loài nấm mốc quan trọng, trong đó *A. niger* là loài điển hình. Một trong những đặc điểm nhận dạng dễ dàng của nhóm *Aspergillus* đen là sự xuất hiện của một lượng lớn các khối bào tử màu đen trên các bộ phận lá sen bị nhiễm, do thành tế bào bào tử chứa melanin – một sắc tố giúp bảo vệ bào tử khỏi tác động của tia tử ngoại (UV), hạn hán và nồng độ muối cao. Đây được xem là một yếu tố thuận lợi cho sự tồn tại bào tử của loài hay nhóm loài này trên các ruộng/hồ trồng sen. Mặc dù, xét theo các đánh giá độc lực cho thấy các loài và chủng *Aspergillus* phân lập trong nghiên cứu này thường chỉ gây bệnh nhẹ hoặc đóng vai trò là tác nhân thứ cấp. Trong luận án, *Aspergillus* được xem xét vì mức độ nghiêm trọng của sự tồn tại bào tử *Aspergillus* trên các bộ phận khác nhau của cây trồng trong điều kiện đồng ruộng. Đặc biệt, những vùng/bộ phận của cây sen dễ bị tổn thương do côn trùng, sâu bệnh hoặc các tác động vật lý thường xuyên trong quá trình trồng sen (như hoạt động chèo thuyền thu hái, ảnh hưởng của mưa gió, hay sự cọ xát từ các chồi non làm rách lá sen - lá trải) tạo điều kiện thuận lợi cho sự phát triển và lan truyền của nấm *Aspergillus*. Các bào tử *Aspergillus* lại có khả năng tồn tại lâu dài trên đồng ruộng và duy trì qua các giai đoạn thu hoạch, bảo quản và chế biến. Vì vậy, mầm bệnh không chỉ hiện diện trong quá trình sinh trưởng của cây mà còn có thể tồn tại trong sản phẩm cho đến giai đoạn chế biến cuối cùng. Điều này làm tăng nguy cơ ô nhiễm nấm kéo dài, ảnh hưởng tiêu cực đến chất lượng và nguy cơ an toàn sinh học của sản phẩm nông nghiệp từ cây sen. Do đó, việc tìm kiếm giải pháp để kiểm soát và phòng ngừa sự lây nhiễm *Aspergillus* ngay từ giai đoạn đồng ruộng là rất cần thiết để giảm thiểu nguy cơ ô nhiễm và đảm bảo an toàn cho toàn bộ chuỗi sản xuất và tiêu thụ nông sản.

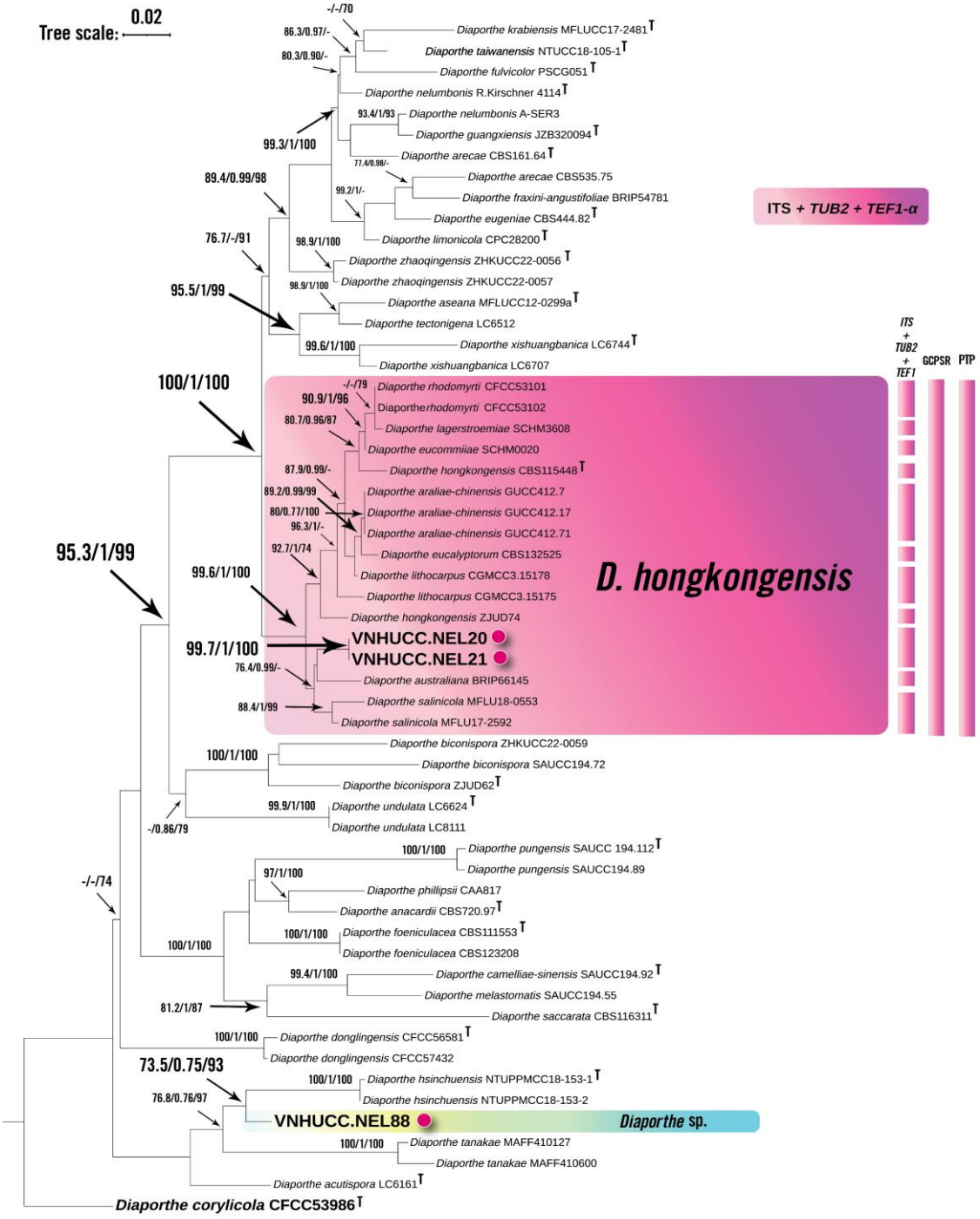
Bên cạnh đó, mặc dù các loài *Aspergillus* thường là tác nhân gây bệnh yếu hoặc thứ cấp, một số loài đã được xác nhận gây bệnh lá, bao gồm đốm lá và thối mềm. Cụ thể, *A. niger* là tác nhân gây đốm lá trên cây gừng (*Zingiber officinale*) và gây rụng lá nghiêm trọng trên cây bơ (*Persea americana*) (Kiyan et al., 2023; Pawar et al., 2008). Loài này cũng liên quan đến bệnh thối mềm trên các cây cảnh như lưỡi hổ (*Dracaena*

trifasciata), cây sứ Thái Lan (*Adenium obesum*) và đốm thân trên phát lộc (*Dracaena sanderiana*) (Abdel-Rahman et al., 2020; Huang et al., 2021; Kiyan et al., 2023). Ngoài ra, *A. niger* cùng với hai loài khác là *A. ustus* và *A. flavus* được xác định là nguyên nhân gây các bệnh về lá trên cây bàng (*Terminalia catappa*), một loài cây được trồng phổ biến ở vùng nhiệt đới, trong đó có Việt Nam (Nasir, 2021). Trong khi đó, *A. fumigatus* được phát hiện là tác nhân gây bệnh cháy lá trên cây vạn thọ (*Tagetes erecta* và *T. patula*) (Aktar & Shamsi, 2015). Trên cây đào, ba loài *A. flavus, A. niger* và *A. acculeatus* có liên quan đến bệnh thối quả, làm ảnh hưởng đến chất lượng và năng suất mùa vụ (Kong et al., 2018). Một nghiên cứu của Bayman và cộng sự về sự hiện diện của các loài nấm trên hạt hồ trăn, hạnh nhân và óc chó cho thấy sự phổ biến của nhiều loài *Aspergillus* như: *A. niger, A. flavus, A. nidulans, A. tamarii, A. ochraceus, A. melleus* và *A. fumigatus* (Bayman et al., 2002). Đáng chú ý, tại Việt Nam, *A. niger* được xác định loài phổ biến trên hạt cà phê nhân, đặc biệt là trên hạt cà phê Robusta với tỷ lệ ghi nhận lên đến 89% (Leong et al., 2007).

3.1.2.7. Diaporthe

Diaporthe Nitschke (1870) là một chi lớn bao gồm các loài gây bệnh thực vật, nội sinh và hoại sinh quan trọng, với phạm vi vật chủ rất đa dạng và phân bố rộng khắp trên thế giới. Ban đầu, khái niệm về loài trong chi *Diaporthe* được xây dựng dựa trên giả định rằng mỗi loài tương ứng với một vật chủ riêng biệt. Tuy nhiên, quan điểm này đã dẫn đến việc mô tả và phân loại hơn 990 loài *Diaporthe* (http://www.indexfungorum.org/, truy cập ngày: 03/04/2025), nhiều trong số đó có thể không phản ánh đúng mối quan hệ sinh học thực sự giữa các loài và vật chủ. Tuy nhiên, nhiều báo cáo gần đây cũng chỉ ra thường có hơn một loài *Diaporthe* được phát hiện từ cùng một vật chủ (Ariyawansa et al., 2021; Fan et al., 2018; Gomes et al., 2013; Li et al., 2025; Thompson et al., 2018). Điều này cho thấy giả định về tính đặc hiệu của vật chủ không hoàn toàn phù hợp. Bên cạnh đó, vì sự phức tạp và thiếu các hệ số hỗ trợ đáng tin cậy, các báo cáo về phát sinh loài trong chi *Diaporthe* thường không nhất quán, gặp khó khăn trong việc xác định ranh giới loài. Gần đây, nhiều báo cáo cho rằng, số lượng loài *Diaporthe* được công nhận có thể đã bị "bias" – hay ước tính quá cao so với thực tế. Phức hợp loài *D. amygdali* cũng đã được chứng minh là một loài duy nhất dựa theo nguyên tắc nhận dạng loài theo phả hệ (GCPSR) và các mô hình hợp nhất GMYC và PTP, và các loài khác nhau trong phức hợp trên trở thành loài đồng nghĩa với chung danh pháp *D. amygdali*. Năm 2022, Norphanphoun et al. đã đề xuất khái niệm nhóm loài (species-group) trong chi *Diaporthe* dựa trên kết quả phân tích phát sinh chủng loài đa locus kết hợp với cây đơn locus, đồng thời giới thiệu 13 phức hợp loài mới. Các tên

gọi phân chi, phức hợp, nhóm loài trong nghiên cứu này cũng dựa theo cách gọi được đề xuất của Norphanphoun.



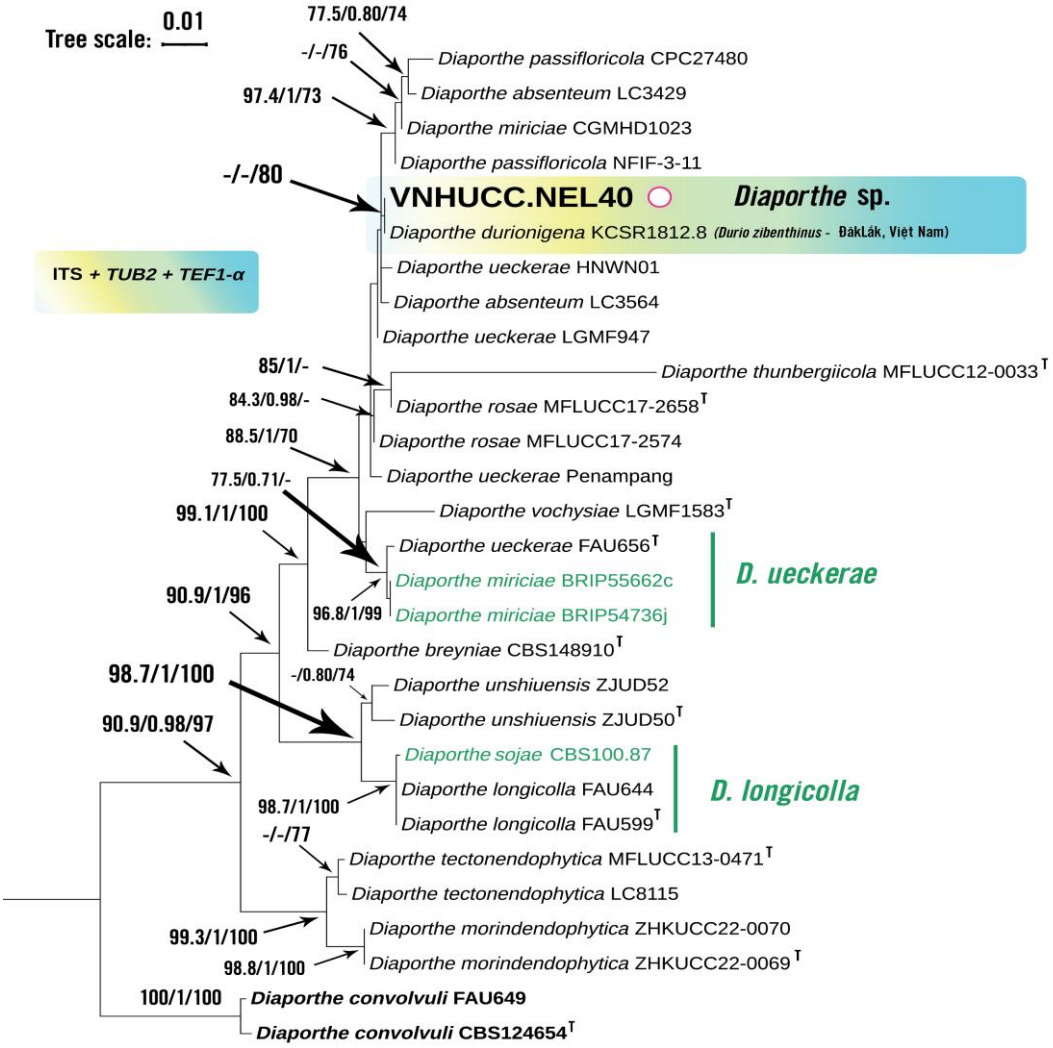
Hình 3.12. Cây phát sinh loài Maximum likelihood (ML) của 3 chủng phân lập đại diện và các phân lập tham chiếu thuộc chi *Diaporthe* (phân chi *Foeniculina)* dựa trên tệp dữ liệu kết hợp 3 locus ITS + *TUB2* + *TEF1-α.* Các giá trị hỗ trợ SH-aLRT > 70%/aBayes > 0,75/ML bootstrap (%) > 70% được hiển thị tại mỗi nút SH-aLRT/BPP/MLBS. Các dạng chủng loại TYPE được biểu thị bằng chữ "T" ở phía cuối mỗi taxa phân loại. Thanh tỷ lệ biểu thị số lượng thay thế ước tính trên mỗi vị trí nucleotide.

Trong chi *Diaporthe* này, nghiên cứu sử dụng chiến lược phân tích đa locus trong từng cụm nhóm (nhánh, phân chi), phức hợp, đồng thời sử dụng phân tích đa locus kết hợp các công cụ phân tích ranh giới loài (GCPSR, PTP) để xác định danh pháp loài của các chủng phân lập thu nhận. Quá trình sàng lọc ban đầu dựa trên phân tích BLASTn và phân tích phát sinh loài sơ bộ với các tham chiếu thuộc chi *Diaporthe*, đã xác định 8 chủng phân lập *Diaporthe* thu thập thuộc 2 phân chi (section): foeniculina và sojae. Trên cơ sở định vị này, nghiên cứu mở rộng phân tích chuyên sâu theo từng phân nhóm/phức hợp bằng cách bổ sung thêm các chủng tham chiếu liên quan, nhằm tăng độ bao phủ kiểu gen và cải thiện độ tin cậy suy luận.

Kết quả phân tích phát sinh loài kết hợp từ ba locus cho thấy hai chủng phân lập VNHUCC.NEL20 và VNHUCC.NEL21 tạo thành một nhánh độc lập, có mối quan hệ gần gũi với chủng phân lập *D. australiana* BRIP 66415 (Hình 3.12). Tuy nhiên, các hệ số hỗ trợ thấp và xuất hiện nhiều tín hiệu xung đột giữa các cây phát sinh loài đơn gene cũng như cây phát sinh loài kết hợp, cho thấy sự hỗ trợ phát sinh loài giữa các loài này còn yếu. Do đó, nghiên cứu tiến hành thực hiện các phân tích bổ sung nhằm xác định được ranh giới loài. Kết quả thử nghiệm PHI theo nguyên tắc GCPSR (Hình 3.12, Phụ lục Hình 3.20) cho thấy tám loài *D. salinicola, D. australiana, D. lithocarpus, D. eucalyptorum, D. araliae-chinensis, D. lagerstroamiae, D. rhodomyrti* và *D. eucomiiae* cùng 2 chủng VNHUCC.NEL20, VNHUCC.NEL21 trong phức hợp giả định này có sự tái tổ hợp đáng kể với giá trị PHI rất thấp (Øw = 0,000001363). Đồng thời, phương pháp hợp nhất đồng tổ tiên PTP cũng chỉ ra rằng các chỉ định loài này nên được gộp lại thành một loài duy nhất (được biểu diễn bằng tập hợp các nhánh màu đỏ, với nút chuyển tiếp loài từ màu xanh sang đỏ được xem là nút gốc phân định loài - Phụ lục Hình 3.24). Do đó, xét theo lịch sử ghi nhận, hai chủng phân lập VNHUCC.NEL20 và VNHUCC.NEL21 trong nghiên cứu này được đề xuất với danh pháp loài *D. hongkongensis* — loài được giới thiệu đầu tiên trong nhóm này (RR Gomes, Glienke & Crous, Persoonia 31:23 (2013). Trong cây phát sinh loài này, chủng phân lập lập VNHUCC.NEL88 cũng cho thấy được cấu trúc trong một phân nhánh phụ độc lập với phân nhánh với *D. hsinchuensis, D. tanakae* với hệ số hỗ trợ tương đối tốt (Hình 3.12).

Kết quả phân tích phát sinh loài ở Hình 3.13 cho thấy, chủng phân lập VNHUCC.NEL40 cũng là một phân lập thuộc phân nhánh longicolla thuộc nhóm Araceae. Kết quả phân tích dựa trên bộ dữ liệu hiện có cho thấy VNHUCC.NEL40 hình thành một nhánh gần với chủng *D. durionigena* KCSR1812.8 (tác nhân gây bệnh chết ngược cành trên sầu riêng tại Đắk Lắk (Thao et al., 2021). Tuy nhiên, sự không nhất quán trong các cây phát sinh đơn gene và cây kết hợp, cũng như sự một số nút có giá trị hỗ trợ với mức tin cậy dưới ngưỡng, cho thấy tín hiệu tiến hóa chưa đủ nhất quán để

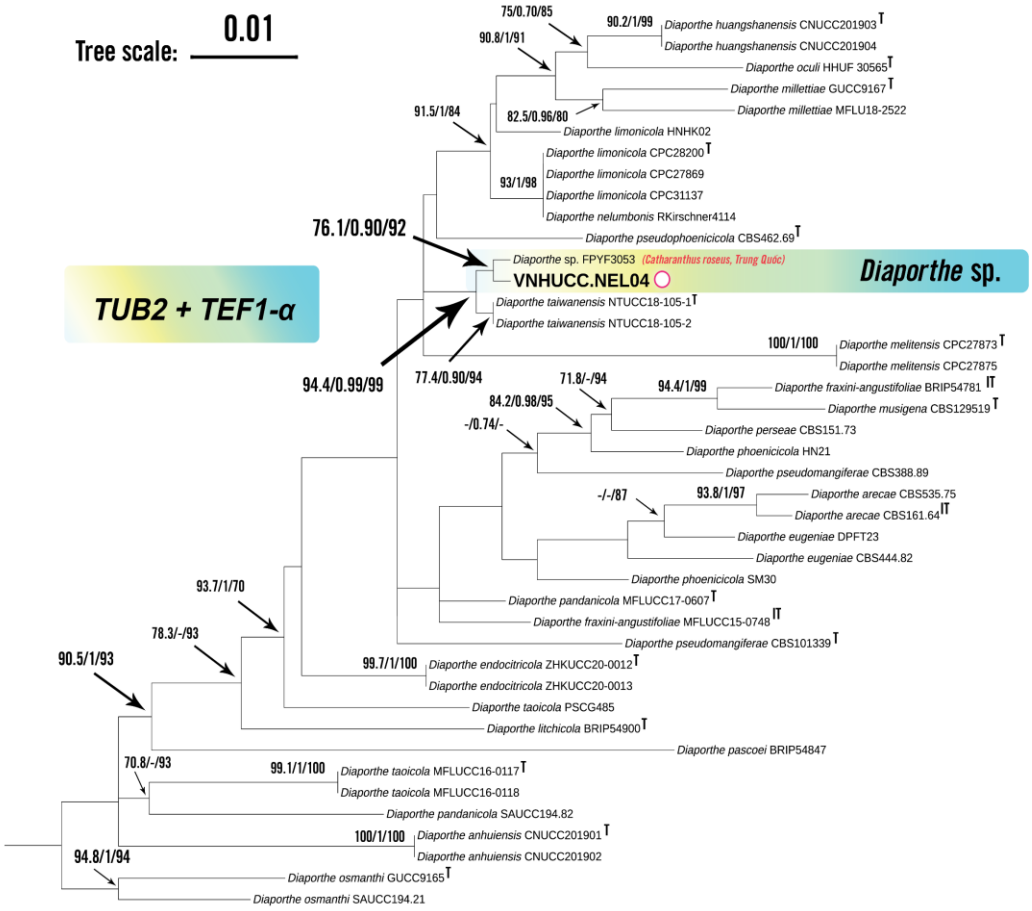
củng cố ranh giới loài. Do đó, trong nghiên cứu này chỉ ghi nhận VNHUCC.NEL40 như một phân lập thuộc clade longicolla của *Diaporthe* và việc định danh ở ở cấp độ loài của chủng phân lập này chưa đủ bằng chứng để thực hiện.



Hình 3.13. Cây phát sinh loài Maximum likelihood (ML) của phân lập đại diện VNHUCC.NEL40 và các phân lập tham chiếu thuộc chi *Diaporthe* (phân nhóm Longicolla, nhóm Araceae*)* dựa trên tệp dữ liệu kết hợp 3 locus ITS + *TUB2* + *TEF1-α.* Các giá trị hỗ trợ SH-aLRT > 70%/aBayes > 0,75/ML bootstrap (%) > 70% được hiển thị tại mỗi nút SH-aLRT/BPP/MLBS.

Tương tự, phân tích phát sinh loài với 2 locus *TUB2* + *TEF1-α* chỉ ra rằng VNHUCC.NEL04 được cấu trúc trong cùng một nhánh phụ với chủng phân lập FPYF3053 chưa được xác định loài (gây bệnh đốm lá *Catharanthus roseus* ở Trung Quốc) với hệ số hỗ trợ (SH-aLRT/BPP/MLBS): 76,1/0,90/92 (Hình 3.14). Nhánh phụ chứa 2 chủng phân lập này cũng cho thấy mối quan hệ phát sinh loài chặt chẽ với loài *D. taiwanensis* (NTUCC18-105-1, NTUCC18-105-2) với hệ số hỗ trợ rất tốt (SH-aLRT/BPP/MLBS): 94,4/0,99/99. Tuy nhiên, việc kết hợp vùng ITS gây ra xung đột và các nhánh phát sinh bất thường, trong khi cây phát sinh loài dựa trên gene *TEF1-α* cho

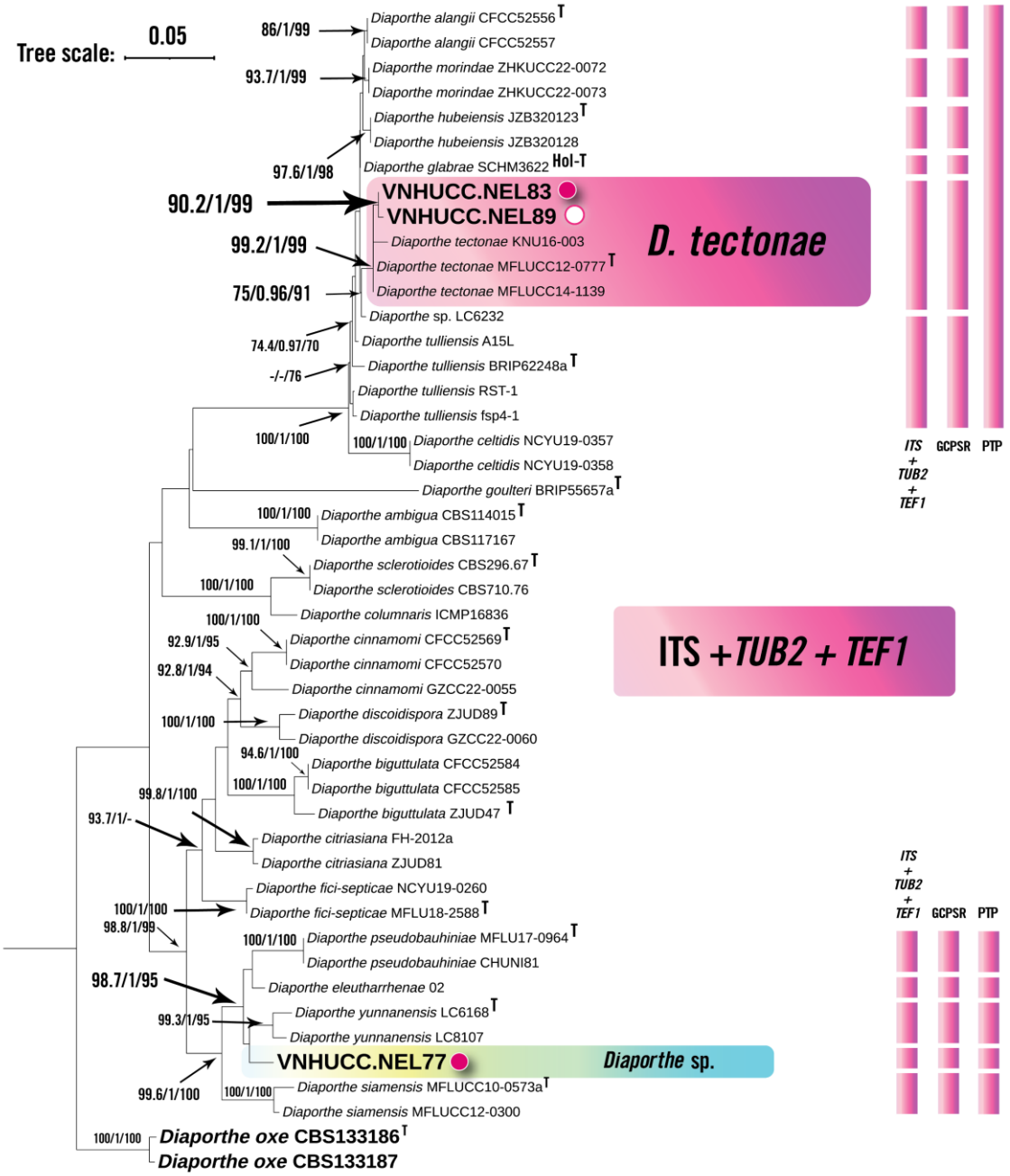
kết quả ổn định, nhất quán và gần với cây phát sinh kết hợp. Điều này cho thấy gene *TEF1-α* cùng *TUB2* là những marker, vùng locus phù hợp và đáng tin cậy hơn để xác định mối quan hệ phát sinh loài trong nhóm này.



Hình 3.14. Cây phát sinh loài Maximum likelihood (ML) của VNHUCC.NEL04 và các chủng phân lập tham chiếu thuộc chi *Diaporthe* (phân nhóm longicolla*)* dựa trên tệp dữ liệu kết hợp 2 locus *TUB2* + *TEF1-α*. Các giá trị hỗ trợ SH-aLRT > 70%/aBayes > 0,75/ML bootstrap (%) > 70% được hiển thị tại mỗi nút SH-aLRT/BPP/MLBS.

Trong khi đó, hai chủng VNHUCC.NEL83 và VNHUCC.NEL89 được nhóm trong các chủng tham chiếu của *D. tectonae* với sự xuất hiện của chủng TYPE MFLUCC12-0777 (gây bệnh chết cành trên *Tectona grandis*, Thái Lan). Một sự tương đồng về cấu trúc phân cụm trên cây phát sinh đa locus giữa các chủng ở Việt Nam (VNHUCC.NEL83, VNHUCC.NEL89) trong nghiên cứu này và các trình tự *TUB2* từ sen Đài Loan (LC068969, LC069367, LC086653) của Chen & Kirschner (2018) đã được quan sát thấy, gợi mở về một mối quan hệ đồng loài hoặc cận loài giữa các chủng phân lập này. Tuy nhiên, do trình tự *TUB2* khuếch đại trong nghiên cứu này ngắn hơn so với dự kiến nên chưa thể khẳng định. Về lịch sử ký chủ, theo nghiên cứu của Du et al. (2021), *D. tectonae, D. hongkongensis*, cùng 5 loài *Diaporthe* khác được xác nhận là tác nhân gây ra bệnh đốm lá và cháy ngọn chồi trên cây kiwi (*Actinidia* spp.) tại Trung Quốc. Bên cạnh đó, tác giả cũng chỉ ra rằng thử nghiệm gây bệnh trên trái, lá và cành

kiwi cho thấy *D. tectonae* cùng với *D. alangii* và là hai loài gây bệnh mạnh nhất, gây triệu chứng rõ rệt trên các mô được gây tổn thương. Trên cây phát sinh loài 3 locus, VNHUCC.NEL77 được chỉ định trong phức hợp siamensis, tạo thành một nhánh độc lập có mối quan hệ phát sinh loài chị em với *D. yunnanensis, D. pseudobahaunniae, D. eleutharrhenae* và *D. siamensis* với hệ số hỗ trợ liên quan tương đối tốt (SH-aLRT/BPP/MLBS): 98,7/1/95.



Hình 3.15. Cây phát sinh loài Maximum likelihood của VNHUCC.NEL83, VNHUCC.NEL89, VNHUCC.NEL77 và các chủng phân lập tham chiếu thuộc chi *Diaporthe* (phân nhóm Sojae*)* dựa trên tệp dữ liệu kết hợp 2 locus *TUB2* + *TEF1-α.* Các giá trị hỗ trợ SH-aLRT > 70%/aBayes > 0,75/ML bootstrap (%) > 70% được hiển thị tại mỗi nút SH-aLRT/BPP/MLBS.

Như vậy, trong chi *Diaporthe* với 8 phân lập được ghi nhận, dựa trên các bằng chứng và phân tích liên quan, chỉ có 04/08 chủng phân lập được xác định chính xác đến loài, với 2 loài đã được ghi nhận *D. hongkongensis* (VNHUCC.NEL20, VNHUCC.NEL21) và *D. tectonae* (VNHUCC.NEL83, VNHUCC.NEL89). Các phân lập còn lại cần thêm các vùng gene và các phân tích tổ hợp khác để đánh giá và đưa kết luận cụ thể, đặc biệt là với một chi lớn và ranh giới loài chưa được xác định rõ ràng như *Diaporthe*. Việc phát hiện các chủng mới trong nghiên cứu này, kết hợp với ba loài *Diaporthe* (*D. ueckerae, D. tulliensis* và *D. nelumbonis*) đã được Chen & Kirschner (2018) ghi nhận trên cây sen, có thể khẳng định rằng chi *Diaporthe* biểu hiện mức độ đa dạng loài đáng kể trên ký chủ này.

Nhìn chung, nghiên cứu đã xác lập bức tranh toàn diện về đa dạng tác nhân nấm liên quan đến các triệu chứng bệnh trên cây sen tại Thành phố Huế và đạt được các phát hiện nổi bật: ghi nhận 13 loài nấm mới cho Việt Nam và 17 loài ghi nhận mới liên quan đến các triệu chứng bệnh hại trên cây sen ở Việt Nam (Bảng 3.1). Việc kết hợp kỹ thuật phân tích phát sinh loài đa locus với dữ liệu hình thái học, thông tin phân bố địa lý và ký chủ đã cung cấp một cái nhìn chính xác và sâu sắc về thành phần cũng như cấu trúc phân loại của các tác nhân gây bệnh thuộc nhiều chi nấm quan trọng như *Lasiodiplodia*, *Neofusicoccum*, *Nigrospora*, *Colletotrichum*, *Curvularia*, *Exserohilum*, *Neopestalotiopsis*, *Aspergillus* và *Diaporthe*. Kết quả nghiên cứu không chỉ xác nhận sự đa dạng phong phú của cộng đồng nấm gây bệnh trên cây sen mà còn ghi nhận nhiều loài mới lần đầu tiên được phát hiện tại Việt Nam cũng như trên cây sen, mở rộng phạm vi ký chủ và phân bố địa lý của các loài này.

Cách tiếp cận tổng hợp dựa trên nền tảng đa locus đã khắc phục những hạn chế của việc chỉ dựa vào các thông tin đơn lẻ dựa trên đặc điểm hình thái hoặc trình tự đơn gene (ITS), từ đó nâng cao độ chính xác trong việc định danh loài và phân biệt các phức hợp loài phức tạp, phân giải các loài tiềm ẩn. Những phát hiện này tạo nền tảng dữ liệu khoa học quan trọng cho việc xây dựng bộ dữ liệu gene chuẩn hóa các tác nhân gây bệnh trên cây sen, góp phần nâng cao hiệu quả công tác giám sát dịch bệnh, xây dựng dự báo nguy cơ bùng phát và phát triển các chiến lược quản lý, phòng chống đặc hiệu. Qua đó, nghiên cứu không chỉ hỗ trợ bảo vệ và phát triển bền vững ngành trồng sen tại Việt Nam trong bối cảnh biến đổi khí hậu và áp lực dịch bệnh ngày càng tăng, mà còn góp phần nâng cao chất lượng của chuỗi sản phẩm bản địa với thương hiệu "sen Huế" có tiềm năng xuất khẩu.

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

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
Neofusicoccum	VNHUCC.NEL104 VNHUCC.NEL203 VNHUCC.NEL134 VNHUCC.NEL18	*N. parvum*	-	+	+	+
Lasiodiplodia	VNHUCC.NEL38 VNHUCC.NEL19 VNHUCC.NEL250 VNHUCC.NEL253 VNHUCC.NEL107 VNHUCC.NEL16	*L. theobromae*	-	-	-	-
Nigrospora	VNHUCC.NEL30 VNHUCC.NEL431 VNHUCC.NEL233	*N. lacticolonia*	-	+	+	+
Colletotrichum	VNHUCC.NEL282 VNHUCC.NEL92 VNHUCC.NEL39D1	*Colletorichum fructicola*	-	-	+	+
	VNHUCC.NEL70 VNHUCC.NEL79 VNHUCC.NEL10 VNHUCC.NEL72 VNHUCC.NEL172	*C. siamense*	-	-	-	+
	VNHUCC.NEL71	*C. tropicale*	-	+	-	+
	VNHUCC.NEL52	*C. endophyticum*	-	-	+	+
	VNHUCC.NEL92 VNHUCC.NEL102	*C. plurivorum*	-	-	+	+
Curvularia	VNHUCC.NEL53	*Curvularia asiatica*	-	+	+	+
	VNHUCC.NEL301	*C. senegalensis*	-	+	+	+

	VNHUCC.NEL95					
	VNHUCC.NEL35 VNHUCC.NEL300 VNHUCC.NEL66 VNHUCC.NEL68 VNHUCC.NEL69 VNHUCC.NEL32 VNHUCC.NEL93	*C. plantarum*	-	+	+	+
	VNHUCC.NEL100	*C. lunata*	-	-	-	+
	VNHUCC.NEL57 VNHUCC.NEL101	*C. dactyloctenicola*	-	+	+	+
	VNHUCC.NEL51 VNHUCC.NEL305	*C. radicifolligena*	-	+	+	+
	VNHUCC.NEL42	*C. suttoniae*	-	+	+	+
Exserohilum	VNHUCC.NEL137 VNHUCC.NEL136 VNHUCC.NEL34 VNHUCC.NEL56	*E. rostratum*	-	+	+	+
Neopestalotiopsis	VNHUCC.NEL13	*Neopestalotiopsis* sp.	+	+	+	+
Aspergillus	VNHUCC.NEL03	*Aspergillus fumigatus*	-	-	+	+
	VNHUCC.NEL160	*A. niger*	-	-	+	+
Diaporthe	VNHUCC.NEL83 VNHUCC.NEL89	*D. tectonae*	-	+	+	+
	VNHUCC.NEL21 VNHUCC.NEL20	*D. hongkongensis*	-	+	+	+
Tổng cộng			**1**	**13**	**17**	**20**

Ghi chú: (+): Màu vàng biểu thị **có**, **(-)**: Khung màu xanh biểu thị sự **không** của trường thông tin tương ứng

Bảng 3.2. Tổng hợp các chủng đã định danh và thông tin triệu chứng bệnh hại điển hình tương ứng

Chi	Loài	Chủng phân lập đại diện	Triệu chứng bệnh điển hình ghi nhận	Giống sen ghi nhận
Lasiodiplodia	*Lasiodiplodia theobromae*	VNHUCC.NEL38, VNHUCC.NEL19 VNHUCC.NEL250 VNHUCC.NEL253 VNHUCC.NEL107 VNHUCC.NEL16	Liên quan đến triệu chứng tàn lụi, thối cuống trên cây sen, với các triệu chứng điển hình ngoài đồng ruộng, bao gồm: héo rũ, hiện tượng nâu hóa mô. Đáng chú ý, phần lớn các chủng *Lasiodiplodia* phân lập được ở lá, chỉ một tỷ lệ ít ghi nhận ở cuống lá.	Sen hồng cao sản Sen trắng
Neofusicoccum	*Neofusicoccum parvum*	VNHUCC.NEL104 VNHUCC.NEL203 VNHUCC.NEL134 VNHUCC.NEL18	Liên quan đến triệu chứng tàn lụi, thối cuống lá kèm nâu đen mạch dẫn khi cắt ngang, hoại tử lan dọc theo cuống làm gãy rũ phiến lá, và trong trường hợp nặng có thể nhanh chóng lan rộng ở địa điểm trồng sen (tỷ lệ *Neofusicoccum* ghi nhận nhiều hơn ở cuống lá)	Sen hồng cao sản Sen trắng
Nigrospora	*Nigrospora lacticolonia*	VNHUCC.NEL30 VNHUCC.NEL431 VNHUCC.NEL233	Hiện tượng cháy lá (leaf blight) trên lá sen đặc trưng bởi các đốm hoại tử màu nâu nhạt, hình dạng bất định, thường khởi phát từ mép lá và lan dần vào trong, sau đó hợp lưu thành các mảng hoại tử diện rộng làm giảm đáng kể diện tích quang hợp. Mô tại vùng bệnh dần mất nước, chuyển trạng thái khô và giòn, dễ rách khi chịu tác động cơ học nhẹ. Trên bề mặt vết bệnh, quan sát được khối bào tử đen trên bề mặt.	Sen hồng cao sản Sen trắng
Neopestalotiopsis	*Neopestalotiopsis* sp.	VNHUCC.NEL13 VNHUCC.NEL110 VNHUCC.NEL111	Liên quan đến các vết bệnh đốm xám đồng tâm trên giống sen cao sản (chưa ghi nhận trên sen trắng), các lớp xếp chồng lên nhau, màu xám tro đến nâu (phân biệt với dạng đồng tâm từng lớp/vòng như triệu chứng thán thư do *Colletotrichum* gây ra)	Sen hồng cao sản
Colletotrichum	*Colletotrichum siamense*	VNHUCC.NEL10 VNHUCC.NEL70 VNHUCC.NEL79	Triệu chứng thối đen (kéo dài từ khí khổng trung tâm đến bìa lá, một số vết bệnh quan sát thấy các khối bào tử màu cam có thể dễ dàng nhìn thấy bằng mắt	Sen hồng cao sản Sen trắng

		VNHUCC.NEL72 VNHUCC.NEL172	thường. Loài này có tỷ lệ ghi nhận trên sen trắng (4/5 chủng phân lập đại diện) nhiều hơn so với giống sen hồng cao sản (Phụ lục Hình 3.9)	
	Colletotrichum fructicola	VNHUCC.NEL91 VNHUCC.NEL39D1 VNHUCC.NEL282	Ghi nhận trên vết thối nâu đậm (màu nâu sẫm hơn so với các dạng vết bệnh khác). Đặc trưng với các khối bào tử màu cam ghi nhận ở trung tâm vết bệnh (triệu chứng này ghi nhận ở cả 2 giống sen trắng và sen hồng)	Sen hồng cao sản Sen trắng
	Colletotrichum tropicale	VNHUCC.NEL71	Liên quan đến triệu chứng thối nâu (phần lớn phía dưới vết bệnh có màu sáng)	Sen trắng
	Colletotrichum endophytica	VNHUCC.NEL52	Liên quan đến các triệu chứng hỗn hợp khô nâu + các vết thối nâu đồng tâm	Sen hồng cao sản
	Colletotrichum plurivorum	VNHUCC.NEL92 VNHUCC.NEL102	Liên quan đến các triệu chứng thối nâu có các vòng đồng tâm màu nâu ở phía trong và kèm thêm 1-3 lớp đồng tâm màu đen xám không đều ở vòng ngoài. Ghi nhận trên cây sen trắng (phần lớn lá dù ở giai đoạn sớm- lá dù còn thấp)	Sen trắng
Curvularia	*Curvularia plantarum*	VNHUCC.NEL93, VNHUCC.NEL66 VNHUCC.NEL69, VNHUCC.NEL68 VNHUCC.NEL300, VNHUCC.NEL32 VNHUCC.NEL35	Liên quan đến triệu chứng đốm lá, đặc trưng nhận dạng là màu sắc vết bệnh phía trên và phía dưới cùng một màu nâu sáng	Sen hồng cao sản Sen trắng
	Curvularia verruculosa	VNHUCC.NEL74	Liên quan đến triệu chứng thối nâu và xoăn lá ghi nhận ở ruộng sen hồng tại Hương Trà	Sen hồng cao sản
	Curvularia dactyloctenicola	VNHUCC.NEL57 VNHUCC.NEL101	Liên quan đến các triệu chứng đốm nâu (các vết lan rộng, mô bệnh trở nên khô giòn) trên giống sen hồng và sen trắng	Sen hồng cao sản Sen trắng
	Curvularia asiatica	VNHUCC.NEL53	Liên quan đến triệu chứng đốm nâu (mặt trên nâu, dưới nâu) trên các ruộng trồng sen hồng khu vực cổng làng Dạ Lê Chánh, Thủy Vân, Hương Thủy (nay thuộc phường Thanh Thủy)	Sen hồng cao sản

	Curvularia suttoniae	VNHUCC.NEL42	Liên quan đến triệu chứng khô nâu, triệu chứng tương tự Nigrospora lacticolonia nhưng diễn biến bệnh chậm hơn và chỉ ghi nhận trên giống sen hồng. Điều đặc biệt là phổ địa lý của Curvularia suttoniae ghi nhận cũng khá tương đồng với 2 chủng của *N. lacticolinia* VNHUCC.NEL30, VNHUCC.NEL431	Sen hồng cao sản
	Curvularia lunata	VNHUCC.NEL100	Ghi nhận trên mẫu bệnh với đặc trưng các đốm tròn nhỏ màu nâu vàng đến vàng trên giống sen trắng	Sen trắng
	Curvularia radicifolligena	VNHUCC.NEL51	Liên quan đến triệu chứng thối nâu, lan từ mép lá vào trung tâm (đặc trưng với phần lớn các mẫu ghi nhận triệu chứng có chữ V)	Sen hồng cao sản
Exserohilum	*Exserohilum rostratum*	VNHUCC.NEL33, VNHUCC.NEL34 VNHUCC.NEL56, VNHUCC.NEL136 VNHUCC.NEL137	Liên quan đến triệu chứng khô nâu vết dạng bất định, mép lượn sóng, ranh giới khá rõ giữa mô bệnh và mô khỏe, một số trường mẫu ghi nhận một quầng vàng làm ranh giới một cách rõ rệt Màu sắc vết bệnh chuyển dần từ nâu nhạt sang nâu sẫm/đen (một số vùng ghi nhận màu xám oliu)	Sen hồng cao sản
Aspergillus	*Aspergillus niger* *Aspergillus fumigatus*	VNHUCC.NEL160 VNHUCC.NEL03	Liên quan đến các triệu chứng thối rữa trên lá sen (lá trải), đặc biệt sau với những lá có tổn thương cơ học	Sen hồng cao sản
Diaporthe	*Diaporthe tectonae*	VNHUCC.NEL83 VNHUCC.NEL89	Liên quan đến triệu chứng đốm đen, đến nâu, với đặc trưng là các khối bào tử đen lớn dễ dàng quan sát phía trên bề mặt vết bệnh (phía trên vết bệnh nhiều hơn mặt dưới vết bệnh)	Sen hồng cao sản Sen trắng
	Diaporthe hongkongensis	VNHUCC.NEL21 VNHUCC.NEL20	Triệu chứng điển hình là đốm nâu đậm đến nâu đen, bất định, thường bắt đầu ở rìa lá. Theo thời gian, hợp nhất và lan rộng vào trung tâm.	Sen hồng cao sản

3.2. ĐÁNH GIÁ ẢNH HƯỞNG CỦA VẬT LIỆU NANO BẠC ĐẾN MỘT SỐ NẤM 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

Để đánh giá toàn diện khả năng ức chế sinh trưởng sợi nấm của nano bạc đối với các tác nhân liên quan đến các triệu chứng bệnh hại trên cây sen, nghiên cứu đã lựa chọn 29 chủng phân lập nấm đại diện. Các chủng thử nghiệm được nuôi cấy trên môi trường đĩa thạch PDA với 6 nồng độ nano bạc khác nhau, từ 0 đến 30 mg/L, nhằm xác định ảnh hưởng của việc tiếp xúc với nano bạc lên sự phát triển của sợi nấm. Bên cạnh, hoạt chất Hexaconazole được sử dụng làm đối chứng thương mại. Sau 7 ngày nuôi cấy, đường kính sinh trưởng tản nấm được ghi nhận, hiệu lực ức chế được tính toán và thể hiện dưới dạng biểu đồ Heatmap (Hình 3.16). 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 ≤ 1mg/L không cho thấy sự suy giảm đáng kể hay khác biệt với đối chứng - không xử lý. Tuy nhiên, một số chủng phân lập thử nghiệm thuộc chi *Curvularia* như *C. dactyloctenicola* (VNHUCC.NEL57), *C. radicifoliigena* (VNHUCC.NEL51), *C. verruculosa* (VNHUCC.NEL74), *C. suttoniae* (VNHUCC.NEL42) và *C. lunata* (VNHUCC.NEL100) lại thể hiện mức độ phản ứng "nhạy cảm" hơn đối với nano bạc nồng độ thấp. Cụ thể, mức độ ức chế sinh 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.

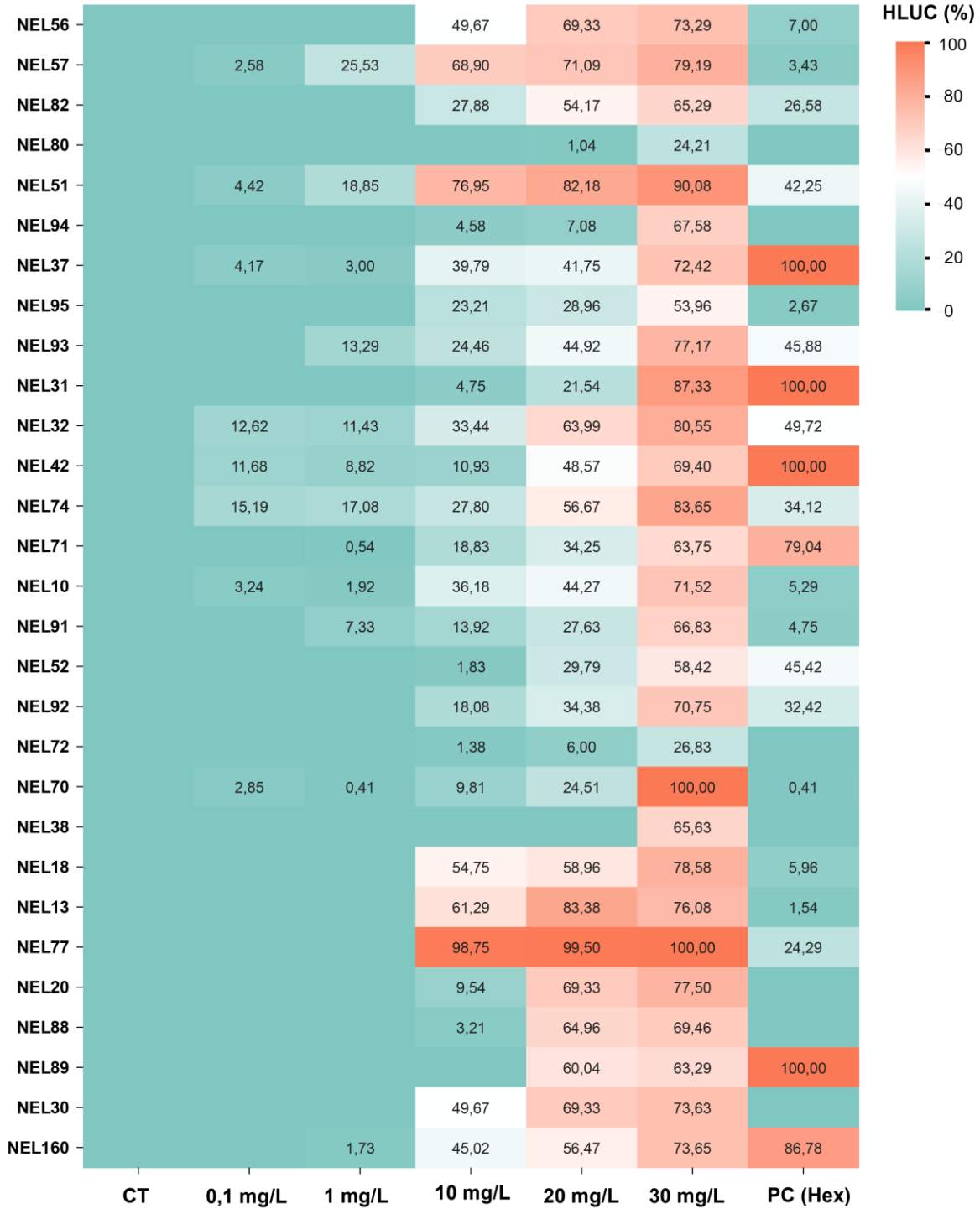
Đáng chú ý, với thuốc diệt nấm thương mại Hexaconazole, kết quả thử nghiệm cho thấy có tới 16/29 chủng phân lập ghi nhận hiệu lực ức chế dưới 25% sau 7 ngày, cho dù Hexaconazole vẫn ghi nhận hiệu quả (ức chế hoàn toàn – 100%) với một số tác nhân như VNHUCC.NEL37, VNHUCC.NEL31 (*Curvularia* sp.), VNHUCC.NEL42 (*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 dải nồng độ cao (≥10 mg/L). Cụ thể, nano bạc ở các nồng độ 10, 20 và 30 mg/L đều cho thấy khả năng ức chế đáng kể sự phát triển sợi nấm. Ở nồng độ 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 chủng phân lập ở nồng độ 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, khẳng định tiềm năng của nano bạc trong việc kiểm soát bệnh do chi nấm này gây ra.

Ngoài *Curvularia*, hiệu quả ức chế đáng kể (trên 55% so với đối chứng) cũng được ghi nhận ở các tác nhân nấm thuộc các chi 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. Tuy nhiên, có một sự đa dạng về khả năng "đáp ứng" với nano bạc giữa các chủng nấm phân lập. Mặc dù tính nhạy cảm cao với nano bạc đã được ghi nhận ở nhiều chủng phân lập, nano bạc lại cho thấy lại cho thấy hiệu quả ức chế thấp hơn đáng kể hoặc gần như không có hiệu quả trong việc kiểm soát sinh trưởng của một số chủng phân lập như VNHUCC.NEL80 (*Curvularia* sp.) và VNHUCC.NEL72 (*Colletotrichum siamense*).

Một phát hiện khá thú vị khác trong thử nghiệm này, không phải chủng phân lập nào cũng ghi nhận hiệu lực ức chế tăng theo mức độ tuyến tính tương ứng với 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- không bổ sung nano bạc. Ba chủng phân lập VNHUCC.NEL37 (*Curvularia* sp.), VNHUCC.NEL32 (*Curvularia plantarum*), VNHUCC.NEL42 (*Curvularia suttoniae*), và hai 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 (Hình 3.16, Bảng phụ lục 4.1).

Những phát hiện này không chỉ nhấn mạnh sự khác biệt giữa các loài, chủng phân lập trong phản ứng với phương pháp xử lý cụ thể mà còn gợi ý rằng việc tối ưu hóa nồng độ nano bạc cần được điều chỉnh khi áp dụng dựa trên đặc tính sinh học cụ thể của từng loài, từng chủng, từng phân lập. Điều này không chỉ thách thức các mô hình dự đoán truyền thống về mối quan hệ giữa nồng độ và hiệu quả ức chế, mà còn gợi mở những câu hỏi sâu sắc về cơ chế tương tác phức tạp giữa nano bạc và các chủng nấm khác nhau. Sự đa dạng và không đồng nhất này nhấn mạnh tính cần thiết của các nghiên cứu chuyên sâu để làm rõ các yếu tố quyết định hiệu quả của nano bạc.



Hình 3.16. Biểu đồ Heatmap thể hiện hiệu lực ức chế sinh trưởng sợi nấm (%) của 29 chủng phân lập nấm đại diện ở các nồng độ nano bạc khác nhau. CT: Đối chứng không bổ sung nano bạc. PC: Đối chứng thương mại Hexaconazole. HLUC: Hiệu lực ức chế (%). Phần trống không hiển thị dữ liệu tương ứng với giá trị hiệu lực bằng 0. Để tối ưu không gian hiển thị của phần kết quả, ký hiệu VNHUCC.NEL được rút gọn thành NEL của từng chủng phân lập.

Nhìn chung, mặc dù tác dụng ức chế của nano bạc đối với sự phát triển của sợi nấm là rõ ràng, sự phát triển chậm lại của nấm là đáng kể, nhưng mức độ nhạy cảm của các loại nấm đối với nano bạc là khác nhau giữa các chủng phân lập. Do đó, có thể khẳng định tác dụng ức chế của nano bạc phụ thuộc vào nồng độ áp dụng và độ nhạy cảm của các chủng nấm được thử nghiệm. Sự khác biệt "độ nhạy cảm" hoạt động kháng nấm có thể là do các đặc tính cụ thể của các chủng phân lập gây bệnh, chẳng hạn như khả năng trao đổi chất, cũng như sự khác biệt trong các tín hiệu đáp ứng với một điều kiện bất lợi (stress) nhất định. Kết quả nghiên cứu này không chỉ cung cấp dữ liệu đánh giá quan trọng về hiệu quả của nano bạc đối với một số lượng lớn đa dạng tác nhân nấm liên quan đến các triệu chứng bệnh hại trên cây sen mà còn mở ra hướng tiếp cận mới với một vật liệu mới trong nông nghiệp bền vững, giảm phụ thuộc vào thuốc hóa học truyền thống.

3.2.1.2. Độ nhạy cảm đối với nano bạc (Giá trị EC_{50})

Sự khác biệt về "độ nhạy cảm" trong hoạt động kháng nấm của nano bạc không chỉ phản ánh sự đa dạng sinh học và đặc tính sinh lý riêng biệt của từng chủng phân lập gây bệnh, mà còn phụ thuộc vào cách thức các chủng này phản ứng với các yếu tố stress môi trường và tác nhân điều trị. Việc hiểu rõ và định lượng chính xác mức độ nhạy cảm này là rất cần thiết để đánh giá hiệu quả thực tế của nano bạc trong kiểm soát các tác nhân gây hại trên cây sen, đồng thời mở ra tiềm năng ứng dụng rộng rãi nano bạc như một giải pháp thay thế bền vững trong nông nghiệp. Để thực hiện điều này, nghiên cứu đã sử dụng chỉ số EC_{50} như một thước đo để đánh giá mức độ nhạy cảm của các chủng nấm gây bệnh hại này khi xử lý với nano bạc.

Theo Ủy ban hành động chống kháng thuốc trừ/diệt nấm (FRAC), EC_{50} được định nghĩa là liều thuốc hoặc chất, làm ức chế 50% sự phát triển khi so sánh với đối chứng. Trong nghiên cứu này, giá trị EC_{50} được xác định là nồng độ hiệu quả trung bình mà sự phát triển của nấm bị ức chế 50% và được ước tính bằng phân tích đường cong liều lượng - đáp ứng dựa trên kết quả hiệu lực ức chế nấm trên đĩa thạch ở các nồng độ khác nhau.

Trong nghiên cứu này, giá trị EC_{50} được ước tính dựa trên ba mô hình khác nhau: mô hình hồi quy logarit tuyến tính (linear log regression), mô hình nội suy tuyến tính từ trục log của nồng độ (log-space interpolation) và mô hình hồi quy probit log_{10}. Kết quả tổng hợp và đối chiếu các số liệu từ cả ba mô hình, được trình bày trong Bảng phụ lục 4.2, cho thấy mô hình Probit log_{10} và nội suy tuyến tính cho mức độ phù hợp cao hơn với dữ liệu thực nghiệm, đặc biệt trong các chủng phân lập biến động bất thường và các điểm ngoại lai, so với mô hình hồi quy logarit tuyến tính (có đến hơn 15 mẫu với $r^2 < 0,7$). Rõ ràng, sử dụng phương trình hồi quy tuyến tính thể hiện "độ phủ" kém, cũng như mức độ phù hợp thấp, đặc biệt đối với các mẫu ghi nhận hiệu lực ức chế đáp ứng có biến động bất thường (tăng chậm ở nồng độ thấp và tăng nhanh ở nồng độ cao). Phương pháp nội

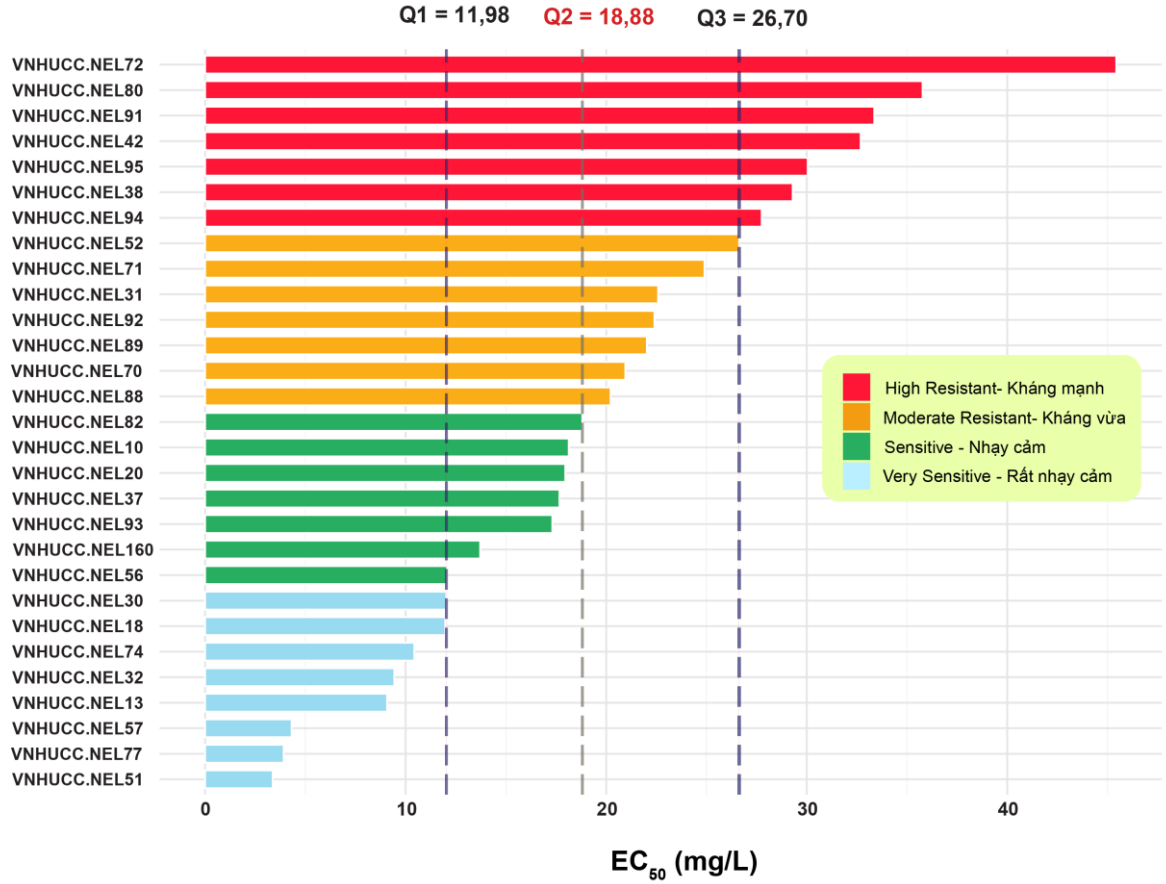
suy EC_{50} phản ánh chính xác giá trị thực tế của hiệu lực nano bạc xung quanh mức 50%. Tuy nhiên, phương pháp này có nhược điểm phụ thuộc mạnh vào hai "điểm kẹp", dẫn đến một số trường hợp không thể xác định giá trị EC_{50} (không có cặp điểm kẹp nào thỏa mãn – các giá trị đáp ứng đều nhỏ hơn 50%), như trong trường hợp các chủng phân lập VNHUCC.NEL80 (*Curvularia* sp.) và VNHUCC.NEL72 (*Colletotrichum siamense*).

Việc lựa chọn mô hình và hàm liên kết phù hợp là yếu tố then chốt, ảnh hưởng trực tiếp đến sự phân bố của tệp dữ liệu giá trị ước tính EC_{50} (Phụ lục Hình 4.2). Điều này không chỉ ảnh hưởng đến độ chính xác của các giá trị ước lượng mà còn giúp giải thích sự biến đổi (độ nhạy cảm) của các chủng thử nghiệm với nano bạc một cách rõ ràng hơn. Hơn nữa, việc chỉ rõ các thông tin liên quan trong quá trình ước lượng sẽ cung cấp cái nhìn sâu sắc về sự phân bố của các giá trị EC_{50} trong tổng thể mẫu, từ đó hỗ trợ việc đánh giá hiệu lực của nano bạc một cách khoa học và chính xác.

Bên cạnh đó, nghiên cứu lựa chọn sử dụng các kết quả từ mô hình phi tuyến tính Probit log_{10} để phân tích sâu hơn nhằm đánh giá sự phân bố của các giá trị EC_{50} thu được – cũng như đánh giá được mức độ nhạy cảm với nano bạc của các chủng phân lập thử nghiệm như thế nào. Kết quả phân tích ở Hình 3.17 cho thấy, giá trị EC_{50} của 29 chủng phân lập được lựa chọn 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). Dựa trên cách phân nhóm này, ở nhóm tứ phân vị thứ nhất (giá trị $EC_{50} \leq 11,98$) ghi nhận 8 chủng phân lập với giá trị EC_{50} dao động từ 3,37 – 12,03 (giá trị EC_{50} trung bình là 8,13 mg/L, trung vị là 9,29 mg/L) – đây được xem là nhóm rất nhạy cảm (nano bạc có hiệu quả nhất) với việc xử lý nano bạc. Chủng phân lập nhạy cảm nhất trong nhóm này là VNHUCC.NEL51 (*C. radicifoliigena*). Ở tứ phân vị thứ hai (Q2 – trung vị) với giá trị ước tính EC_{50} nằm trong khoảng ($11,98 < EC_{50} \leq 18,88$) – với 7 chủng phân lập được ghi nhận thuộc nhóm này (với giá trị EC_{50} trung bình của nhóm ghi nhận là 16,53 mg/L với tập giá trị từ 12,07 – 18,88) – được phân loại vào nhóm "nhạy cảm" với nano bạc.

Nhóm có mức kháng nhẹ với nano bạc được xác định với giá trị EC_{50} trong khoảng $18,88 < EC_{50} \leq 26,70$ với sự phân bố các giá trị EC_{50} từ 20,30 – 26,70 mg/L. Nhóm còn lại được xác định với giá trị $EC_{50} > 26,70$ – được xem là nhóm kháng mạnh với nano bạc (nano bạc ít hiệu quả nhất), với 7 chủng phân lập được xếp vào trong nhóm này. Giá trị EC_{50} của nhóm này rất cao từ 27,75 đến 45,44 mg/L. Chủng phân lập VNHUCC.NEL72 (*Colletotrichum siamense*) là chủng ghi nhận giá trị ước tính EC_{50} cao nhất trong tất cả các chủng phân lập tiến hành phân tích. Các chủng VNHUCC.NEL42 (*Curvularia suttoniae*), VNHUCC.NEL80 (*Curvularia* sp.,) và VNHUCC.NEL91 (*C. fructicola*) cũng

là những chủng phân lập thể hiện mức độ kháng mạnh với nano bạc, với giá trị ước tính EC_{50} đều trên 30 mg/L. Bên cạnh đó, so sánh sự khác biệt phân bố EC_{50} giữa các mô hình ước tính cũng được tiến hành và thể hiện ở Phụ lục Hình 4.9. Nhìn chung, các mô hình ước tính đều cho thấy sự tương đồng về phân bố của các giá trị EC_{50} đối với hầu hết các chủng phân lập. Tuy nhiên, một số chủng như VNHUCC.NEL56, VNHUCC.82, VNHUCC.52 và VNHUCC.NEL89 có sự khác biệt lớn trong phân hạng giữa các mô hình ước tính. Điều này gợi ý rằng việc lựa chọn mô hình phù hợp sẽ ảnh hưởng đáng kể đến kết quả ước tính nồng độ ức chế 50% hoạt tính của nano bạc đối với những chủng phân lập này.



Hình 3.17. Sự phân bố các giá trị EC_{50} của các chủng phân lập thử nghiệm theo mô hình Probit log_{10}. Mức độ nhạy cảm của các chủng phân lập với nano bạc được phân nhóm bằng phương pháp thống kê mô tả tứ phân vị dựa trên 3 điểm ngưỡng (Q1, Q3 – đường đứt nét màu xanh, Q2 – giá trị trung vị - đường đứt nét màu xám). Các nhóm mức độ nhạy cảm khác nhau với nano bạc được thể hiện bằng các khối màu tương ứng.

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

Cùng với việc đánh giá hiệu lực ức chế và ghi nhận sự suy giảm sự sinh trưởng sợi nấm trên môi trường PDA bổ sung nano bạc, thử nghiệm này cũng giúp quan sát được những biến đổi hình thái bất thường của tản nấm khi tiếp xúc với nano bạc:

- 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 vệt tối màu xuyên tâm ở mặt ngược (reverse). Mặc dù những thay đổi về hoa văn, màu sắc thường có mức biến động khá lớn trước các thay đổi của điều kiện môi trường.

+ 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 (Hình 3.22A).

- Biến đổi bất thường về hình thái tản nấm:

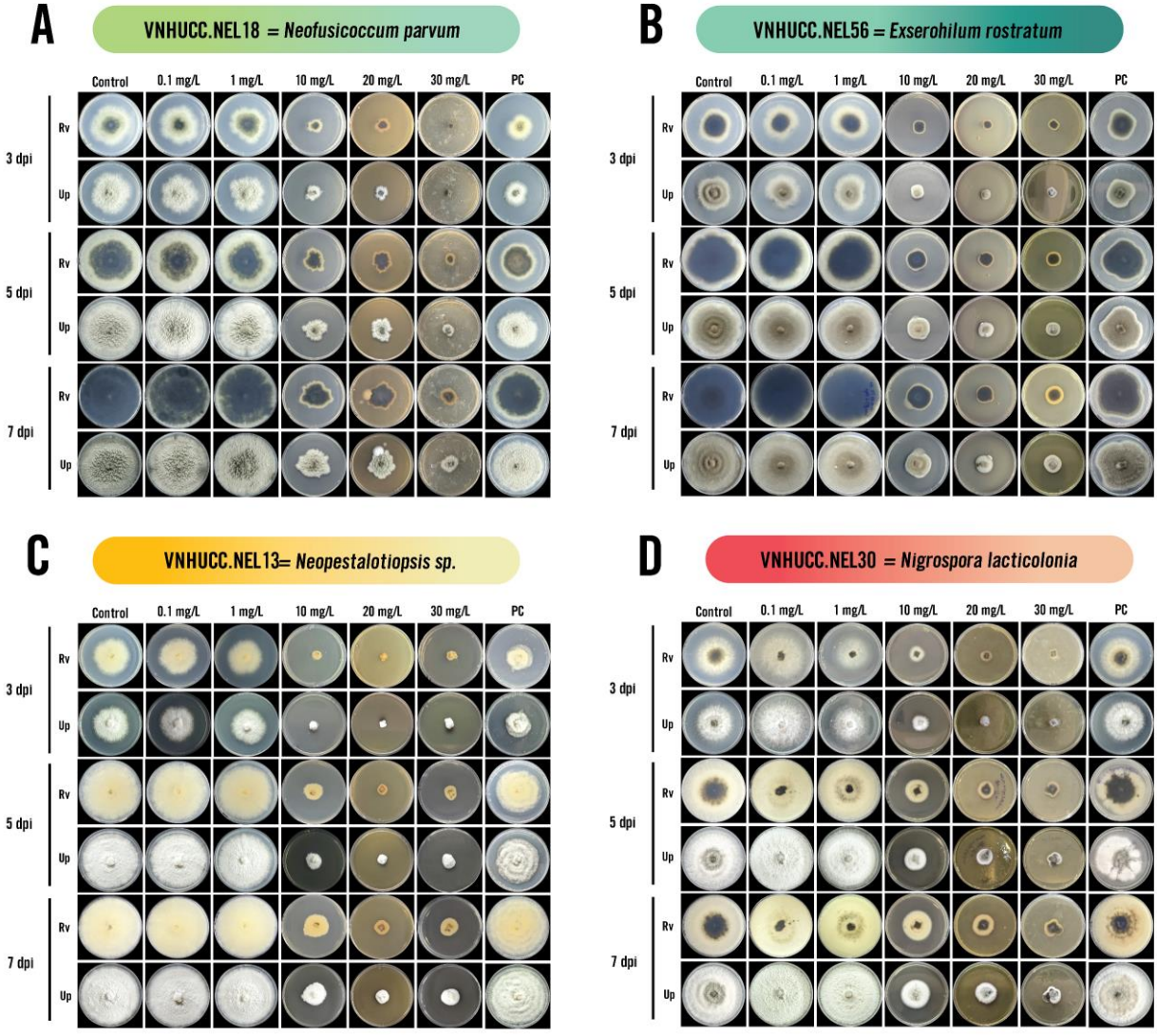
+ Gia tăng phát triển sợi nấm khí sinh (aerial mycelium) thay vì xu hướng bình thường lan rộng theo phương ngang để tối ưu hấp thụ chất dinh dưỡng.

+ Biến đổi bất thường ở phần rìa/viền (margin) của tản nấm, thể hiện qua các đường viền dạng gợn sóng, là hiện tượng đáng chú ý khi tiếp xúc với nano bạc. Nguyên nhân chính của hiện tượng này có thể bắt nguồn từ sự thay đổi cấu trúc và biến đổi bên trong tế bào nấm, dẫn đến sự co rút không đồng đều của sợi nấm theo thời gian. Đặc biệt, chủng phân lập *Curvularia lunata* (VNHUCC.NEL100) thể hiện sự nhạy cảm đáng kể với hiện tượng này. Ngay cả ở nồng độ nano bạc thấp (0,1 mg/L), các đường viền gợn sóng đã xuất hiện rõ rệt, phản ánh "tính mẫn cảm" cao của phân lập này với tác động của nano bạc. Trạng thái biến đổi này cũng được ghi nhận trên tản nấm của *Neofusicoccum parvum* – VNHUCC.NEL18 và *Colletotrichum plurivorum* – VNHUCC.NEL92 ở nồng độ nano bạc 10 mg/L trở lên (Hình 3.18 và Hình 3.23).

+ 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 như các chủng phân lập của *Curvularia* spp. (VNHUCC.NEL74, VNHUCC.NEL 51, VNHUCC.NEL37, VNHUCC.NEL80), *E. rostratum* (VNHUCC.NEL56), *Neopestalotiopsis* sp. (VNHUCC.NEL13), *N. lacticolonia* (VNHUCC.NEL30) và các chủng *Colletotrichum* spp., đặc biệt là *C. fructicola* (VNHUCC.NEL91) và *C. tropicale* (VNHUCC.NEL71). Ngược lại, một số chủng phân lập khác lại chuyển đổi thành dạng kết cấu phẳng hơn khi tiếp xúc với nano bạc *Neofusicoccum parvum* (VNHUCC.NEL18) và *Curvularia senegalensis* (VNHUCC.NEL95).

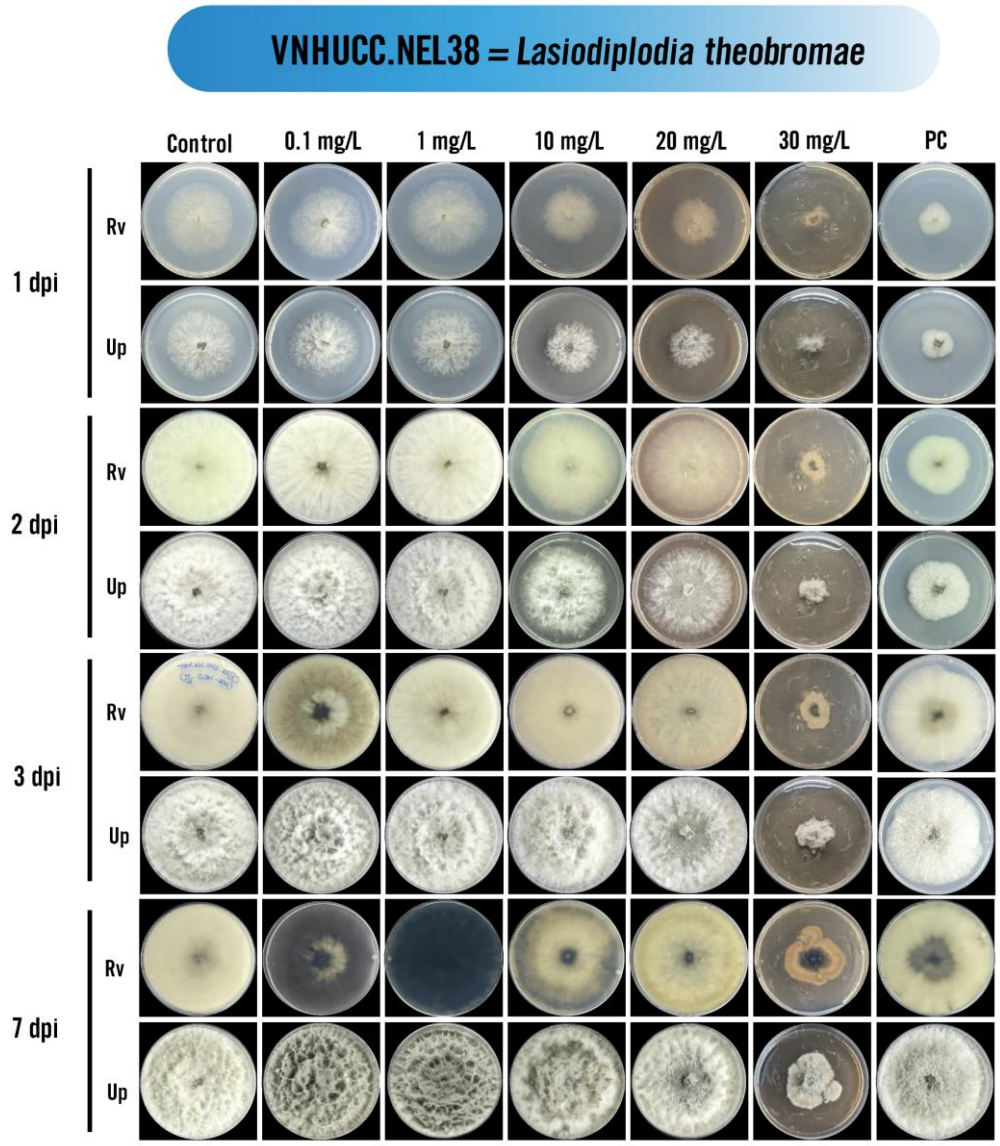
Nano bạc thể hiện hiệu lực ức chế khá tương đồng lên sợi nấm của bốn chủng phân lập thuộc bốn chi khác nhau (*Neofusicoccum, Exserohilum, Neopestalotiopsis, Nigrospora*), với sự khác biệt rõ rệt chỉ xuất hiện ở các nồng độ cao từ 10 mg/L trở lên (Hình 3.18). Ở các nồng độ thấp (0,1 và 1 mg/L), không quan sát được biến đổi đáng kể so với đối chứng. Trong số này, chủng VNHUCC.NEL13 (*Neopestalotiopsis* sp.) cho thấy độ nhạy cao nhất với nano bạc, thể hiện phản ứng rõ ràng nhất. Bên cạnh đó, chủng *L. theobromae* (VNHUCC.NEL38) có tốc độ sinh trưởng rất nhanh, có thể phủ kín đĩa cấy

chỉ trong vòng 2-3 ngày. Từ ngày thứ 3 trở đi, sự phát triển của nấm ở các nồng độ nano bạc 20 mg/L, 10 mg/L, 1 mg/L, 0,1 mg/L và nhóm đối chứng không còn cho thấy sự khác biệt về đường kính. Tuy nhiên, ở nồng độ 30 mg/L, hiệu quả ức chế sinh trưởng vẫn duy trì rõ rệt và khác biệt so với các nồng độ thấp hơn, ngay cả sau 7 ngày theo dõi. Ngoài nồng độ 30 mg/L, đối chứng thương mại Hexaconazole vẫn duy trì khả năng kiểm soát tốt loài nấm này ở giai đoạn đầu. Tuy nhiên, hiệu quả ức chế của Hexaconazole đối với chủng VNHUCC.NEL38 (*L. theobromae*) bắt đầu suy giảm và hiệu lực ức chế không đáng kể từ ngày thứ 4 trở đi (Hình 3.19).



Hình 3.18. Ảnh hưởng của nano bạc đến sự sinh trưởng và hình thái tản nấm của 4 chủng phân lập nấm đại diện của 4 chi khác nhau theo thời gian và nồng độ. (A). VNHUCC.NEL18 (*N. parvum)*, (B). VNHUCC.NEL56 (*E. rostratum)*, (C). VNHUCC.NEL13 (*Neopestalotiopsis* sp.), (D). VNHUCC.NEL 30 (*N. lacticolonia).* Ghi chú: dpi = số ngày sau cấy; Up: mặt chính của tản nấm; Rv: mặt ngược của tản nấm. Control: đối chứng; PC: Hexaconazole với nồng độ 0,2%.

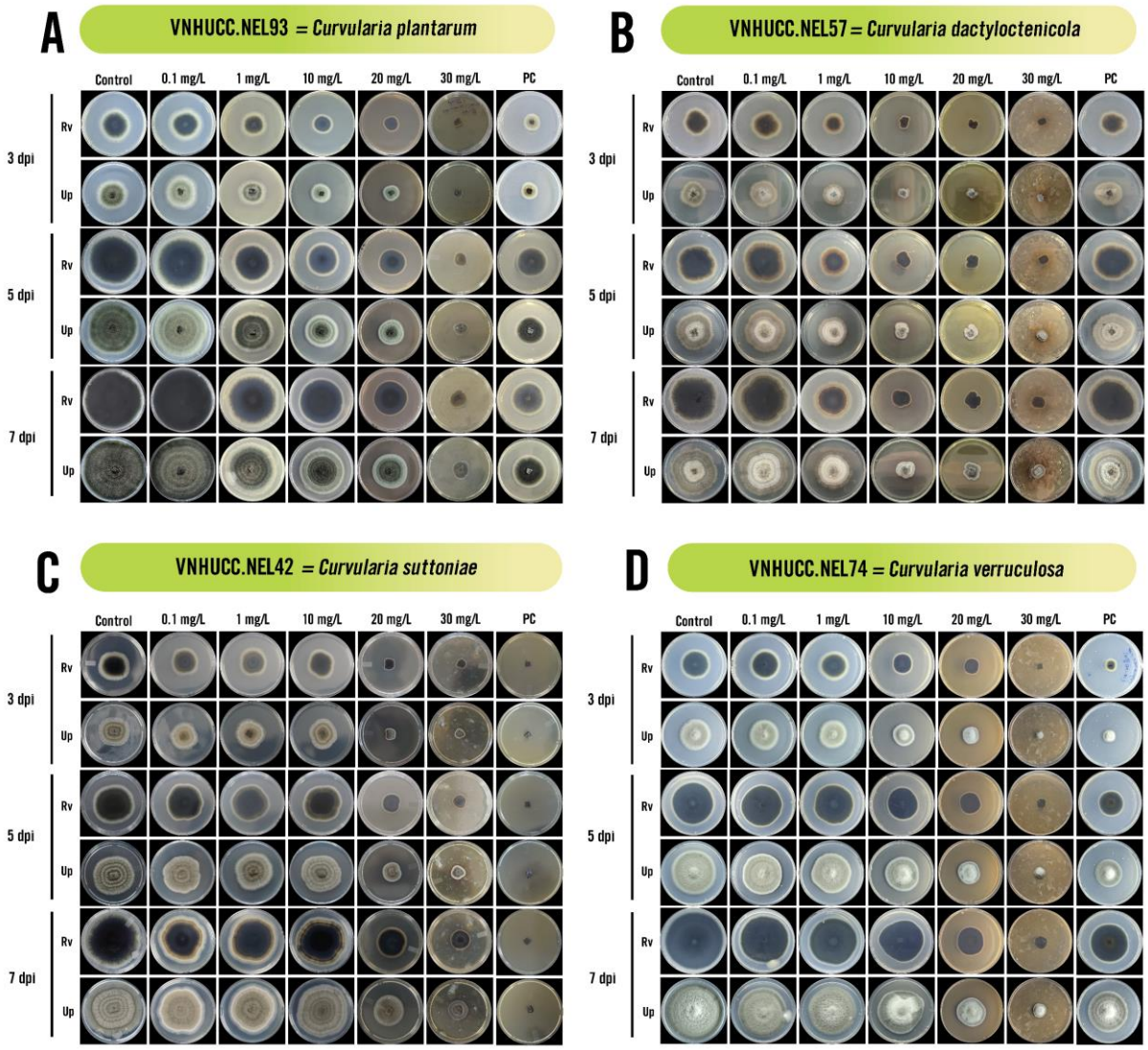
Tuy nhiên, ở cấp độ vĩ mô, các chủng phân lập cũng biểu hiện một số phản ứng đặc trưng khác nhau. Cụ thể, cả VNHUCC.NEL13 (*Neopestalotiopsis* sp.) và VNHUCC.NEL56 *(E. rostratum*) đều xuất hiện hiện tượng phồng lên của tản nấm, khác biệt so với dạng phẳng của đối chứng và các nồng độ thấp (Hình 3.18C, D).



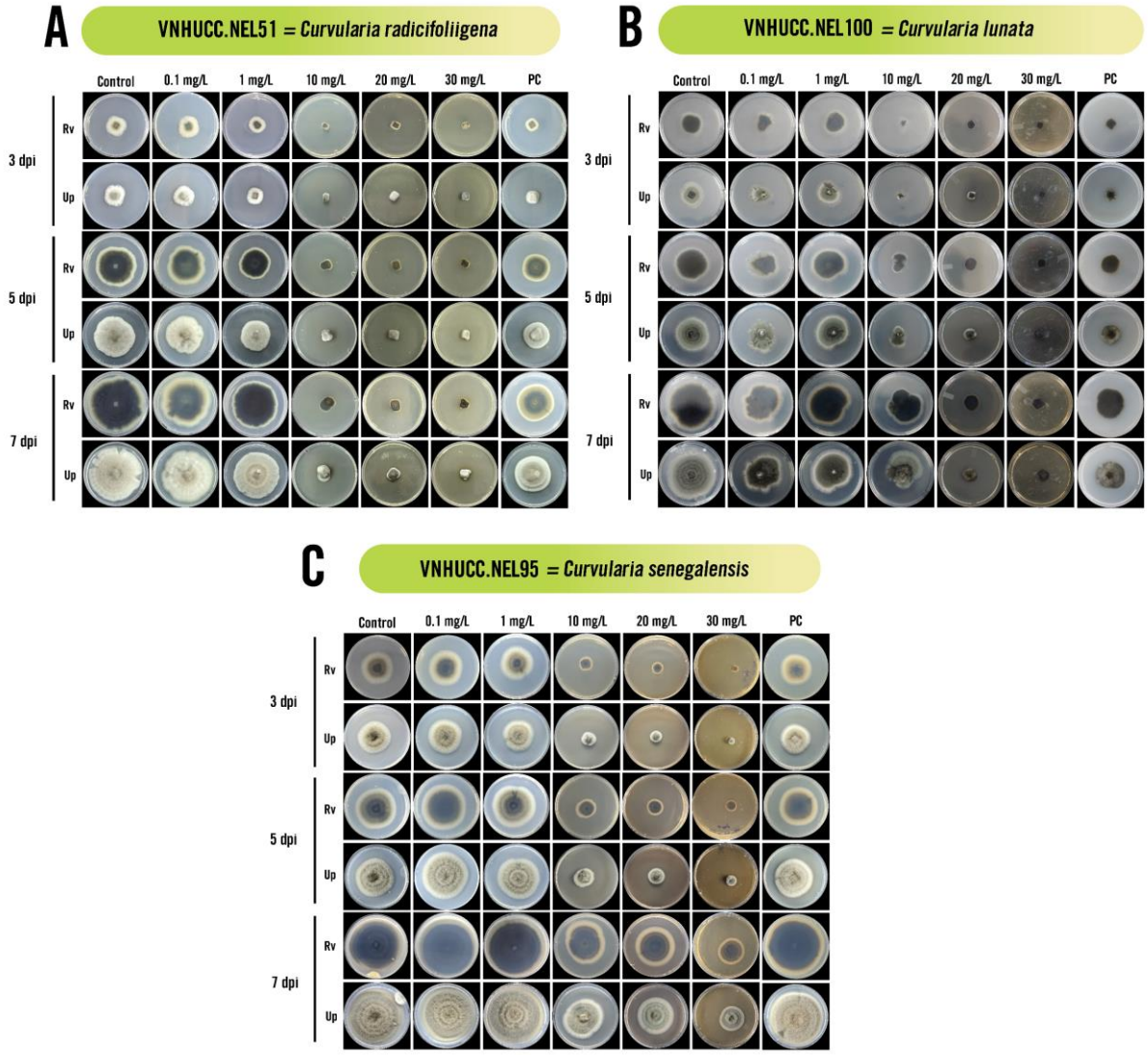
Hình 3.19. Ảnh hưởng của nano bạc đến sự sinh trưởng và hình thái tản nấm của *L. theobromae* – VNHUCC.NEL38 theo thời gian và nồng độ. Ghi chú: dpi = số ngày sau cấy; Up: mặt chính của tản nấm; Rv: mặt ngược của tản nấm. Control: đối chứng – không bổ sung nano bạc; PC: Hexaconazole với nồng độ 0,2%.

Trong khi đó, khi tiếp xúc với nano bạc ở nồng độ cao, 2 chủng phân lập đại diện cho 2 chi *Neofusicoccum* (VNHUCC.NEL18) và *Lasiodiplodia* (VNHUCC.NEL38) thuộc Họ Bostryosphaeriaceae lại cho thấy sự tiêu giảm của các sợi nấm trên không hay sợi nấm khí sinh (aerial mycelia) so với đối chứng (Hình 3.18A và Hình 3.19). Đáng

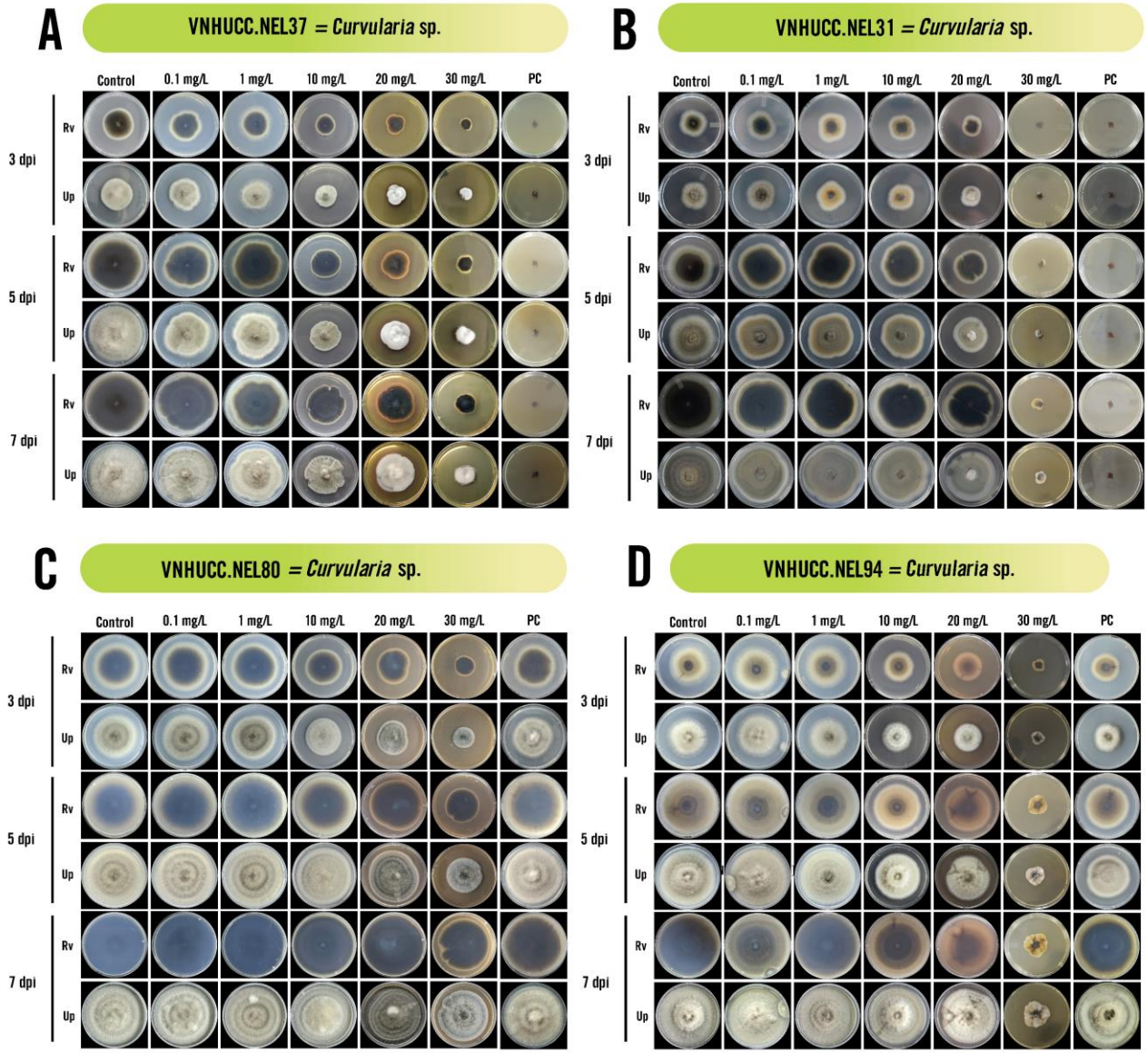
chú ý, bốn trong số năm chủng ghi nhận hiện tượng biến dạng, co rút bất thường ở viền tản nấm khi tiếp xúc với nồng độ nano bạc cao, trong đó VNHUCC.NEL18 và VNHUCC.NEL13 biểu hiện biến dạng rõ rệt bắt đầu từ mức 10 mg/L. Ngược lại, dù không có hiện tượng co rút bất thường ở viền, chủng VNHUCC.NEL56 (*E. rostratum*) lại cho thấy sự mở rộng đáng kể của vùng viền trắng trên cả hai mặt tản nấm (Hình 3.18B). Trong khi đó, chủng phân lập VNHUCC.NEL30 (*N. lacticolonia*) ghi nhận sự suy giảm diện tích của vùng màu đen ở trung tâm (tương ứng với sự mở rộng của mảng màu trắng) của mặt ngược (dễ nhận thấy ở dãy nồng độ từ 10 mg/L, Hình 3.18D).



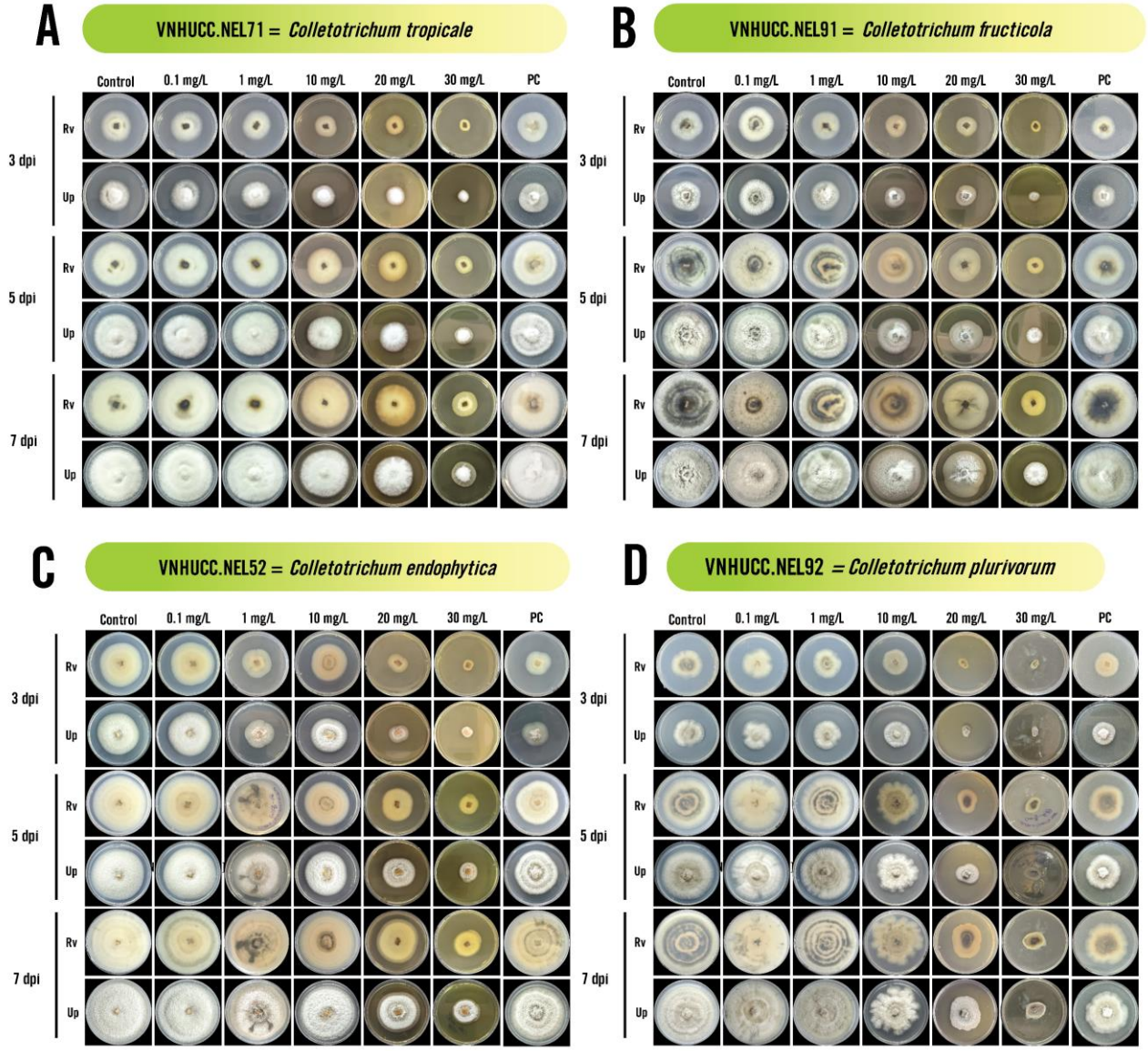
Hình 3.20. Ảnh hưởng của nano bạc đến sự sinh trưởng và hình thái tản nấm theo thời gian và nồng độ nano bạc khác nhau trên môi trường PDA của 4 tác nhân nấm thuộc chi *Curvularia* (A) C. *plantarum*, (B). *C. dactyloctenicola*, (C). *C. suttoniae*, (D). *C. verruculosa.* Ghi chú: dpi = số ngày sau cấy; Up: mặt chính của tản nấm; Rv: mặt ngược của tản nấm. Control: đối chứng – không bổ sung nano bạc; PC: Hexaconazole với nồng độ 0,2%



Hình 3.21. Ảnh hưởng của nano bạc đến sự sinh trưởng và hình thái tản nấm theo thời gian và nồng độ nano bạc khác nhau trên môi trường PDA của 3 tác nhân nấm thuộc chi *Curvularia* (A) C. *radicifoliigena*, (B). *C. lunata*, (C). *C. senegalensis.* Ghi chú: dpi = số ngày sau cấy; Up: mặt chính của tản nấm; Rv: mặt ngược của tản nấm. Control: đối chứng – không bổ sung nano bạc; PC: Hexaconazole với nồng độ 0,2%



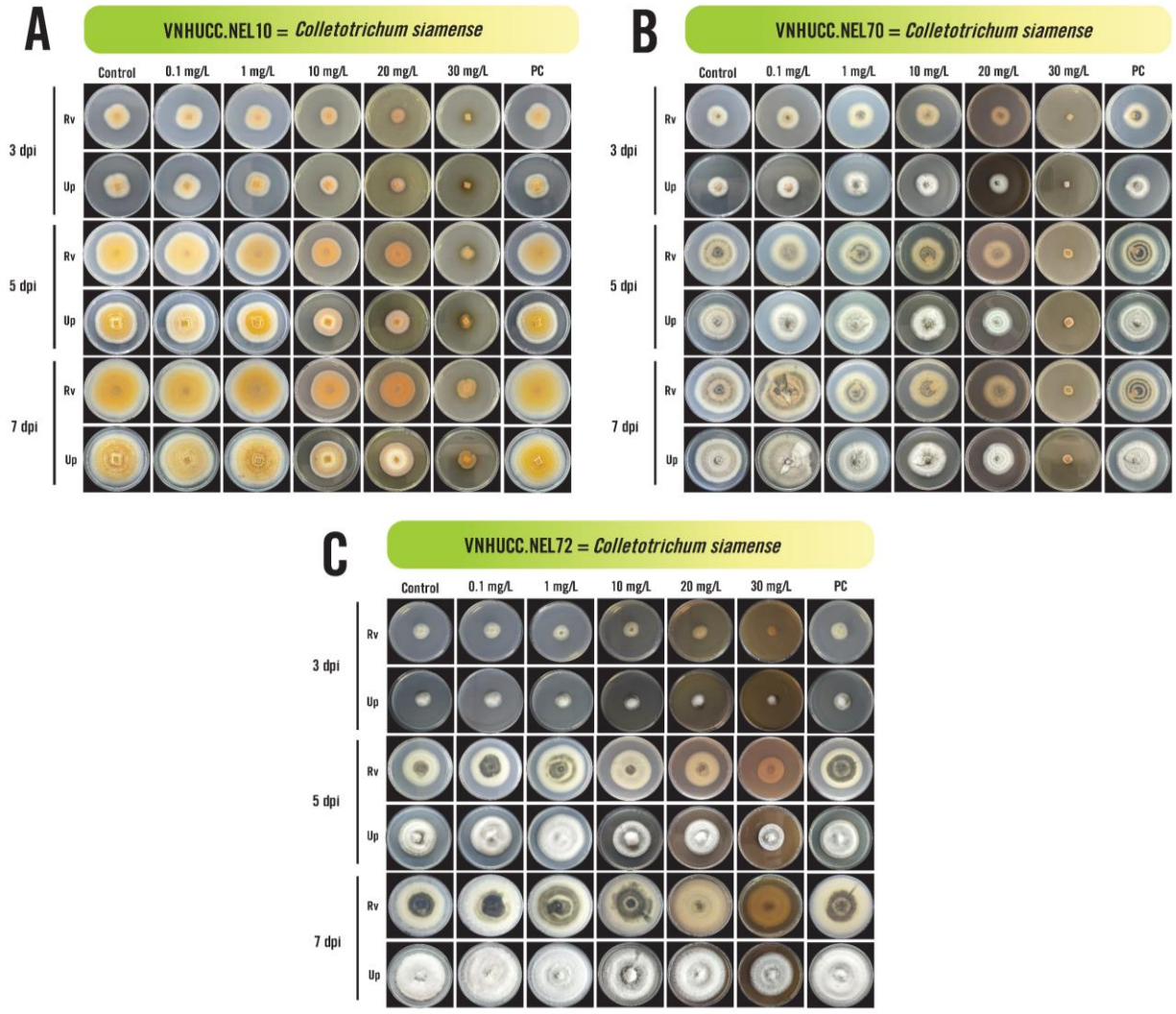
Hình 3.22. Ảnh hưởng của nano bạc đến sự sinh trưởng và hình thái tản nấm theo thời gian và nồng độ nano bạc khác nhau trên môi trường PDA của 4 chủng phân lập nấm chưa xác định loài thuộc chi *Curvularia*: VNHUCC.NEL37, VNHUCC.NEL31, VNHUCC.NEL80, VNHUCC.NEL94. Ghi chú: dpi = số ngày sau cấy; Up: mặt chính của tản nấm; Rv: mặt ngược của tản nấm. Control: đối chứng – không bổ sung nano bạc; PC: Hexaconazole với nồng độ 0,2%



Hình 3.23. Ảnh hưởng của nano bạc đến sự sinh trưởng và hình thái tản nấm theo thời gian và nồng độ nano bạc khác nhau trên môi trường PDA của 4 tác nhân nấm thuộc chi *Colletotrichum* (A) C. *tropicale*, (B). *C. fructicola*, (C). *C. endophytica,* (D). *C. plurivorum.* Ghi chú: dpi = số ngày sau cấy; Up: mặt chính của tản nấm; Rv: mặt ngược của tản nấm. Control: đối chứng – không bổ sung nano bạc

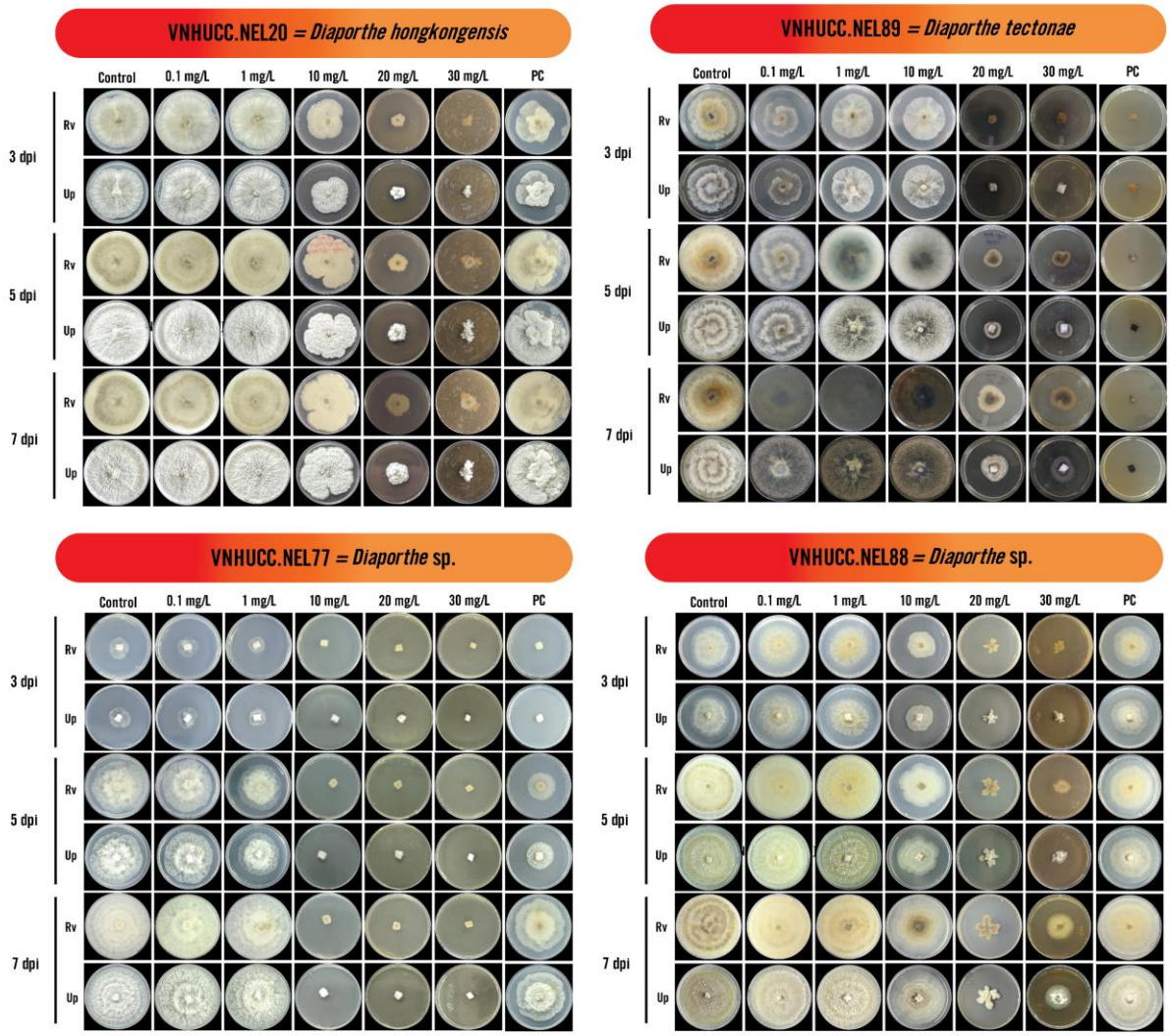
Nghiên cứu này cũng quan sát thấy một xu hướng nhất quán: phần lớn các biến đổi về màu sắc của các chủng phân lập *Curvularia* được ghi nhận ở mặt chính, mặt ngược (reverse side) vẫn quan sát thấy sự gia tăng các viền/vùng trắng nhưng biểu hiện chưa rõ rệt. Trong khi đó, các phân lập *Colletotrichum* thì lại cho thấy những sự biến đổi các hoa văn (pattern) màu sắc một cách rõ rệt ở mặt ngược của tản nấm. Trong số 11 chủng phân lập của chi *Curvularia* được thử nghiệm, có đến 5 chủng ghi nhận hiện tượng biến dạng bất thường ở viền tản nấm khi tiếp xúc với nano bạc. Đặc biệt, chủng phân lập VNHUCC.NEL100 – *Curvularia lunata* cho thấy rõ rệt hình thức biến dạng này xuất hiện

ở tất cả các nồng độ nano bạc được thử nghiệm (Hình 3.21B). Ngược lại, hiện tượng co rút viền tản nấm, mặc dù phổ biến ở nhiều chi nấm khác trong nghiên cứu này, lại rất hiếm gặp ở chi *Colletotrichum*. Ngoại trừ chủng phân lập VNHUCC.NEL92 - *Colletotrichum plurivorum* (1/11 chủng thử nghiệm), các chủng còn lại của chi này hầu như không ghi nhận hiện tượng biến đổi bất thường này (Hình 3.23 và Hình 3.24).



Hình 3.24. Ảnh hưởng của nano bạc đến sự sinh trưởng và hình thái tản nấm theo thời gian và nồng độ nano bạc khác nhau trên môi trường PDA của 3 chủng phân lập nấm thuộc loài phức hợp *Colletotrichum siamense:* VNHUCC.NEL10, VNHUCC.NEL70, VNHUCC.NEL72. Control: Đối chứng – không bổ sung nano bạc.

Xét riêng trong loài phức hợp *C. siamense* với 3 chủng phân lập: VNHUCC.NEL10, VNHUCC.NEL70 và VNHUCC.NEL72. Mặc dù sự khác biệt về hoa văn và màu sắc, nhưng 2 chủng VNHUCC.NEL10 và VNHUCC.NEL70 lại cùng chung một kiểu đáp ứng về cả hiệu lực ức chế và cách đáp ứng tản nấm ở viền. Trong khi, VNHUCC.NEL72 lại thể hiện một sự đáp ứng khác biệt so với 2 chủng phân lập còn lại trong loài phức hợp *C. siamense,* kết cấu bông xốp mặc dù suy giảm nhưng vẫn duy trì ở mức độ nhất định.



Hình 3.25. Ảnh hưởng của nano bạc đến sự sinh trưởng và hình thái tản nấm theo thời gian và nồng độ nano bạc khác nhau trên môi trường PDA của 4 chủng phân lập nấm thuộc chi *Diaporthe* (A) VNHUCC.NEL20 *(D. hongkongensis*), (B). VNHUCC.NEL89 (*D. tectonae)*, (C). VNHUCC.NEL77 *(Diaporthe* sp.), (D). VNHUCC.NEL88 (*Diaporthe* sp.). Control: Đối chứng – không bổ sung nano bạc.

Trong đánh giá này, nghiên cứu cũng tiến hành với 4 chủng phân lập *Diaporthe,* bao gồm: VNHUCC.NEL20 (*D. hongkongensis*), VNHUCC.NEL89 (*D. tectonae*) và 2 chủng phân lập chưa xác định được loài: VNHUCC.NEL77 và VNHUCC.NEL88. Xét về các đáp ứng hình thái khi tiếp xúc với nano bạc, các chủng phân lập này đều cho thấy một số điểm chung như: biến dạng rõ rệt ở viền, với các co thắt sâu vào trung tâm tản nấm (đặc biệt là 2 chủng phân lập VNHUCC.NEL20 và VNHUCC.NEL88). Đồng thời, các kết cấu hoa văn ở bề mặt tản nấm có xu hướng suy giảm rõ rệt tương ứng với sự tăng dần của nồng độ nano bạc (Hình 3.25). Ngoài ra, ở các nồng độ cao, tản nấm của các chủng *Diaporthe* này có xu hướng chuyển màu sẫm hơn so với đối chứng.

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

Phương pháp khuếch tán đĩa trên môi trường rắn (thạch) có hạn chế khả năng khuếch tán một cách đồng đều qua cấu trúc mạng lưới của dạng môi trường này. Do đó, phương pháp đánh giá trên môi trường lỏng cũng được sử dụng để so sánh cũng như đánh giá toàn diện về ảnh hưởng của nano bạc với các tác nhân nấm.

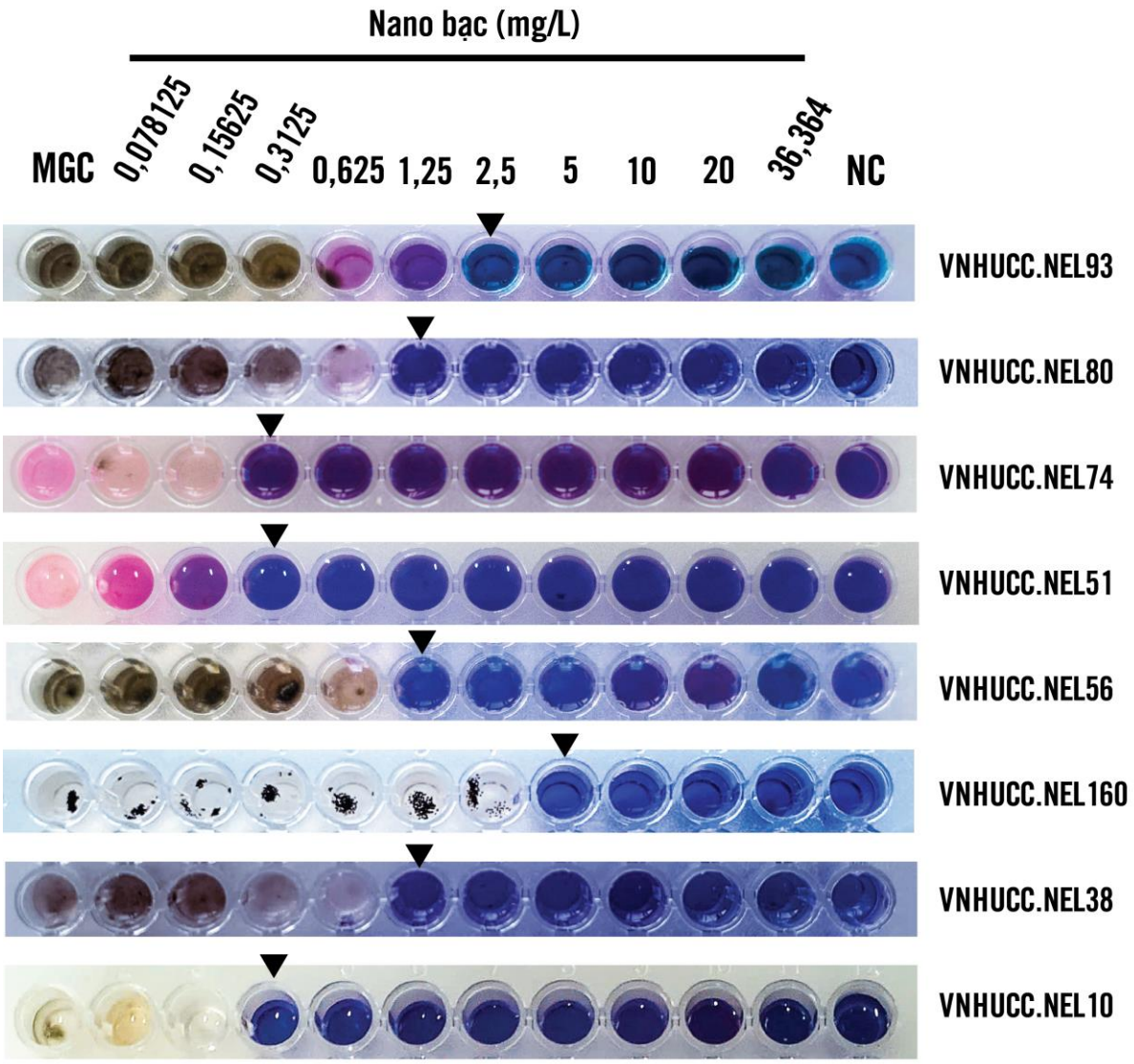
Để kiểm tra chi tiết hơn các tác động của việc tiếp xúc với nano bạc, nghiên cứu này đã chọn các 8 chủng phân lập đại diện: VNHUCC.NEL93 (*Curvularia plantarum*), VNHUCC.NEL51 (*C. radicifoliigena*), VNHUCC.NEL74 (*Curvularia* sp.), VNHUCC.NEL80 (*Curvularia* sp.), VNHUCC.NEL10 (*Colletotrichum siamense*), VNHUCC.NEL56 (*E. rostratum*), VNHUCC.NEL160 (*A. niger*) và VNHUCC.NEL38 (*L. theobromae*) để phân tích thêm. Các chủng phân lập này được chọn dựa trên tính đại diện với các tiêu chí: đảm bảo tính đa dạng (thành phần loài/chi), mức độ nhạy cảm (dựa trên hiệu lực ức chế, giá trị EC_{50}), tính nhất quán trong phát triển: tốc độ phát triển nhanh, sợi nấm dày và không ức chế hoàn toàn sự phát triển bởi nano bạc. Những đặc điểm này sẽ tạo điều kiện thuận lợi – mô hình tối ưu cho việc quan sát và đánh giá các thay đổi trong quá trình phát triển dưới tác động của nano bạc.

Các chi không có chủng phân lập nào được lựa chọn trong thử nghiệm này bao gồm: *Neofusicoccum, Nigrospora, Neopestalotiopsis, Diaporthe* do những hạn chế sau: các chủng phân lập *Diaporthe* có thời gian hình thành bào tử khá dài, và sở hữu đến 3 dạng bào tử vô tính khác nhau (alpha, beta và gamma) mang các hình dạng khác biệt – khiến cho việc so sánh đối chiếu với các chủng phân lập khác gặp khó khăn khi các dạng bào tử xuất hiện đồng thời. Bên cạnh đó, phần lớn các chủng phân lập đại diện của *Diaporthe* bị ức chế mạnh hoặc hoàn toàn với nano bạc – điều này sẽ hạn chế trong các đánh giá ảnh hưởng ở dãy nồng độ cao. Các chủng phân lập đại diện thuộc *Neofusicoccum* và *Neopestalotiopsis* không có sự nhất quán về mặt thời gian trong sự hình thành bào tử ở các nồng độ nano bạc khác nhau – nên được loại trừ khỏi các thử nghiệm.

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 và đã được sử dụng rộng rãi trong các thử nghiệm khả năng sống và cả độc tính của tế bào (Chakansin et al., 2022; Rampersad, 2012; Serrano et al., 2023). Kết quả thử nghiệm pha loãng vi giếng được ghi nhận và thể hiện ở Hình 3.26 và Bảng 3.3 cho thấy, giá trị MIC của nano bạc với các chủng phân lập đại diện dao động 0,3125 – 5 mg/L. Ba chủng phân lập VNHUCC.NEL10 (*Colletotrichum siamense*),

VNHUCC.NEL51 (*Curvularia radicifoliigena*) và VNHUCC.NEL74 (*C. verruculosa*) đều thể hiện mức độ nhạy cảm cao với giá trị MIC ghi nhận rất thấp (0,3125 mg/L).



Hình 3.26. Thử nghiệm resazurin với 8 chủng phân lập đại diện nhằm xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC). Dung dịch resazurin, được sử dụng làm chất chỉ thị tăng trưởng của nấm, việc chuyển màu từ xanh sang hồng biểu thị sự sống của các tế bào (viable cell). MGC (Microbial growth control): đối chứng tăng trưởng, NC: đối chứng âm tính (môi trường).

Chủng phân lập ghi nhận mức độ kháng cao VNHUCC.NEL80 (*Curvularia* sp.) trong thử nghiệm ức chế sợi nấm trên môi trường rắn cũng được đánh giá trong thử nghiệm này: mặc dù ghi nhận nồng độ ức chế tối thiểu tương đối thấp 1,25 mg/L nhưng nồng độ diệt nấm tối thiểu (MFC) lại lên đến 10 mg/L. Nồng độ 10 mg/L cũng được xác định nồng độ ức chế tối thiểu của *A. niger* (VNHUCC.NEL160). Mặc dù có hiệu quả kháng lại tất cả các chủng phân lập nấm đã thử nghiệm, nhưng nano bạc dường như

không có hoạt tính diệt nấm (thể hiện qua chỉ số MFC/MIC ≥ 4) đối với một số phân lập: VNHUCC.NEL38 (*L. theobromae*), VNHUCC.NEL56 (*E. rostratum*), VNHUCC.NEL80 (*Curvularia* sp.). Điều này cũng được xác nhận bằng cách tiến hành nuôi cấy dịch từ các đĩa sau MIC trên môi trường PDA.

Bảng 3.0.3. 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	*Curvularia plantarum*	2,5	5	2
VNHUCC.NEL80	*Curvularia* sp.	1,25	10	8
VNHUCC.NEL74	*C. verruculosa*	0,3125	20	64
VNHUCC.NEL51	*C. radicifoliigena*	0,3125	0,3125	1
VNHUCC.NEL56	*E. rostratum*	1,25	5	4
VNHUCC.NEL160	*A. niger*	5	10	2
VNHUCC.NEL38	*L. theobromae*	1,25	ND	ND
VNHUCC.NEL10	*Colletotrichum siamense*	0,3125	0,625	2

Chú thích: ND (not dectected): 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.

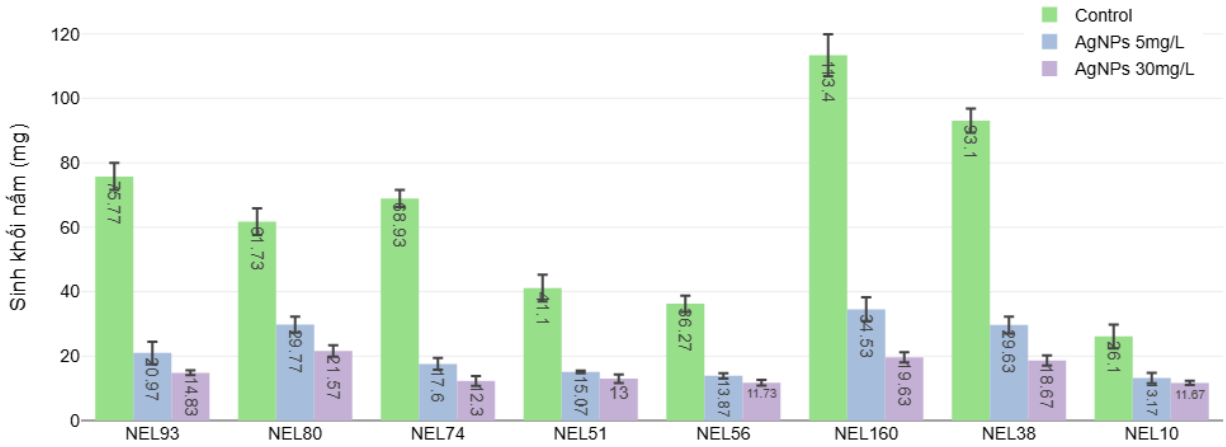
Dựa trên kết quả xác định nồng độ tối thiểu ức chế (MIC) được trình bày trong mục 3.2.2.1, nghiên cứu đã lựa chọn một giá trị MIC chung (MICc) - giá trị MIC lớn nhất ghi nhận được (5 mg/L) làm ngưỡng giới hạn chuẩn để đánh giá tác động của tám chủng phân lập khác nhau. Bên cạnh đó, một nồng độ nano bạc 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 – nhằm cung cấp một cái nhìn toàn diện hơn về khả năng ức chế và ảnh hưởng của nano bạc.

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.

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%.



Hình 3.27. Ảnh hưởng của nano bạc đến khả năng tăng sinh khối (khô) của các chủng phân lập thử nghiệm sau 3 ngày nuôi cấy. Để tối ưu không gian hiểu thị phần kết quả, ký hiệu VNHUCC.NEL từng phân lập được rút gọn thành NEL. Control: mẫu đối chứng – không xử lý nano bạc. Độ lệch chuẩn (SD) được biểu thị tại các thanh dữ liệu tương ứng

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.

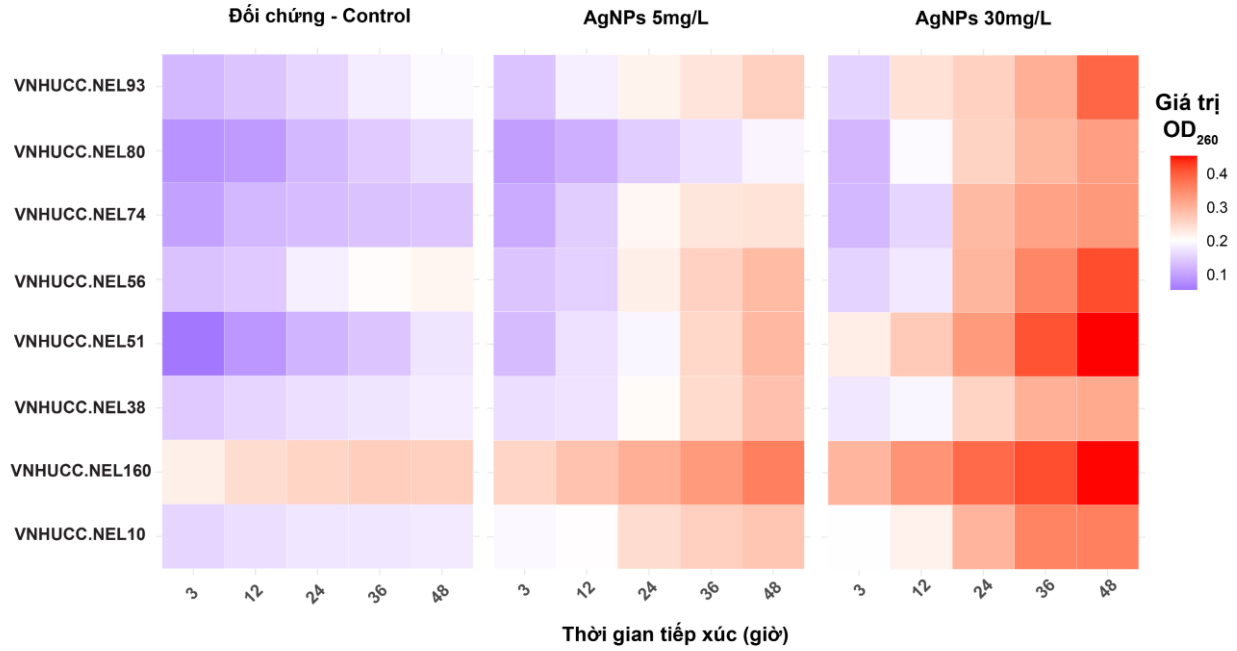
3.2.3. Ảnh hưởng của nano bạc đến đặc điểm sinh hóa và tính toàn vẹn của màng tế bào

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_{260})

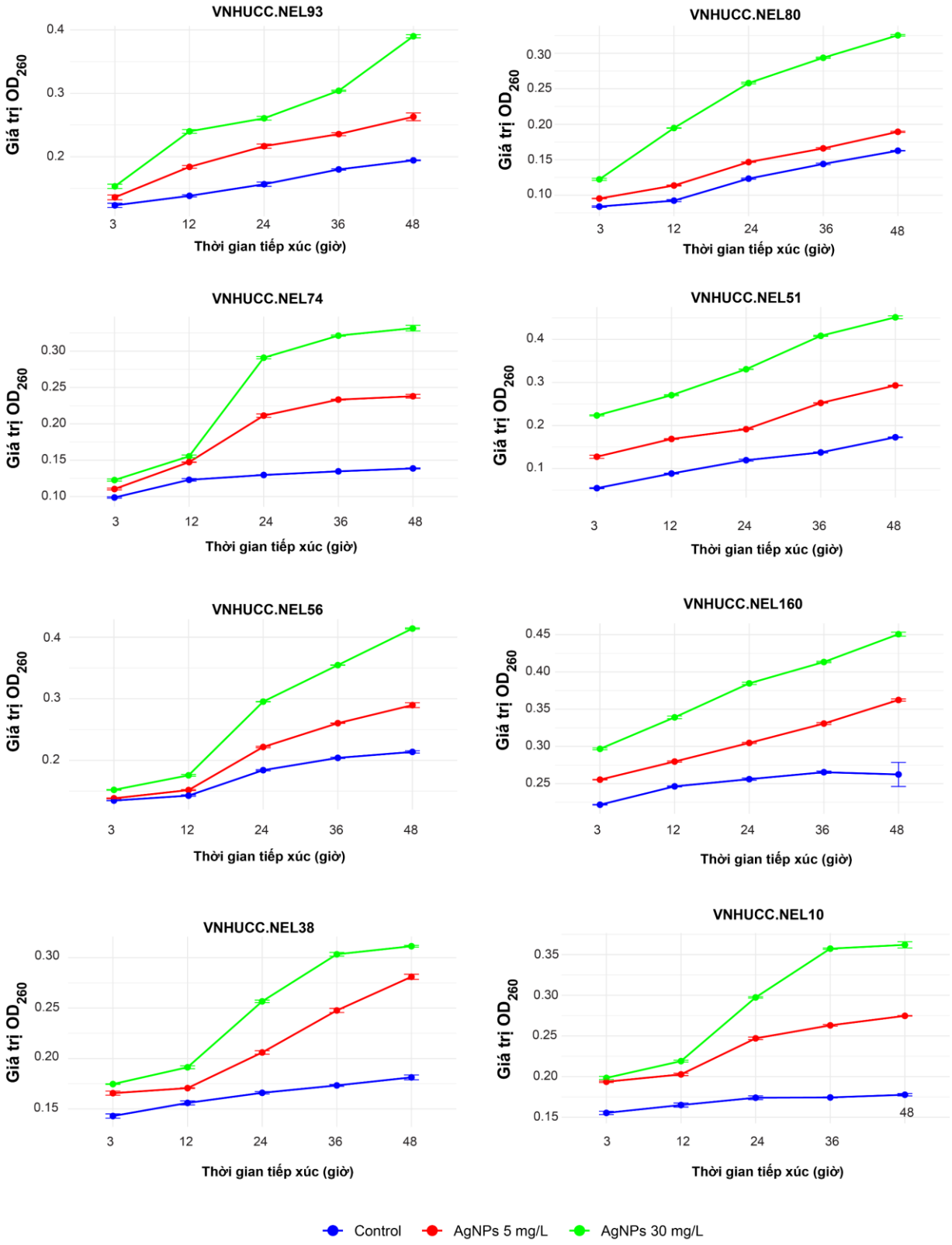
Để nghiên cứu sâu hơn về tổn thương của màng tế bào của nấm, độ dẫn điện ngoại bào và acid nucleic (giá trị hấp thụ ở OD_{260}) của môi trường đã được ghi nhận sau khi xử

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).



Hình 3.28. Biểu đồ Heatmap tác động của nano bạc đến sự xu hướng thay đổi giá trị hấp thụ ở bước sóng OD_{260} 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 hấp thụ ở OD_{260} tương ứng.

Nghiên cứu này tiến hành đánh giá độ hấp thụ OD_{260} của dịch lọc sợi nấm được nuôi cấy ở các nồng độ nano bạc khác nhau, nhằm phản ánh sự giải phóng các thành phần nội bào, đặc biệt là acid nucleic. So với mẫu đối chứng (Control), các mẫu được xử lý với nồng độ nano bạc 5 mg/L và 30 mg/L cho thấy giá trị hấp thụ (OD_{260}) tăng đáng kể. Xử lý ở nồng độ nano bạc 30 mg/L cũng cho thấy tạo ra một mức độ rò rỉ lớn hơn đáng kể so với nồng độ nano bạc 5 mg/L đối với sự phát triển của các chủng phân lập thử nghiệm (Hình 3.28). Đáng chú ý, sự khác biệt trong mức độ rò rỉ vật chất nội bào không chỉ phụ thuộc vào nồng độ nano bạc mà còn chịu chi phối đáng kể bởi thời gian tiếp xúc. Khi thời gian tiếp xúc kéo dài, lượng chất nội bào được giải phóng ngày càng gia tăng, đặc biệt rõ rệt sau 24 giờ tiếp xúc với nano bạc.



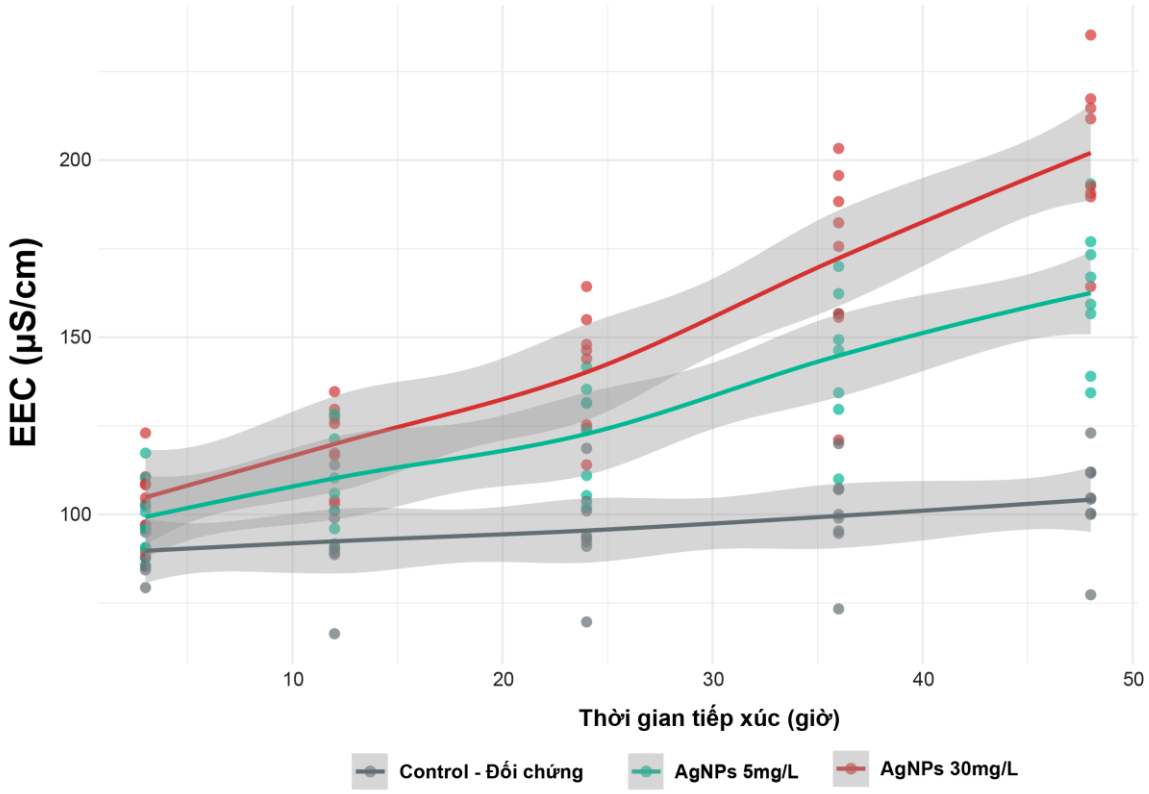
Hình 3.29. Biểu đồ cho thấy xu hướng rò ri acid nucleic (OD_{260}) theo thời gian tiếp xúc ở các nồng độ khác nhau (Control – Đối chứng – Không xử lý nano bạc; AgNPs 5 mg/L và 30 mg/L) theo từng chủng phân lập. Độ lệch chuẩn (SD) được biểu thị tại các nút mang dữ liệu tương ứng.

Chủng phân lập VNHUCC.NEL38 (*L. theobromae*) cho thấy sự khác biệt rõ rệt về giá trị OD_{260} khi xử lý với hai nồng độ nano bạc khác nhau. Sau 12 giờ, với giá trị OD_{260} khi xử lý nano bạc 30 mg/L đạt 0,1913 cao hơn nhưng không quá khác biệt so với 0,1707 khi xử lý ở nồng độ 5 mg/L. Đến 24 giờ, sự khác biệt này trở nên rõ ràng hơn, với OD_{260} ở nồng độ 30 mg/L tăng lên 0,2567, vượt trội so với giá trị 0,206 ở nồng độ 5 mg/L. Tại thời điểm 36 giờ, xu hướng này tiếp tục, khi giá trị OD_{260} ở nồng độ 30 mg/L là 0,3033, lớn hơn so với 0,2477 ở nồng độ 5 mg/L. Đặc biệt, tại 48 giờ, sự khác biệt giữa hai nồng độ đạt mức cao nhất, với việc tiếp xúc với nano bạc ở nồng độ 30 mg/L ghi nhận giá trị OD_{260} đạt 0,3113 cao hơn giá trị OD_{260} = 0,281 khi xử lý ở nồng độ 5 mg/L (Hình 3.29).

Tuy nhiên, nghiên cứu cũng cho thấy có một số chủng phân lập như VNHUCC.NEL74 (*Curvularia verruculosa*), VNHUCC.NEL51 (*Curvularia radicifoliigena*), VNHUCC.NEL10 (*Colletotrichum siamense*) có xu hướng tốc độ rò rỉ chững lại (độ dốc thấp hơn) ở khoảng thời gian tiếp xúc từ 36 đến 48 giờ - điều này có thể đến từ việc màng tế bào đã bị phá hủy hoàn toàn, ở mức độ quá ngưỡng của tế bào không thể phục hồi, vật chất nội bào rò rỉ ra bên ngoài môi trường. Kết quả thu được xác nhận rằng việc tiếp xúc với nano bạc có khả năng làm tổn thương sự toàn vẹn của màng tế bào ở các chủng phân lập thử nghiệm. Điều này gợi ý rằng nano bạc có thể hoạt động như một tác nhân phá vỡ màng tế bào, dẫn đến giải phóng các thành phần nội bào.

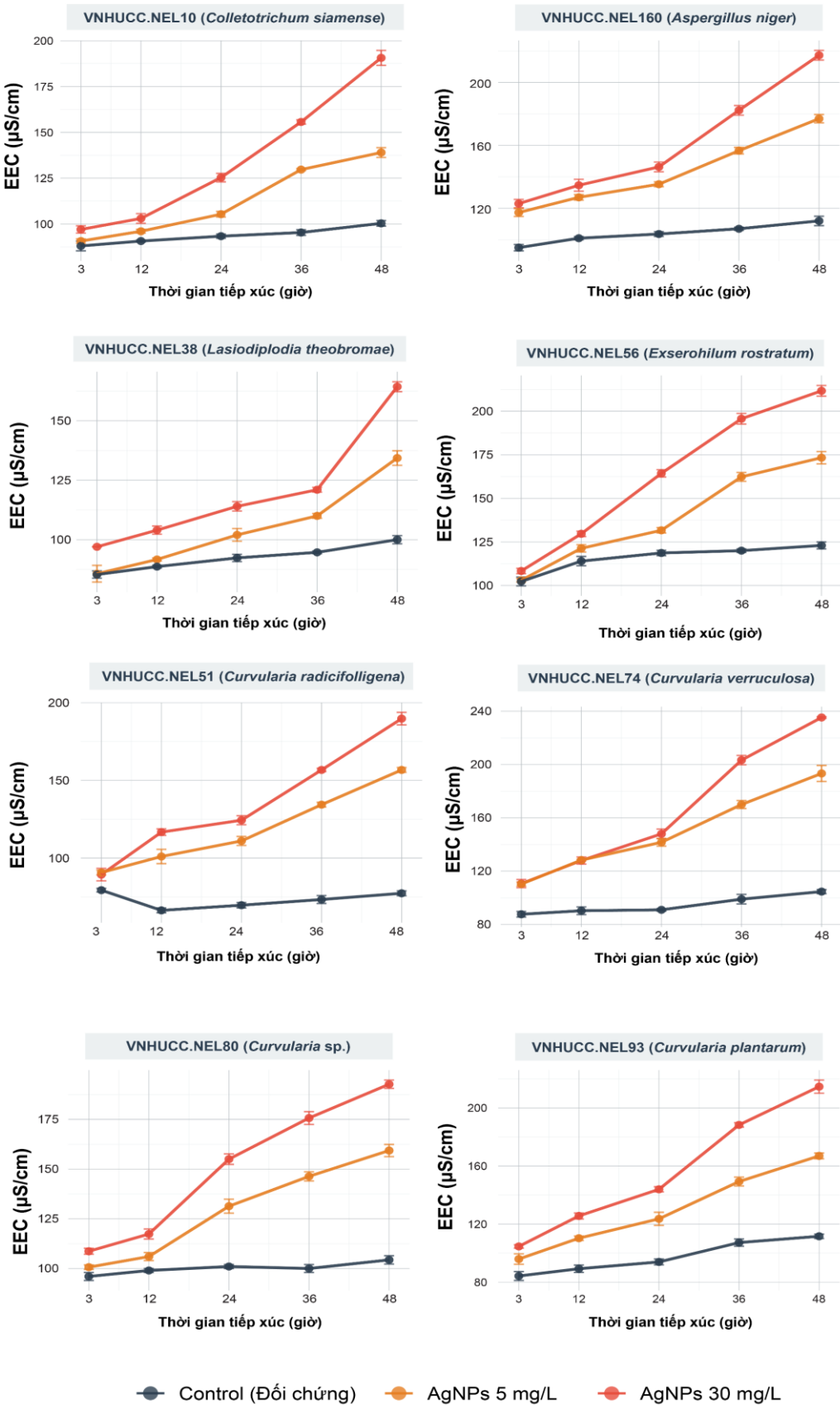
3.2.3.2. Độ dẫn điện ngoại bào (Extracellular electrical conductivity – EEC)

Bên cạnh đó, một bằng 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. Hình 3.30A thể hiện xu hướng gia tăng độ dẫn điện ngoại bào của các chủng phân lập thử nghiệm trong nghiên cứu này khi xử lý nano bạc theo thời gian. Kết quả cho thấy một xu hướng rõ rệt, giá trị EEC khi xử lý với nano bạc ở bất kỳ nồng độ nào đều cao hơn nhóm đối chứng (Control) ở tất cả các thời điểm đánh giá ($p < 0,05$) – trừ VNHUCC.NEL10, VNHUCC.NEL38 và VNHUCC.NEL56 không có sự khác biệt giữa xử lý nano bạc ở nồng độ 5 mg/L với mẫu đối chứng (không xử lý nano bạc) ở thời điểm 3 giờ tiếp xúc. Tuy nhiên, xử lý với nano bạc nồng độ cao 30 mg/L cho thấy sự khác biệt đáng kể so với nhóm đối chứng ở tất cả các thời điểm, đặc biệt là ở thời điểm 48 giờ ($p < 0,01$) và điều này cũng cho thấy tác động mạnh mẽ hơn với mức độ gia tăng EEC lớn hơn khi so sánh với nồng độ 5 mg/L ở hầu hết các chủng phân lập.



Hình 3.30. Biểu đồ phân tán (Scatter plot) cho thấy xu hướng chung các giá trị độ dẫn điện ngoại bào (EEC) quan sát được ở các chủng phân lập theo thời gian khi xử lý nano bạc ở các nồng độ khác nhau.

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 nấm thử nghiệm tăng đáng kể khi kéo dài thời gian xử lý. Ở các mốc thời gian sớm (3 giờ và 12 giờ) 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.



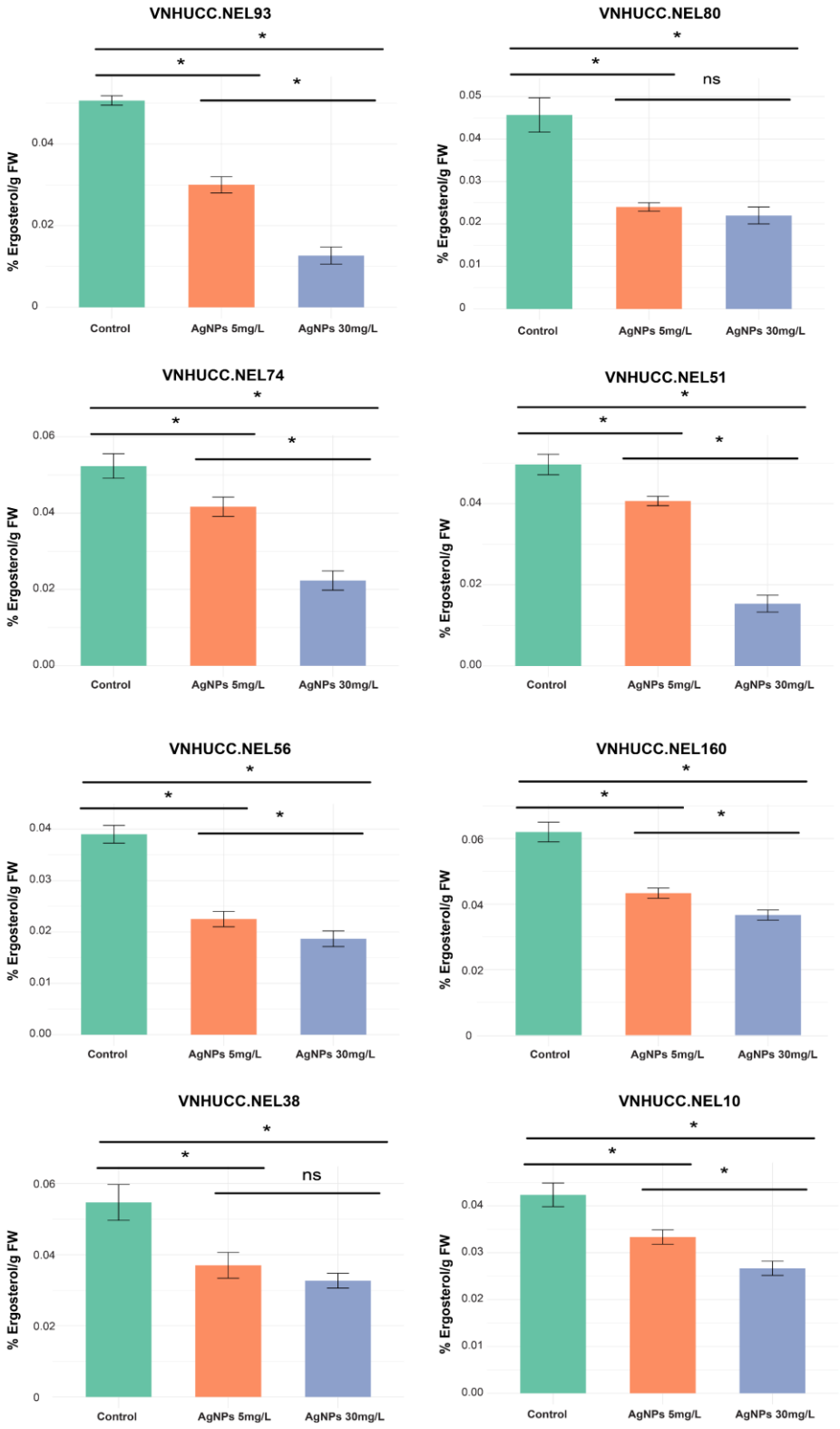
Hình 3.31. Sự biến động giá trị EEC quan sát được theo thời gian của từng phân lập thử nghiệm. Độ lệch chuẩn (SD) được biểu thị tại các nút mang dữ liệu tương ứng.

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 so với đối chứng ở cùng thời điểm theo tỷ lệ phần trăm để đảm bảo cùng một giá trị đầu vào. Chủng phân lập VNHUCC.NEL51 (*C. radicifoliigena*) cho thấy sự gia tăng EEC lớn nhất khi được xử lý bằng nano bạc. Cụ thể, ở nồng độ 30 mg/L, sự gia tăng lần lượt đạt 113,65% sau 36 giờ và 145,27% sau 48 giờ. Đối với nồng độ 5 mg/L, mức tăng tương ứng là 83,18% và 102,59% tại các thời điểm 36 giờ và 48 giờ. Một chủng phân lập *Curvularia* khác - VNHUCC.NEL74 (*C. verruculosa*) cũng ghi nhận tác động mạnh mẽ với mức độ gia tăng EEC quan sát được tăng lần lượt 124,83% và 84,70% khi xử lý ở 5 mg/L và 30 mg/L sau 48 giờ (Hình 3.30D-E). So với các phân lập trong thử nghiệm, VNHUCC.NEL38 (*L. theobromae*) ghi nhận mức thay đổi giá trị EEC thấp nhất so với đối chứng. Tại thời điểm 48 giờ sau xử lý nano bạc, giá trị EEC của VNHUCC.NEL38 tăng lần lượt 34,33% và 64,33% ở nồng độ 5 mg/L và 30 mg/L (Hình 3.31).

3.2.3.3. Hàm lượng Ergosterol

Ergosterol là thành phần sterol chính và dồi dào nhất 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). Cũng chính vì vậy, ergosterol được xem là mục tiêu chính của phần lớn các thuốc chống nấm, kháng nấm hiện nay, can thiệp vào chức năng thông qua việc ức chế các bước khác nhau trong quá trình tổng hợp ergosterol hoặc bằng cách tạo phức trực tiếp với ergosterol màng.

Kết quả thể hiện ở Hình 3.32 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 ($p < 0,05$). Đáng chú ý, các chủng phân lập thuộc chi *Curvularia* sp. (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.



Hình 3.32. Sự suy giảm hàm lượng ergosterol khi xử lý với nano bạc ở các nồng độ khác nhau. "*" biểu thị sự khác biết có ý nghĩa thống kê ở $p < 0,05$, ns cho thấy không có sự khác biết có ý nghĩa thống kê. FW – khối lượng tươi sợi nấm. Độ lệch chuẩn (SD) được biểu thị tại các cột mang dữ liệu tương ứng.

Đặc biệt, chủng phân lập VNHUCC.NEL51 (*C. radicifoliigena*) khi tiếp xúc với nano bạc ở nồng độ 5 mg/L chỉ ghi nhận sự suy giảm 18,12% hàm lượng ergosterol nhưng thể hiện nhạy cảm cao khi xử lý với nồng độ cao 30 mg/L. Hàm lượng ergosterol của VNHUCC.NEL74 (*C. verruculosa*) cũng cho thấy sự giảm mạnh: 57,32% so với đối chứng và 46,40% so với xử lý nano bạc 5 mg/L.

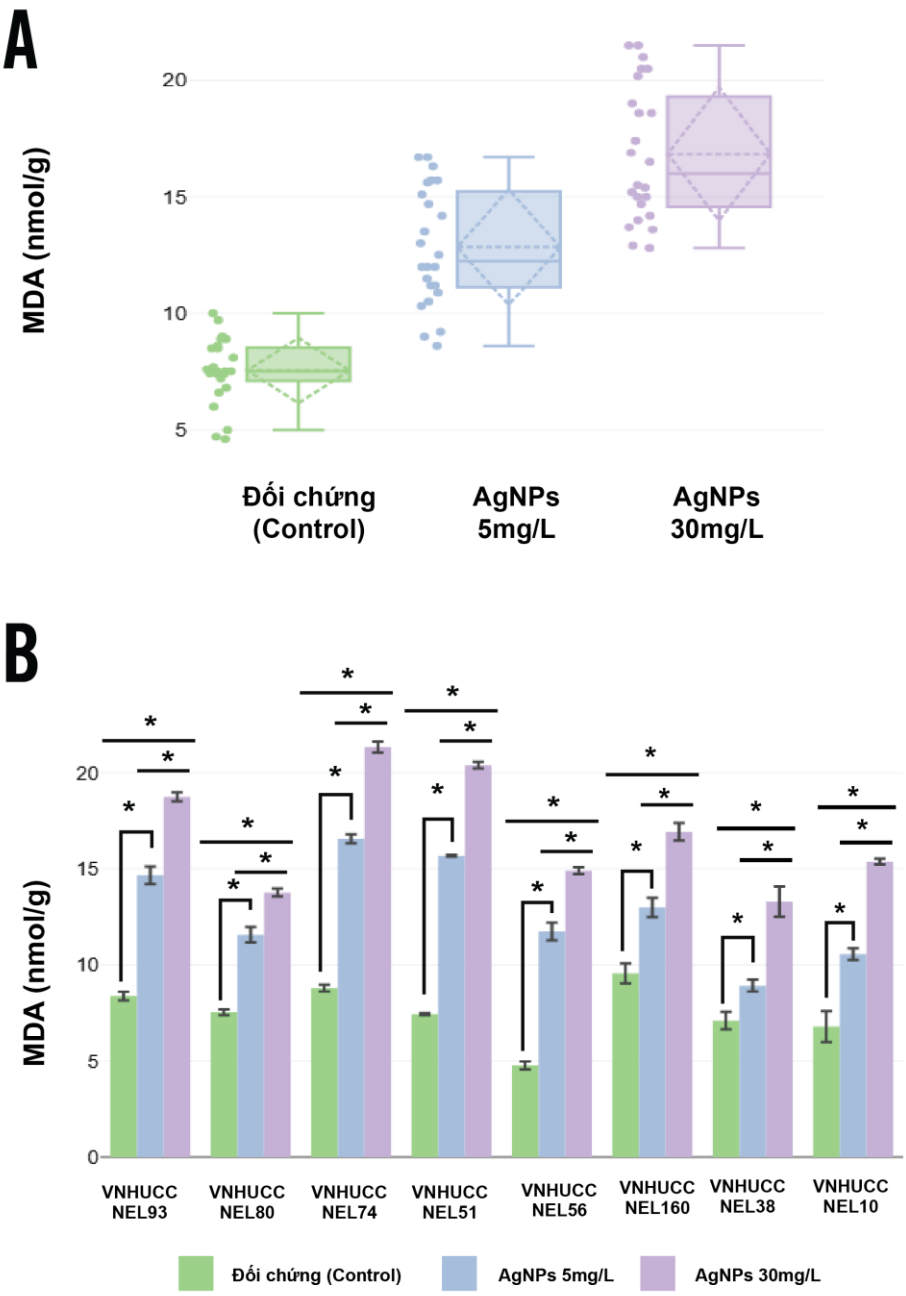
Trong khi đó, ở các phân lập đại diện thuộc các chi khác như VNHUCC.NEL10 (*Colletotrichum siamense*), VNHUCC.NEL160 (*A. niger*), VNHUCC.NEL38 (*N. parvum*), VNHUCC.NEL56 (*E. rostratum*) ghi nhận một mức suy giảm hàm lượng ergosterol thấp hơn, dao động từ 37 – 52,13% nhưng khác biệt đáng kể so với đối chứng ở nồng độ 30 mg/L ($p < 0,05$).

3.2.3.4. Quá trình peroxy hóa lipid – MDA

Malondialdehyde (MDA) là sản phẩm phân hủy của quá trình peroxy hóa lipid và thường được dùng để theo dõi như một chỉ số có thể phản ánh gián tiếp mức độ tổn thương oxy hóa (Castro et al., 2015; Zhao et al., 2016). Dữ liệu về sự thay đổi hàm lượng MDA nội bào của các chủng phân lập khi xử lý với các nồng độ nano bạc khác nhau được trình bày trong Hình 3.33.

Bên cạnh những bằng chứng mức độ rò rỉ acid nucleic, độ dẫn điện ngoại bào, nghiên cứu cũng nhận thấy sự gia tăng giá trị MDA ở tất cả các chủng phân lập nấm được thử nghiệm với nano bạc sau 48 giờ (Hình 3.33B). Kết quả cho thấy, xử lý nano bạc làm tăng đáng kể hàm lượng MDA sau 48 giờ tiếp xúc ở tất cả 8 phân lập thử nghiệm ($p < 0,05$). Cụ thể, việc xử lý nano bạc ở nồng độ 5 mg/L và 30 mg/L dẫn đến nồng độ MDA cao hơn từ 1,2 đến 3,1 lần so với đối chứng không xử lý.

Nhiều nghiên cứu trước đây chỉ ra rằng phospholipid ở màng tế bào là mục tiêu chính của các dạng oxy phản ứng (ROS), trong đó các dạng gốc dư thừa tạo ra sự thay đổi và biến đổi đáng kể trong thành phần tế bào (Li et al., 2021; Zou et al., 2022). Các dữ liệu nghiên cứu thu thập được khi tiếp xúc với nano bạc trong nghiên cứu này đã củng cố các chuỗi biến động diễn ra ở màng tế bào mỗi khi phân lập nấm chịu tác động của nano bạc – hay một yếu tố bất lợi/stress của điều kiện môi trường (Yang et al., 2020). Nghiên cứu này phù hợp với những phát hiện độc lập của Liang et al. (2025); Zhao et al. (2024) khi nhận thấy rằng việc xử lý bằng tinh dầu quế (*Cinnamomum* sp.) làm tăng đáng kể nồng độ MDA, tăng sự rò rỉ hàm lượng protein ở *A. flavus*. MDA được tạo ra bởi quá trình peroxy hóa màng lipid, dẫn đến hình thành các liên kết chéo với enzyme, nucleotide, acid amin và nhiều phân tử khác. Quá trình này dẫn đến việc tạo ra các thành phần không hòa tan, gây hại cho cấu trúc màng tế bào.

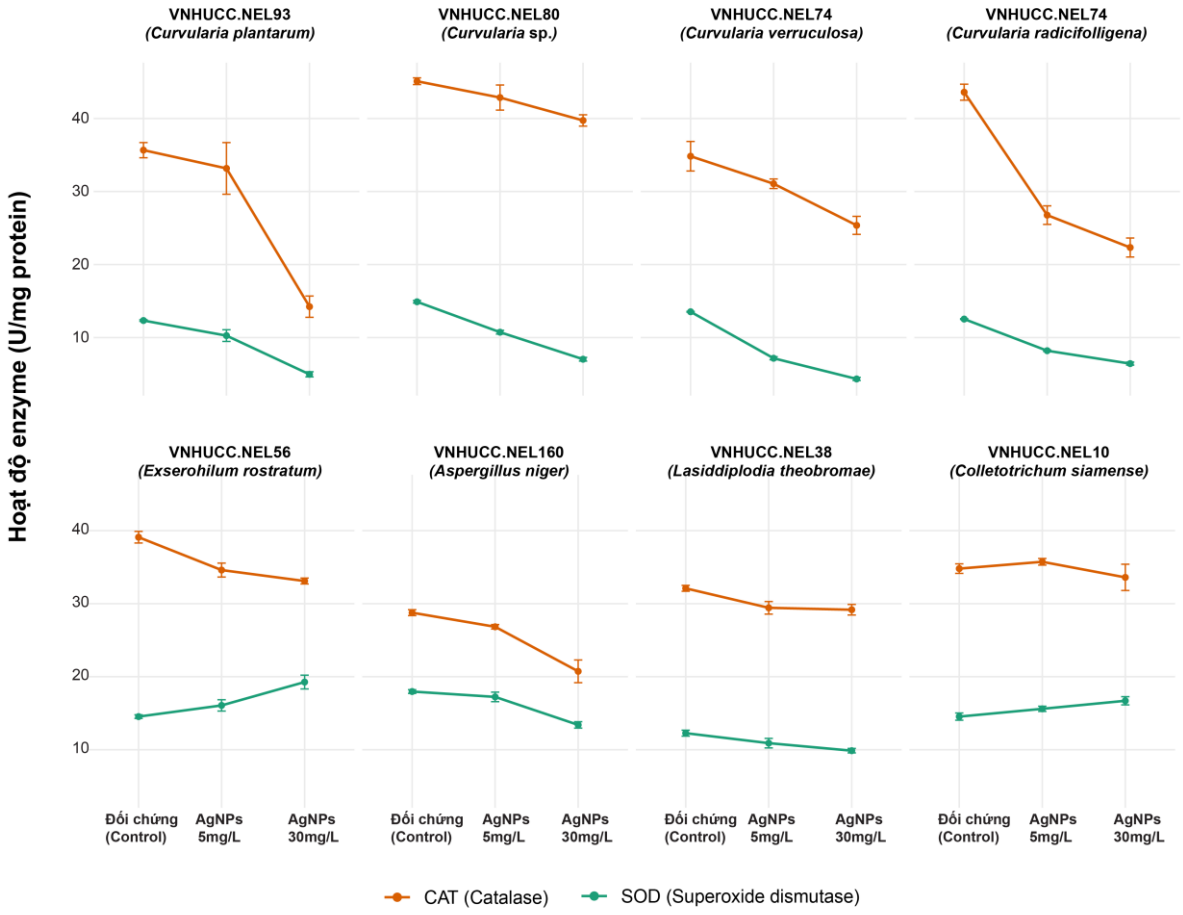


Hình 3.33. Hàm lượng MDA (µmol/g) khi xử lý với nano bạc sau 48 giờ. A. Biểu đồ phân bố (Box plot) các giá trị dữ liệu quan sát được của MDA giữa nhóm đối chứng (Control) và nhóm được xử lý với nano bạc (5 mg/L và 30 mg/L). B. Biểu đồ cho thấy sự khác nhau hàm lượng MDA theo từng phân lập. Độ lệch chuẩn (SD) được biểu thị tại các cột mang dữ liệu tương ứng. Sự khác biệt có ý nghĩa ($p < 0,05$) được biểu thị bằng "*". từng phân lập.

Điều này chứng minh rằng nano bạc có thể đã thúc đẩy stress oxy hóa và peroxide hoá lipid màng và sự gia tăng này dẫn đến việc không thể phục hồi tính toàn vẹn của cấu trúc 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).



Hình 3.34. Xu hướng biến động hoạt độ của 2 enzyme superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) ở các nồng độ xử lý khác nhau sau 48 giờ. Enzyme SOD được biểu thị bằng đường màu xanh, enzyme CAT được biểu thị bằng đường màu cam. Độ lệch chuẩn (SD) được biểu thị tại các nút mang dữ liệu tương ứng.

Enzyme superoxide dismutase (SOD) là một trong những enzyme chính chịu trách nhiệm bảo vệ chống lại stress oxy hóa, đóng vai trò là chất chống oxy hóa hoạt động như chất khử các gốc tự do và ngăn ngừa các quá trình trung gian do gốc tự do (Mansoor et al., 2022; Yu et al., 2020). Dựa trên các kết quả thu được thể hiện ở Hình 3.34, ở thời điểm 48 giờ sau khi xử lý với nano bạc (ở cả 2 nồng độ), hoạt độ enzyme

SOD ở phần lớn các chủng phân lập thử nghiệm có xu hướng giảm và khác biệt đáng kể với mẫu đối chứng ($p < 0,05$). Mức độ suy giảm hoạt độ enzyme SOD lớn nhất ghi nhận ở chủng phân lập VNHUCC.NEL74 (*Curvularia verruculosa)*, với mức suy giảm 67,98% khi xử lý ở nồng độ 30 mg/L so với đối chứng. Ngược lại, VNHUCC.NEL10 (*Colletotrichum siamense*) và VNHUCC.NEL56 (*E. rostratum*) lại ghi nhận sự gia tăng hoạt độ enzyme SOD khi xử lý nano bạc. Sự gia tăng hoạt động của enzyme chống oxy hóa tăng (SOD) có thể gián tiếp cho thấy bào tử của những phân lập này đã và đang ở trạng thái kích thích oxy hóa mạnh hơn dưới tác động của nano bạc ở thời điểm 48 giờ, và do đó sự gia tăng các enzyme chống oxy hóa ở đây là phòng vệ tự nhiên.

Trong khi đó, enzyme catalase (CAT) lại cho thấy mức độ một sự nhạy cảm lớn hơn với việc xử lý nano bạc, với phần lớn ghi nhận được biến động theo chiều hướng giảm và có khác biệt đáng kể so với mẫu đối chứng, đặc biệt là với nồng độ xử lý 30 mg/L ($p < 0,05$, ngoại trừ VNHUCC.NEL10 – *Colletotrichum siamense*). Nhìn chung, chiều hướng suy giảm đồng thời của cả hai loại enzyme chống oxy hóa này trong phần lớn các phân lập thử nghiệm cho thấy phản ứng phối hợp hoặc mức độ dễ bị tổn thương chung trước căng thẳng do nano bạc gây ra, đặc biệt là ở nồng độ cao. Có thể khẳng định, xử lý với nano bạc đã ít nhiều gây nên sự biến động của các enzyme chống oxy hóa này, phá vỡ trạng thái cân bằng oxy hóa khử trong tế bào. Những phát hiện của nghiên cứu này phù hợp với những phát hiện trước đây, trong đó sự suy giảm hoạt động của các enzyme chống oxy hóa như SOD, CAT, GSH-Px (glutathione peroxidase) đã phá vỡ sự cân bằng vốn có, gián tiếp dẫn đến tăng hàm lượng MDA, gây ra những tổn thương tế bào. Nhận định này phù hợp với báo cáo của Qian et al. (2011), trong đó nhấn mạnh rằng cân bằng giữa tốc độ tạo ROS và năng lực "quét dọn" của các enzyme như SOD, CAT và APX có thể bị phá vỡ dưới tác động của các hợp chất kim loại. Hệ quả của sự mất cân bằng này là biến động hàm lượng MDA trong tế bào, phản ánh mức độ peroxid hóa lipid tăng cao khi hệ thống chống oxy hóa bị suy yếu. Ở cấp độ phân tử, Liu et al. (2016) khi khảo sát độc tính của hạt nano TiO_2 đối với nấm *Pichia pastoris* đã cung cấp thêm bằng chứng rằng tính nhạy cảm với stress oxy hóa được tăng cường khi hệ thống điều hòa ROS suy yếu. Nghiên cứu cho thấy sự giảm biểu hiện các gene liên quan đến chống oxy hóa, đặc biệt các gene chi phối quá trình điều hòa tổng hợp glutathione (GSH), qua đó làm suy giảm năng lực đệm khử và khiến tế bào dễ tổn thương trước sự tích tụ ROS. Đáng chú ý, động học đáp ứng chống oxy hóa không hoàn toàn tuyến tính theo thời gian tiếp xúc. Nghiên cứu gần đây của Liu et al. (2024) trên sợi nấm *Fusarium* gây bệnh héo rũ ở dưa lưới cho thấy một kiểu đáp ứng hai pha trước xử lý nano bạc: trong giai đoạn ngắn (dưới 6 giờ), hoạt tính của SOD, CAT và POD tăng lên, phản ánh cơ chế bù trừ nhằm tái lập cân bằng oxy hóa–khử; tuy nhiên, khi kéo dài thời gian xử lý (12–24 giờ), hoạt tính của các enzyme này giảm đáng kể. Sự suy giảm muộn này có thể bắt nguồn từ (i) quá tải stress oxy hóa

vượt ngưỡng năng lực chống chịu, (ii) biến tính/ức chế enzyme do ROS hoặc tương tác với nano bạc, và/hoặc (iii) điều hòa giảm ở mức phiên mã/dịch mã của các thành phần hệ thống chống oxy hóa. Hậu quả là hiệu quả loại bỏ ROS suy giảm, peroxid hóa lipid tăng, MDA tích lũy, và cuối cùng khởi phát các chuỗi tổn thương dẫn đến chết tế bào nấm. Một nghiên cứu khác về tác động của vật liệu nano nano đồng – chitosan (Ch-CuNP) đến hồ sơ sinh hóa của *Macrophomina phaseolina*, đặc biệt là các hoạt động enzyme của CAT, POX, PPO (polyphenol oxidase) và PAL (phenylalanine ammonia-lyase) cũng được ghi nhận. Hoạt động các enzyme này ghi nhận sự phản ứng phụ thuộc vào nồng độ, trong đó sự tăng lên ở nồng độ thấp hoặc giai đoạn mới tiếp xúc và của các hoạt động enzyme giảm dần khi nồng độ Ch-CuNP tăng thêm (Fatima et al., 2024).

Để làm sáng tỏ liệu rằng có mối liên hệ chung nào giữa sự biến động của hai enzyme SOD và CAT này không khi tiếp xúc với nano bạc, nghiên cứu này tiến hành một phân tích tương quan chi tiết giữa SOD và CAT ở các nghiệm thức xử lý khác nhau: nhóm đối chứng, AgNPs 5 mg/L và AgNPs 30 mg/L. Kết quả phân tích dữ liệu SOD-CAT ban đầu ở nhóm đối chứng cho thấy một mối tương quan âm (yếu), và việc xử lý nano bạc với nồng độ 30 mg/L đã làm thay đổi mối tương quan này, dẫn đến một mối tương quan dương trung bình (hệ số r = 0,4). Mặc dù cường độ tương quan chưa đạt ngưỡng đủ mạnh, sự dịch chuyển từ tương quan âm sang dương cho thấy ảnh hưởng nhất định của AgNPs nồng độ cao đến sự biến động hoạt tính của hai enzyme này. Ngoài cái nhìn tổng thể về mối tương quan, nghiên cứu cũng tiến hành phân tích thành phần chính PCA (Principal components analysis) nhằm cung cấp bằng chứng về sự thay đổi mối tương quan giữa hoạt động của SOD và CAT khi tiếp xúc với nano bạc của từng chủng phân lập khi tiến hành kết hợp dữ liệu quan sát của hai enzyme SOD và CAT (Phụ lục Hình 4.10). Các mẫu đối chứng được ghi nhận phân bố gần trục ít phân tán, biến thiên, thể hiện ít sự biến động trong thay đổi hoạt độ enzyme. Trong khi, khi xử lý với nano bạc 30 mg/L đã ghi nhận sự phân bố rộng và lệch về phía bên trái, phản ánh sự biến động lớn và phản ứng tiêu cực rõ rệt khi xử lý nano bạc ở nồng độ cao.

Tóm lại, tổng hợp các dữ liệu sinh hóa, quan sát kính hiển vi thu thập được có thể gợi mở một giả thuyết: nano bạc đã làm suy yếu hoạt động của các enzyme chống oxy hóa, đặc biệt là enzyme SOD, CAT tham gia loại bỏ các gốc superoxide nội bào dư thừa. Khi này sự tích tụ các gốc superoxide ngày càng lớn, sẽ thúc đẩy quá trình peroxy hóa màng tế bào. Sản phẩm peroxy hóa như malondialdehyde tăng lên, có thể bất hoạt các enzyme và protein màng, gây tổn thương (hố, tổn thưởng trên thành sợi nấm dưới quan sát hiển vi) và tăng tính thấm, từ đó làm suy yếu chức năng màng, gây tổn hại và ức chế sự phát triển của nấm. Những biến đổi này hoàn toàn phù hợp với các bằng chứng lý sinh hóa ghi nhận trong nghiên cứu, gián tiếp chứng minh những thay đổi trong sự toàn vẹn màng tế bào như: gia tăng vật chất nội bào ra ngoài môi trường, độ dẫn điện

ngoại bào, hàm lượng MDA được khi tiếp xúc với nano bạc của các phân lập thử nghiệm. Sự biến động ROS khác biệt giữa các phân lập nấm có thể xuất phát từ sự khác biệt trong tốc độ sinh trưởng của từng phân lập, dẫn đến việc sợi nấm thu thập ở các giai đoạn phát triển để đánh giá khác nhau. Điều này, kết hợp với sự biến động và tính nhạy cảm cao của các enzyme liên quan, có thể ảnh hưởng đến khả năng phản ứng của nấm với các yếu tố môi trường. Có thể phải cần mở rộng các khoảng thời gian đánh giá để có cái nhìn toàn diện về tính biến động của các enzyme này khi tiếp xúc với nano bạc.

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

Đánh giá vi mô lên bào tử và sợi nấm cũng được ghi nhận thông qua kính hiển vi để đánh giá những tác động bên trong việc ức chế sự phát triển của tác nhân nấm gây bệnh 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, 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

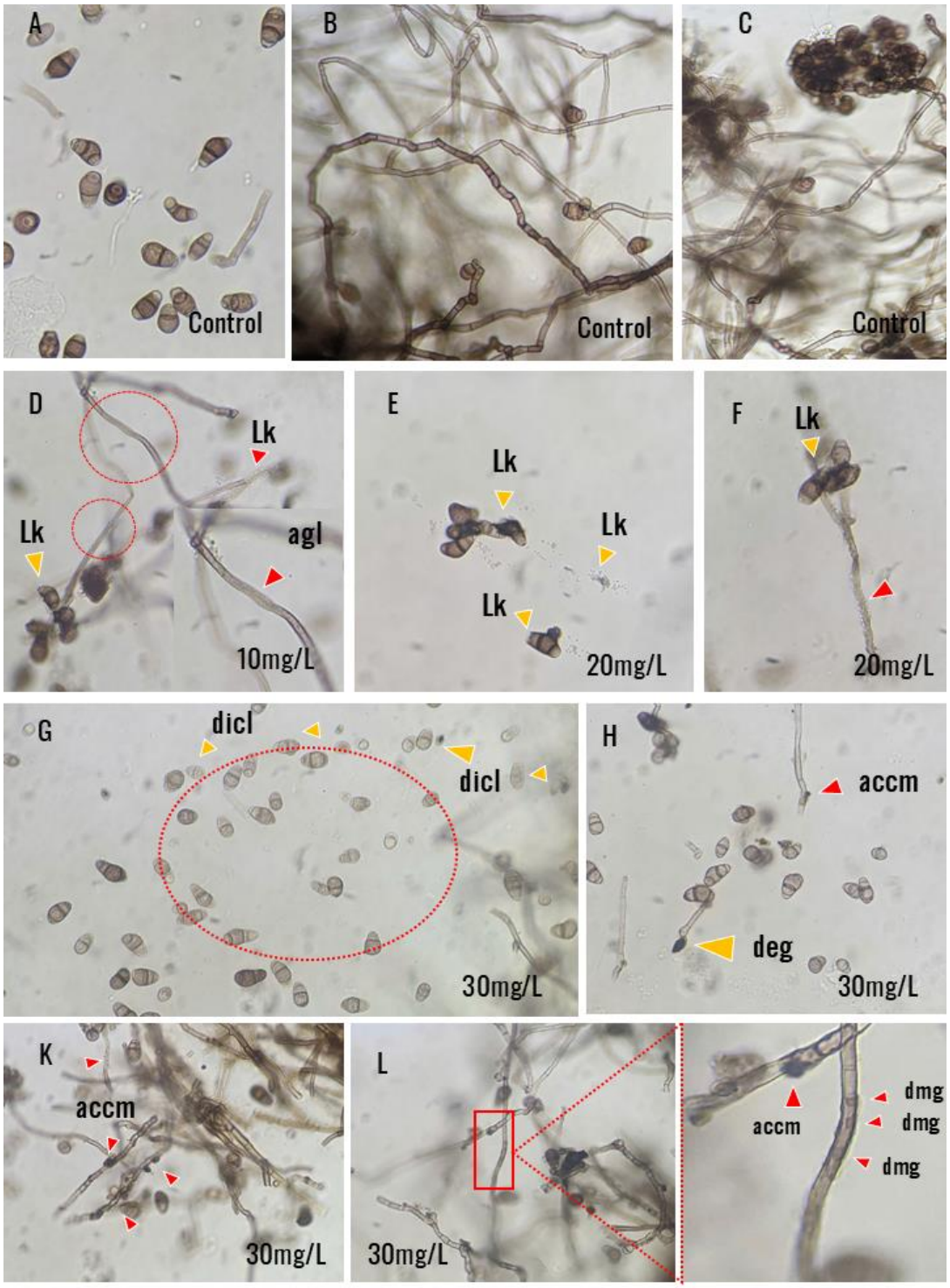
v. Sự tích lũy của các thành phần ngoại lai ở phía ngoài màng và sự xâm nhập tích tụ vào bên trong cũng được quan sát.

vi. Sự rò rỉ vật chất nội bào của sợi nấm, bào tử cũng được ghi nhận.

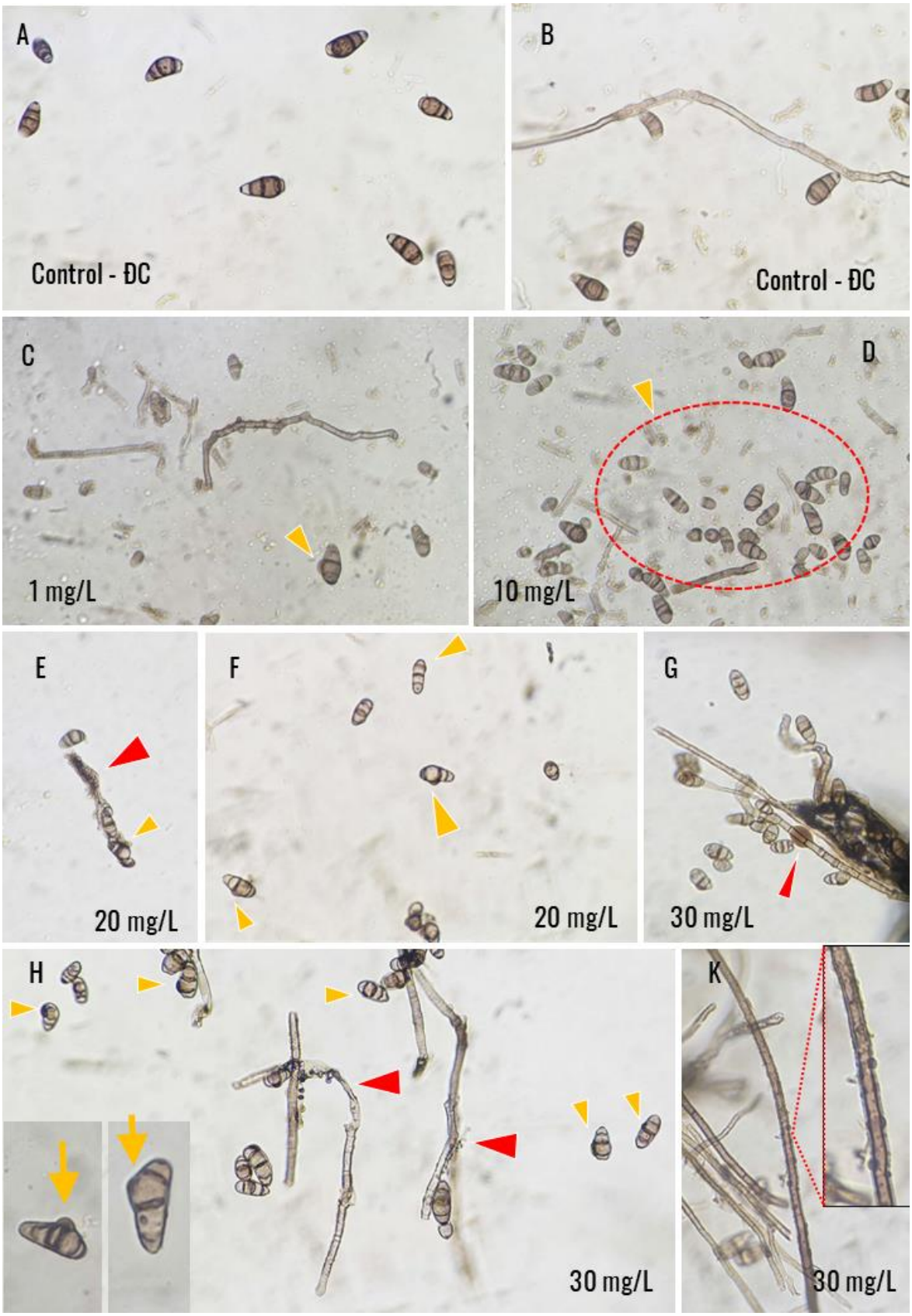
vii. Sự suy giảm/mất sắc tố hoặc gia tăng hiện tượng nâu hóa

Thành tế bào bao gồm các polysaccharides (đặc biệt là glucan và chitin), cùng với glycoprotein, hydrophobin và các protein bề mặt, đóng vai trò quan trọng trong tương tác của tế bào nấm với môi trường (Cortés et al., 2019; Delgado et al., 2023). Khi tế bào nấm tiếp xúc với các hạt nano bạc, các tương tác lý-hóa động như lực hút tĩnh điện, lực hút van der Waals và liên kết với các nhóm chức bề mặt có thể xảy ra giữa bề mặt hạt nano và các cấu phần sinh học. Những tương tác này thúc đẩy hạt nano bám dính và tích tụ trên bề mặt tế bào, sau đó thâm nhập và gây rối loạn cấu trúc thành/màng, dẫn tới tăng tính thấm và phá vỡ màng (Ghorbani et al., 2022). Hơn nữa, kiểm tra bằng kính hiển vi đã tiết lộ những biến đổi 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 nano bạc tăng cao. Diện tích bề mặt

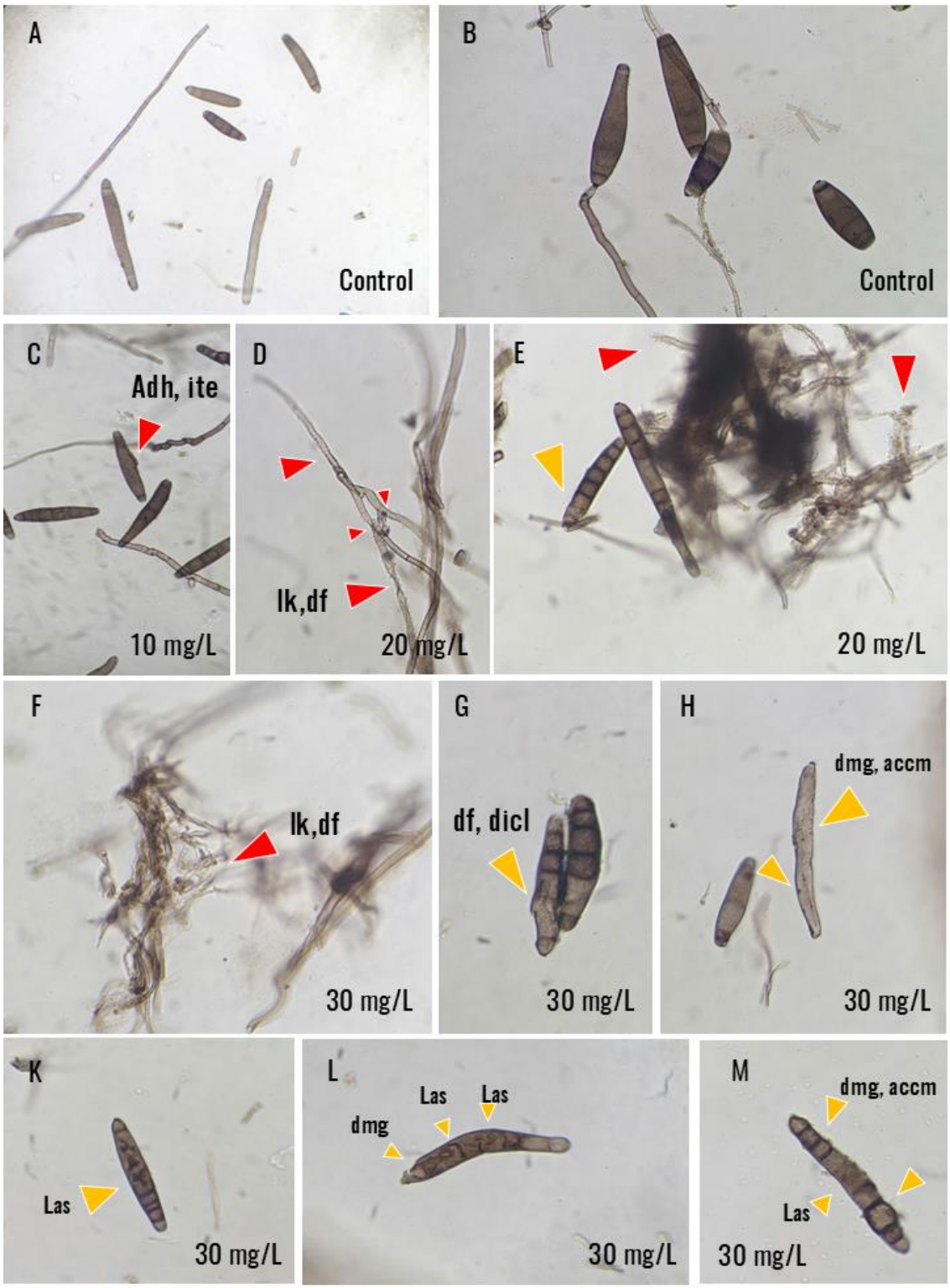
lớn hơn của nano bạc cũng góp phần cho phép bám dính và khuếch tán chặt hơn vào bề mặt tế bào nấm, dẫn đến tính toàn vẹn của màng bị tổn hại và ức chế nấm hiệu quả.



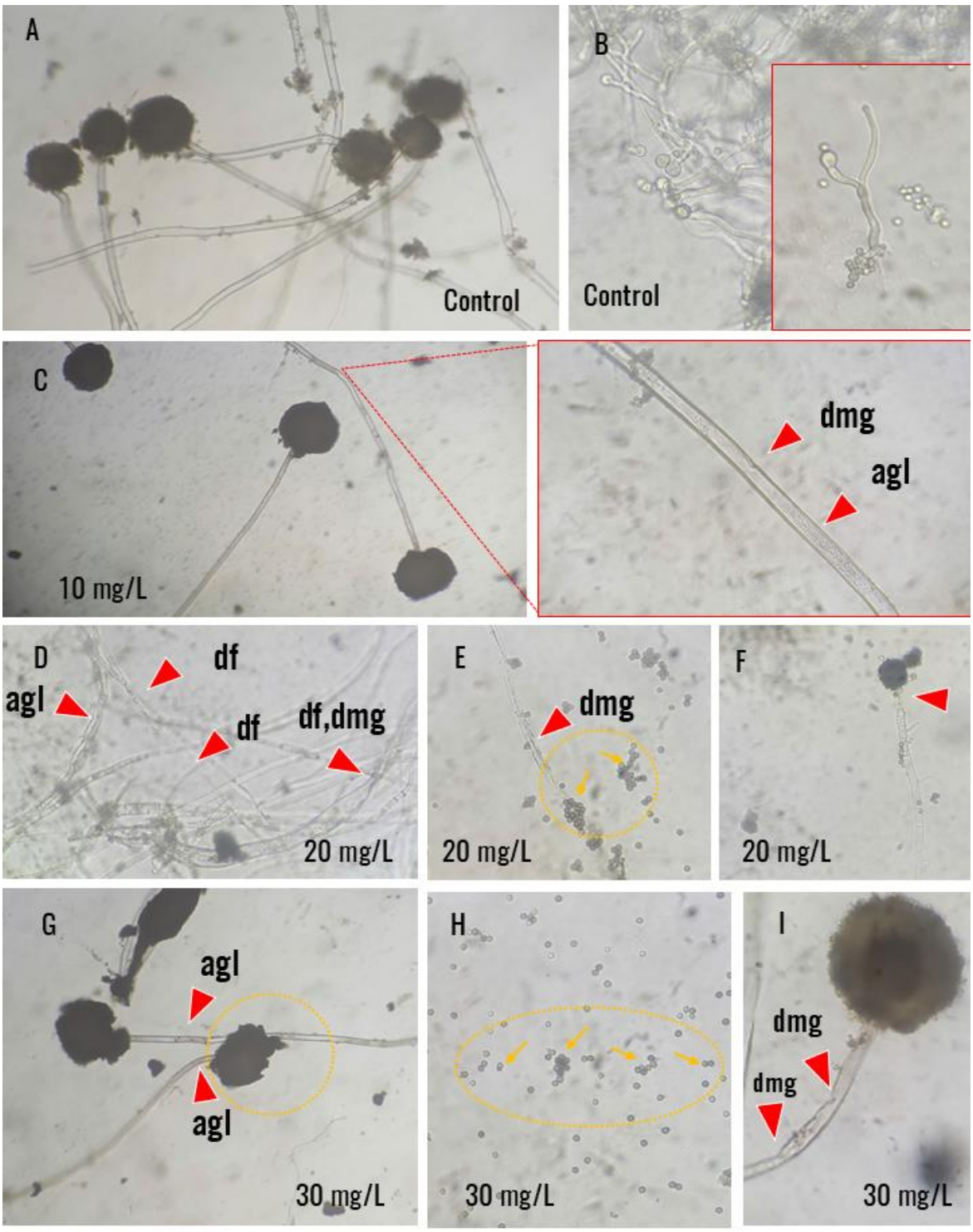
Hình 3.35. Những tác động vi thể của nano bạc ở các nồng độ khác nhau lên hình thái sợi nấm và bào tử *C. plantarum* (VNHUCC.NEL93) ở vật kính 40X. df: trạng thái biến dạng cấu trúc, teo nhỏ. Dicl: hiện tượng sự mất, suy giảm sắc tố, conj: hiện tượng tiếp hợp, lk: rò rỉ vật chất nội bào. Control: mẫu đối chứng không xử lý nano bạc. Các tam giác màu đỏ chỉ dấu cho các tổn thương ở sợi nấm. Các tam giác màu vàng chỉ dấu cho các tổn thương ở các bào tử.



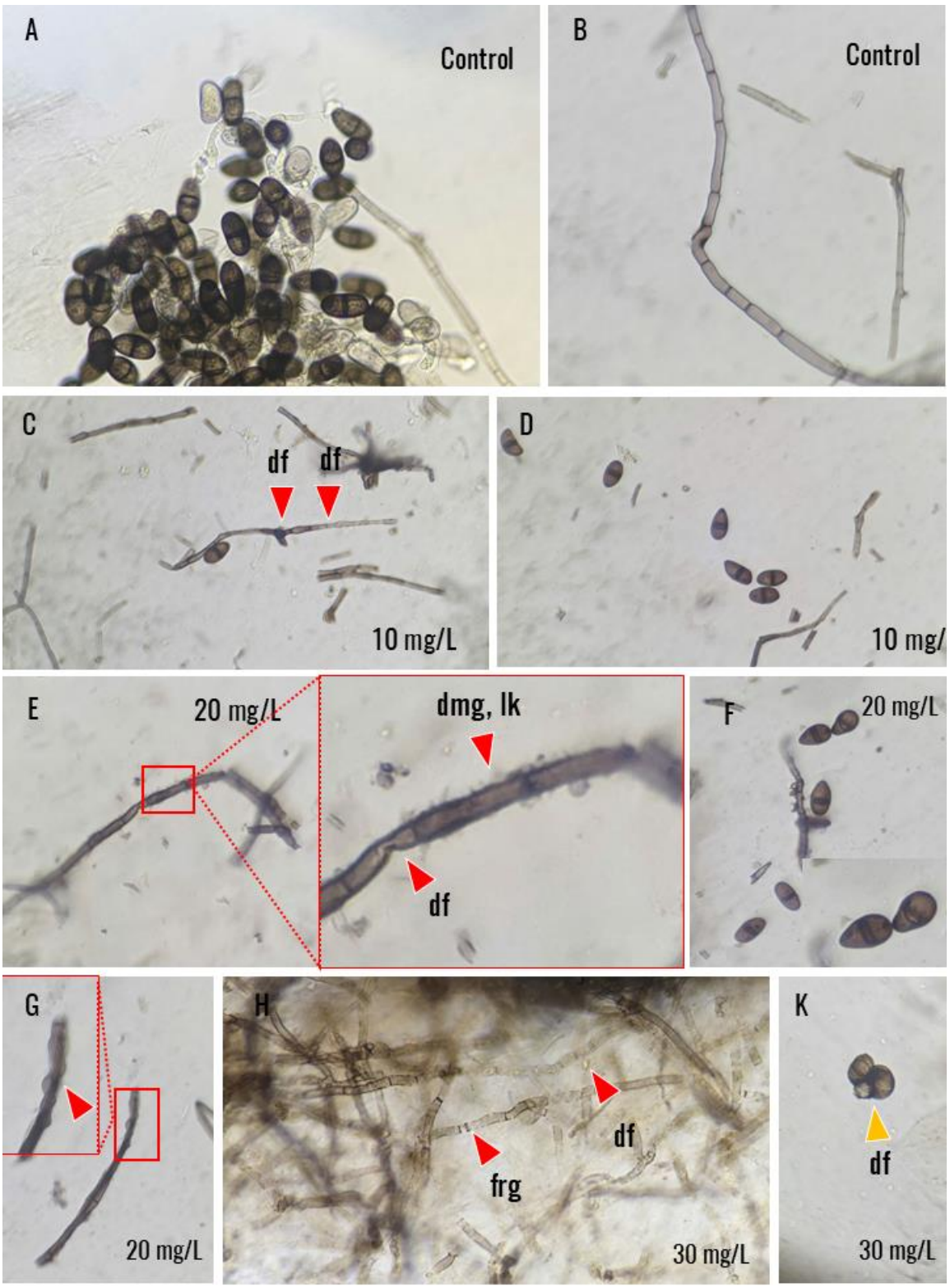
Hình 3.36. Những tác động vi thể của nano bạc ở các nồng độ khác nhau lên hình thái sợi nấm và bào tử *C. radicifoliigena* ở vật kính 40X. Tam giác màu vàng chỉ dấu cho những tác động ghi nhận ở bào tử, tam giác màu đỏ chỉ dấu cho những tác động của nano bạc đến sợi nấm. Control: mẫu đối chứng



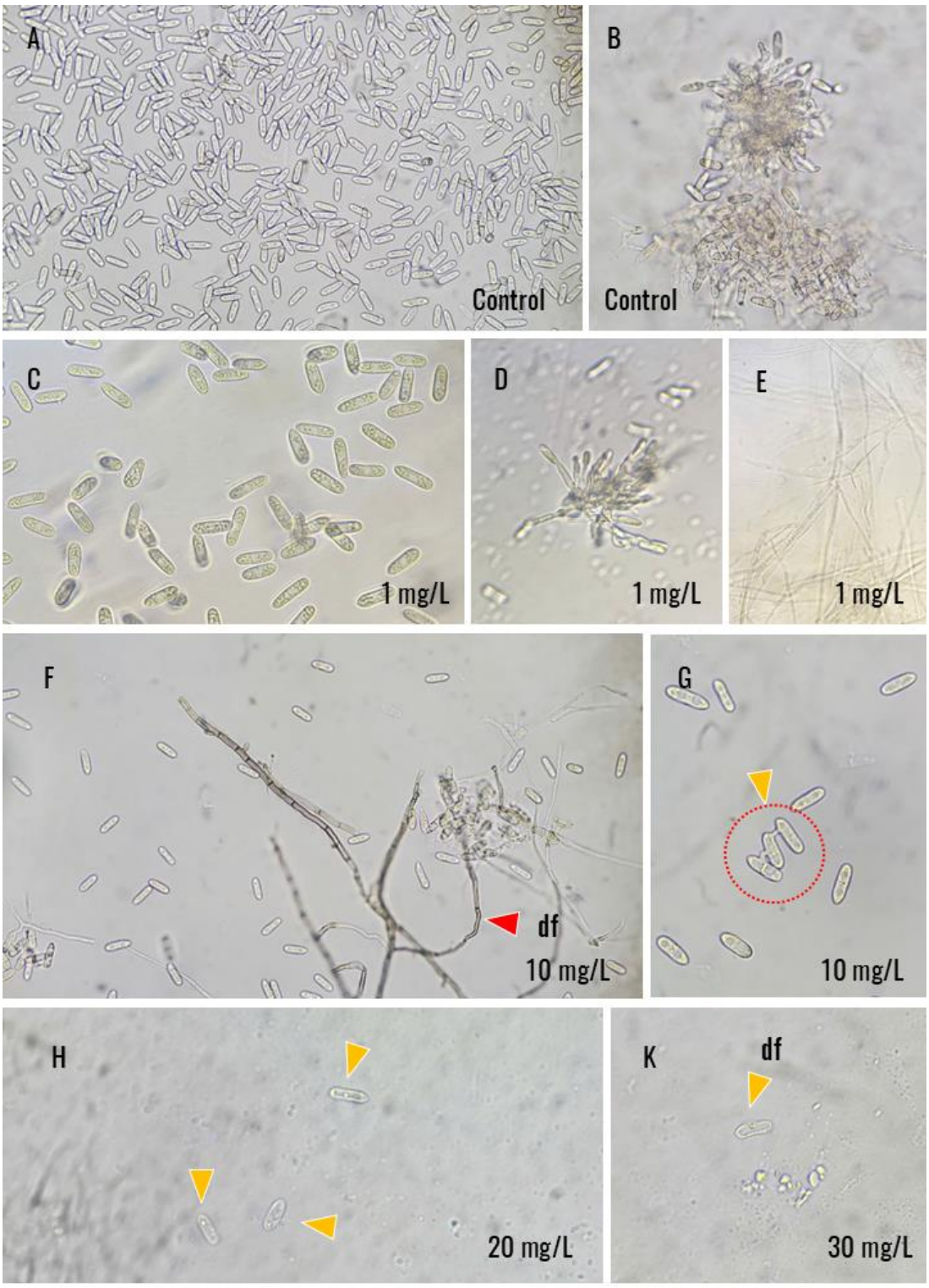
Hình 3.37. Những tác động của nano bạc ở các nồng độ khác nhau lên hình thái ở cấp độ vi thể của sợi nấm và bào tử *E. rostratum* (VNHUCC.NEL56) ở vật kính 40X. Ghi chú: Control: mẫu đối chứng; accm: hiện tượng đông tụ, Las: hiện tượng mất, thoái hóa vách ngăn; lk: hiện tượng rò rỉ vật chất nội bào; df: biểu thị cho trạng thái bị biến dạng cấu trúc, teo nhỏ. dmg: trạng thái bị tổn thương tạo thành những vết lõm. Các tam giác màu đỏ chỉ dấu cho các tổn thương ở sợi nấm. Các tam giác màu vàng chỉ dấu cho các tổn thương ở các bào tử.



Hình 3.38. Những tác động của nano bạc ở các nồng độ khác nhau lên hình thái ở cấp độ vi thể của sợi nấm và bào tử *A. niger* (VNHUCC.NEL160) ở vật kính 40X. Ghi chú: Control: mẫu đối chứng. df: biểu thị cho trạng thái bị biến dạng cấu trúc, teo nhỏ. dmg: biểu thị cho trạng thái bị tổn thương tạo thành những vết lõm, agl: trạng thái đông tụ vật chất nội bào. Các tam giác màu đỏ chỉ dấu cho các tổn thương ở sợi nấm. Các mũi tên màu vàng chỉ dấu cho các tổn thương đến các bào tử.



Hình 3.39. Những tác động của nano bạc ở các nồng độ khác nhau lên hình thái ở cấp độ vi thể của sợi nấm và bào tử *L. theobromae* (VNHUCC.NEL38) ở vật kính 40X. Control: mẫu đối chứng (Hình A, B). df: biến dạng cấu trúc, teo nhỏ. dmg: trạng thái bị tổn thương tạo thành những vết lõm, agl: trạng thái đông tụ vật chất nội bào; frg: hiện tượng phân mảnh. Các tam giác màu đỏ chỉ dấu cho các tổn thương ở sợi nấm. Các mũi tên màu vàng chỉ dấu cho các tổn thương ở các bào tử.



Hình 3.40. Những tác động của nano bạc ở các nồng độ khác nhau lên hình thái ở cấp độ vi thể của sợi nấm và bào tử *C. siamense* (VNHUCC.NEL10) ở vật kính 40X. Ghi chú: Control: mẫu đối chứng (Hình A, B). df: hiện tượng biến dạng cấu trúc, teo nhỏ. dmg: tổn thương tạo thành những vết lõm. Các tam giác màu đỏ chỉ dấu cho các tổn thương ở sợi nấm. Các tam giác màu vàng chỉ dấu cho các tổn thương ở các bào tử.

Bảng 3.4. Tác động vi thể của nano bạc đến bào tử và sợi nấm của tám chủng phân lập nấm đại diện

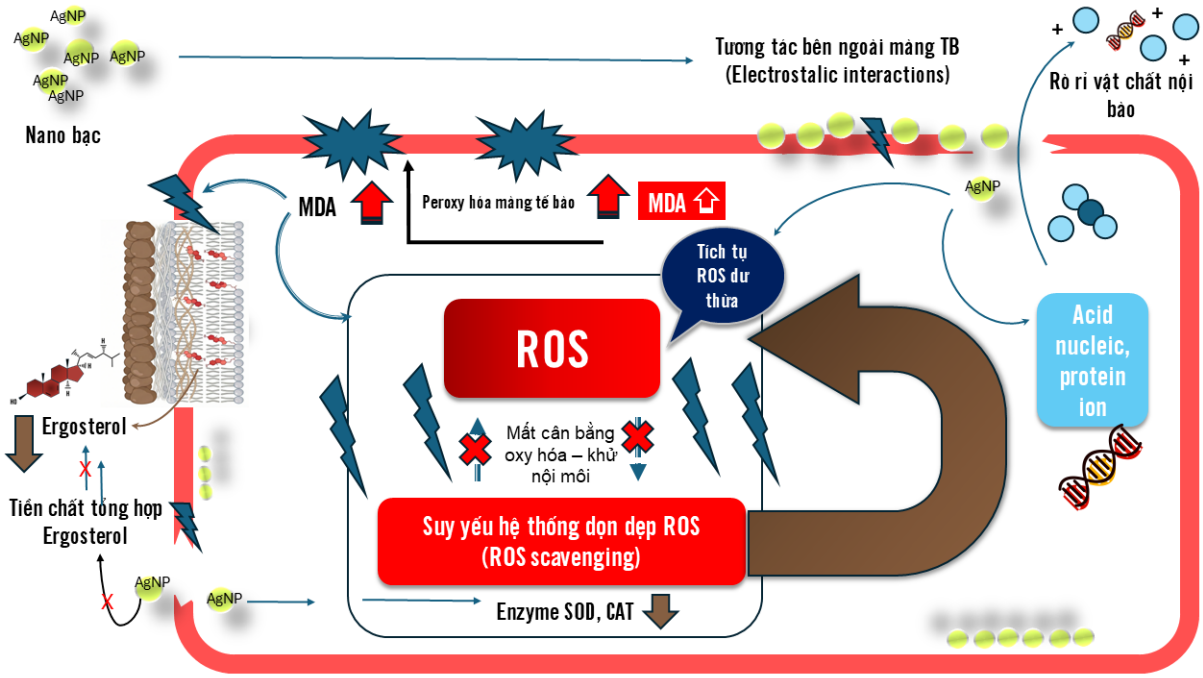
Phân lập thử nghiệm	Những tác động ghi nhận	
	Đối chứng (Control)	**Xử lý nano bạc**
C. plantarum (VNHUCC.NEL93)	Ở mẫu đối chứng, các bào tử của *Curvularia plantarum* vẫn giữ được các cấu trúc điển hình của loài: bào tử thẳng hoặc cong nhẹ, màu nâu nhạt. Cấu trúc điển hình với tế bào phụ thứ 3 phình to, có màu nâu đậm hơn ở phần phụ thứ 3 này cũng như 2 vách ngăn giới hạn của tế bào này so với các phần khác. Cuống bào tử (conidiophores) dài, màu nâu, có vách ngăn rõ ràng. Tế bào sinh bào tử (conidiogenous cells) mang các bào tử (Hình 3.35B) Thành sợi nấm trơn nhẵn, sợi nấm còn nguyên vẹn, không có dấu hiệu tổn thương (Hình 3.35B-C)	+ Ở nồng độ 10 mg/L, hiện tượng rò rỉ vật chất nội bào xảy ra với mức độ vừa phải, đi kèm với sự đông tụ tế bào chất trong sợi nấm. Khi tăng nồng độ lên 20 mg/L, mức độ rò rỉ vật chất nội bào càng gia tăng rõ rệt, không chỉ xuất hiện ở sợi nấm mà còn được ghi nhận ở cả bào tử. + Ở nồng độ 30 mg/L, ghi nhận sự thay đổi hình thái các bào tử điển hình của loài *C. plantarum.* Phần lớn các bào tử không còn trạng thái cong đặc trưng, suy giảm/mất sắc tố của các tế bào bào tử (đặc biệt là các tế bào trung gian), các cuống bào tử (Hình 3.35G). Các bào từ mới hình thành ở đầu ngọn – ghi nhận sự thoái hóa hoàn toàn (Hình 3.35H). Cuống sinh bào tử (conidiophres) mất sắc tố, ngắn, rời rạc. Sợi nấm đứt gãy, phân mảnh (chỉ ghi nhận những đoạn phân mảnh rời rạc trong vi trường). Quan sát được các lỗ rỗng rõ rệt trên thành sợi nấm (Hình 3.35L). Bên cạnh, cũng ghi nhận sự tích tụ các khối màu đen (chưa rõ) trên sợi nấm và cả cuống sinh bào tử.
C. verruculosa (VNHUCC.NEL74)	Ở mẫu đối chứng, các bào tử của *Curvularia verruculosa* vẫn giữ được các cấu trúc điển hình của loài này: Bào tử có xu hướng hơi "thẳng", hoặc chỉ cong nhẹ so với các loài khác trong chi *Curvularia.* Phần lớn bào tử có 4 tế bào (3 vách ngăn). Màu sắc bào tử từ nâu nhạt đến nâu, tuy nhiên các tế bào bào tử có xu hướng đồng màu, mặc dù tế bào thứ 3 vẫn thường có màu đậm hơn so với các tế bào còn lại của bào tử (Phụ lục Hình 4.12).	Chủng phân lập VNHUCC.NEL74 cho thấy sự nhạy cảm đáng kể với nano bạc + Ở nồng độ 1 mg/L: đã ghi nhận một số biến dạng bất thường ở hình thái sợi nấm (sự co thắt bất thường). Trong khi đó, bào tử không có các thay đổi đáng kể + Ở nồng độ 10 mg/L, sợi nấm thô ráp, xuất hiện nhiều "khối u". Phần lớn các bào tử quan sát được chỉ có 3 tế bào (2 vách ngăn). Bên cạnh đó, ghi nhận sự bám dính bất thường ở các góc phân nhánh của hệ sợi nấm (Phụ lục Hình 4.12C, D). + Ở nồng độ 20 mg/L: số lượng các "khối u" bất thường càng dày đặc hơn trên sợi nấm (Phụ lục Hình 4.12F). So với 10 mg/L, việc tiếp xúc với nano bạc 20 mg/L tiếp tục quan sát được sự suy giảm số lượng vách ngăn, một số trường hợp chỉ còn 1 vách ngăn. + Ở nồng độ 30 mg/L: Số lượng bào tử quan sát được rất thấp. Sợi nấm bị teo nhỏ nghiêm trọng. Sự suy giảm sắc tố rõ rệt được ghi nhận ở cả sợi nấm và bào tử của *C. verruculosa*. Ngoài ra, một số trường hợp quan sát thấy xu hướng tiếp hợp giữa các sợi nấm liền kề (Phụ lục Hình 4.12K).

Curvularia sp. (VNHUCC.NEL80)	Bào tử và sợi nấm trơn nhẵn, nguyên vẹn.	+ Ở nồng độ 0,1 - 10 mg/L: không có quá nhiều tác động được ghi nhận, ngoại trừ một số bào tử ghi nhận sự phình to bất thường của tế bào bào tử thứ 3 khi xử lý ở nồng độ 10 mg/L so với đối chứng. + Ở nồng độ 20 mg/L: suy giảm sắc tố, kích thước, số lượng bào tử (Phụ lục Hình 4.13D) + Ở nồng độ 30 mg/L: sợi nấm và bào tử bị biến dạng nghiêm trọng (Phụ lục Hình 4.13E,F)
Curvularia radicifoliigena (VNHUCC.NEL51)	Ở mẫu đối chứng, bào tử chủng phân lập VNHUCC.NEL51 có dạng bào tử thẳng hoặc cong nhẹ ở các tế bào trung gian. Phần lớn các bào tử bao gồm 4 tế bào (3 vách ngăn), các tế bào ở phần đầu, phần cuối nhạt màu hơn các tế bào còn lại. Cuống sinh bào tử (conidiophores) màu nâu nhạt, có vách ngăn, ở dạng đơn, ít phân nhánh	Chủng phân lập VNHUCC.NEL51 thể hiện mức độ nhạy cảm cao đối với nano bạc, với các ảnh hưởng được quan sát ở nồng độ từ 1 mg/L như sau: + Ở nồng độ 1 mg/L: Một số bào tử xuất hiện các "khối u" bất thường trên bề mặt. + Ở nồng độ 10 mg/L: Ngoài các "khối u" đã ghi nhận trên bào tử, còn quan sát thấy hiện tượng suy giảm sắc tố nâu đặc trưng của bào tử, khiến các tế bào bào tử có xu hướng đồng màu, giảm sự phân biệt màu sắc. + Ở các nồng độ cao hơn, cụ thể là 20 mg/L và 30 mg/L: Tỷ lệ bào tử mất (hoàn toàn) sắc tố tăng lên đáng kể. Đồng thời, sợi nấm bị biến dạng nghiêm trọng, co rút bất thường và xuất hiện nhiều "khối u" trên thành sợi nấm, làm bề mặt sợi nấm trở nên sần sùi hơn. Tương tự, các bào tử cũng ghi nhận các khối u và các vết tổn thương rõ rệt (Hình 3.36 E-K)
Exserohilum rostratum (VNHUCC.NEL56)	Sợi nấm có bề mặt nhẵn, có vách ngăn. Cuống sinh bào tử (conidiophores) to, đơn độc, thẳng, cong hoặc hơi uốn khúc ở phần đầu, có vách ngăn, không phân nhánh, hình trụ gần tròn, màu nâu ô liu nhạt đến nâu cánh gián.	+ Ở nồng độ 10 mg/L, ghi nhận một số biến dạng ở cấp độ nhẹ, tuy nhiên các cấu trúc tổng thể (bào tử, cuống sinh bào tử, sợi nấm) vẫn duy trì các đặc trưng như ban đầu. + Ở nồng độ 20 mg/L, sợi nấm của *E. rostratum* bị biến dạng với sự co thắt, teo nhỏ bất thường. Vật chất nội bào rò rỉ ra bên ngoài. Cấu trúc bào tử cũng ghi nhận sự biến đổi bất thường, một số ghi nhận mất vách ngăn ở phần đầu (Hình 3.37 D, E) + Ở nồng độ 30 mg/L, hệ sợi nấm bị biến dạng hoàn toàn. Bào tử cũng bị tổn thương, biến dạng, hiện tượng mất vách ngăn lớn hơn (một số trường hợp mất hoàn toàn). Bên cạnh đó, ghi nhận một số phần tế bào bào tử phình to bất thường, và một số ghi nhận sự tích tụ của các khối màu đen bên trong bào tử (Hình 3.37H, M)
Aspergillus niger (VNHUCC.NEL160)	Mang các cấu trúc điển hình được mô tả trước đây: đầu bào tử tỏa ra. Bào tử dạng hình tròn, không màu, hơi sần sùi. Cuống bào tử dài, trong suốt, không có vách ngăn Bọng hình cầu, màu đen (Hình 3.38A). Bên cạnh đó, không xử lý cho thấy quá trình nảy	Hiện tượng đông tụ tế bào chất được ghi nhận ở các nồng độ nano bạc từ 10 mg/L trở lên (bao gồm 10, 20 và 30 mg/L), đặc biệt là ở khu vực ngọn của đính bào đài. Ở nồng độ 10 mg/L, sợi nấm chỉ xuất hiện các tổn thương nhẹ. Khi tăng nồng độ xử lý, các biến dạng trên sợi nấm trở nên rõ rệt hơn, đồng thời mức độ tổn thương cũng gia tăng đáng kể. Cụ thể, tại nồng độ 30 mg/L, các vết lõm và lỗ thủng trên sợi nấm có thể dễ dàng quan sát được. Ngoài ra, các biểu hiện biến dạng như trương phình, lồi lõm bất thường và phân nhánh không điển

	mầm bào tử xảy ra bình thường, với nhiều đính bào đài được hình thành (Hình 3.38B)	hình cũng được ghi nhận. Màu sắc của các bào tử cũng thay đổi rõ rệt, một tỷ lệ lớn lớn các bào tử chuyển từ trạng thái không màu sang màu xám đậm. Khi nồng độ nano bạc tăng, các bọng hình cầu màu đen trên sợi nấm không còn duy trì được kích thước bình thường mà trở nên nhỏ hơn và méo mó, cho thấy sự tổn thương càng nghiêm trọng hơn ở nồng độ cao của nano bạc (Phụ lục Hình 4.14)
Lasiodiplodia theobromae (VNHUCC.NEL38)	Cả bào tử trưởng thành và non đều có hình bán trứng đến hình elip-hình trứng, với các đặc trưng như đỉnh tròn rộng và thuôn nhọn về phía gốc cụt. Các bào tử trưởng thành có màu nâu nhạt đến nâu sẫm với sự hình thành vân dọc điển hình, một vách ngăn. Trong khi các bào tử chưa trưởng thành trong suốt và không có vách ngăn. Số lượng bào tử quan sát được trong vi trường: lớn (Hình 3.39A)	Xử lý nano bạc ở nồng độ 10 mg/L, 20 mg/L và 30 mg/L gây ra những tác động và mức độ biến dạng khác nhau đến sợi nấm, bào tử của *L. theobromae.* + Ở nồng độ 10 mg/L: các sợi nấm đứt gãy, phân mảnh, một số ghi nhận biến dạng với các vết lõm. Hình thái bào tử trưởng thành có xu hướng thuôn nhọn hơn về một đầu so với đối chứng (tỷ lệ bào tử ghi nhận hiện tượng quan sát được: 40%). + Ở nồng độ 20 mg/L: các biến dạng nghiêm trọng hơn ghi nhận ở sợi nấm của *L. theobromae* với các vết lõm lớn và sâu hơn, bề mặt sợi nấm sần sùi hơn. Một số ghi nhận các khối u với các kích thước khác nhau trên thành sợi nấm (Hình 3.39F, G). Một số ghi nhận vật chất ngoại bào bất thường bám ở đầu các sợi nấm (Hình 3.39G). Bào tử thuôn nhọn hơn khi so sánh các bào tử xử lý nano bạc ở nồng độ 10 mg/L (gần như tam giác đều ở nửa phần trên của bào tử tính từ vách ngăn, tạo thành 1 đầu nhọn, 1 đầu tù). Xử lý với nano bạc 20 mg/L cũng ghi nhận sự gia tăng thể tích của một bào quan chưa xác định (không bào hoặc thể lipid, Hình 3.43F, mũi tên màu vàng) + Ở nồng độ 30 mg/L: hệ sợi nấm của *L. theobromae* bị biến dạng và phân mảnh hoàn toàn, bên cạnh rò rỉ vật chất nội bào cũng được ghi nhận (Hình 3.39H). Bào tử biến dạng nghiêm trọng, không còn nhận ra hình thái điển hình (Hình 3.39K). Đáng chú ý, không có bào tử chưa trưởng thành nào được ghi nhận khi xử lý với nano bạc ở nồng độ từ 10 mg/L trở lên.
Colletotrichum siamense (VNHUCC.NEL10)	Ở đối chứng không xử lý, bào tử *C. siamense* nguyên vẹn mang đầy đủ các trạng thái điển hình của loài được mô tả trước đây: là một tế bào, hình trụ, trong suốt, tròn ở cả hai đầu (một số hơi nhọn ở 1 đầu)	Các biến dạng và thay đổi của VNHUCC.NE10 được ghi nhận từ nồng độ 10 mg/L + Ở nồng độ 10 mg/L, thành sợi nấm dày hơn và quan sát các biến dạng bất thường. Số lượng trung bình bào tử quan sát được thấp hơn so với đối chứng. Một số quan sát ghi nhận sự tiếp hợp giữa các bào tử khi xử lý ở nồng độ 10 mg/L + Ở nồng độ 20 mg/L và 30 mg/L: số lượng bào tử có thể quan sát được rất thấp trong vi trường. Đặc biệt, ở nồng độ 30 mg/L, bào tử ghi nhận sự tổn thương nghiêm trọng với các "khoảng trống" (Hình 3.40K)

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

Mặc dù các hoạt động kháng nấm của các dạng nano khác nhau đã được nghiên cứu trước đây, nhưng cơ chế hoạt động chính xác của nano bạc vẫn chưa được làm sáng tỏ một cách đầy đủ. Mô hình giả thuyết về tác động của nano bạc trong nghiên cứu này được xây dựng dựa trên các phân tích số liệu về sinh khối và những bằng chứng biến đổi sinh hóa được ghi nhận. Ngoài ra, các phân tích bổ sung nhằm xác định mối tương quan giữa các nhân tố và sự suy giảm sinh khối nấm cũng được tiến hành và trình bày trong Phụ lục Hình 4.15. Phân tích này sử dụng tương quan Pearson giữa yếu tố mục tiêu (giá trị suy giảm sinh khối) và các yếu tố sinh hóa liên quan được thực hiện trong nghiên cứu như: giá trị OD_{260}, hàm lượng MDA, giá trị độ dẫn điện ngoại bào (EEC), hàm lượng ergosterol (ERG), và hoạt độ của 2 enzyme SOD và CAT. Kết quả phân tích cho thấy, dưới tác động của nano bạc ở hai nồng độ 5 mg/L và 30 mg/L, hai nhân tố liên quan chặt chẽ nhất đến sự suy giảm 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.

Sự thâm nhập vào tế bào nấm là bước đầu tiên trong các giai đoạn liên quan đến một số quá trình ức chế sự phát triển của nấm. Thành tế bào nấm gồm mạng lưới chitin, β-glucan, mannoprotein, lipid và các polysaccharide cấu trúc mang nhiều nhóm chức như carboxyl, amino và sulfhydryl (Ruiz-Herrera & Ortiz-Castellanos, 2019; Yoshimi et al., 2022). Các nghiên cứu trước đây chỉ ra rằng quá trình này xảy ra thông qua tương tác tĩnh

điện giữa bề mặt nấm được bao phủ bởi các nhóm carboxyl, amino và sulfhydryl và nano bạc (Mondéjar-López et al., 2023; Peng & Chen, 2024). Khi mật độ tương tác hoặc thời gian tiếp xúc nhất định, nano bạc có thể xâm nhập vào tế bào nấm thông qua các con đường chính: một là đi qua các khoảng hở trên màng tế bào bị biến tính và mất tính toàn vẹn khi tiếp xúc, hai là trực tiếp xâm nhập vào bên trong tế bào (endocytosis) hoặc qua các kênh ion. Thực tế, trong nghiên cứu này đã quan sát được những tổn thương, "khoảng trống", co rút bất thường trên bề mặt sợi nấm của tất cả 8 chủng phân lập đại diện thử nghiệm, cũng như sự rò rỉ hàm lượng vật chất nội bào. Tuy nhiên, sự tương tác ban đầu không nhất thiết gây phá hủy ngay lập tức cấu trúc thành tế bào. Một số trường hợp, có thể nano bạc chỉ "neo" tạm thời vào bề mặt ngoại bào hoặc ma trận ngoại bào (extracellular matrix-like material) mà chưa gây ra tổn thương hình thái rõ rệt (Parveen et al., 2023). Đây có thể là lý do cho các quan sát không ghi nhận tổn thương đáng kể ở các dãy nồng độ thấp hay thời gian tiếp xúc ngắn ở một số chủng phân lập.

Một khi nano bạc xâm nhập, tích lũy vào bên trong, các đáp ứng với nhân tố lạ - điều kiện "stress" được kích hoạt, dẫn đến các biến đổi sinh hóa, trong đó gốc tự do được hình thành và tham gia vào chuỗi phản ứng trung gian. MDA được xem là dấu hiệu chính để đánh giá mức độ tổn thương và phá hủy màng tế bào do quá trình oxy hóa (Ayala et al., 2014). Kết quả trong nghiên cứu cho thấy hàm lượng MDA trong sợi nấm xử lý với nano bạc tăng lên đáng kể, phản ánh mức độ gia tăng peroxy hóa lipid màng. Sự gia tăng MDA là chỉ thị gián tiếp cho thấy quá trình sinh các loại oxy phản ứng (ROS) đã được kích thích mạnh hơn dưới tác động của nano bạc. Ở trạng thái sinh lý bình thường, hệ thống chống oxy hóa nội bào (bao gồm các enzyme chủ chốt như superoxide dismutase (SOD) và catalase (CAT) duy trì cân bằng oxy hóa khử bằng cách khử hoặc vô hiệu hóa ROS, từ đó ngăn ngừa tổn thương. Tuy nhiên, dữ liệu sinh hóa trong nghiên cứu này ghi nhận hoạt tính của SOD và CAT biến động đáng kể khi tiếp xúc với nano bạc của các chủng phân lập. Những biến động ở các enzyme "dọn dẹp" ROS này đồng nghĩa hiệu suất loại bỏ ROS bị suy giảm, đặc biệt khi sự điều biến không đủ bù đắp tốc độ phát sinh ROS. Hậu quả là lượng ROS ngày càng gia tăng và tích lũy theo thời gian, dẫn đến phá vỡ sự cân bằng của hệ thống oxy hóa khử nội bào. Điều này phù hợp với các kết quả và cơ chế: sự cân bằng giữa sản xuất ROS và các hệ thống dọn dẹp, chẳng hạn như superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX), catalase (CAT) có thể bị mất cân bằng sau khi tiếp xúc với các hợp chất kim loại, dẫn đến thay đổi hàm lượng MDA trong tế bào vì MDA là dấu hiệu cho thấy mức độ cân bằng giữa ROS và các chất chống oxy hóa (Qian et al., 2011)

Sự tích lũy ROS kéo dài kéo theo chuỗi tổn thương thứ cấp: (i) thúc đẩy peroxy hóa phospholipid màng – được phản ánh rõ qua mức MDA tăng; (ii) tiềm ẩn nguy cơ gây tổn thương DNA (dù khía cạnh này chưa được khảo sát trực tiếp trong nghiên cứu hiện tại); (iii) làm suy giảm tính toàn vẹn cấu trúc – chức năng màng. Khi màng bị tổn thương, tính thấm không đặc hiệu tăng, dẫn đến rò rỉ các thành phần nội bào quan trọng (acid nucleic, protein, ion…), từ đó làm suy giảm chuyển hóa, ức chế tăng trưởng sợi nấm và có thể dẫn đến chết tế bào nếu stress kéo dài hoặc vượt ngưỡng chịu đựng.

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, bao gồm phân mảnh DNA (mặc dù không được khảo sát trong nghiên cứu này) và 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 tổn thương màng tế bào. Trong trạng thái này, tế bào nấm chịu áp lực kép, trạng thái "gọng kìm" từ các tác động ở cả phía nội bào và ngoại bào lên màng, gây ra biến dạng, tổn thương 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. Sự gia tăng tính thấm của màng tế bào cũng được xác minh trong nghiên cứu của Li et al. (2022) về ảnh hưởng của nano bạc lên tế bào của bốn tác nhân gây bệnh thối quả kiwi: *Alternaria alternata*, *Pestalotiopsis microspora*, *Diaporthe actinidiae* và *Botryosphaeria dothidea*. Một số nghiên cứu gần đây đã chỉ ra rằng nano bạc gây tổn thương đến thành tế bào của nhiều loại nấm, chẳng hạn như *C. albicans, Trichosporon asahii, Cladosporium halotolerans, Alternaria solani* (Ameen et al., 2023; Lara et al., 2015; Narware et al., 2023; Xia et al., 2016). Tương tự, khi đánh giá tác động của nano bạc đối với mầm bệnh ghẻ lúa mì *F. graminearum* cho thấy hình thái sợi nấm, bao gồm màng tế bào và thành tế bào, bị phá vỡ khi xử lý bằng nano bạc (Jian et al., 2022).

Một phát hiện nổi bật của nghiên cứu này là sự suy giảm đáng kể hàm lượng ergosterol đi kèm với hiện tượng rò rỉ vật chất nội bào và các dấu hiệu tổn thương cấu trúc thành – màng tế bào sợi nấm quan sát được dưới kính hiển vi. Ergosterol, một sterol đặc trưng của nấm (tương đương chức năng với cholesterol ở động vật nguyên sinh), hiện diện chủ yếu trong màng sinh chất, nơi nó duy trì tính toàn vẹn cấu trúc, điều hòa tính lưu động và góp phần vào khả năng thích nghi của nấm trước các áp lực môi trường (Dupont et al., 2012; Eliaš et al., 2024). Hơn nữa, quá trình sinh tổng hợp ergosterol liên quan mật thiết đến cơ chế kháng thuốc kháng nấm và độc lực của các chủng gây bệnh (Bauer et al., 2023; Slavin & Bach, 2022). Do đó, việc ghi nhận sự suy giảm ergosterol trong nghiên cứu này, cùng với bằng chứng rò rỉ nội bào và tổn thương hình thái, cung cấp một trục cơ

chế hợp lý: nano bạc gây rối loạn sinh tổng hợp hoặc tổ chức ergosterol, làm mất ổn định màng, dẫn đến các tác động tiêu cực tính toàn vẹn màng, dẫn đến sự rò rỉ vật chất nội bào ra ngoài môi trường nuôi cấy. Kết quả này củng cố vai trò của ergosterol như một điểm tấn công trung tâm và giải thích phần lớn các hiệu ứng ức chế quan sát được đối với tác nhân nấm gây bệnh. Các con đường này cũng được khẳng định với nhiều báo cáo cũng ghi nhận những biến đổi rõ rệt trong thành phần thành tế bào khi tiếp xúc với các hạt nano. Cụ thể, các hạt nano chitosan bao bọc tinh dầu từ *C. martinii* và nano kẽm oxid (ZnONP) gây giảm nồng độ ergosterol và chitin một cách phụ thuộc liều lượng (Kalagatur et al., 2018; Kumari et al., 2019). Nghiên cứu của Różalska et al. (2018) đã cung cấp bằng chứng cho thấy sự thay đổi tỷ lệ phosphatidylcholine/phosphatidylethanolamine trong màng tế bào, điều này dẫn đến mất tính toàn vẹn của màng và suy giảm chức năng tế bào. Đồng thời, các tế bào được xử lý bằng nano bạc có hàm lượng phospholipid C18:2 giảm, kèm theo sự ức chế quá trình khử bão hòa các acid béo. Các nanocomposite khác, chẳng hạn như vi cầu natri alginat MgO/CuO phối hợp với nystatin kháng nấm, cũng chứng minh khả năng gây tổn thương màng tế bào *C. albicans*, dẫn đến rò rỉ các thành phần nội bào. Nhiều nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng diện tích hoặc số lượng không bào trong tế bào tăng lên sau khi tiếp xúc với vật liệu nano (Wen et al., 2023; Wong et al., 2017). Hiện tượng này được cho là do mức độ tự thực nội bào (autophagy) tăng cao, một phản ứng sinh học nhằm chống lại các yếu tố bất lợi từ môi trường. Trong nghiên cứu này, hiện tượng tương tự (mặc dù không xác định chính xác đây là bào quan nào) cũng được ghi nhận ở 2 chủng VNHUCC.NEL56 (*E. rostratum*) và VNHUCC.NEL38 (*L. theobromae*).

Các báo cáo trước đây cũng chỉ ra ở cấp độ phân tử, các hạt nano tương tác với nhiều phân tử sinh học khác nhau và hình thành phức hợp, gây biến dạng cấu trúc, bất hoạt các protein xúc tác, đồng thời gây tổn thương acid nucleic như đứt gãy DNA. Ngoài tác động của hạt, một số báo cáo cũng chỉ ra rằng ion bạc (Ag^+) giải phóng từ nano bạc có thể tương tác với nhóm thiol của protein và enzyme màng, làm bất hoạt chức năng, và có khả năng tương tác với acid nucleic, góp phần tăng ROS và tổn thương phân tử. Sự tương tác tĩnh điện giữa nano bạc mang điện tích dương và bề mặt tế bào mang điện tích âm có thể làm rối loạn lớp kép lipid, phá vỡ thành–màng và gây thoát ion nội bào, dẫn đến chết tế bào trong điều kiện stress kéo dài. (Abdel-Hafez et al., 2016).

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

- Cần tiếp tục thu thập và xác định đặc điểm sinh học của các chủng phân lập chưa đủ dữ liệu để định danh loài gây bệnh trên cây sen, 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 này. 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 nhằm xác định các nguy cơ khi sử dụng tại các quy mô lớn như đồng ruộng, ao hồ.

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.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tài liệu Tiếng Việt

Anh, Đ. T. L., Hằng, N. T. H., & Đôn, L. Đ. (2019). Đặc điểm hình thái, sinh học và phân tử của nấm *Colletotrichum* spp. gây bệnh thán thư trên cây mãng cầu ta (*Annona squamosa* L.) tại tỉnh Bình Thuận và Tây Ninh. *Tạp chí Bảo vệ thực vật*, *2*, 25–33. http://www.cabicompendium.org/cpc

Châu, N. H., Bưu, N. Q., & Hà, Đ. Q. (2020). Nghiên cứu khả năngức chế nấm gây bệnh trên cây thanh long của vật liệu hỗn hợp nano bạc/đồng. *Tạp chí Phân tích Hóa, Lý và Sinh học*, *25*(1), 105–109.

Châu, N. H., Thúy, N. T., Hiền, Đ. T., Mai, H. T., Quang, N. V., Long, P. H., Ngọc, N. T. B., & Thêu, T. T. P. (2017). Nghiên cứu khả năng ức chế nấm gây bệnh trên cây đậu tương của vật liệu nano Ag/Bentonite. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, *15*, 349–357.

Cường, H. V., Hà, T. T. T., Thảo, L. Q., Thúy, H. T. T., & Vinh, L. V. (2023). Xác định nguyên nhân gây bệnh tàn lụi cây sen tại Thừa Thiên Huế năm 2022. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam, 21*(5), 529–542. www.vnua.edu.vn

Danh, C. Đ., Tâm, L. T., Bình, T. V., Ngân, T. T., Quang, L. Đ., Quang, H. Đ., Cường, N. C., Hà, N. T., Hiệp, L. T. T., Chi Trần Phương, & Ngân, D. T. (2024). Research on production and testing of antifungal activity *Phytophthora* spp. causing fruit rot and *Colletotrichum* spp. causing anthracnose of silver nanoparticles, chitosan and turmeric resin bioproducts. *Tạp chí Khoa học Công nghệ Việt Nam*, *66*(1), 42–49. https://doi.org/10.31276/VJST.66(1).42-49

Hạnh, C. H., Nhung, N. H., Hương, T. T., Chi, T. Q., Khánh, P. D., Alexandrovna, K. L., Petrovich, S. V., & Sơn, H. A. (2020). Hoạt tính kháng nấm của nano bạc đối với một số nấm gây bệnh trên cây trồng trong điều kiện *in vitro*. *Tạp chí Khoa học Công nghệ Việt Nam*, *62*(9), 42–47. https://vjol.info.vn/index.php/most/article/view/51866/42719

Hồng, N. T. T., Phương, N. T. X., Thư, Đ. N. A., An, N. L., & Kiên, C. T. (2024). Xác định tác nhân gây bệnh thối cuống lá sen tại Huyện Tháp Mười, Tỉnh Đồng Tháp. *Tạp chí Bảo vệ thực vật*, *6*, 3–10. https://ppri.org.vn/so-6-a202

Hưng, N. D., Cường, H. V., & Chúng Lằm, H. (2018). Phát hiện các loài *Colletotrichum* gây bệnh thán thư ớt bằng phản ứng chuỗi polymerase. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, *16*(12), 1025–1038. www.vnua.edu.vn

Linh, N. V. M., Thảo, P. T. H., Liên, N. T. H., Vân, Đ. T. H., Hiếu, N. V., Vân, N. T., & Châu, N. H. (2022). Khả năng ức chế nấm *Lasiodiplodia theobromae* gây bệnh thối cuống trên xoài của nano bạc và đồng. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, *19*(4), 735–740. https://doi.org/10.15625/1811-4989/17108

Linh, P. G., Quốc, V. H. V., Long, D. T., & Thi, N. P. A. (2022). Khảo sát khả năng kháng nấm *Neoscytalidium* sp. gây bệnh đốm nâu trên cây thanh long bằng hạt nano (Ag, ZnO) và tinh dầu (cam, sả, bưởi). *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ. 58*, 250–259. https://doi.org/10.22144/ctu.jvn.2022.144

Long, L. T., Tiền, N. T. T., Huyền, N. T. Đ., & Trang, N. H. (2024). Khả năng kháng nấm *Colletotrichum* sp. gây bệnh thán thư trên xoài sau thu hoạch của dịch ngoại bào *Streptomyces murinus* NARZ. *Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Nông nghiệp và phát triển nông thôn. 133*(3B), 144–153. https://doi.org/10.26459/hueunijard.v133i3b.7442

Luân, L. Q., Uyên, N. H. P., & Giang, P. H. (2014). Nghiên cứu hiệu ứng kháng nấm *Phytophthora capsici* gây bệnh chết nhanh ở cây hồ tiêu của chế phẩm nano bạc - chitosan chế tạo bằng phương pháp chiếu xạ. *Tạp chí Sinh học*, *36*, 152–157.

Nga, H. T., Huệ, H. T. N., & Nghĩa, L. T. (2017). Nghiên cứu đa dạng di truyền nguồn gen cây sen (*Nelumbo nucifera* Geartn.) bảo tồn tại Trung tâm tài nguyên thực vật. *Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, *81*(8), 41–46.

Ngọc, N. T. B., Châu, N. H., Tin, T. X., Nhất, L. M., Dung, P. T., Hường, N. T. T., & Hưng, Đ. D. (2015). Nghiên cứu hiệu quả của hạt nano bạc ức chế một số chủng nấm thực vật *(Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum, Rhizoctonia sonali* và *Corynespora cassiicola*) trong phòng thí nghiệm. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, *5*(59), 80–87.

Phúc, L. K., Đông, T. T. H., & Giang, N. T. (2021). Đặc điểm nông sinh học và diễn biến về mật độ của một số loài sâu hại chính trên các giống sen (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) tại Thừa Thiên Huế. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn*, *6*, 21–28.

Tâm, Đ. T. T., Hiền, Đ. T., & Huyền, N. T. (2024). Phân lập và nghiên cứu đặc điểm sinh học của chủng nấm *Lasiodiplodia theobromae* gây bệnh chết khô cành trên nho tại Hà Nội và Hưng Yên. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, *22*(1), 58–69. www.vnua.edu.vn

Thái, Đ. H., & Tường, L. M. (2016). Khảo sát khả năng đối kháng của xạ khuẩn đối với nấm *Phytophthora* sp. gây bệnh cháy lá, thối thân trên cây sen. *Tạp chí Khoa Học Trường Đại Học Cần Thơ*, *3*, 20–27. https://doi.org/10.22144/ctu.jsi.2016.066

Thảnh, H. V., Tuất, N. V., Hoạt, T. X., & Thảo, L. T. (2018). Một số đặc điểm sinh học của nấm *Colletotrichum* spp. gây bệnh thán thư trên cây cà phê chè và hiệu lực của một số thuốc ức chế sự phát triển của nấm trên môi trường nhân tạo. *Tạp chí Khoa Học và Công Nghệ Nông Nghiệp Việt Nam*, *8*(93), 75–79.

Thao, L. Đ., Hiền, L. T., Liêm, N. V., Trang, T. T. T., Tú, T. T., Thanh, Đ. T., Hưng, N. H., & Trịnh, P. T. (2021). Một số nghiên cứu về bệnh chết ngược cành sầu riêng tại Tây Nguyên. *Tạp chí Bảo vệ Thực vật*, *5*, 28–33.

Toàn, L. T., & Nam, N. H. (2021). Hiệu quả của dịch trích thực vật đối với nấm *Curvularia* sp. gây bệnh vết nâu trên lúa. *Tạp chí Khoa học Trường Đại Học Cần Thơ, 57*(5), 177–184. https://doi.org/10.22144/ctu.jvn.2021.154

Toàn, L. T., & Sử, T. (2024). Thành phần nấm gây lem lép hạt lúa tại hòn đất – Kiên Giang và khảo sát hiệu quả của một số dịch trích thực vật đối với nấm *Curvularia* sp. và *Fusarium* sp. hại hạt lúa. *AGU International Journal of Sciences-2020*, *24*(1), 68–75.

Trang, N. T. Q. (2021). *Nghiên cứu đặc điểm thực vật học, sinh lý, hóa sinh và nhân giống in vitro một số giống sen (Nelumbo nucifera Gaertn.) trồng ở Thừa Thiên Huế*. Luận án Tiến sĩ, Đại học Huế.

Trang, N. T. Q., Hồng, H. T. K., & Hương, V. T. M. (2017). Điều tra thực trạng sản xuất cây sen (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) ở tỉnh Thừa Thiên Huế. *Hội Thảo Khoa Học Sinh Lý Thực Vật Toàn Quốc Lần 2 (Sinh lý thực vật Ứng Dụng Trong Nông Nghiệp Công Nghệ Cao)*, *1*, 121–130.

Trung, N. Q., Xuân, B. T., & Ngọc Hòa, N. (2019). Phân lập và nghiên cứu đa dạng di truyền nấm *Curvularia lunata* gây bệnh lem lép hạt lúa. *Tạp chí Bảo vệ thực vật*, *5*, 45–49.

Trường, N. V., & Vương, L. M. (2020). Bước đầu nghiên cứu bệnh thối thân, thối củ sen ở Thừa Thiên Huế. *Hội thảo quốc gia bệnh hại thực vật Việt Nam*, 169–175.

Tùng, H. T., Huy, N. P., Nam, N. B., Luận, V. Q., Hiền, V. T., Phượng, T. T. B., & Nhựt, D. T. (2016). Tác động của nano bạc lên khả năng tăng trưởng của cây cúc trong hệ thống vi thủy canh. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, *14*(3), 461–471.

Tường, L. M., & Quí, N. H. (2016). Xác định tác nhân gây bệnh thán thư cây sen (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) ở một số tỉnh Đồng bằng Sông Cửu Long. *Hội thảo quốc gia bệnh hại thực vật Việt Nam*, 150–164.

Tường, L. M., Triển, N. P., & Việt, T. X. (2022). Khả năng đối kháng nấm *Colletotrichum* sp. gây bệnh thán thư hạt sen của một số chủng xạ khuẩn. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, 34–40.

Uyên, Đ. T. K., Phến, T. V., & Hòa, N. V. (2018). Xác định nấm *Colletotrichum truncatum* gây bệnh thán thư trên thanh long và hiệu quả của dịch trích thảo mộc lên sự phát triển của nấm. *Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, *86*, 83–89.

Uyên, Đ. T. K., Tường, L. T., & Văn Hòa, N. (2022). Nghiên cứu xác định nấm *Phomopsis durionis* và *Lasiodiplodia theobromae* gây bệnh cháy lá trên cây sầu riêng. *Tạp chí Khoa Học và Công Nghệ Nông Nghiệp Việt Nam*, *5*(138), 57–60.

Tài liệu Tiếng Anh

Abbott, W. S. (1925). A Method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, *18*(2), 265–267. https://doi.org/10.1093/jee/18.2.265a

AbdElfatah, H. A. S., Sallam, N. M. A., Mohamed, M. S., & Bagy, H. M. M. K. (2021). *Curvularia lunata* as new causal pathogen of tomato early blight disease in Egypt. *Molecular Biology Reports*, *48*(3), 3001–3006. https://doi.org/10.1007/s11033-021-06254-8

Abdel-Hafez, S. I. I., Nafady, N. A., Abdel-Rahim, I. R., Shaltout, A. M., Daròs, J. A., & Mohamed, M. A. (2016). Assessment of protein silver nanoparticles toxicity against pathogenic *Alternaria solani*. *3 Biotech*, *6*(2). https://doi.org/10.1007/s13205-016-0515-6

Abdel-Rahman, T., El-Morsy, S. A., & Halawa, A. (2020). Occurrence of stem and leaf spots on lucky bamboo (*Dracaena sanderiana* hort. ex. mast.) plants in vase and its cure with safe means. *Journal of Plant Protection and Pathology*, *11*(12). https://doi.org/10.21608/jppp.2020.170648

Abdollahzadeh, J., Javadi, A., Goltapeh, E. M., Zare, R., & Phillips, A. J. L. (2010). Phylogeny and morphology of four new species of *Lasiodiplodia* from Iran. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, *25*. https://doi.org/10.3767/003158510X524150

Abo-Shama, U. H., El-Gendy, H., Mousa, W. S., Hamouda, R. A., Yousuf, W. E., Hetta, H. F., & Abdeen, E. E. (2020). Synergistic and antagonistic effects of metal nanoparticles in combination with antibiotics against some reference strains of pathogenic microorganisms. *Infection and Drug Resistance*, *13*. https://doi.org/10.2147/IDR.S234425

Adam, R. Z., & Khan, S. B. (2022). Antimicrobial efficacy of silver nanoparticles against *Candida albicans*. *Materials*, *15*(16), 5666. https://doi.org/10.3390/ma15165666

Addrah, M. E., Shi, B., Li, H., Ningning, Y., Zhang, J., & Zhao, J. (2021). First report of sunflower leaf spot caused by *Curvularia lunata* in China. *Journal of Plant Pathology*, *103*(4), 1363. https://doi.org/10.1007/s42161-021-00929-8

Admasu, W., Sintayehu, A., Gezahgne, A., & Terefework, Z. (2023). Survey and identification of coinfecting Botryosphaeriales causing stem canker diseases of *Eucalyptus camaldulensis* in Ethiopia. *Journal of Arid Environments*, *210*, 104921. https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2022.104921

Adomako, J., Larbi-Koranteng, S., Bukari, T. A., & Danso, Y. (2025). Pathogenic variability among Curvularia species causing brown leaf spot disease of rice. *Journal of Plant Pathology*, *107*(1), 243–249. https://doi.org/10.1007/s42161-024-01803-z

Aebi, H. (1984). Oxygen Radicals in Biological Systems. *Methods in Enzymology*, *105*(1947), 121–126. https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3

Agnihotri, S., Mukherji, S., & Mukherji, S. (2013). Immobilized silver nanoparticles enhance contact killing and show highest efficacy: Elucidation of the mechanism of bactericidal action of silver. *Nanoscale*, *5*(16), 7328. https://doi.org/10.1039/c3nr00024a

Agnihotri, S., Mukherji, S., & Mukherji, S. (2014). Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5-100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. *RSC Advances*, *4*(8), 3974–3983. https://doi.org/10.1039/c3ra44507k

Ahmadpour, A., Heidarian, Z., Ghosta, Y., Alavi, Z., Alavi, F., Manamgoda, D. S., Karunarathna, S. C., & Rampelotto, P. H. (2025). Morphological and molecular characterization of *Curvularia* species from Iran, with description of two novel species and two new records. *Mycologia*, *117*(2), 261–285. https://doi.org/10.1080/00275514.2025.2450754

Ahmadpour, A., Karami, S., Heidarian, Z., & Javan-Nikkhah, M. (2013). *Exserohilum rostratum* causing sugarcane leaf spot in Iran. *Australasian Plant Disease Notes*, *8*(1), 97–99. https://doi.org/10.1007/s13314-013-0105-y

Ahmed, N. E., Adam, Y. S., & Eltayb, S. M. (2023). Leaf blight: A new disease of *Xanthium strumarium* caused by *Exserohilum rostratum* in Sudan. *University of Khartoum Journal of Agricultural Sciences*, *17*(3). https://doi.org/10.53332/uofkjas.v17i3.1949

Ahmed, T., Noman, M., Shahid, M., Hameed, A., & Li, B. (2023). Pathogenesis and disease control in crops: The Key to global food security. *Plants*, *12*(18), 3266. https://doi.org/10.3390/plants12183266

Aiello, D., Guarnaccia, V., Costanzo, M. B., Leonardi, G. R., Epifani, F., Perrone, G., & Polizzi, G. (2022). Woody canker and shoot blight caused by Botryosphaeriaceae and Diaporthaceae on mango and litchi in Italy. *Horticulturae*, *8*(4). https://doi.org/10.3390/horticulturae8040330

Aktar, M., & Shamsi, S. (2015). Blight of two species of marigold (Tagetes) caused by *Aspergillus fumigatus* Fresenius. *Bangladesh Journal of Plant Pathology*, *31*(2), 1–9.

Alam, M. W., Rehman, A., Ahmad, S., Sarwar, M., Nawaz, A., Khan, S. M., Ali, S., Aslam, S., & Mannan, A. (2020). First report of *Nigrospora sphaerica* causing leaf spot of date palm in Pakistan. *Journal of Plant Pathology*, *102*(1), 223. https://doi.org/10.1007/s42161-019-00360-0

Alborés, S., Estevez, M. B., Raffaelli, S., & Sanguiñedo, P. (2023). Microbial silver nanoparticles: Synthesis, characterization and applications. In *Applications of Silver Nanoparticles*.

Alcazar-Fuoli, L., & Mellado, E. (2012). Ergosterol biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*: Its relevance as an antifungal target and role in antifungal drug resistance. *Frontiers in Microbiology*, *3*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00439

Al-Nadabi, H., Maharachchikumbura, S. S. N., Al-Gahaffi, Z. S., Al-Hasani, A. S., Velazhahan, R., & Al-Sadi, A. M. (2020). Molecular identification of fungal pathogens associated with leaf spot disease of date palms (*Phoenix dactylifera*). *All Life*, *13*(1), 578–597. https://doi.org/10.1080/26895293.2020.1835740

Alves, A., Crous, P. W., Correia, A., & Phillips, A. J. L. (2008). Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. *Fungal Diversity*, *28*, 1–13. http://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/28-1.pdf

Al-Zubaidi, S., Al-Ayafi, A., & Abdelkader, H. (2019). Biosynthesis, characterization and antifungal activity of silver nanoparticles by *Aspergillus niger* isolate. *Journal of Nanotechnology Research*, *01*(01). https://doi.org/10.26502/jnr.2688-8521002

Ameen, F., Al-Homaidan, A. A., Al-Sabri, A., Almansob, A., & AlNAdhari, S. (2023). Anti-oxidant, anti-fungal and cytotoxic effects of silver nanoparticles synthesized using marine fungus *Cladosporium halotolerans*. *Applied Nanoscience*, *13*(1), 623–631. https://doi.org/10.1007/s13204-021-01874-9

Antony, S., Billones-Baaijens, R., Stodart, B. J., Steel, C. C., Lang, M. D., & Savocchia, S. (2023). Incidence and distribution of Botryosphaeriaceae species associated with dieback in walnut orchards in Australia. *Plant Pathology*, *72*(3), 610–622. https://doi.org/10.1111/ppa.13685

Ariyawansa, H. A., Tsai, I., Wang, J. Y., Withee, P., Tanjira, M., Lin, S. R., Suwannarach, N., Kumla, J., Elgorban, A. M., & Cheewangkoon, R. (2021). Molecular phylogenetic diversity and biological characterization of *Diaporthe* species associated with leaf spots of *Camellia sinensis* in Taiwan. *Plants*, *10*(7), 1434. https://doi.org/10.3390/plants10071434

Armand, A., & Jayawardena, R. S. (2024). Morphomolecular identification and pathogenicity of *Colletotrichum* species associated with avocado anthracnose in Northern Thailand. *Plant Pathology*, *73*(1), 186–197. https://doi.org/10.1111/ppa.13792

Arthington-Skaggs, B. A., Jradi, H., Desai, T., & Morrison, C. J. (1999). Quantitation of ergosterol content: Novel method for determination of fluconazole susceptibility of *Candida albicans*. *Journal of Clinical Microbiology*, *37*(10). https://doi.org/10.1128/jcm.37.10.3332-3337.1999

Atiq, M., Naeem, I., Sahi, S. T., Rajput, N. A., Haider, E., Usman, M., Shahbaz, H., Fatima, K., Arif, E., & Qayyum, A. (2020). Nanoparticles: a safe way towards fungal diseases. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, *53*(17–18), 781–792. https://doi.org/10.1080/03235408.2020.1792599

Ayala, A., Muñoz, M. F., & Argüelles, S. (2014). Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2014*(1), 360438. https://doi.org/10.1155/2014/360438

Babele, P. K., Singh, A. K., & Srivastava, A. (2019). Bio-inspired silver nanoparticles impose metabolic and epigenetic toxicity to *Saccharomyces cerevisiae*. *Frontiers in Pharmacology*, *10*. https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01016

Baćmaga, M., Wyszkowska, J., Borowik, A., & Kucharski, J. (2022). Effects of tebuconazole application on soil microbiota and enzymes. *Molecules*, *27*(21), 7501. https://doi.org/10.3390/molecules27217501

Bandara, K. M. C. S., Ferdinandez, H. S., Manamgoda, D. S., & Daundasekera, W. A. M. (2022). The first report of *Curvularia senegalensis* causing leaf and floral spots on *Zinnia elegans* in Sri Lanka. *Ceylon Journal of Science*, *51*(1), 73. https://doi.org/10.4038/cjs.v51i1.7981

Bao, H., Yu, X., Xu, C., Li, X., Li, Z., Wei, D., & Liu, Y. (2015). New toxicity mechanism of silver nanoparticles: Promoting apoptosis and inhibiting proliferation. *PLoS ONE*, *10*(3), e0122535. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122535

Bărbieru, O.-G., Dimitriu, L., Călin, M., Răut, I., Constantinescu-Aruxandei, D., & Oancea, F. (2019). Plant biostimulants based on selenium nanoparticles biosynthesized by *Trichoderma* strains. *Priorities of Chemistry for a Sustainable Development-Priochem*, 95. https://doi.org/10.3390/proceedings2019029095

Barros, D., Pradhan, A., Pascoal, C., & Cássio, F. (2021). Transcriptomics reveals the action mechanisms and cellular targets of citrate-coated silver nanoparticles in a ubiquitous aquatic fungus. *Environmental Pollution*, *268*, 115913. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115913

Bates, M. G., Risselada, M., Peña-Hernandez, D. C., Hendrix, K., & Moore, G. E. (2024). Antibacterial activity of silver nanoparticles against *Escherichia coli* and methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* is affected by incorporation into carriers for sustained release. *American Journal of Veterinary Research*, *85*(3), 1–11. https://doi.org/10.2460/ajvr.23.10.0229

Bauer, K., Rafael, B., Vágó, B., Kiss-Vetráb, S., Molnár, A., Szebenyi, C., Varga, M., Szekeres, A., Vágvölgyi, C., Papp, T., & Nagy, G. (2023). Characterization of the Sterol 24-C-methyltransferase genes reveals a network of alternative sterol biosynthetic pathways in *Mucor lusitanicus*. *Microbiology Spectrum*, *11*(3). https://doi.org/10.1128/spectrum.00315-23

Bayman, P., Baker, J. L., & Mahoney, N. E. (2002). *Aspergillus* on tree nuts: Incidence and associations. *Mycopathologia*, *155*(3), 161–169. https://doi.org/10.1023/A:1020419226146

Berbee, M. L., Pirseyedi, M., & Hubbard, S. (1999). Cochliobolus phylogenetics and the origin of known, highly virulent pathogens, inferred from ITS and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. *Mycologia*, *91*(6), 964. https://doi.org/10.2307/3761627

Bezerra, J. D. P., Crous, P. W., Aiello, D., Gullino, M. L., Polizzi, G., & Guarnaccia, V. (2021). Genetic diversity and pathogenicity of botryosphaeriaceae species associated with symptomatic citrus plants in Europe. *Plants*, *10*(3), 242. https://doi.org/10.3390/plants10030492

Bhushan, B., Jung, Y. C., & Koch, K. (2009). Self-cleaning efficiency of artificial superhydrophobic surfaces. *Langmuir*, *25*(5), 3240–3248. https://doi.org/10.1021/la803860d

Bhuyan, B., Saha, S., Sarma, A., Dutta, A. K., Tayung, K., & Kakati, R. P. (2024). First report of *Curvularia dactylocteniicola* causing leaf spot disease of *Vigna unguiculata* in India. *New Disease Reports*, *50*(2). https://doi.org/10.1002/ndr2.70009

Bian, C., Kusuya, Y., Sklenář, F., D'hooge, E., Yaguchi, T., Ban, S., Visagie, C. M., Houbraken, J., Takahashi, H., & Hubka, V. (2022). Reducing the number of accepted species in *Aspergillus* series Nigri. *Studies in Mycology*, *102*(1), 95–132. https://doi.org/10.3114/sim.2022.102.03

Bouafia, A., Laouini, S. E., Ahmed, A. S. A., Soldatov, A. V., Algarni, H., Chong, K. F., & Ali, G. A. M. (2021). The recent progress on silver nanoparticles: Synthesis and electronic applications. *Nanomaterials*, *11*(9), 2318. https://doi.org/10.3390/nano11092318

Bragard, C., Di Serio, F., Gonthier, P., Jaques Miret, J. A., Justesen, A. F., MacLeod, A., Magnusson, C. S., Campese, C., … Reignault, P. L. (2021). Pest categorisation of *Colletotrichum plurivorum*. *EFSA Journal*, *19*(11). https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6886

Bruna, T., Maldonado-Bravo, F., Jara, P., & Caro, N. (2021). Silver nanoparticles and their antibacterial applications. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(13), 7202. https://doi.org/10.3390/ijms22137202

Burdușel, A. C., Gherasim, O., Grumezescu, A. M., Mogoantă, L., Ficai, A., & Andronescu, E. (2018). Biomedical applications of silver nanoparticles: An up-to-date overview. *Nanomaterials*, *8*(9), 681. https://doi.org/10.3390/nano8090681

Cai, L., Gong, X., Zheng, X., Kuang, W., Yang, L., Zhang, L., Sun, X., Ma, J., & Cui, R. (2022). First report of lotus seedpod withering caused by *Fusarium proliferatum* on *Nelumbo nucifera* plants in China. *Plant Disease*, *106*(1), 331. https://doi.org/10.1094/PDIS-06-21-1236-PDN

Cai, L., Hyde, K. D., Taylor, P., Weir, B. S., Waller, J. M., Abang, M. M., Zhang, J. Z., Yang, Y. L., Phoulivong, S., Liu, Z. Y., Prihastuti, H., Shivas, R. G., Mckenzie, E., & Johnston, P. R. (2009). A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. *Fungal Diversity*, *39*.

Camargo, L. de O., Fontoura, I., Veriato, T. S., Raniero, L., & Castilho, M. L. (2023). Antibacterial activity of silver nanoparticles functionalized with amikacin applied against multidrug-resistant Acinetobacter baumannii. *American Journal of Infection Control*, *51*(8), 871–878. https://doi.org/10.1016/j.ajic.2022.12.009

Cao, B., Haelewaters, D., Schoutteten, N., Begerow, D., Boekhout, T., Giachini, A. J., Gorjón, S. P., Gunde-Cimerman, N., Hyde, K. D., … Zhao, R. L. (2021). Delimiting species in Basidiomycota: A Review. *Fungal Diversity*, *109*(1), 181–237. https://doi.org/10.1007/S13225-021-00479-5

Cao, X. R., Xu, X. M., Che, H. Y., West, J. S., & Luo, D. Q. (2019). Characteristics and distribution of *Colletotrichum* species in coffee plantations in Hainan, China. *Plant Pathology*, *68*(6), 1146–1156. https://doi.org/10.1111/ppa.13028

Capella-Gutiérrez, S., Silla-Martínez, J. M., & Gabaldón, T. (2009). trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. *Bioinformatics*, *25*(15), 1972–1973. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp348

Carbone, I., & Kohn, L. M. (1999). A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*, *91*(3), 553–556. https://doi.org/10.2307/3761358

Carrapiço, A., Martins, M. R., Caldeira, A. T., Mirão, J., & Dias, L. (2023). Biosynthesis of metal and metal oxide nanoparticles using microbial cultures: Mechanisms, antimicrobial activity, and applications to cultural heritage. *Microorganisms*, *11*(2), 378. https://doi.org/10.3390/microorganisms11020378

Castro, M. R., Victoria, F. N., Oliveira, D. H., Jacob, R. G., Savegnago, L., & Alves, D. (2015). Essential oil of *Psidium cattleianum* leaves: Antioxidant and antifungal activity. *Pharmaceutical Biology*, *53*(2), 242–250. https://doi.org/10.3109/13880209.2014.914231

Cavassin, E. D., de Figueiredo, L. F. P., Otoch, J. P., Seckler, M. M., de Oliveira, R. A., Franco, F. F., Marangoni, V. S., Zucolotto, V., Levin, A. S. S., & Costa, S. F. (2015). Comparison of methods to detect the *in vitro* activity of silver nanoparticles (AgNP) against multidrug resistant bacteria. *Journal of Nanobiotechnology*, *13*(1). https://doi.org/10.1186/s12951-015-0120-6

Chakansin, C., Yostaworakul, J., Warin, C., Kulthong, K., & Boonrungsiman, S. (2022). Resazurin rapid screening for antibacterial activities of organic and inorganic nanoparticles: Potential, limitations and precautions. *Analytical Biochemistry*, *637*, 114449. https://doi.org/10.1016/j.ab.2021.114449

Chang, J. Y., Liu, S. Sen, Ma, H. X., Shi, J., Guo, N., & Zhang, H. J. (2019). Genetic diversity analysis of *Curvularia lunata* in summer maize in Huang-Huai-Hai Region. *Scientia Agricultura Sinica*, *52*(5), 822–836. https://doi.org/10.3864/j.issn.0578-1752.2019.05.005

Chen, G., Fan, M., Wu, J., Li, N., & Guo, M. (2018). Antioxidant and anti-inflammatory properties of flavonoids from lotus plumule. *Food Chemistry*, *277*, 706–712. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.040

Chen, K. L., & Kirschner, R. (2018). Fungi from leaves of lotus (*Nelumbo nucifera*). *Mycological Progress*, *17*(1–2), 275–293. https://doi.org/10.1007/s11557-017-1324-y

Chen, L., & Xiao, Y. (2023). Silver nanoparticles and arbuscular mycorrhizal fungi influence *Trifolium repen* root-associated AMF community structure and its co-occurrence pattern. *Scientia Horticulturae*, *320*, 112232. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2023.112232

Chen, W., Meng, S., Fang, J., Su, S., Zou, H., Yan, X., & Cao, P. (2023). First report of *Exserohilum rostratum* causing leaf blight on broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) in China. *Plant Disease*, *107*(10), 3303. https://doi.org/10.1094/PDIS-05-23-0902-PDN

Chen, Y., Fu, D., Wang, W., Gleason, M. L., Zhang, R., Liang, X., & Sun, G. (2022). Diversity of *Colletotrichum* species causing apple bitter rot and Glomerella leaf spot in China. *Journal of Fungi*, *8*(7), 740. https://doi.org/10.3390/jof8070740

Chethana, C. S., Chowdappa, P., Pavani, K. V., Biju, C. N., Praveena, R., & Sujatha, A. M. (2015). Morphological and multi-loci gene analysis of five species of *Colletotrichum* responsible for anthracnose on black pepper in South India. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*, *6*(3), 327–342.

Chethana, K. W. T., Manawasinghe, I. S., Hurdeal, V. G., Bhunjun, C. S., Appadoo, M. A., Gentekaki, E., Raspé, O., Promputtha, I., & Hyde, K. D. (2021). What are fungal species and how to delineate them? In *Fungal Diversity*, *109*(1), 1–25. https://doi.org/10.1007/s13225-021-00483-9

Choi, Y. J., Lee, J. S., Lee, H. B., & Kim, H. J. (2018). First report of leaf blight caused by *Curvularia verruculosa* on zoysiagrass (*Zoysia japonica*) in Korea. *Plant Disease*, *102*(6), 1173. https://doi.org/10.1094/PDIS-09-17-1402-PDN

Choudhary, M., Sardana, H. R., Bhat, M. N., & Gurjar, M. S. (2018). First report of leaf spot disease caused by *Exserohilum rostratum* on bottle gourd in India. *Plant Disease*, *102*(10), 2042. https://doi.org/10.1094/PDIS-02-18-0315-PDN

Chowhan, P., & Chakraborty, A. P. (2023). First report of *Curvularia lunata* (ON246070) causing leaf spot disease of banana from Raiganj, West Bengal, India. *Plant Health Progress*, *24*(1), 32–36. https://doi.org/10.1094/PHP-05-22-0054-RS

Chung, P. C., Wu, H. Y., Wang, Y. W., Ariyawansa, H. A., Hu, H. P., Hung, T. H., Tzean, S. S., & Chung, C. L. (2020). Diversity and pathogenicity of *Colletotrichum* species causing strawberry anthracnose in Taiwan and description of a new species, *Colletotrichum miaoliense* sp. nov. *Scientific Reports*, *10*(1). https://doi.org/10.1038/s41598-020-70878-2

Cifuentes, Z., Custardoy, L., de la Fuente, J. M., Marquina, C., Ibarra, M. R., Rubiales, D., & Pérez-de-Luque, A. (2010). Absorption and translocation to the aerial part of magnetic carbon-coated nanoparticles through the root of different crop plants. *Journal of Nanobiotechnology*, *8*(1). https://doi.org/10.1186/1477-3155-8-26

Cortés, J. C. G., Curto, M. Á., Carvalho, V. S. D., Pérez, P., & Ribas, J. C. (2019). The fungal cell wall as a target for the development of new antifungal therapies. *Biotechnology Advances*, *37*(6), 107352. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.02.008

Cui, R. Q., & Sun, X. T. (2012). First report of *Curvularia lunata* causing leaf spot on lotus in China. *Plant Disease*, *96*(7), 1068. https://doi.org/10.1094/PDIS-03-12-0234-PDN

Cyert, M. S., & Philpott, C. C. (2013). Regulation of cation balance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, *193*(3), 677–713. https://doi.org/10.1534/genetics.112.147207

da Cunha, K. C., Sutton, D. A., Fothergill, A. W., Gené, J., Cano, J., Madrid, H., de Hoog, S., Crous, P. W., & Guarro, J. (2013). In vitro antifungal susceptibility and molecular identity of 99 clinical isolates of the opportunistic fungal genus *Curvularia*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, *76*(2), 168–174. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.02.034

Dağhan, H., Gülmezoğlu, N., Köleli, N., & Karakaya, B. (2020). Impact of titanium dioxide nanoparticles (TiO_2-NPs) on growth and mineral nutrient uptake of wheat (*Triticum vulgare* L.). *Biotech Studies*, *29*(2), 69–76. https://doi.org/10.38042/biost.2020.29.02.03

Dai, Y., Gan, L., Liu, X., Lan, C., Li, Z., & Yang, X. (2024). Occurrence of leaf spot caused by *Colletotrichum plurivorum* on cowpea in Fujian Province, China. *Crop Protection*, *176*, 106496. https://doi.org/10.1016/j.cropro.2023.106496

Dakal, T. C., Kumar, A., Majumdar, R. S., & Yadav, V. (2016). Mechanistic basis of antimicrobial actions of silver nanoparticles. *Frontiers in Microbiology*, *7*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01831

Damm, U., Cannon, P. F., Liu, F., Barreto, R. W., Guatimosim, E., & Crous, P. W. (2013). The *Colletotrichum orbiculare* species complex: Important pathogens of field crops and weeds. *Fungal Diversity*, *61*(1), 29–59. https://doi.org/10.1007/s13225-013-0255-4

Damm, U., Sato, T., Alizadeh, A., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (2019). The *Colletotrichum dracaenophilum, C. magnum* and *C. orchidearum* species complexes. *Studies in Mycology*, *92*(1), 1–46. https://doi.org/10.1016/j.simyco.2018.04.001

Damodara Shenoy, B. (2025). Do you believe in 'new' fungal species? *Mycological Spectrum*, *1*(1), 47–58. https://doi.org/https://doi.org/10.64993/MS.1.1.4
Darmanin, T., & Guittard, F. (2015). Superhydrophobic and superoleophobic properties in nature. *Materials Today*, *18*(5), 273–285. https://doi.org/10.1016/j.mattod.2015.01.001
Das, D., & Ahmed, G. (2012). Silver nanoparticles damage yeast cell wall. *International Research Journal of Biotechnology*, *3*(3), 37–39. http://www.interesjournals.org/IRJOB
Davidovits, P. (2025). Nanotechnology in biology and medicine. In *Physics in Biology and Medicine*. https://doi.org/10.1016/b978-0-443-21558-2.00018-3
de Queiroz Brito, A. C., de Mello, J. F., de Almeida Souza, A. E., dos Santos Nascimento, S., de Souza-Motta, C. M., & Machado, A. R. (2023). Richness of *Nigrospora* spp. (Apiosporaceae) in *Manihot esculenta* in Brazil and the description of three new species. *Mycological Progress*, *22*(6). https://doi.org/10.1007/s11557-023-01887-4
De Queiroz, K. (2005). Ernst Mayr and the modern concept of species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(1), 6600–6607. https://doi.org/10.1073/pnas.0502030102;wgroup:string:publication
De Queiroz, K. (2007). Species concepts and species delimitation. *Systematic Biology*, *56*(6), 879–886. https://doi.org/10.1080/10635150701701083
de Silva, D. D., Groenewald, J. Z., Crous, P. W., Ades, P. K., Nasruddin, A., Mongkolporn, O., & Taylor, P. W. J. (2019). Identification, prevalence and pathogenicity of *Colletotrichum* species causing anthracnose of *Capsicum annuum* in Asia. *IMA Fungus*, *10*(1). https://doi.org/10.1186/s43008-019-0001-y
de Silva, N. I., Hyde, K. D., Lumyong, S., Phillips, A. J. L., Bhat, D. J., Maharachchikumbura, S. S. N., Thambugala, K. M., Tennakoon, D. S., Suwannarach, N., & Karunarathna, S. C. (2022). Morphology, phylogeny, host association and geography of fungi associated with plants of Annonaceae, Apocynaceae and Magnoliaceae. *Mycosphere*, *13*(1), 955–1076. https://doi.org/10.5943/mycosphere/13/1/12
Dean, R., Van Kan, J. A. L., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., Rudd, J. J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., & Foster, G. D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, *13*(4), 414–430. https://doi.org/10.1111/J.1364-3703.2011.00783.X
Delgado, J., Núñez, F., Bermúdez, E., & Asensio, M. A. (2023). Mechanisms of antifungal resistance. *Molecular Medical Microbiology, Third Edition*, 2847–2864. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818619-0.00156-8
Deng, S., Ma, X., Chen, Y., Feng, H., Zhou, D., Wang, X., Zhang, Y., Zhao, M., Zhang, J., Daly, P., & Wei, L. (2022). LAMP assay for distinguishing *Fusarium oxysporum* and *Fusarium commune* in lotus (*Nelumbo nucifera*) rhizomes. *Plant Disease*, *106*(1), 231–246. https://doi.org/10.1094/PDIS-06-21-1223-RE
Dhara, B., Maity, A., Mondal, P., & Mitra, A. K. (2020). First report of *Exserohilum* leaf spot: a unique halophilic pathogen in *Cucumis sativus* in the South Bengal area of India. *Australasian Plant Pathology*, *49*(3), 257–266. https://doi.org/10.1007/s13313-020-00705-9
Diao, Y. Z., Zhang, C., Liu, F., Wang, W. Z., Liu, L., Cai, L., & Liu, X. L. (2017). *Colletotrichum* species causing anthracnose disease of chili in China. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, *38*(1), 20–37. https://doi.org/10.3767/003158517X692788
Dinesha, S., Hosur, S. R., Toushif, P. K., Bodiga, D., Dechamma, N. L. D., Ashwath, M. N., & Pradhan, D. (2024). Sustaino-resilient agroforestry for climate resilience, food security and land degradation neutrality. In *Land and Environmental Management through Forestry*. https://doi.org/10.1002/9781119910527.ch9
Diogo, E., Gonçalves, C. I., Silva, A. C., Valente, C., Bragança, H., & Phillips, A. J. L. (2021). Five new species of *Neopestalotiopsis* associated with diseased *Eucalyptus* spp. in Portugal. *Mycological Progress*, *20*(11), 1441–1456. https://doi.org/10.1007/s11557-021-01741-5
Dissanayake, D. M. S., Adikaram, N. K. B., Yakandawala, D. M. D., & Jayasinghe, L. (2021). Molecular phylogeny-based identification of *Colletotrichum endophytica* and *C. siamense* as causal agents of avocado anthracnose in Sri Lanka. *Ceylon Journal of Science*, *50*(4), 449. https://doi.org/10.4038/cjs.v50i4.7943
Divakaran, D., Sriariyanun, M., Basha, S. A., Suyambulingam, I., Sanjay, M. R., & Siengchin, S. (2024). Physico-chemical, thermal, and morphological characterization of biomass-based novel microcrystalline cellulose from *Nelumbo nucifera* leaf: Biomass to biomaterial approach. *Biomass Conversion and Biorefinery*, *14*(19), 23825–23839. https://doi.org/10.1007/s13399-023-04349-9

Divakaran, D., Sriariyanun, M., Suyambulingam, I., Mavinkere Rangappa, S., & Siengchin, S. (2023). Exfoliation and physico-chemical characterization of novel bioplasticizers from *Nelumbo nucifera* leaf for biofilm application. *Heliyon*, *9*(12), e22550. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e22550

Dixit, D., Gangadharan, D., Popat, K. M., Reddy, C. R. K., Trivedi, M., & Gadhavi, D. K. (2018). Synthesis, characterization and application of green seaweed mediated silver nanoparticles (AgNPs) as antibacterial agents for water disinfection. *Water Science and Technology*, *78*(1), 235–246. https://doi.org/10.2166/wst.2018.292

Dong, Y., Zhu, H., Shen, Y., Zhang, W., & Zhang, L. (2019). Antibacterial activity of silver nanoparticles of different particle size against *Vibrio natriegens*. *PLoS ONE*, *14*(9), e0222322. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222322

dos Santos, P. R. R., Leão, E. U., Aguiar, R. W. de S., de Melo, M. P., & dos Santos, G. R. (2018). Morphological and molecular characterization of *Curvularia lunata* pathogenic to andropogon grass. *Bragantia*, *77*(2), 326–332. https://doi.org/10.1590/1678-4499.2017258

Duan, C. H., & Chen, G. Y. (2022). First report of *Colletotrichum tropicale* causing anthracnose on common fig in Taiwan. *Plant Disease*, *106*(6), 1750. https://doi.org/10.1094/PDIS-06-21-1329-PDN

Duarte, I. G., Amaral, A. G. G., Vieira, W. A. dos S., Veloso, J. S., Silva, A. C. da, Silva, C. de F. B. da, Balbino, V. de Q., Castlebury, L. A., & Câmara, M. P. S. (2023). Diversity of *Colletotrichum* species associated with torch ginger anthracnose. *Mycologia*, *115*(5), 661–673. https://doi.org/10.1080/00275514.2023.2227747

Dupont, S., Lemetais, G., Ferreira, T., Cayot, P., Gervais, P., & Beney, L. (2012). Ergosterol biosynthesis: A fungal pathway for life on land? *Evolution*, *66*(9), 2961. https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2012.01667.x

Durán, N., Durán, M., de Jesus, M. B., Seabra, A. B., Fávaro, W. J., & Nakazato, G. (2016). Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, *12*(3), 789–799.https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.11.016

Eliaš, D., Tóth Hervay, N., & Gbelská, Y. (2024). ergosterol biosynthesis and regulation impact the antifungal resistance and virulence of *Candida* spp. *Stresses*, *4*(4), 641–662. https://doi.org/10.3390/stresses4040041

Ensikat, H. J., Ditsche-Kuru, P., Neinhuis, C., & Barthlott, W. (2011). Superhydrophobicity in perfection: The outstanding properties of the lotus leaf. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, *2*(1), 152–161. https://doi.org/10.3762/bjnano.2.19

Fan, X. L., Yang, Q., Bezerra, J. D. P., Alvarez, L. V., & Tian, C. M. (2018). *Diaporthe* from walnut tree (*Juglans regia*) in China, with insight of the *Diaporthe eres* complex. *Mycological Progress*, *17*(7), 841–853. https://doi.org/10.1007/s11557-018-1395-4

Fatima, Q., Shoaib, A., Gull, N., Khurshid, S., & Fatima, U. (2024). Chitosan-mediated copper nanohybrid attenuates the virulence of a necrotrophic fungal pathogen *Macrophomina phaseolina*. *Scientific Reports*, *14*(1), 23193. https://doi.org/10.1038/s41598-024-74949-6

Feng, Y., Cui, X., He, S., Dong, G., Chen, M., Wang, J., & Lin, X. (2013). The role of metal nanoparticles in influencing arbuscular mycorrhizal fungi effects on plant growth. *Environmental Science and Technology*, *47*(16), 9496–9504. https://doi.org/10.1021/es402109n

Ferdinandez, H. S., Manamgoda, D. S., Udayanga, D., Deshappriya, N., Munasinghe, M. S., & Castlebury, L. A. (2021). Molecular phylogeny and morphology reveal three novel species of *Curvularia* (Pleosporales, Pleosporaceae) associated with cereal crops and weedy grass hosts. *Mycological Progress*, *20*(4), 431–451. https://doi.org/10.1007/s11557-021-01681-0

Ferdinandez, H. S., Manamgoda, D. S., Udayanga, D., Munasinghe, M. S., & Castlebury, L. A. (2023). Molecular phylogeny and morphology reveal two new graminicolous species, *Curvularia aurantia* sp. nov. and *C. vidyodayana* sp. nov. with new records of *Curvularia* spp. from Sri Lanka. *Fungal Systematics and Evolution*, *12*, 219–246. https://doi.org/10.3114/fuse.2023.12.11

Fisher, M. C., Gurr, S. J., Cuomo, C. A., Blehert, D. S., Jin, H., Stukenbrock, E. H., Stajich, J. E., Kahmann, R., Boone, C., Denning, D. W., Gow, N. A. R., Klein, B. S., Kronstad, J. W., Sheppard, D. C., Taylor, J. W., Wright, G. D., Heitman, J., Casadevall, A., & Cowen, L. E. (2020). Threats posed by the fungal kingdom to humans, wildlife, and agriculture. *MBio*, *11*(3). https://doi.org/10.1128/mBio.00449-20

Gai, Y., & Wang, H. (2024). Plant Disease: A growing threat to global food security. *Agronomy*, *14*(8), 1615. https://doi.org/10.3390/agronomy14081615

Gajbhiye, M., Kesharwani, J., Ingle, A., Gade, A., & Rai, M. (2009). Fungus-mediated synthesis of silver nanoparticles and their activity against pathogenic fungi in combination with fluconazole. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, *5*(4). https://doi.org/10.1016/j.nano.2009.06.005

Ganash, M., Abdel Ghany, T. M., & Omar, A. M. (2018). Morphological and biomolecules dynamics of phytopathogenic fungi under stress of silver nanoparticles. *BioNanoScience*, *8*(2). https://doi.org/10.1007/s12668-018-0510-y

Gandolfo, M. A., Nixon, K. C., & Crepet, W. L. (2004). Cretaceous flowers of Nymphaeaceae and implications for complex insect entrapment pollination mechanisms in early angiosperms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(21). https://doi.org/10.1073/pnas.0402473101

Garcia-Aroca, T., Doyle, V., Singh, R., Price, T., & Collins, K. (2018). First report of *Curvularia* leaf spot of corn, caused by Curvularia lunata, in the United States. *Plant Health Progress*, *19*(2). https://doi.org/10.1094/PHP-02-18-0008-BR

García-Estrada, R. S., Cruz-Lachica, I., Osuna-García, L. A., & Márquez-Zequera, I. (2020). First report of Papaya (*Carica papaya*) anthracnose caused by *Colletotrichum plurivoru*m in Mexico. *Plant Disease*, *104*(2), 589. https://doi.org/10.1094/PDIS-05-19-0914-PDN

Ghorbani, F., Gorji, P., Mobarakeh, M. S., Mozaffari, H. R., Masaeli, R., & Safaei, M. (2022). Optimized synthesis of Xanthan gum/ZnO/TiO2Nanocomposite with high antifungal activity against pathogenic Candida albicans. *Journal of Nanomaterials*, *2022*(1). https://doi.org/10.1155/2022/7255181

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. https://doi.org/10.1128/aem.61.4.1323-1330.1995

Gomes, R. R., Glienke, C., Videira, S. I. R., Lombard, L., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (2013). Diaporthe: A genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, *31*, 1–41. https://doi.org/10.3767/003158513x666844

Gondil, V. S., Kalaiyarasan, T., Bharti, V. K., & Chhibber, S. (2019). Antibiofilm potential of Seabuckthorn silver nanoparticles (SBT@AgNPs) against *Pseudomonas aeruginosa*. *3 Biotech*, *9*(11). https://doi.org/10.1007/s13205-019-1947-6

Gong, X., Kuang, W., Zheng, X., Zhang, L., Sun, X., Ma, J., & Cui, R. (2022). First report of *Alternaria alternata* causing leaf spot on *Nelumbo nucifera* plants in China. *Plant Disease*, *106*(11), 2999. https://doi.org/10.1094/pdis-07-21-1471-pdn

Gong, X., Li, Y., Zheng, X., Zhang, L., Sun, X., & Cui, R. (2023). Leaf vein disease in *Nelumbo nucifera* caused by *Nigrospora pyriformis* infection in China. *Plant Disease*, *107*(2), 567. https://doi.org/10.1094/PDIS-04-22-0925-PDN

Guarnaccia, V., Polizzi, G., Papadantonakis, N., & Gullino, M. L. (2020). *Neofusicoccum* species causing branch cankers on avocado in Crete (Greece). *Journal of Plant Pathology*, *102*(4), 1251–1255. https://doi.org/10.1007/s42161-020-00618-y

Guo, H. B. (2009). Cultivation of lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn. ssp. *nucifera*) and its utilization in China. *Genetic Resources and Crop Evolution*, *56*(3), 323–330. https://doi.org/10.1007/s10722-008-9366-2

Guo, Z.-J., Amenyogbe, M. K., Chen, S.-Q., Rashad, Y. M., Deng, J.-X., & Luo, H. (2025). Morphological and phylogenetic analyses reveal two novel species of *Curvularia* (Pleosporales, Pleosporaceae) from southern China. *MycoKeys*, *120*, 139–156. https://doi.org/10.3897/mycokeys.120.156570

Gusella, G., Aiello, D., & Polizzi, G. (2020). First report of leaf and twig blight of Indian hawthorn (*Rhaphiolepis indica*) caused by *Neofusicoccum parvum* in Italy. *Journal of Plant Pathology*, *102*(1), 275. https://doi.org/10.1007/s42161-019-00412-5

Ha, N. T., Ngat, H. T., Thu Ha, N. T., & Hoi, P. X. (2012). Study on pathogenicity of *Colletotrichum gloeosporioides* on Coffee in North of Vietnam. *Academia Journal of Biology*, *33*(1), 67–73. https://doi.org/10.15625/0866-7160/v33n1.736

Habeeb Rahman, A. P., Pranjal, Kumar Behera, S., Mishra, A., Stålsby Lundborg, C., & Tripathy, S. K. (2022). Transcriptomic regulation of *Salmonella typhimurium* during sonophotocatalysis and the effect of stress adaptation on the antibiotic resistance and tolerance post-treatment. *Chemical Engineering Journal*, *446*, 137442. https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2022.137442

Hall, T. A. (1999). BIOEDIT: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/ NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, *41*.

Haroon, M., Zaidi, A., Ahmed, B., Rizvi, A., Khan, M. S., & Musarrat, J. (2019). Effective inhibition of phytopathogenic microbes by eco-friendly leaf extract mediated silver nanoparticles

(AgNPs). *Indian Journal of Microbiology*, *59*(3), 273–287. https://doi.org/10.1007/s12088-019-00801-5
Hawa, M. M., Salleh, B., & Latiffah, Z. (2009). First report of *Curvularia lunata* on red-fleshed dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*) in Malaysia. *Plant Disease*, *93*(9), 971. https://doi.org/10.1094/PDIS-93-9-0971C
He, F., Yang, J., Zhao, Y., Laborda, P., Jia, Y., Safdar, A., Kange, A. M., Li, B., Zhou, L., Zeng, Q., Brown, S., Fu, Z. Q., & Liu, F. (2022). Identification and characterization of a stem canker and twig dieback disease of pear caused by *Neofusicoccum parvum* in Chinese mainland. *Phytopathology Research*, *4*(1). https://doi.org/10.1186/s42483-022-00111-7
He, K., Zhao, C., Zhang, M., Li, J., Zhang, Q., Wu, X., Wei, S., Wang, Y., Chen, X., & Li, C. (2023). The chromosome-scale genomes of *Exserohilum rostratum* and *Bipolaris zeicola* pathogenic fungi causing rice spikelet rot disease. *Journal of Fungi*, *9*(2), 177. https://doi.org/10.3390/jof9020177
He, Z., Chen, W., Chen, C., Liu, X., & Li, L. (2019). First report of apple stem grooving virus infecting lotus (*Nelumbo nucifera*) in China. *Plant Disease*, *103*(4), 782. https://doi.org/10.1094/PDIS-09-18-1626-PDN
He, Z., Dong, T., Wang, T., Chen, W., Liu, X., & Li, L. (2020). Genetic variation of the novel Badnaviruses infecting *Nelumbo nucifera* based on the RT/RNase H coding region sequences. *Horticultural Plant Journal*, *6*(5), 335–342. https://doi.org/10.1016/j.hpj.2020.07.003
Hernández-Restrepo, M., Madrid, H., Tan, Y. P., da Cunha, K. C., Gené, J., Guarro, J., & Crous, P. W. (2018). Multi-locus phylogeny and taxonomy of *Exserohilum*. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, *41*(1), 71–108. https://doi.org/10.3767/persoonia.2018.41.05
Hinchliff, C. E., & Roalson, E. H. (2013). Using supermatrices for phylogenetic inquiry: An example using the sedges. *Systematic Biology*, *62*(2), 205–219. https://doi.org/10.1093/sysbio/sys088
Hiruma, K., Gerlach, N., Sacristán, S., Nakano, R. T., Hacquard, S., Kracher, B., Neumann, U., Ramírez, D., Bucher, M., O'Connell, R. J., & Schulze-Lefert, P. (2016). Root endophyte *Colletotrichum tofieldiae* confers plant fitness benefits that are phosphate status dependent. *Cell*, *165*(2), 464–474. https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.02.028
Hoang, A. T., Lam, T. T., Thi, H. T. P., Nguyen Thi, H., Pham, H. P., Doan Thi, L., Ngo, D. D., & Do, A. D. (2025). Identification of *Nigrospora sphaerica* and *Curvularia lunata* as causal agents of leaf spot disease in cantaloupe (*Cucumis melo* L.) in Southern Vietnam. *Australasian Plant Pathology*, *54*(2), 177–186. https://doi.org/10.1007/s13313-025-01028-3
Horstmann, C., Campbell, C., Kim, D. S., & Kim, K. (2019). Transcriptome profile with 20 nm silver nanoparticles in yeast. *FEMS Yeast Research*, *19*(2). https://doi.org/10.1093/femsyr/foz003
Hu, P., An, J., Faulkner, M. M., Wu, H., Li, Z., Tian, X., & Giraldo, J. P. (2020). Nanoparticle charge and size control foliar delivery efficiency to plant cells and organelles. *ACS Nano*, *14*(7), 7970–7986. https://doi.org/10.1021/acsnano.9b09178
Huang, S., Zheng, X., Yang, D., An, J., Wang, L., Pang, F., Tao, A., & Fu, G. (2021). First report of soft rot caused by *Aspergillus niger* sensu lato on mother-in-law's tongue in China. *Plant Disease*, *105*(3), 703. https://doi.org/10.1094/PDIS-03-20-0678-PDN
Huang, Y., Jones, C., Urbina, H., & Zhang, S. (2023). First report of leaf blight caused by *Curvularia aeria* and *C. senegalensis* on tomato (*Solanum lycopersicum*) in Florida, U.S.A. *Plant Disease*, *107*(12), 4027. https://doi.org/10.1094/PDIS-06-23-1209-PDN
Huson, D. H., & Bryant, D. (2006). Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular Biology and Evolution*, *23*(2), 254–267. https://doi.org/10.1093/molbev/msj030
Hwang, I. S., Lee, J., Hwang, J. H., Kim, K. J., & Lee, D. G. (2012). Silver nanoparticles induce apoptotic cell death in *Candida albicans* through the increase of hydroxyl radicals. *FEBS Journal*, *279*(7), 1327–1338. https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08527.x
Hyde, K. D., Cai, L., McKenzie, E. H. C., Yang, Y. L., Zhang, J. Z., & Prihastuti, H. (2009). *Colletotrichum*: A catalogue of confusion. *Fungal Diversity*, *39*, 1–17.
Inokuti, E. M., Silva, D. E. M., Almeida, M. M. M., Oliveira, J. R., Andrade, I. L., Silva, C. F. B., Corrêa, M. C. M., & Lima, C. S. (2024). First report of *Colletotrichum tropicale* causing anthracnose on pitaya (*Hylocereus costaricensis*) in Brazil. *Plant Disease*, *108*(3), 797. https://doi.org/10.1094/PDIS-08-23-1627-PDN
Iturrieta-González, I., Gené, J., Wiederhold, N., & García, D. (2020). Three new *Curvularia* species from clinical and environmental sources. *Mycokeys*, *68*, 1–21. https://doi.org/10.3897/MYCOKEYS.68.51667
Ivask, A., Elbadawy, A., Kaweeteerawat, C., Boren, D., Fischer, H., Ji, Z., Chang, C. H., Liu, R., Tolaymat, T., Telesca, D., Zink, J. I., Cohen, Y., Holden, P. A., & Godwin, H. A. (2014). Toxicity

mechanisms in *Escherichia coli* vary for silver nanoparticles and differ from ionic silver. *ACS Nano*, *8*(1), 374–386. https://doi.org/10.1021/nn4044047

James, T. Y., Stajich, J. E., Hittinger, C. T., & Rokas, A. (2020). Toward a fully resolved fungal tree of life. *Annual Review of Microbiology*, *74*, 291–313. https://doi.org/10.1146/annurev-micro-022020-051835

Jayawardena, R. S., Bhunjun, C. S., Hyde, K. D., Gentekaki, E., & Itthayakorn, P. (2021). *Colletotrichum*: lifestyles, biology, morpho-species, species complexes and accepted species. *Mycosphere*, *12*(1), 519–669. https://doi.org/10.5943/mycosphere/12/1/7

Jayawardena, R. S., Hyde, K. D., de Farias, A. R. G., Bhunjun, C. S., Ferdinandez, H. S., Manamgoda, D. S., Udayanga, D., Herath, I. S., Thambugala, K. M., Manawasinghe, I. S., Gajanayake, A. J., Samarakoon, B. C., Bundhun, D., Gomdola, D., Huanraluek, N., Sun, Y. ru, Tang, X., Promputtha, I., & Thines, M. (2021). What is a species in fungal plant pathogens? *Fungal Diversity*, *109*(1), 239–266. https://doi.org/10.1007/S13225-021-00484-8

Jian, Y., Chen, X., Ahmed, T., Shang, Q., Zhang, S., Ma, Z., & Yin, Y. (2022). Toxicity and action mechanisms of silver nanoparticles against the mycotoxin-producing fungus *Fusarium graminearum*. *Journal of Advanced Research*, *38*, 1–12. https://doi.org/10.1016/j.jare.2021.09.006

Jiang, K., Li, Z., Zeng, X., Chen, X., Liang, S., & Zhang, W. (3 C.E.). Two new species of *Colletotrichum* (Glomerellales, Glomerellaceae) causing anthracnose on *Epimedium sagittatum*. *MycoKeys*, *115*, 363–381. https://doi.org/10.3897/mycokeys.115.144522

Jo, Y., Kim, B. H., & Jung, G. (2009). Antifungal activity of silver ions and nanoparticles on phytopathogenic fungi. *Plant Disease*, *93*, 1037–1043. https://doi.org/10.1094/PDIS-93-10-1037

Juárez-Maldonado, A., Ortega-Ortíz, H., Morales-Díaz, A. B., González-Morales, S., Morelos-Moreno, Á., Cabrera-De la Fuente, M., Sandoval-Rangel, A., Cadenas-Pliego, G., & Benavides-Mendoza, A. (2019). Nanoparticles and nanomaterials as plant biostimulants. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(1), 162. https://doi.org/10.3390/ijms20010162

Jyothi, A., Mounika, J., & Jagadeeshwar, R. (2020). Rice leaf extract synthesized silver nanoparticles: An in vitro fungicidal evaluation against *Rhizoctonia solani*, the causative agent of sheath blight disease in rice. *Fungal Biology*, *124*(7), 671–681. https://doi.org/10.1016/j.funbio.2020.03.012

Kaboré, K. H., Kassankogno, A. I., Adreit, H., Milazzo, J., Guillou, S., Blondin, L., Chopin, L., Ravel, S., Charriat, F., Barro, M., Tollenaere, C., Lebrun, M. H., & Tharreau, D. (2022). Genetic diversity and structure of *Bipolaris oryzae* and *Exserohilum rostratum* populations causing brown spot of rice in Burkina Faso based on genotyping-by-sequencing. *Frontiers in Plant Science*, *13*. https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1022348

Kalagatur, N. K., Nirmal Ghosh, O. S., Sundararaj, N., & Mudili, V. (2018). Antifungal activity of chitosan nanoparticles encapsulated with *Cymbopogon martinii* essential oil on plant pathogenic fungi *Fusarium graminearum*. *Frontiers in Pharmacology*, *9*. https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00610

Kale, S. K., Parishwad, G. V., Husainy, A. S. N., & Patil, A. S. (2021). Emerging agriculture applications of silver nanoparticles. *ES Food and Agroforestry*, *3*. https://doi.org/10.30919/esfaf438

Kalishwaralal, K., BarathManiKanth, S., Pandian, S. R. K., Deepak, V., & Gurunathan, S. (2010). Silver nanoparticles impede the biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *79*(2), 340–344. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.04.014

Kalyaanamoorthy, S., Minh, B. Q., Wong, T. K. F., Von Haeseler, A., & Jermiin, L. S. (2017). ModelFinder: Fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature Methods*, *14*(6), 587–589. https://doi.org/10.1038/nmeth.4285

Kee, Y. J., Hafifi, A. B. M., Huda-Shakirah, A. R., Wong, K. L., Jin, X. L., Siti Nordahliawate, M. S., Zakaria, L., & Mohd, M. H. (2019). First report of reddish brown spot disease of red-fleshed dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*) caused by *Nigrospora lacticolonia* and *Nigrospora sphaerica* in Malaysia. *Crop Protection*, *122*, 165–170. https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.05.006

Kee, Y. J., Zakaria, L., & Mohd, M. H. (2020). *Curvularia asianensis* and *Curvularia eragrostidis* associated with leaf spot of *Sansevieria trifasciata* in Malaysia. *Journal of Phytopathology*, *168*(5), 290–296. https://doi.org/10.1111/jph.12890

Kekkonen, M., Mutanen, M., Kaila, L., Nieminen, M., & Hebert, P. D. N. (2015). Delineating Species with DNA Barcodes: a case of taxon dependent method performance in moths. *PLOS ONE*, *10*(4), e0122481. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122481

Khemmuk, W., Shivas, R. G., Henry, R. J., & Geering, A. D. W. (2016). Fungi associated with foliar diseases of wild and cultivated rice (*Oryza* spp.) in northern Queensland. *Australasian Plant Pathology*, *45*(3), 297–308. https://doi.org/10.1007/s13313-016-0418-3

Khuong, N. Q., Nhien, D. B., Thu, L. T. M., Trong, N. D., Hiep, P. C., Thuan, V. M., Quang, L. T., Thuc, L. V., & Xuan, D. T. (2023). Using *Trichoderma asperellum* to antagonize *Lasiodiplodia theobromae* causing stem-end rot disease on Pomelo (*Citrus maxima*). *Journal of Fungi*, *9*(10), 981. https://doi.org/10.3390/jof9100981

Kidd, S. E., & Westblade, L. F. (2024). *Bipolaris* or *Curvularia*? Resolving the spicy issue of how clinical isolates should be reported. *PLOS Pathogens*, *20*(11), e1012678-. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1012678

Kim, H., Kang, H., Chu, G., & Byun, H. (2008). Antifungal effectiveness of nanosilver colloid against rose powdery mildew in greenhouses. *Solid State Phenomena*, *135*, 15–18. https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/SSP.135.15

Kiyan, V., Smagulova, A., Kovenskiy, A., Bekenova, A., & Uakhit, R. (2023). First report of stem rot of *Adenium obesum* and leaf spot of *Persea americana* caused by *Aspergillus niger* in Kazakhstan. *Plant Disease*, *107*(9), 2849. https://doi.org/10.1094/PDIS-02-23-0202-PDN

Kong, I. C., Ko, K. S., & Koh, D. C. (2020). Evaluation of the effects of particle sizes of silver nanoparticles on various biological systems. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(22), 8465. https://doi.org/10.3390/ijms21228465

Kong, Q., Yu, X., Song, D., & Ren, X. (2018). Effect of tricyclazole on morphology, virulence and gene expression of *Aspergillus aculeatus* for management of soft rot disease in peach. *Journal of Applied Microbiology*, *125*(6), 1827–1835. https://doi.org/10.1111/jam.14076

Korra, T., Navathe, S., Biradar, S., & Chand, R. (2023). Pathogenicity and infection behaviour of *Exserohilum rostratum* on wheat and associated collateral hosts. *Journal of Plant Pathology*, *105*(3), 695–709. https://doi.org/10.1007/s42161-023-01358-5

Kripa, T. S., Kumar, S., Mufeeda, K. T., Jose, J. M., Mahadevakumar, S., & Singh, R. (2024). Morpho-cultural and molecular phylogenetic characterisation of *Curvularia verruculosa* causing leaf spot and blight disease on *Strychnos potatorum* – A new record from India. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *129*, 102207. https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2023.102207

Krishnaraj, C., Ramachandran, R., Mohan, K., & Kalaichelvan, P. T. (2012). Optimization for rapid synthesis of silver nanoparticles and its effect on phytopathogenic fungi. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *93*, 95–99. https://doi.org/10.1016/j.saa.2012.03.002

Kriti, A., Ghatak, A., & Mandal, N. (2020). Inhibitory potential assessment of silver nanoparticles on phytopathogenic spores and mycelial growth of *Bipolaris sorokiniana* and *Alternaria brassicicola*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, *9*(3), 692–699. https://doi.org/10.20546/ijcmas.2020.903.083

Kuang, W., Gong, X., Lin, Y., Chen, L., Zheng, X., Tang, J., Shi, X., Sun, X., Zhang, L., & Cui, R. (2023). First report of *Serratia marcescens* causing seed necrosis on *Nelumbo nucifera* in China. *Crop Protection*, *173*, 106379. https://doi.org/10.1016/j.cropro.2023.106379

Kumari, M., Giri, V. P., Pandey, S., Kumar, M., Katiyar, R., Nautiyal, C. S., & Mishra, A. (2019). An insight into the mechanism of antifungal activity of biogenic nanoparticles than their chemical counterparts. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *157*, 45–52. https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.03.005

Kumari, M., Pandey, S., Bhattacharya, A., Mishra, A., & Nautiyal, C. S. (2017). Plant physiology and biochemistry protective role of biosynthesized silver nanoparticles against early blight disease in *Solanum lycopersicum*. *Plant Physiology and Biochemistry*, *121*, 216–225. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.11.004

Kurera, W. M. S., Adikaram, N. K. B., Yakandawala, D. M. D., Maharachchikumbura, S. S., Jayasinghe, L., & Samarakoon, K. (2023). Molecular and phenotypic characterization of *Colletotrichum plurivorum* and *Colletotrichum musae* causing banana anthracnose disease in the Central Province of Sri Lanka. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka*, *51*(2). https://doi.org/10.4038/jnsfsr.v51i2.11217

Lamsal, K., Kim, S. W., Jung, J. H., Kim, Y. S., Kim, K. S., & Lee, Y. S. (2011). Inhibition effects of silver nanoparticles against powdery mildews on cucumber and pumpkin. *Mycobiology*, *39*(1), 26. https://doi.org/10.4489/myco.2011.39.1.026

Lara, H. H., Romero-Urbina, D. G., Pierce, C., Lopez-Ribot, J. L., Arellano-Jiménez, M. J., & Jose-Yacaman, M. (2015). Effect of silver nanoparticles on Candida albicans biofilms: An

ultrastructural study. *Journal of Nanobiotechnology*, *13*(1). https://doi.org/10.1186/s12951-015-0147-8
Larue, C., Veronesi, G., Flank, A. M., Surble, S., Herlin-Boime, N., & Carrière, M. (2012). Comparative uptake and impact of TiO2 nanoparticles in wheat and rapeseed. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues*, *75*(13–15), 722–734. https://doi.org/10.1080/15287394.2012.689800
Lee, W., Kim, D. G., Perera, R. H., Kim, J. S., Cho, Y., Lee, J. W., Seo, C. W., & Lim, Y. W. (2023). Diversity of *Nigrospora* (Xylariales, Apiosporaceae) species identified in Korean macroalgae including five unrecorded species. *Mycobiology*, *51*(6), 401–409. https://doi.org/10.1080/12298093.2023.2283272
Lemire, J. A., Harrison, J. J., & Turner, R. J. (2013). Antimicrobial activity of metals: Mechanisms, molecular targets and applications. *Nature Reviews Microbiology*, *11*(6), 371–384. https://doi.org/10.1038/nrmicro3028
Leong, S. L., Hien, L. T., An, T. V., Trang, N. T., Hocking, A. D., & Scott, E. S. (2007). Ochratoxin A-producing Aspergilli in Vietnamese green coffee beans. *Letters in Applied Microbiology*, *45*(3), 301–306. https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02189.x
Letunic, I., & Bork, P. (2021). Interactive tree of life (iTOL) v5: An online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Research*, *49*(W1), 293–296. https://doi.org/10.1093/nar/gkab301
Li, J., Li, H., Zheng, L., Yan, S. L., & Wang, Q. Z. (2016). First report of lotus root disease caused by *Fusarium tricinctum* in China. *Plant Disease*, *100*(8), 1784. https://doi.org/10.1094/PDIS-04-15-0473-PDN
Li, J., Li, Y., Li, J., & Jiang, N. (2025). Species of *Diaporthe* (Diaporthaceae, Diaporthales) associated with *Alnus nepalensis* leaf spot and branch canker diseases in Xizang, China. *MycoKeys*, *116*, 185–204. https://doi.org/10.3897/mycokeys.116.142750
Li, L., Pan, H., Deng, L., Qian, G., Wang, Z., Li, W., & Zhong, C. (2022). The antifungal activity and mechanism of silver nanoparticles against four pathogens causing kiwifruit post-harvest rot. *Frontiers in Microbiology*, *13*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.988633
Li, M., Gao, Z., Wang, Y., Zhang, W., Yang, J., Gong, D., Ma, Y., Li, Y., & Hu, M. (2022). First report of *Nigrospora lacticolonia* causing leaf spot of *Bougainvillea spectabilis* in China. *Canadian Journal of Plant Pathology*, *44*(5), 695–701. https://doi.org/10.1080/07060661.2022.2067245
Li, Q., Bu, J., Shu, J., Yu, Z., Tang, L., Huang, S., Guo, T., Mo, J., Luo, S., Solangi, G. S., & Hsiang, T. (2019). *Colletotrichum* species associated with mango in southern China. *Scientific Reports*, *9*(1). https://doi.org/10.1038/s41598-019-54809-4
Li, T., Li, H., Liu, T., Zhu, J., Zhang, L., Mu, W., & Liu, F. (2021). Evaluation of the antifungal and biochemical activities of mefentrifluconazole against *Botrytis cinerea*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *173*, 104784. https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2021.104784
Li, W., Hu, M., Xue, Y., Li, Z., Zhang, Y., Zheng, D., Lu, G., Wang, J., & Zhou, J. (2020). Five fungal pathogens are responsible for bayberry twig blight and fungicides were screened for disease control. *Microorganisms*, *8*(5), 689. https://doi.org/10.3390/microorganisms8050689
Li, Y., Smith, T., Svetlana, P., Yang, J., Jin, J. H., & Li, C. Sen. (2014). Paleobiogeography of the lotus plant (Nelumbonaceae: *Nelumbo)* and its bearing on the paleoclimatic changes. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, *399*, 284–293. https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2014.01.022
Li, Y., Svetlana, P., Yao, J., & Li, C. (2014). A review on the taxonomic, evolutionary and phytogeographic studies of the lotus plant (Nelumbonaceae: *Nelumbo*). *Acta Geologica Sinica*, *88*(4), 1252–1261. https://doi.org/10.1111/1755-6724.12287
Liang, H., Lv, F., Xian, M., Luo, C., Zhang, L., Yang, M., Li, Q., & Zhao, X. (2025). Inhibition mechanism of *Cinnamomum burmannii* leaf essential oil against *Aspergillus flavus* and aflatoxins. *Foods*, *14*(4), 682. https://doi.org/10.3390/foods14040682
Lin, H. Y., Chung, C. P., Hsia, S. M., Chang, Y. C., Chiang, W., Kuo, Y. H., & Lin, Y. L. (2023). Anti-inflammatory alkaloids from lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) leaves. *European Food Research and Technology*, *249*(3), 739–748. https://doi.org/10.1007/s00217-022-04169-7
Liu, C., Zheng, X., & Chen, F. (2021). Dieback and leaf spot in box elder (*Acer negundo*) caused by *Exserohilum rostratum*. *Plant Disease*, *105*(10), 2955–2963. https://doi.org/10.1094/PDIS-07-20-1424-RE
Liu, F., Bonthond, G., Groenewald, J. Z., Cai, L., & Crous, P. W. (2019). Sporocadaceae, a family of coelomycetous fungi with appendage-bearing conidia. *Studies in Mycology*, *92*, 287–415. https://doi.org/10.1016/j.simyco.2018.11.001

Liu, F., Ma, Z. Y., Hou, L. W., Diao, Y. Z., Wu, W. P., Damm, U., Song, S., & Cai, L. (2022). Updating species diversity of *Colletotrichum*, with a phylogenomic overview. *Studies in Mycology*, *101*(1), 1–56. https://doi.org/10.3114/sim.2022.101.01

Liu, F., Wang, M., Damm, U., Crous, P. W., & Cai, L. (2016). Species boundaries in plant pathogenic fungi: A *Colletotrichum* case study. *BMC Evolutionary Biology*, *16*(1). https://doi.org/10.1186/s12862-016-0649-5

Liu, X., Li, T., Cui, X., Tao, R., & Gao, Z. (2024). Antifungal mechanism of nanosilver biosynthesized with *Trichoderma longibrachiatum* and its potential to control muskmelon *Fusarium* wilt. *Scientific Reports*, *14*(1). https://doi.org/10.1038/s41598-024-71282-w

Liu, Y., Ma, S., Ibrahim, S. A., Li, E., Yang, H., & Huang, W. (2015). Identification and antioxidant properties of polyphenols in lotus seed epicarp at different ripening stages. *Food Chemistry*, *185*, 159–164. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.117

Liu, Y., Shi, Y., Zhuo, D., Yang, T., Dai, L., Li, L., Zhao, H., Liu, X., & Cai, Z. (2023). Characterization of *Colletotrichum* causing anthracnose on rubber trees in Yunnan: Two new records and two new species from China. *Plant Disease*, *107*(10), 3037–3050. https://doi.org/10.1094/PDIS-11-22-2685-RE

Liu, Z., Zhang, M., Han, X., Xu, H., Zhang, B., Yu, Q., & Li, M. (2016). TiO2 nanoparticles cause cell damage independent of apoptosis and autophagy by impairing the ROS-scavenging system in *Pichia pastoris*. *Chemico-Biological Interactions*, *252*, 9–18. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.03.029

Lolas, M., Latorre, B., Ferrada, E., Grinbergs, D., Chilian, J., Ortega-Farias, S., Campillay-Llanos, W., & Díaz, G. A. (2024). Occurrence of *Neofusicoccum parvum* causing canker and branch dieback of European hazelnut in Maule region, Chile. *Plant Disease*, *108*(2), 523. https://doi.org/10.1094/PDIS-08-23-1539-PDN

Lu, T., Qu, Q., Lavoie, M., Pan, X., Peijnenburg, W. J. G. M., Zhou, Z., Pan, X., Cai, Z., & Qian, H. (2020). Insights into the transcriptional responses of a microbial community to silver nanoparticles in a freshwater microcosm. *Environmental Pollution*, *258*, 113727. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113727

Lu, Z., Rong, K., Li, J., Yang, H., & Chen, R. (2013). Size-dependent antibacterial activities of silver nanoparticles against oral anaerobic pathogenic bacteria. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, *24*(6), 1465–1471. https://doi.org/10.1007/s10856-013-4894-5

Lücking, R., Aime, M. C., Robbertse, B., Miller, A. N., Aoki, T., Ariyawansa, H. A., Cardinali, G., Crous, P. W., Druzhinina, I. S., Geiser, D. M., Hawksworth, D. L., Hyde, K. D., Irinyi, L.,… Schoch, C. L. (2021). Fungal taxonomy and sequence-based nomenclature. *Nature Microbiology*, *6*(5), 540–548. https://doi.org/10.1038/S41564-021-00888-X

Luo, X., Xi, Y., Shen, C., Wang, M., & Wang, H. (2022). Occurrence of *Nigrospora sphaerica* causing leaf blight on *Chrysanthemum morifolium* in China. *Crop Protection*, *157*, 105982. https://doi.org/10.1016/j.cropro.2022.105982

Ly, V. A., Truong, T. P. T., & Nguyen, T. H. (2020). Application of anthracnose resistance-associated molecular markers in the detection of resistant chili pepper cultivars in Vietnam. *Science and Technology Development Journal*, *23*(3). https://doi.org/10.32508/stdj.v23i3.2395

Ma, Q., Cheng, C., Geng, Y., Zang, R., Guo, Y., Yan, L., Xu, C., Zhang, M., & Wu, H. (2023). The draft genome sequence and characterization of *Exserohilum rostratum*, a new causal agent of maize leaf spot disease in Chinese Mainland. *European Journal of Plant Pathology*, *165*(1), 57–71. https://doi.org/10.1007/s10658-022-02588-6

Maduke, A. N., Slippers, B., van der Linde, E., Wingfield, M. J., & Fourie, G. (2024). Botryosphaeriaceae species associated with branch dieback and decline of macadamia trees in South Africa. *Australasian Plant Pathology*, *53*(5), 419–434. https://doi.org/10.1007/s13313-024-00992-6

Mahadevakumar, S., Savitha, A. S., Danteswari, C., Sarma, P. V. S. R. N., Renuka, M., Ajithkumar, K., Mahesh, M., & Sampath Kumar, P. T. S. (2025). Morpho-molecular characterization of *Agroathelia rolfsii* causing leaf blight of sacred lotus (*Nelumbo nucifera*) in the Andaman and Nicobar Islands. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *140*, 102899. https://doi.org/10.1016/J.PMPP.2025.102899

Maharachchikumbura, S. S. N., Hyde, K. D., Groenewald, J. Z., Xu, J., & Crous, P. W. (2014). *Pestalotiopsis* revisited. *Studies in Mycology*, *79*(1), 121–186. https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.09.005

Mahdizadeh, V., Safaie, N., & Khelghatibana, F. (2015). Evaluation of antifungal activity of silver nanoparticles against some phytopathogenic fungi and *Trichoderma harzianum*. *Journal of Crop Protection*, *4*(3), 291–300. http://jcp.modares.ac.ir/article-3-12407-en.html

Mahmad Toher, A. S., Mior Ahmad, Z. A., & Wong, M. Y. (2016). First report of *Exserohilum rostratum* as pathogen of rice brown spot in Malaysia. *Plant Disease*, *100*(1), 226. https://doi.org/10.1094/PDIS-03-15-0276-PDN

Mahmad-Toher, A. S., Govender, N., Dorairaj, D., & Wong, M. Y. (2022). Effects of silica soil amendment against *Exserohilum rostratum*, the fungal pathogen of rice brown spot disease in Peninsular Malaysia. *Scientific Reports*, *12*(1). https://doi.org/10.1038/s41598-022-19308-z

Malandrakis, A. A., Kavroulakis, N., & Chrysikopoulos, C. V. (2019). Science of the total environment use of copper, silver, and zinc nanoparticles against foliar and soil-borne plant pathogens. *Science of the Total Environment*, *670*, 292–299. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.210

Manamgoda, D. S., Cai, L., McKenzie, E. H. C., Chukeatirote, E., & Hyde, K. D. (2012). Two new *Curvularia* species from northern Thailand. *Sydowia*, *64*(2), 255–266.

Manamgoda, D. S., Cai, L., McKenzie, E. H. C., Crous, P. W., Madrid, H., Chukeatirote, E., Shivas, R. G., Tan, Y. P., & Hyde, K. D. (2012). A phylogenetic and taxonomic re-evaluation of the *Bipolaris - Cochliobolus - Curvularia* Complex. *Fungal Diversity*, *56*(1), 131–144. https://doi.org/10.1007/s13225-012-0189-2

Manamgoda, D. S., Rossman, A. Y., Castlebury, L. A., Chukeatirote, E., & Hyde, K. D. (2015). A taxonomic and phylogenetic re-appraisal of the genus *Curvularia* (Pleosporaceae): Human and plant pathogens. *Phytotaxa*, *212*(3), 175. https://doi.org/10.11646/phytotaxa.212.3.1

Manawasinghe, I. S., Phillips, A. J. L., Xu, J., Balasuriya, A., Hyde, K. D., Stępień, Ł., Harischandra, D. L., Karunarathna, A., Yan, J., Weerasinghe, J., Luo, M., Dong, Z., & Cheewangkoon, R. (2021). Defining a species in fungal plant pathology: beyond the species level. *Fungal Diversity 2021 109:1*, *109*(1), 267–282. https://doi.org/10.1007/S13225-021-00481-X

Mansoor, S., Wani, O. A., Lone, J. K., Manhas, S., Kour, N., Alam, P., Ahmad, A., & Ahmad, P. (2022). Reactive oxygen species in plants: From source to sink. *Antioxidants*, *11*(2), 225. https://doi.org/10.3390/antiox11020225

Marambio-Jones, C., & Hoek, E. M. V. (2010). A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *Journal of Nanoparticle Research*, *12*(5), 1531–1551. https://doi.org/10.1007/s11051-010-9900-y

Marathe, K., Naik, J., & Maheshwari, V. (2021). Biogenic synthesis of silver nanoparticles using *Streptomyces* spp. and their antifungal activity against *Fusarium verticillioides*. *Journal of Cluster Science*, *32*(5), 1299–1309. https://doi.org/10.1007/s10876-020-01894-5

Marin-Felix, Y., Hernández-Restrepo, M., & Crous, P. W. (2020). Multi-locus phylogeny of the genus *Curvularia* and description of ten new species. *Mycological Progress*, *19*(6), 559–588. https://doi.org/10.1007/s11557-020-01576-6

Marin-Felix, Y., Senwanna, C., Cheewangkoon, R., & Crous, P. W. (2017). New species and records of *Bipolaris* and *Curvularia* from Thailand. *Mycosphere*, *8*(9), 1556–1574. https://doi.org/10.5943/mycosphere/8/9/11

Marmur, A. (2004). The lotus effect: Superhydrophobicity and metastability. *Langmuir*, *20*(9), 3517–3519. https://doi.org/10.1021/la036369u

Matras, E., Gorczyca, A., Pociecha, E., Przemieniecki, S. W., & Oćwieja, M. (2022). Phytotoxicity of silver nanoparticles with different surface properties on monocots and dicots model plants. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, *22*(2), 1647–1664. https://doi.org/10.1007/s42729-022-00760-9

McKnight, K. H., & Rayner, R. W. (1972). A Mycological Colour Chart. *Mycologia*, *64*(1), 230–233. https://doi.org/10.2307/3758035

McQuillan, J. S., & Shaw, A. M. (2014). Differential gene regulation in the Ag nanoparticle and Ag +-induced silver stress response in *Escherichia coli*: A full transcriptomic profile. *Nanotoxicology*, *8*(1), 177–184. https://doi.org/10.3109/17435390.2013.870243

Meeboon, J., & Takamatsu, S. (2015). *Erysiphe takamatsui*, a powdery mildew of lotus: Rediscovery of teleomorph after 40 years, morphology and phylogeny. *Mycoscience*, *56*(2), 159–167. https://doi.org/10.1016/J.MYC.2014.05.002

Meychik, N. R., Nikolaeva, J. I., & Yermakov, I. P. (2005). Ion exchange properties of the root cell walls isolated from the halophyte plants (*Suaeda altissima* L.) grown under conditions of different salinity. *Plant and Soil*, *277*(1–2), 163–174. https://doi.org/10.1007/s11104-005-6806-z

Milewska-Hendel, A., Zubko, M., Stróż, D., & Kurczyńska, E. U. (2019). Effect of nanoparticles surface charge on the *Arabidopsis thaliana* (L.) roots development and their movement into the root cells and protoplasts. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(7), 1650. https://doi.org/10.3390/ijms20071650

Minh, B. Q., Schmidt, H. A., Chernomor, O., Schrempf, D., Woodhams, M. D., Von Haeseler, A., Lanfear, R., & Teeling, E. (2020). IQ-TREE 2: New models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era. *Molecular Biology and Evolution*, *37*(5), 1530–1534. https://doi.org/10.1093/molbev/msaa015

Mishra, S., Singh, B. R., Naqvi, A. H., & Singh, H. B. (2017). Potential of biosynthesized silver nanoparticles using *Stenotrophomonas* sp. BHU-S7 (MTCC 5978) for management of soil-borne and foliar phytopathogens. *Scientific Reports*, *7*(1). https://doi.org/10.1038/srep45154

Mlay, J. A., Kuwi, S. O., Maleko, D. D., & Mtengeti, E. J. (2022). Incidences of fungal leaf spot disease in buffel grass (*Cenchrus ciliaris*) in some selected pasture farms in Tanzania. *Multidisciplinary Science Journal*, *4*(3), 1–7. https://doi.org/10.31893/multiscience.2022015

Mohankumar, V., Dann, E. K., & Akinsanmi, O. A. (2022). Diversity and pathogenicity of Botryosphaeriaceae associated with macadamia branch dieback in Australia. *Plant Disease*, *106*(10), 2576–2582. https://doi.org/10.1094/PDIS-10-21-2125-RE

Mondéjar-López, M., López-Jimenez, A. J., Ahrazem, O., Gómez-Gómez, L., & Niza, E. (2023). Chitosan coated - biogenic silver nanoparticles from wheat residues as green antifungal and nanoprimig in wheat seeds. *International Journal of Biological Macromolecules*, *225*. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.11.159

Moond, M., Singh, S., Sangwan, S., Devi, R., & Beniwal, R. (2022). Green synthesis and applications of silver nanoparticles: A systematic review. *AATCC Journal of Research*, *9*(6), 272–285. https://doi.org/10.1177/24723444221119847

Mukherjee, A., Peralta-Videa, J. R., Gardea-Torresdey, J., & White, J. C. (2016). Effects and Uptake of Nanoparticles in Plants. *Engineered Nanoparticles and the Environment: Biophysicochemical Processes and Toxicity*, *ii*, 386–408. https://doi.org/10.1002/9781119275855.ch20

Mukherjee, P. K., Balasubramanian, R., Saha, K., Saha, B. P., & Pal, M. (1996). A review on *Nelumbo nucifera* Gaertn. *Ancient Science of Life*, *15*(4), 268–276.

Mullin, B. A. (1993). First report of *Exserohilum rostratum, Curvularia senegalensis*, and *Nigrospora oryzae* infecting Kenaf in Texas. *Plant Disease*, *77*(8), 846C. https://doi.org/10.1094/pd-77-0846c

Mussin, J., Robles-Botero, V., Casañas-Pimentel, R., Rojas, F., Angiolella, L., San Martín-Martínez, E., & Giusiano, G. (2021). Antimicrobial and cytotoxic activity of green synthesis silver nanoparticles targeting skin and soft tissue infectious agents. *Scientific Reports*, *11*(1). https://doi.org/10.1038/s41598-021-94012-y

Narware, J., Singh, S. P., Manzar, N., & Kashyap, A. S. (2023). Biogenic synthesis, characterization, and evaluation of synthesized nanoparticles against the pathogenic fungus *Alternaria solani*. *Frontiers in Microbiology*, *14*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1159251

Nasir, M. N. (2021). Management of Aspergillus leaf spot diseases on Terminalia catappa in Sokoto, Nigeria. *Pacific International Journal*, *4*(1), 7. https://doi.org/10.55014/pij.v4i1.26

Navarro, D. A., Bisson, M. A., & Aga, D. S. (2012). Investigating uptake of water-dispersible CdSe/ZnS quantum dot nanoparticles by *Arabidopsis thaliana* plants. *Journal of Hazardous Materials*, *211–212*, 427–435. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.12.012

Nimbarte, S., Manwatkar, V. G., Thakare, M. U., Yeotkar, S. D., Bhende, A. M., Thakare, R. U., & Malode, U. A. (2025). Deciphering the new pinpoint leaf disease in India caused by *Curvularia dactyloctenicola* on *Costus speciousus*. *Vegetos*. https://doi.org/10.1007/s42535-024-01151-4

Noori, A., White, J. C., & Newman, L. A. (2017). Mycorrhizal fungi influence on silver uptake and membrane protein gene expression following silver nanoparticle exposure. *Journal of Nanoparticle Research*, *19*(2). https://doi.org/10.1007/s11051-016-3650-4

Norphanphoun, C., Gentekaki, E., Hongsanan, S., Jayawardena, R., Senanayake, I. C., Manawasinghe, I. S., Abeywickrama, P. D., Bhunjun, C. S., & Hyde, K. D. (2022). *Diaporthe*: formalizing the species-group concept. *Mycosphere*, *13*(1), 752–819. https://doi.org/10.5943/mycosphere/13/1/9

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. https://doi.org/10.1006/mpev.1996.0376

Osonga, F. J., Akgul, A., Yazgan, I., Akgul, A., Eshun, G. B., Sakhaee, L., & Sadik, O. A. (2020). Size and shape-dependent antimicrobial activities of silver and gold nanoparticles: A model study as potential fungicides. *Molecules*, *25*(11), 2682. https://doi.org/10.3390/molecules25112682

Ouda, S. M. (2014). Antifungal activity of silver and copper nanoparticles on two plant pathogens, *Alternaria alternata* and *Botrytis cinerea*. *Research Journal of Microbiology*, *9*(1), 34–42. https://doi.org/10.3923/jm.2014.34.42

Oury, T. D., Ho, Y. S., Piantadosi, C. A., & Crapo, J. D. (1992). Extracellular superoxide dismutase, nitric oxide, and central nervous system O_2 toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *89*(20), 9715–9719. https://doi.org/10.1073/pnas.89.20.9715

OuYang, M. N., Liu, X., Guo, H. M., Lu, Z. H., Zhou, D. D., & Yang, Z. H. (2021). The different toxic effects of metalaxyl and metalaxyl-M on Tubifex tubifex. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *208*, 111587. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111587

Ouyang, Q., Liu, Y., Oketch, O. R., Zhang, M., Shao, X., & Tao, N. (2021). Citronellal exerts its antifungal activity by targeting ergosterol biosynthesis in *Penicillium digitatum*. *Journal of Fungi*, *7*(6), 432. https://doi.org/10.3390/jof7060432

Papaiah, S., Seshadri Goud, T. E., Devi Prasad, B. S., Narasimha, G., & Vemana, K. (2014). Silver nanoparticles, a potential alternative to conventional anti-fungal agents to fungal pathogens affecting crop plants. *International Journal of Nano Dimension*, *5*(2).

Parveen, J., Sultana, T., Kazmi, A., Malik, K., Ullah, A., Ali, A., Qayyum, B., Raja, N. I., Mashwani, Z. U. R., & Rehman, S. U. (2023). Phytosynthesized nanoparticles as novel antifungal agent for sustainable agriculture: A mechanistic approach, current advances, and future directions. *Journal of Nanotechnology*, *2023*, 1–16. https://doi.org/10.1155/2023/8011189

Patrice, N. D. J., Placide, D., Madjerembe, A., Rony, M. T. P., Gabriel, D., Ulrich, B. F., Bouba, D., & Zachee, A. (2021). In vitro, In vivo and In situ, effect of Mancozeb 80 WP on *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. and Sacc., causative agent of anthracnose of Cashew (*Anacardium occidentale* L.) in Chad and Cameroon. *International Journal of Pathogen Research*, *6*(3), 1–14. https://doi.org/10.9734/ijpr/2021/v6i330161

Pawar, N. V., Patil, V. B., Kamble, S. S., & Dixit, G. B. (2008). First report of *Aspergillus niger* as a plant pathogen on *Zingiber officinale* from India. *Plant Disease*, *92*(9), 1368. https://doi.org/10.1094/PDIS-92-9-1368C

Peng, Y., & Chen, B. (2024). Role of cell membrane homeostasis in the pathogenicity of pathogenic filamentous fungi. *Virulence*, *15*(1). https://doi.org/10.1080/21505594.2023.2299183

Pokhrel, T., Shrestha, D., Dhakal, K., Yadav, P. M., & Adhikari, A. (2022). Comparative analysis of the antioxidant and antidiabetic potential of *Nelumbo nucifera* Gaertn. and *Nymphaea lotus* L. var. *pubescens* (Willd.). *Journal of Chemistry*, *2022*, 1–5. https://doi.org/10.1155/2022/4258124

Polinarski, M. A., Beal, A. L. B., Silva, F. E. B., Bernardi-Wenzel, J., Burin, G. R. M., de Muniz, G. I. B., & Alves, H. J. (2021). New Perspectives of Using Chitosan, Silver, and Chitosan–Silver Nanoparticles against Multidrug-Resistant Bacteria. *Particle and Particle Systems Characterization*, *38*(4). https://doi.org/10.1002/ppsc.202100009

Praveena, R., Kozhamburath, A., Jeevalatha, A., Bhat, A. I., & Krishnamurthy, K. S. (2022). Association of *Exserohilum rostratum* with ginger: Morphological characterization, phylogenetic relationships and pathogenicity assays. *Australasian Plant Pathology*, *51*(3), 333–344. https://doi.org/10.1007/s13313-022-00862-z

Prusky, D., & Lichter, A. (2007). Activation of quiescent infections by postharvest pathogens during transition from the biotrophic to the necrotrophic stage. *FEMS Microbiology Letters*, *268*(1), 1–8. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00603.x

Puig, A. S., Keith, L. M., Matsumoto, T. K., Gutierrez, O. A., & Marelli, J. P. (2021). Virulence tests of *Neofusicoccum parvum, Lasiodiplodia theobromae*, and *Phytophthora palmivora* on *Theobroma cacao*. *European Journal of Plant Pathology*, *159*(4), 851–862. https://doi.org/10.1007/s10658-021-02210-1

Puillandre, N., Lambert, A., Brouillet, S., & Achaz, G. (2012). ABGD, Automatic barcode gap discovery for primary species delimitation. *Molecular Ecology*, *21*(8), 1864–1877. https://doi.org/10.1111/J.1365-294X.2011.05239.X

Qian, H., Li, J., Pan, X., Sun, L., Lu, T., Ran, H., & Fu, Z. (2011). Combined effect of copper and cadmium on heavy metal ion bioaccumulation and antioxidant enzymes induction in *Chlorella vulgaris*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, *87*(5), 512–516. https://doi.org/10.1007/s00128-011-0365-1

Qiao, Y. H., Zhang, C. N., Li, M., Li, H., Mao, Y. F., & Chen, F. M. (2023). Species of the *Colletotrichum* spp., the causal agents of leaf spot on European Hornbeam (*Carpinus betulus*). *Journal of Fungi*, *9*(4), 489. https://doi.org/10.3390/jof9040489

Quaedvlieg, W., Binder, M., Groenewald, J. Z., Summerell, B. A., Carnegie, A. J., Burgess, T. I., & Crous, P. W. (2014). Introducing the consolidated species concept to resolve species in the

teratosphaeriaceae. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, *33*(1), 1–40. https://doi.org/10.3767/003158514X681981
Radhakrishnan, V. S., Dwivedi, S. P., Siddiqui, M. H., & Prasad, T. (2018). In vitro studies on oxidative stress-independent, ag nanoparticles-induced cell toxicity of *Candida albicans*, an opportunistic pathogen. *International Journal of Nanomedicine*, *13*, 91. https://doi.org/10.2147/IJN.S125010
Radhakrishnan, V. S., Mudiam, M. K. R., Kumar, M., Dwivedi, S. P., Singh, S. P., & Prasad, T. (2018). Silver nanoparticles induced alterations in multiple cellular targets, which are critical for drug susceptibilities and pathogenicity in fungal pathogen (*Candida albicans*). *International Journal of Nanomedicine*, *13*. https://doi.org/10.2147/IJN.S150648
Rai, M. K., Deshmukh, S. D., Ingle, A. P., & Gade, A. K. (2012). Silver nanoparticles: The powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, *112*(5), 841–852. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05253.x
Rajput, N. A., Hussainullah, Huo, C., Cao, J. F., Atiq, M., Atif, R. M., Lodhi, A. M., Syed, R. N., Sarfraz, S., Hameed, A., & Zhao, Z. (2020). First report of *Curvularia verruculosa* causing leaf spot disease of grape (*Vitis vinifera*) in Afghanistan. *Journal of Plant Pathology*, *102*(4), 1337. https://doi.org/10.1007/s42161-020-00625-z
Ram, D., Devi, T. P., Koti, P. S., Jeevan, B., Kamil, D., Vanapalli, C. S., Raghu, S., Sunani, S. K., & Kashyap, A. S. (2024). Exploring the taxonomic classification of *Curvularia* genera: Enhancing understanding of phytopathogenic species in Poaceae through morphological and molecular approaches. *Journal of Plant Pathology*, *106*(2), 539–551. https://doi.org/10.1007/s42161-023-01560-5
Rambaut, A. (2018). FigTree v. 1.4.4. *Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, Edinburgh*. http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/
Rampersad, S. N. (2012). Multiple applications of alamar blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors (Switzerland)*, *12*(9), 12347–12360. https://doi.org/10.3390/s120912347
Raza, M., Zhang, Z. F., Hyde, K. D., Diao, Y. Z., & Cai, L. (2019). Culturable plant pathogenic fungi associated with sugarcane in southern China. *Fungal Diversity*, *99*(1), 1–104. https://doi.org/10.1007/s13225-019-00434-5
Rehner, S. A., & Samuels, G. J. (1994). Taxonomy and phylogeny of Gliocladium analysed from nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Mycological Research*, *98*(6), 625–634. https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80409-7
Ribeiro, L. G., Roque, G. S. C., Conrado, R., & De Souza, A. O. (2023). Antifungal activity of mycogenic silver nanoparticles on clinical yeasts and phytopathogens. *Antibiotics*, *12*(1), 91. https://doi.org/10.3390/antibiotics12010091
Riederer, M., & Schreiber, L. (2001). Protecting against water loss: Analysis of the barrier properties of plant cuticles. *Journal of Experimental Botany*, *52*(363), 2023–2032. https://doi.org/10.1093/jexbot/52.363.2023
Rodríguez-Gálvez, E., Haro-Diaz, C., Maza-Aguirre, S., Canahuire-Castillo, F., Sullón-Saucedo, J., & Deising, H. B. (2025). *Lasiodiplodia theobromae* disease symptom development in young avocado (*Persea americana* L.) plants depends on the inoculation method. *Tropical Plant Pathology*, *50*(18), 1–5. https://doi.org/10.1007/s40858-025-00700-9
Rohde, M. M., Snyder, C. M., Sloop, J., Solst, S. R., Donati, G. L., Spitz, D. R., Furdui, C. M., & Singh, R. (2021). The mechanism of cell death induced by silver nanoparticles is distinct from silver cations. *Particle and Fibre Toxicology*, *18*(1). https://doi.org/10.1186/s12989-021-00430-1
Rojas, E. I., Rehner, S. A., Samuels, G. J., Van Bael, S. A., Herre, E. A., Cannon, P., Chen, R., Pang, J., Wang, R., Zhang, Y., Peng, Y. Q., & Sha, T. (2010). *Colletotrichum gloeosporioides* s.l. associated with *Theobroma cacao* and other plants in Panamá: Multilocus phylogenies distinguish host-associated pathogens from asymptomatic endophytes. *Mycologia*, *102*(6), 1318–1338. https://doi.org/10.3852/09-244
Roy, N., Gaur, A., Jain, A., Bhattacharya, S., & Rani, V. (2013). Green synthesis of silver nanoparticles: An approach to overcome toxicity. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *36*(3), 807–812. https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.07.005
Roy, S., Hasan, I., & Guo, B. (2023). Recent advances in nanoparticle-mediated antibacterial applications. *Coordination Chemistry Reviews*, *482*, 215075. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2023.215075
Różalska, B., Sadowska, B., Budzyńska, A., Bernat, P., & Różalska, S. (2018). Biogenic nanosilver synthesized in Metarhizium robertsii waste mycelium extract – As a modulator of *Candida*

albicans morphogenesis, membrane lipidome and biofilm. *PLoS ONE*, *13*(3), e0194254. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194254
Ruiz-Herrera, J., & Ortiz-Castellanos, L. (2019). Cell wall glucans of fungi. A review. *Cell Surface*, *5*, 100022. https://doi.org/10.1016/j.tcsw.2019.100022
Ruta, L. L., Banu, M. A., Neagoe, A. D., Kissen, R., Bones, A. M., & Farcasanu, I. C. (2018). Accumulation of AG(I) by Saccharomyces cerevisiae cells expressing plant metallothioneins. *Cells*, *7*(12), 266. https://doi.org/10.3390/cells7120266
Saha, S., Chakrabarty, P. K., & Banerjee, K. (2022). Producing crops without Mancozeb? Perspectives on recent regulatory dilemmas and ways out. *ACS Agricultural Science and Technology*, *2*(2), 272–275. https://doi.org/10.1021/acsagscitech.2c00047
Salleh, A., Naomi, R., Utami, N. D., Mohammad, A. W., Mahmoudi, E., Mustafa, N., & Fauzi, M. B. (2020). The potential of silver nanoparticles for antiviral and antibacterial applications: A mechanism of action. *Nanomaterials*, *10*(8), 1566. https://doi.org/10.3390/nano10081566
Samson, R. A., Visagie, C. M., Houbraken, J., Hong, S. B., Hubka, V., Klaassen, C. H. W., Perrone, G., Seifert, K. A., Susca, A., Tanney, J. B., Varga, J., Kocsubé, S., Szigeti, G., Yaguchi, T., & Frisvad, J. C. (2014). Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, *78*(1), 141–173. https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.07.004
Santiago, M., Pagay, V., & Stroock, A. D. (2013). Impact of electroviscosity on the hydraulic conductance of the bordered pit membrane: A theoretical investigation. *Plant Physiology*, *163*(2), 999–1011. https://doi.org/10.1104/pp.113.219774
Sasia, E., González-Rabelino, P., Collazo, D., Rousserie, G., & Silvera-Pérez, E. (2023). First report of *Neofusicoccum parvum* causing stem canker on cannabis in Uruguay. *Agrociencia Uruguay*, *27*, e1172. https://doi.org/10.31285/AGRO.27.1172
Savithramma, N., Linga Rao, M., Rukmini, K., & Suvarnalatha Devi, P. (2011). Antimicrobial activity of silver nanoparticles synthesized by using medicinal plants. *International Journal of ChemTech Research*, *3*(3).
Schoch, C. L., Crous, P. W., Groenewald, J. Z., Boehm, E. W. A., Burgess, T. I., de Gruyter, J., de Hoog, G. S., Dixon, L. J., Grube, M., … Spatafora, J. W. (2009). A class-wide phylogenetic assessment of Dothideomycetes. *Studies in Mycology*, *64*, 1–15. https://doi.org/10.3114/sim.2009.64.01
Schönbach, C. (2013). Koch's Postulates. In W. Dubitzky, O. Wolkenhauer, K.-H. Cho, & H. Yokota (Eds.), *Encyclopedia of Systems Biology*, 1086–1087. Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9863-7_746
Schwab, F., Zhai, G., Kern, M., Turner, A., Schnoor, J. L., & Wiesner, M. R. (2016). Barriers, pathways and processes for uptake, translocation and accumulation of nanomaterials in plants - Critical review. *Nanotoxicology*, *10*(3), 257–278. https://doi.org/10.3109/17435390.2015.1048326
Selvakumar, R., Remya, M., Akshay Ravi, R. B., & Viswanathan, R. (2023). First report of *Exserohilum rostratum* causing sugarcane leaf spot in India. *Sugar Tech*, *25*(5), 1267–1270. https://doi.org/10.1007/s12355-023-01281-0
Senthil, B., Rajasekar, A., & Devasena, T. (2018). Mechanism of bactericidal action of biosynthesized silver nanoparticles. *Research Journal of Biotechnology*, *13*(1), 72–77.
Senthilkumar, M., Amaresan, N., & Sankaranarayanan, A. (2021). Estimation of Malondialdehyde (MDA) by Thiobarbituric Acid (TBA) Assay. In M. Senthilkumar, N. Amaresan, & A. Sankaranarayanan (Eds.), *Plant-Microbe Interactions: Laboratory Techniques* (pp. 103–105). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1080-0_25
Serrano, R., González-Menéndez, V., Tormo, J. R., & Genilloud, O. (2023). Development and validation of a HTS platform for the discovery of new antifungal agents against four relevant fungal phytopathogens. *Journal of Fungi*, *9*(9), 883. https://doi.org/10.3390/jof9090883
Shao, Y., Zhao, J., Fan, Y., Wan, Z., Lu, L., Zhang, Z., Ming, W., & Ren, L. (2020). Shape memory superhydrophobic surface with switchable transition between "Lotus Effect" to "Rose Petal Effect". *Chemical Engineering Journal*, *382*, 122989. https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.122989
Sharkey, T. D. (2024). The end game(s) of photosynthetic carbon metabolism. *Plant Physiology*, *195*(1), 67–78. https://doi.org/10.1093/plphys/kiad601
Sharma, B. R., Gautam, L. N. S., Adhikari, D., & Karki, R. (2017). A comprehensive review on chemical profiling of *Nelumbo nucifera*: Potential for drug development. *Phytotherapy Research*, *31*(1), 3–26. https://doi.org/10.1002/ptr.5732
Sharma, T. K., Khan, N. K. M. I., & Indu, R. S. (2021). Evaluation of yield loss assessment caused due to Curvularia leaf spot (Curvularia lunata) in maize. *International Journal of Current*

Microbiology and Applied Sciences, *10*(9), 538–544. https://doi.org/10.20546/ijcmas.2021.1009.062
Shen, T., Wang, Q., Li, C., Zhou, B., Li, Y., & Liu, Y. (2020). Transcriptome sequencing analysis reveals silver nanoparticles antifungal molecular mechanism of the soil fungi *Fusarium solani* species complex. *Journal of Hazardous Materials*, *388*, 122063. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122063
Shirsath, L. P., Patil, S. P., & Patil, U. K. (2018). Incidence of leaf spot disease on cotton caused by *Curvularia verruculosa* and role of its hydrolytic enzymes in pathogenesis. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, *24*(4), 711–714. https://doi.org/10.1007/s12298-018-0557-9
Shuping, D. S. S., & Eloff, J. N. (2017). The use of plants to protect plants and food against fungal pathogens: A Review. *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines: AJTCAM*, *14*(4), 120–127. https://doi.org/10.21010/ajtcam.v14i4.14
Siddiqui, M. H., Al-Whaibi, M. H., Firoz, M. H. A. M., Al-Khaishany, M. Y., Impact, T., Al-Whaibi, M. H., Firoz, M. H. A. M., & Al-Khaishany, M. Y. (2015). Nanotechnology and plant sciences. In *Nanotechnology and Plant Sciences: Nanoparticles and Their Impact on Plants*. https://doi.org/10.1007/978-3-319-14502-0
Silva, D. N., Talhinhas, P., Várzea, V., Cai, L., Paulo, O. S., & Batista, D. (2012). Application of the Apn2/MAT locus to improve the systematics of the *Colletotrichum gloeosporioides* complex: An example from coffee (*Coffea* spp.) Hosts. *Mycologia*, *104*(2), 396–409. https://doi.org/10.3852/11-145
Šimončicová, J., Kaliňáková, B., Kováčik, D., Medvecká, V., Lakatoš, B., Kryštofová, S., Hoppanová, L., Palušková, V., Hudecová, D., Ďurina, P., & Zahoranová, A. (2018). Cold plasma treatment triggers antioxidative defense system and induces changes in hyphal surface and subcellular structures of *Aspergillus flavus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *102*(15), 6647–6658. https://doi.org/10.1007/s00253-018-9118-y
Singh, J., Kumar, A., Nayal, A. S., Vikal, S., Shukla, G., Singh, A., Singh, A., Goswami, S., Kumar, A., Gautam, Y. K., Verma, Y., Gaurav, S. S., & Pratap, D. (2024). Comprehensive antifungal investigation of green synthesized silver nanoformulation against four agriculturally significant fungi and its cytotoxic applications. *Scientific Reports*, *14*(1). https://doi.org/10.1038/s41598-024-56619-9
Sklenář, F., Jurjević, Zalar, P., Frisvad, J. C., Visagie, C. M., Kolařík, M., Houbraken, J., Chen, A. J., Yilmaz, N., Seifert, K. A., Coton, M., Déniel, F., Gunde-Cimerman, N., Samson, R. A., Peterson, S. W., & Hubka, V. (2017). Phylogeny of xerophilic aspergilli (subgenus Aspergillus) and taxonomic revision of section Restricti. *Studies in Mycology*, *88*, 161–236. https://doi.org/10.1016/j.simyco.2017.09.002
Skóra, B., Krajewska, U., Nowak, A., Dziedzic, A., Barylyak, A., & Kus-Liśkiewicz, M. (2021). Noncytotoxic silver nanoparticles as a new antimicrobial strategy. *Scientific Reports*, *11*(1). https://doi.org/10.1038/s41598-021-92812-w
Slavin, Y. N., & Bach, H. (2022). Mechanisms of antifungal properties of metal nanoparticles. *Nanomaterials*, *12*(24), 4470. https://doi.org/10.3390/nano12244470
Smith, N. E. C. (2024). Call me by your name: Considerations of DNA sequences as types within wider discussions on fungal nomenclature. *Mycology*, *15*(2), 137–143. https://doi.org/10.1080/21501203.2023.2295412
Soares, W. R. O., Vieira, W. A. S., Reis, A., Miller, R. N. G., Santos, M. D. M., de Castro Costa, É., Câmara, M. P. S., & Café-Filho, A. C. (2024). Diversity of *Colletotrichum* causing anthracnose on *Psidium guajava* in varied Brazilian physiographic regions. *Plant Pathology*, *73*(5), 1213–1228. https://doi.org/10.1111/ppa.13879
Souza, T. M., Pereira, J., Bezerra, J. L., & de Oliveira, R. J. V. (2023). First report of Colletotrichum tropicale causing leaf spot on Cariniana legalis in Brazil. *Plant Disease*, *107*(2), 578. https://doi.org/10.1094/PDIS-11-21-2522-PDN
Spielman-Sun, E., Avellan, A., Bland, G. D., Tappero, R. V., Acerbo, A. S., Unrine, J. M., Giraldo, J. P., & Lowry, G. V. (2019). Nanoparticle surface charge influences translocation and leaf distribution in vascular plants with contrasting anatomy. *Environmental Science: Nano*, *6*(8), 2508–2519. https://doi.org/10.1039/c9en00626e
Stankowski, S., & Ravinet, M. (2021). Defining the speciation continuum. *Evolution*, *75*(6), 1256–1273. https://doi.org/10.1111/evo.14215
Stevens, F. L. (1931). The Ascigerous stage of Colletotrichum lagenarium induced by Ultra-Violet irradiation. *Mycologia*, *23*(2), 134. https://doi.org/10.2307/3753767
Su, H., Hu, C., Cao, B., Qu, X., Guan, P., Mu, Y., Han, L., & Huang, X. (2020). A semisynthetic borrelidin analogue BN-3b exerts potent antifungal activity against *Candida albicans* through

ROS-mediated oxidative damage. *Scientific Reports*, *10*(1). https://doi.org/10.1038/s41598-020-61681-0
Sun, Y. R., Jayawardena, R. S., Sun, J. E., & Wang, Y. (2023). Pestalotioid species associated with medicinal plants in Southwest China and Thailand. *Microbiology Spectrum*, *11*(1), e0398722. https://doi.org/10.1128/spectrum.03987-22
Syu, Y. yu, Hung, J. H., Chen, J. C., & Chuang, H. wen. (2014). Impacts of size and shape of silver nanoparticles on *Arabidopsis* plant growth and gene expression. *Plant Physiology and Biochemistry*, *83*, 57–64. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.07.010
Talhinhas, P., & Baroncelli, R. (2021). *Colletotrichum* species and complexes: geographic distribution, host range, and conservation status. *Fungal Diversity*, *110*(1), 109–198. https://doi.org/10.1007/s13225-021-00491-9
Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, *38*(7), 3022. https://doi.org/10.1093/molbev/msab120
Tang, H., Zheng, L., Yan, S. L., Wang, Q. Z., & Li, J. (2017). First report of rot disease on post-harvest lotus roots caused by *Fusarium oxysporum* in China. *Journal of Plant Pathology*, *99*(2). https://doi.org/10.4454/jpp.v99i2.3856
Tang, Z., Lou, J., Mo, J., He, L., Chen, Y., Wu, H., Zeng, W., Shen, Y., Wu, C., Wang, Z., & Zhang, L. (2023). First worldwide report of *Exserohilum rostratum* causing leaf spot on Strawberry (*Fragaria* x *ananassa*). *Plant Disease*, *107*(8), 2532. https://doi.org/10.1094/PDIS-07-22-1724-PDN
Tarazona, A., Gómez, J. V., Mateo, E. M., Jiménez, M., & Mateo, F. (2019). Antifungal effect of engineered silver nanoparticles on phytopathogenic and toxigenic *Fusarium* spp. and their impact on mycotoxin accumulation. *International Journal of Food Microbiology*, *306*, 108259. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108259
Tedersoo, L., Geisen, S., Chang, Y., & Nilsson, R. H. (2025). Toward DNA-based taxonomy of prokaryotes and microeukaryotes. *Trends in Genetics*. https://doi.org/10.1016/J.TIG.2025.07.009
Tedersoo, L., Moghadam, M. S. H., Panksep, K., Prins, V., Anslan, S., Mikryukov, V., Bahram, M., Abarenkov, K., Wurzbacher, C., Ding, Y., Alkahtani, S. H., & Nilsson, R. H. (2025). Thirty novel fungal lineages: formal description based on environmental samples and DNA. *MycoKeys 124*, 1–121. https://doi.org/10.3897/mycokeys.124.161674
Templeton, M. D., Rikkerink, E. H. A., Solon, S. L., & Crowhurst, R. N. (1992). Cloning and molecular characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-encoding gene and cDNA from the plant pathogenic fungus *Glomerella cingulata*. *Gene*, *122*(1). https://doi.org/10.1016/0378-1119(92)90055-T
Teodoro, J. S., Simões, A. M., Duarte, F. V., Rolo, A. P., Murdoch, R. C., Hussain, S. M., & Palmeira, C. M. (2011). Assessment of the toxicity of silver nanoparticles in vitro: A mitochondrial perspective. *Toxicology in Vitro*, *25*(3), 664–670. https://doi.org/10.1016/j.tiv.2011.01.004
Terzioğlu, E., Arslan, M., Balaban, B. G., & Çakar, Z. P. (2022). Microbial silver resistance mechanisms: recent developments. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *38*(9). https://doi.org/10.1007/s11274-022-03341-1
Thanh, L. T. H., Tien, N. T. T., Trang, N. T. T., Trieu, T. Q., Tien, N. Q. D., & Loc, N. H. (2025). First report of *Colletotrichum siamense* and *Colletotrichum endophyticum* associated with anthracnose on avocado (*Persea americana* Mill.) in Vietnam. *Journal of Plant Pathology*, *107*(1), 633–647. https://doi.org/10.1007/s42161-024-01813-x
Thao, L. D., Choi, H., Choi, Y., Mageswari, A., Lee, D., Kim, D. H., Shin, H. D., Choi, H., Ju, H. J., & Hong, S. B. (2024). Re-identification of *Colletotrichum gloeosporioides* species complex isolates in Korea and their host plants. *Plant Pathology Journal*, *40*(1), 16–29. https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.09.2023.0133
Thao, L. D., Hien, L. T., Trang, T. T. T., Trinh, P. T., & Tuan, D. K. (2023). First report of *Lasiodiplodia theobromae* causing fruit rot of jackfruit in Vietnam. *Indian Phytopathology*, *76*(4), 1137–1140. https://doi.org/10.1007/s42360-023-00684-z
Thompson, S. M., Grams, R. A., Neate, S. M., Shivas, R. G., Ryley, M. J., Tan, Y. P., Aitken, E. A. B., Wright, G. C., & O'Connor, D. J. (2018). First reports of *Diaporthe kongii, D. masirevicii*, and *D. ueckerae* associated with stem and peg dieback on Peanut in Australia. *Plant Disease*, *102*(7), 1459. https://doi.org/10.1094/PDIS-12-17-1930-PDN
Torres-Cruz, T. J., Abbasi, M., Simmons, D. R., & Aime, M. C. (2025). Checklist of Rust Fungi (Basidiomycota, Pucciniales) and their hosts in Indiana, United States of America. *MycoKeys 121: 167-235*, *121*, 167–235. https://doi.org/10.3897/mycokeys.121.148853

Trai, V. T. N., Ha, T. T. T., & Hung, N. B. (2024). First report of *Lasiodiplodia theobromae* causing gummosis on *Citrus grandis* (L.) Osbeck in Vietnam. *Research in Plant Disease*, *30*(1), 78–81. https://doi.org/10.5423/RPD.2024.30.1.78

Tripathi, D. K., Tripathi, A., Shweta, Singh, S., Singh, Y., Vishwakarma, K., Yadav, G., Sharma, S., Singh, V. K., Mishra, R. K., Upadhyay, R. G., Dubey, N. K., Lee, Y., & Chauhan, D. K. (2017). Uptake, accumulation and toxicity of silver nanoparticle in autotrophic plants, and heterotrophic microbes: A concentric review. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 1–16. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00007

Tuan, N. T. (2023). Land-use efficiency of some agricultural livelihood models on low-lying land: A Study in Ha Tinh, Vietnam. *Universal Journal of Agricultural Research*, *11*(1), 10. https://doi.org/10.13189/ujar.2023.110102

Vagabov, V. M., Ivanov, A. Y., Kulakovskaya, T. V., Kulakovskaya, E. V., Petrov, V. V., & Kulaev, I. S. (2008). Efflux of potassium ions from cells and spheroplasts of *Saccharomyces cerevisiae* yeast treated with silver and copper ions. *Biochemistry (Moscow)*, *73*(11), 1224–1227. https://doi.org/10.1134/S0006297908110084

van Vuuren, N., Yilmaz, N., Wingfield, M. J., & Visagie, C. M. (2024). Five novel *Curvularia* species (Pleosporaceae, Pleosporales) isolated from fairy circles in the Namib desert. *Mycological Progress*, *23*(1), 39. https://doi.org/10.1007/s11557-024-01977-x

Velho, A. C., Stadnik, M. J., & Wallhead, M. (2019). Unraveling *Colletotrichum* species associated with Glomerella leaf spot of apple. *Tropical Plant Pathology*, *44*(2), 197–204. https://doi.org/10.1007/s40858-018-0261-x

Veloso, J. S., Câmara, M. P. S., Lima, W. G., Michereff, S. J., & Doyle, V. P. (2018). Why species delimitation matters for fungal ecology: *Colletotrichum* diversity on wild and cultivated cashew in Brazil. *Fungal Biology*, *122*(7), 677–691. https://doi.org/10.1016/j.funbio.2018.03.005

Vera-Reyes, I., Altamirano-Hernández, J., Reyes-de la Cruz, H., Granados-Echegoyen, C. A., Loera-Alvarado, G., López-López, A., García-Cerda, L. A., & Loera-Alvarado, E. (2022). Inhibition of phytopathogenic and beneficial fungi applying silver nanoparticles in vitro. *Molecules*, *27*(23), 8147. https://doi.org/10.3390/molecules27238147

Vest, K. E., Leary, S. C., Winge, D. R., & Cobine, P. A. (2013). Copper import into the mitochondrial matrix in Saccharomyces cerevisiae is mediated by Pic2, a mitochondrial carrier family protein. *Journal of Biological Chemistry*, *288*(33), 23884–23892. https://doi.org/10.1074/jbc.M113.470674

Vieira, W. A. S., Lima, W. G., Nascimento, E. S., Michereff, S. J., Câmara, M. P. S., & Doyle, V. P. (2017). The impact of phenotypic and molecular data on the inference of *Colletotrichum* diversity associated with *Musa*. *Mycologia*, *109*(6), 912–934. https://doi.org/10.1080/00275514.2017.1418577

Vijayaram, S., Razafindralambo, H., Sun, Y. Z., Vasantharaj, S., Ghafarifarsani, H., Hoseinifar, S. H., & Raeeszadeh, M. (2024). Applications of green-synthesized metal nanoparticles — A Review. *Biological Trace Element Research*, *202*(1), 360–386. https://doi.org/10.1007/s12011-023-03645-9

Vilgalys, R., & Hester, M. (1990). Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology*, *172*(8), 4238–4246. https://doi.org/10.1128/jb.172.8.4238-4246.1990

Voigt, K., James, T. Y., Kirk, P. M., Santiago, A. L. C. M. de A., Waldman, B., Griffith, G. W., Fu, M., Radek, R., Strassert, J. F. H., Wurzbacher, C., Jerônimo, G. H., Simmons, D. R., Seto, K., Gentekaki, E., Hurdeal, V. G., Hyde, K. D., Nguyen, T. T. T., & Lee, H. B. (2021). Early-diverging fungal phyla: taxonomy, species concept, ecology, distribution, anthropogenic impact, and novel phylogenetic proposals. *Fungal Diversity*, *109*(1), 59–98. https://doi.org/10.1007/S13225-021-00480-Y

Vu, Q. H. N., Tran, T. T. N., Tran, L. T., Nguyen, T. T. T., Pham, T. T. T., Hoang, Q. T., & Pham, T. T. D. (2024). Identification of fungal species associated with chilli fruit disease in North-Central Vietnam. *Journal of Plant Pathology*, *106*(2), 507–526. https://doi.org/10.1007/s42161-023-01551-6

Wang, C. Bin, Li, Y., Xue, H., Piao, C. G., & Jiang, N. (2023). Diversity of *Colletotrichum* species causing anthracnose on three oak species (*Quercus acutissima, Q. mongolica* and *Q. variabilis*) in China. *Plant Pathology*, *72*(9), 1699–1715. https://doi.org/10.1111/ppa.13781

Wang, G. F., Tian, T., Meng, J. F., Xiao, X. Q., & Xiao, Y. N. (2020). First report of *Fusarium incarnatum* causing rot disease on lotus in China. *Journal of Plant Pathology*, *102*(2), 595. https://doi.org/10.1007/s42161-019-00477-2

Wang, H., Liu, X., Gan, H., Chen, W., Wu, P., Li, L., & He, Z. (2019). Genomic and biological characterization of a novel strain of sweet potato latent virus isolated from lotus (*Nelumbo*

nucifera Gaertn.). *Journal of Plant Pathology*, *101*(4). https://doi.org/10.1007/s42161-019-00338-y
Wang, L., Fu, J., Li, M., Fragner, L., Weckwerth, W., & Yang, P. (2016). Metabolomic and proteomic profiles reveal the dynamics of primary metabolism during seed development of lotus (*Nelumbo nucifera*). *Frontiers in Plant Science*, *7*. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00750
Wang, M., Liu, F., Crous, P. W., & Cai, L. (2017). Phylogenetic reassessment of *Nigrospora*: Ubiquitous endophytes, plant and human pathogens. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, *39*(1), 118–142. https://doi.org/10.3767/persoonia.2017.39.06
Wang, X. C., Zhuang, W. Y., Lira, C., Wang, X. C., & Zhuang, W. Y. (2022). New species of *Aspergillus* (Aspergillaceae) from Tropical Islands of China. *Journal of Fungi 2022, 8*(3), 225. https://doi.org/10.3390/JOF8030225
Wang, Y. C., Hao, X. Y., Wang, L., Xiao, B., Wang, X. C., & Yang, Y. J. (2016). Diverse *Colletotrichum* species cause anthracnose of tea plants (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) in China. *Scientific Reports*, *6*. https://doi.org/10.1038/srep35287
Wang, Y., Pan, X. J., Zhang, Q., & Zhao, D. G. (2018). First report of *Curvularia asianensis* causing leaf blotch of *Epipremnum pinnatum* in Guangxi Autonomous Region of China. *Plant Disease*, *102*(9), 1854. https://doi.org/10.1094/PDIS-01-18-0145-PDN
Wanjiku, E. K., Waceke, J. W., Wanjala, B. W., & Mbaka, J. N. (2020). Identification and pathogenicity of fungal pathogens associated with stem end rots of avocado fruits in Kenya. *International Journal of Microbiology*, *2020*, 4063697. https://doi.org/10.1155/2020/4063697
Wei, T., Luo, M., Zhang, H., Jia, W., Zeng, Y., & Jiang, Y. (2022). *Curvularia verruculosa* as new causal pathogen of common bean leaf spot disease in China. *Crop Protection*, *162*, 106091. https://doi.org/10.1016/j.cropro.2022.106091
Wen, H., Shi, H., Jiang, N., Qiu, J., Lin, F., & Kou, Y. (2023). Antifungal mechanisms of silver nanoparticles on mycotoxin-producing rice false smut fungus. *IScience*, *26*(1), 105763. https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.105763
White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics: PCR - protocols and applications - a laboratory manual. In *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Issue 1).
Wong, B. S. E., Hu, Q., & Baeg, G. H. (2017). Epigenetic modulations in nanoparticle-mediated toxicity. *Food and Chemical Toxicology*, *109*, 746–752. https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.07.006
Worrall, E. A., Hamid, A., Mody, K. T., Mitter, N., & Pappu, H. R. (2018). Nanotechnology for plant disease management. *Agronomy*, *8*(12), 285. https://doi.org/10.3390/agronomy8120285
Xia, Z. K., Ma, Q. H., Li, S. Y., Zhang, D. Q., Cong, L., Tian, Y. L., & Yang, R. Y. (2016). The antifungal effect of silver nanoparticles on *Trichosporon asahii*. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, *49*(2), 182–188. https://doi.org/10.1016/j.jmii.2014.04.013
Xie, S. N., Li, B. Y., Ru, Y. Y., Sun, J., & Hao, J. J. (2022). First report of *Exserohilum rostratum* causing leaf spot on maize (*Zea mays*) in Henan, China. *Plant Disease*, *106*(6), 1748. https://doi.org/10.1094/PDIS-04-21-0860-PDN
Yakoup, A. Y., Kamel, A. G., Elbermawy, Y., Abdelsattar, A. S., & El-Shibiny, A. (2024). Characterization, antibacterial, and cytotoxic activities of silver nanoparticles using the whole biofilm layer as a macromolecule in biosynthesis. *Scientific Reports*, *14*(1). https://doi.org/10.1038/s41598-023-50548-9
Yan, J. Y., Xie, Y., Zhang, W., Wang, Y., Liu, J. K., Hyde, K. D., Seem, R. C., Zhang, G. Z., Wang, Z. Y., Yao, S. W., Bai, X. J., Dissanayake, A. J., Peng, Y. L., & Li, X. H. (2013). Species of Botryosphaeriaceae involved in grapevine dieback in China. *Fungal Diversity*, *61*(1), 221–236. https://doi.org/10.1007/s13225-013-0251-8
Yang, Q., Wang, J., Zhang, P., Xie, S., Yuan, X., Hou, X., Yan, N., Fang, Y., & Du, Y. (2020). In vitro and in vivo antifungal activity and preliminary mechanism of cembratrien-diols against *Botrytis cinerea*. *Industrial Crops and Products*, *154*, 112745. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112745
Yi, R. H., Huang, Y., Liu, Q., Peng, Y. F., & Li, D. (2023). *Dalbergia odorifera*, a new host of *Colletotrichum tropicale* causing anthracnose in China. *Plant Disease*, *107*(10), 3280. https://doi.org/10.1094/PDIS-01-23-0179-PDN
Yin, X., Li, X., Yin, J. J., & Wu, X. (2016). First report of *Phytopythium helicoides* causing rhizome rot of asian lotus in China. *Plant Disease*, *100*(2), 532. https://doi.org/10.1094/PDIS-07-15-0833-PDN

Yoshimi, A., Miyazawa, K., Kawauchi, M., & Abe, K. (2022). Cell wall integrity and its industrial applications in filamentous fungi. *Journal of Fungi*, *8*(5), 435. https://doi.org/10.3390/jof8050435

Yu, X., Sheng, J. J., Zheng, X. W., Diao, Y., Zheng, X. F., Xie, K. Q., Zhou, M. Q., & Hu, Z. L. (2015). First report of Dasheen mosaic virus infecting lotus (*Nelumbo nucifera*) in China. *Plant Disease*, *99*(10), 1449. https://doi.org/10.1094/PDIS-01-15-0106-PDN

Yu, X., Zhang, J., Zhang, X., Yang, X., Xu, X., Lin, J., Bing, H., Wang, X., Zhao, J., & Xiang, W. (2022). Identification and pathogenicity of fungi associated with leaf spot of muskmelon in Eastern Shandong province, China. *Plant Disease*, *106*(3), 872–890. https://doi.org/10.1094/PDIS-06-21-1126-RE

Yu, Y. T., Wei, X., Liu, Y., Dong, G., Hao, C. Y., Zhang, J., Jiang, J. Z., Cheng, J. T., Liu, A., & Chen, S. (2022). Identification and quantification of oligomeric proanthocyanidins, alkaloids, and flavonoids in lotus seeds: A potentially rich source of bioactive compounds. *Food Chemistry*, *379*, 132124. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132124

Yu, Z., Li, Q., Wang, J., Yu, Y., Wang, Y., Zhou, Q., & Li, P. (2020). Reactive Oxygen Species - related nanoparticle toxicity in the biomedical field. *Nanoscale Research Letters*, *15*(1). https://doi.org/10.1186/s11671-020-03344-7

Zapata, M., Rodríguez-Serrano, E., Castro, J. F., Santelices, C., Carrasco-Fernández, J., Damm, U., & Palfner, G. (2024). Novel species and records of *Colletotrichum* associated with native woody plants in south-central Chile. *Mycological Progress*, *23*(1). https://doi.org/10.1007/s11557-024-01956-2

Zeng, Y., Himmel, M. E., & Ding, S. Y. (2017). Visualizing chemical functionality in plant cell walls. *Biotechnology for Biofuels*, *10*(1). https://doi.org/10.1186/s13068-017-0953-3

Zhang, J., Ma, S., Du, S., Chen, S., & Sun, H. (2019). Antifungal activity of thymol and carvacrol against postharvest pathogens *Botrytis cinerea*. *Journal of Food Science and Technology*, *56*(5), 2611–2620. https://doi.org/10.1007/s13197-019-03747-0

Zhang, L., Shu, M., Sun, X., Shi, X., & Cui, R. (2019). First report of *Alternaria tenuissima* causing *Nelumbo nucifera* leaf spot in China. *Plant Disease*, *103*(3), 585. https://doi.org/10.1094/PDIS-03-18-0472-PDN

Zhang, M., Li, D., Si, Y., Ju, Y., & Zhu, L. (2023). *Colletotrichum* species associated with anthracnose in *Salix babylonica* in China. *Plants*, *12*(8), 1679. https://doi.org/10.3390/plants12081679

Zhang, M., Sun, W., Li, Q., Tang, L., Huang, S., Guo, T., Mo, J., & Huang, H. (2023). Anthracnose of *Philodendron bipinnatifidum* caused by *Colletotrichum karsti* and *C. endophytica* in Guangxi, China. *Plant Disease*, *107*(2), 576. https://doi.org/10.1094/PDIS-10-21-2236-PDN

Zhang, Q. H., Huang, L. L., Liu, Y. J., Ai, Y., & Peng, D. H. (2018). First report of leaf spot of lotus (Nelumbo nucifera) caused by *Nigrospora oryzae* in China. *Plant Disease*, *102*(5), 1038. https://doi.org/10.1094/PDIS-10-17-1676-PDN

Zhang, X. F., Liu, Z. G., Shen, W., & Gurunathan, S. (2016). Silver nanoparticles: Synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(9), 1534. https://doi.org/10.3390/ijms17091534

Zhang, X., Yuan, X., Cheng, S., Huo, D., Long, H., Liu, B., Xiong, G., & Jiang, J. (2023). First report of leaf spot on *Camellia sinensis* caused by *Neofusicoccum parvum* in China. *Journal of Plant Pathology*, *105*(3), 1235. https://doi.org/10.1007/s42161-023-01456-4

Zhang, Y., Fu, L., Li, S., Yan, J., Sun, M., Giraldo, J. P., Matyjaszewski, K., Tilton, R. D., & Lowry, G. V. (2021). Star polymer size, charge content, and hydrophobicity affect their leaf uptake and translocation in plants. *Environmental Science and Technology*, *55*(15), 10758–10768. https://doi.org/10.1021/acs.est.1c01065

Zhang, Y., Martinez, M. R., Sun, H., Sun, M., Yin, R., Yan, J., Marelli, B., Giraldo, J. P., Matyjaszewski, K., Tilton, R. D., & Lowry, G. V. (2023). Charge, aspect ratio, and plant species affect uptake efficiency and translocation of polymeric agrochemical nanocarriers. *Environmental Science and Technology*, *57*(22), 8269–8279. https://doi.org/10.1021/acs.est.3c01154

Zhang, Y., Wu, H., Yu, X., Chen, F., & Wu, J. (2012). Microscopic observations of the lotus leaf for explaining the outstanding mechanical properties. *Journal of Bionic Engineering*, *9*(1), 84–90. https://doi.org/10.1016/S1672-6529(11)60100-5

Zhao, R., Mao, L. J., & Zhang, C. L. (2023). Three new species of *Trichoderma* (Hypocreales, Hypocreaceae) from soils in China. *MycoKeys 97: 21-40*, *97*, 21–40. https://doi.org/10.3897/mycokeys.97.101635

Zhao, X., Guo, M., Luo, J., Zhang, H., Lv, J., Zhou, F., Ru, Q., Jin, Z., Yang, S., & Yang, M. (2024). Inhibitory mechanism and application of cinnamon essential oil against *Aspergillus flavus*. *LWT*, *201*, 116267. https://doi.org/10.1016/J.LWT.2024.116267

Zhao, Y., Wang, Y., Yang, H., Wang, W., Wu, J., & Hu, X. (2016). Quantitative proteomic analyses identify aba-related proteins and signal pathways in maize leaves under drought conditions. *Frontiers in Plant Science*, *7*. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01827

Zheng, X. R., Zhang, M. J., & Chen, F. M. (2024). *Colletotrichum* species causing *Cyclocarya paliurus* anthracnose in southern China. *Forests*, *15*(3), 490. https://doi.org/10.3390/f15030490

Zheng, X. R., Zhang, M. J., Shang, X. L., Fang, S. Z., & Chen, F. M. (2021). Etiology of *Cyclocarya paliurus* Anthracnose in Jiangsu Province, China. *Frontiers in Plant Science*, *11*. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.613499

Zheng, X. R., Liu, C. L., Zhang, M. J., Shang, X. L., Fang, S. Z., & Chen, F. M. (2021). First report of leaf blight of *Cyclocarya paliurus* caused by *Nigrospora sphaerica* in China. *Crop Protection*, *140*, 105453. https://doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105453

Zheng, Y., Wang, Q., Zhuang, W., Lu, X., Miron, A., Chai, T. T., Zheng, B., & Xiao, J. (2016). Cytotoxic, antitumor and immunomodulatory effects of the water-soluble polysaccharides from lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) seeds. *Molecules*, *21*(11), 1465. https://doi.org/10.3390/molecules21111465

Zhou, Y., Gong, G., Cui, Y., Zhang, D., Chang, X., Hu, R., Liu, N., & Sun, X. (2015). Identification of Botryosphaeriaceae species causing kiwifruit rot in Sichuan Province, China. *Plant Disease*, *99*(5), 699–708. https://doi.org/10.1094/PDIS-07-14-0727-RE

Zhou, Y. N., Song, W. W., Xue, Z. X., & Liang, C. (2019). First report of lotus powdery mildew caused by *Erysiphe takamatsui* in China. *Plant Disease*, *103*(7), 1781. https://doi.org/10.1094/PDIS-02-19-0280-PDN

Zhou, Y., Zhang, W., Li, Y., Ji, S., Li, X., Hyde, K. D., Zhang, K., Phillips, A. J. L., Manawasinghe, I. S., & Yan, J. (2023). Identification and characterization of *Colletotrichum* species associated with cherry leaf spot disease in China. *Plant Disease*, *107*(2), 500–513. https://doi.org/10.1094/PDIS-11-21-2538-RE

Zhu, Z. J., Wang, H., Yan, B., Zheng, H., Jiang, Y., Miranda, O. R., Rotello, V. M., Xing, B., & Vachet, R. W. (2012). Effect of surface charge on the uptake and distribution of gold nanoparticles in four plant species. *Environmental Science and Technology*, *46*(22), 12391–12398. https://doi.org/10.1021/es301977w

Zibani, A., Ali, S., & Benslimane, H. (2022). Corn diseases in Algeria: first report of three *Bipolaris* and two *Exserohilum* species causing leaf spot and leaf blight diseases. *Cereal Research Communications*, *50*(3), 449–461. https://doi.org/10.1007/s42976-021-00192-8

Zou, X., Wei, Y., Jiang, S., Xu, F., Wang, H., Zhan, P., & Shao, X. (2022). ROS Stress and cell membrane disruption are the main antifungal mechanisms of 2-phenylethanol against *Botrytis cinerea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *70*(45), 14468–14479. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c06187

Tài liệu tham khảo website

Cổng thông tin điện tử Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn**.** *Đồng Tháp: Siêu lợi nhuận từ đa dạng hóa các sản phẩm từ sen***.** **https://www.mard.gov.vn/Pages/dong-thap-sieu-loi-nhuan-tu-da-dang-hoa-cac-san-pham-tu-sen.aspx?item=11.** Truy cập ngày: 06/12/2024

Sở Nông nghiệp và Môi trường**.** *Về việc chăm sóc và phòng trừ sinh vật gây hại trên cây sen lấy hạt vụ Đông Xuân 2019-2020***.** **https://snnmt.hue.gov.vn/thong-bao/thong-bao-ve-viec-cham-soc-va-phong-tru-sinh-vat-gay-hai-tren-cay-sen-lay-hat-vu-dong-xuan-2019-2020.html**. Truy cập ngày: 10/06/2025

Farr, D.F., Rossman, A.Y (2024). http://nt.ars–grin.gov/fungaldatabases. Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Truy cập ngày: 05/08/2024

Tường Vi (2019). *Trên 100 ha sen chết ở Thừa Thiên - Huế*. **https://baotintuc.vn/kinh-te/tren-100-ha-sen-chet-o-thua-thien-hue-20190618133123808.html**. Báo Tin tức - Thông tấn xã Việt Nam. Truy cập ngày: 15/06/2025

PHỤ LỤC

PHỤ LỤC 1. THÔNG TIN HỒ SƠ CÁC CHỦNG PHÂN LẬP SỬ DỤNG VÀ VẬT LIỆU NANO BẠC SỬ DỤNG TRONG NGHIÊN CỨU

Bảng phụ lục 1.1. Hồ sơ thông tin và nguồn gốc của các chủng phân lập đại diện (81) sử dụng trong nghiên cứu

STT	Mã phân lập	Chi	Họ	Loài	Giống*	Bộ phận thu thập phân lập	Địa điểm phân lập		Sinh cảnh
							Phường/Xã	Quận/ Huyện	
1	VNHUCC.NEL141	*Neofusicoccum*	Botryosphaeriaceae	*N. parvum*	Sen hồng	Cuống lá	Đông Ba	Phú Xuân	Hồ
2	VNHUCC.NEL142	*Neofusicoccum*	Botryosphaeriaceae	*N. parvum*	Sen hồng	Cuống lá	Thuận Hòa	Phú Xuân	Hồ
3	VNHUCC.NEL18	*Neofusicoccum*	Botryosphaeriaceae	*N. parvum*	Sen hồng	Cuống lá	Đông Ba	Phú Xuân	Hồ
4	VNHUCC.NEL104	*Neofusicoccum*	Botryosphaeriaceae	*N. parvum*	Sen trắng	Lá	Đông Ba	Phú Xuân	Hồ
5	VNHUCC.NEL105	*Neofusicoccum*	Botryosphaeriaceae	*N. parvum*	Sen trắng	Cuống lá	Đông Ba	Phú Xuân	Hồ
6	VNHUCC.NEL134	*Neofusicoccum*	Botryosphaeriaceae	*N. parvum*	Sen hồng	Lá	Phong Hiền	Phong Điền	Ruộng
7	VNHUCC.NEL135	*Neofusicoccum*	Botryosphaeriaceae	*N. parvum*	Sen hồng	Lá	Phong Hiền	Phong Điền	Ruộng
8	VNHUCC.NEL202	*Neofusicoccum*	Botryosphaeriaceae	*N. parvum*	Sen trắng	Lá	Lộc Trì	Phú Lộc	Ruộng
9	VNHUCC.NEL203	*Neofusicoccum*	Botryosphaeriaceae	*N. parvum*	Sen trắng	Cuống lá	Lộc Trì	Phú Lộc	Ruộng
10	VNHUCC.NEL250	*Lasiodiplodia*	Botryosphaeriaceae	*L. theobromae*	Sen hồng	Lá	Phú Mỹ	Phú Vang	Ruộng
11	VNHUCC.NEL251	*Lasiodiplodia*	Botryosphaeriaceae	*L. theobromae*	Sen hồng	Lá	Thủy Phương	Hương Thủy	Ruộng
12	VNHUCC.NEL252	*Lasiodiplodia*	Botryosphaeriaceae	*L. theobromae*	Sen hồng	Lá	Thủy Phương	Hương Thủy	Ruộng
13	VNHUCC.NEL253	*Lasiodiplodia*	Botryosphaeriaceae	*L. theobromae*	Sen hồng	Lá	Phong Hiền	Phong Điền	Ruộng
14	VNHUCC.NEL254	*Lasiodiplodia*	Botryosphaeriaceae	*L. theobromae*	Sen hồng	Lá	Xuân Phú	Phú Xuân	Ruộng

15	**VNHUCC.NEL38**	***Lasiodiplodia***	**Botryosphaeriaceae**	***L. theobromae***	**Sen hồng**	**Lá**	**Thủy Vân**	**Thuận Hóa**	**Ruộng**
16	VNHUCC.NEL107	*Lasiodiplodia*	Botryosphaeriaceae	*L. theobromae*	Sen hồng	Lá	Tây Lộc	Phú Xuân	Chậu
17	VNHUCC.NEL16	*Lasiodiplodia*	Botryosphaeriaceae	*L. theobromae*	Sen trắng	Lá	Phong Hiền	Phong Điền	Ruộng
18	VNHUCC.NEL19	*Lasiodiplodia*	Botryosphaeriaceae	*L. theobromae*	Sen trắng	Lá	Đông Ba	Phú Xuân	Hồ
19	VNHUCC.NEL180	*Lasiodiplodia*	Botryosphaeriaceae	*L. theobromae*	Sen hồng	Lá	La Chữ	Hương Trà	Ruộng
20	VNHUCC.NEL181	*Lasiodiplodia*	Botryosphaeriaceae	*L. theobromae*	Sen hồng	Lá	La Chữ	Hương Trà	Ruộng
21	VNHUCC.NEL305	*Curvularia*	Pleosporaceae	*C. radicifoliigena*	Sen hồng	Lá	Phong Hiền	Phong Điền	Ruộng
22	VNHUCC.NEL53	*Curvularia*	Pleosporaceae	*C. asiatica*	Sen hồng	Lá	Thủy Vân	Hương Thủy	Ruộng
23	VNHUCC.NEL42	*Curvularia*	Pleosporaceae	*C. suttoniae*	Sen hồng	Lá	Đông Ba	Phú Xuân	Chậu
24	VNHUCC.NEL31	*Curvularia*	Pleosporaceae	*Curvularia* sp.	Sen hồng	Lá	Thủy Vân	Thuận Hóa	Ruộng
25	VNHUCC.NEL32	*Curvularia*	Pleosporaceae	*C. plantarum*	Sen hồng	Lá	Thủy Vân	Thuận Hóa	Ruộng
26	VNHUCC.NEL37	*Curvularia*	Pleosporaceae	*Curvularia* sp.	Sen trắng	Lá	Đông Ba	Phú Xuân	Hồ
27	VNHUCC.NEL50	*Curvularia*	Pleosporaceae	*Curvularia* sp.	Sen trắng	Lá	Đông Ba	Phú Xuân	Hồ
28	VNHUCC.NEL35	*Curvularia*	Pleosporaceae	*C. plantarum*	Sen hồng	Lá	Đông Ba	Phú Xuân	Hồ
29	VNHUCC.NEL300	*Curvularia*	Pleosporaceae	*C. plantarum*	Sen hồng	Lá	Đông Ba	Phú Xuân	Chậu
30	**VNHUCC.NEL51**	***Curvularia***	**Pleosporaceae**	***C. radicifoliigena***	**Sen hồng**	**Lá**	**Phong Hiền**	**Phong Điền**	**Ruộng**
31	**VNHUCC.NEL74**	***Curvularia***	**Pleosporaceae**	***C. verruculosa***	**Sen hồng**	**Lá**	**Hương Toàn**	**Hương Trà**	**Ruộng**
32	VNHUCC.NEL301	*Curvularia*	Pleosporaceae	*C. senegalensis*	Sen hồng	Lá	Tây Lộc	Phú Xuân	Chậu
33	**VNHUCC.NEL80**	***Curvularia***	**Pleosporaceae**	***Curvularia* sp.**	**Sen hồng**	**Lá**	**Thủy Bằng**	**Thuận Hóa**	**Ruộng**

34	VNHUCC.NEL57	*Curvularia*	Pleosporaceae	*C. dactyloctenicola*	Sen hồng	Lá	Thủy Bằng	Thuận Hóa	Ruộng
35	VNHUCC.NEL82	*Curvularia*	Pleosporaceae	*Curvularia* sp.	Sen hồng	Lá	Thủy Bằng	Thuận Hóa	Ruộng
36	VNHUCC.NEL85	*Curvularia*	Pleosporaceae	*Curvularia* sp.	Sen hồng	Lá	Thủy Bằng	Thuận Hóa	Ruộng
37	**VNHUCC.NEL93**	***Curvularia***	**Pleosporaceae**	***C. plantarum***	**Sen trắng**	**Lá**	**Đông Ba**	**Phú Xuân**	**Hồ**
38	VNHUCC.NEL94	*Curvularia*	Pleosporaceae	*Curvularia* sp.	Sen trắng	Lá	Đông Ba	Phú Xuân	Hồ
39	VNHUCC.NEL95	*Curvularia*	Pleosporaceae	*C. senegalensis*	Sen trắng	Lá	Tây Lộc	Phú Xuân	Chậu
40	VNHUCC.NEL100	*Curvularia*	Pleosporaceae	*C. lunata*	Sen trắng	Lá	Đông Ba	Phú Xuân	Hồ
41	VNHUCC.NEL101	*Curvularia*	Pleosporaceae	*C. dactyloctenicola*	Sen trắng	Lá	Thủy Dương	Hương Thủy	Ruộng
42	VNHUCC.NEL400	*Curvularia*	Pleosporaceae	*Curvularia* sp.	Sen trắng	Lá	Tây Lộc	Phú Xuân	Chậu
43	VNHUCC.NEL68	*Curvularia*	Pleosporaceae	*C. plantarum*	Sen trắng	Lá	Thủy Bằng	Thuận Hóa	Ruộng
44	VNHUCC.NEL69	*Curvularia*	Pleosporaceae	*C. plantarum*	Sen trắng	Lá	Thủy Bằng	Thuận Hóa	Ruộng
45	VNHUCC.NEL65	*Curvularia*	Pleosporaceae	*Curvularia* sp.	Sen trắng	Lá	Phong Hiền	Phong Điền	Ruộng
46	VNHUCC.NEL66	*Curvularia*	Pleosporaceae	*C. plantarum*	Sen trắng	Lá	Phong Hiền	Phong Điền	Ruộng
47	VNHUCC.NEL33	*Exserohilum*	Pleosporaceae	*E. rostratum*	Sen hồng	Lá	Đông Ba	Phú Xuân	Hồ
48	VNHUCC.NEL34	*Exserohilum*	Pleosporaceae	*E. rostratum*	Sen hồng	Lá	Thủy Vân	Thuận Hóa	Ruộng
49	VNHUCC.NEL136	*Exserohilum*	Pleosporaceae	*E. rostratum*	Sen hồng	Lá	Phong Hiền	Phong Điền	Ruộng
50	VNHUCC.NEL137	*Exserohilum*	Pleosporaceae	*E. rostratum*	Sen hồng	Lá	Phong Hiền	Phong Điền	Ruộng
51	**VNHUCC.NEL56**	***Exserohilum***	**Pleosporaceae**	***E. rostratum***	**Sen hồng**	**Lá**	**Thủy Bằng**	**Thuận Hóa**	**Ruộng**
52	VNHUCC.NEL30	*Nigrospora*	Apiosporaceae	*N. lacticolonia*	Sen hồng	Lá	Đông Ba	Phú Xuân	Chậu

53	VNHUCC.NEL431	*Nigrospora*	Apiosporaceae	*N. lacticolonia*	Sen trắng	Lá	Đông Ba	Phú Xuân	Chậu
54	VNHUCC.NEL233	*Nigrospora*	Apiosporaceae	*N. lacticolonia*	Sen trắng	Lá	Thủy Xuân	Thuận Hóa	Hồ
55	VNHUCC.NEL13	*Neopestalotiopsis*	Sporocadaceae	*Neopestalotiopsis* sp.	Sen hồng	Lá	Đông Ba	Phú Xuân	Chậu
56	VNHUCC.NEL110	*Neopestalotiopsis*	Sporocadaceae	*Neopestalotiopsis* sp.	Sen hồng	Lá	Đông Ba	Phú Xuân	Hồ
57	VNHUCC.NEL111	*Neopestalotiopsis*	Sporocadaceae	*Neopestalotiopsis* sp.	Sen hồng	Lá	Đông Ba	Phú Xuân	Hồ
58	VNHUCC.NEL52	*Colletotrichum*	Glomerellaceae	*C. endophytica*	Sen hồng	Lá	Đông Ba	Phú Xuân	Chậu
59	VNHUCC.NEL72	*Colletotrichum*	Glomerellaceae	*C. siamense*	Sen trắng	Lá	Tây Lộc	Phú Xuân	Chậu
60	VNHUCC.NEL71	*Colletotrichum*	Glomerellaceae	*C. tropicale*	Sen trắng	Lá	Tây Lộc	Phú Xuân	Chậu
61	VNHUCC.NEL172	*Colletotrichum*	Glomerellaceae	*C. siamense*	Sen hồng	Lá	Phong Thu	Phong Điền	Ruộng
62	**VNHUCC.NEL10**	***Colletotrichum***	**Glomerellaceae**	***C. siamense***	**Sen trắng**	**Lá**	**Xuân Phú**	**Thuận Hóa**	**Ruộng**
63	VNHUCC.NEL70	*Colletotrichum*	Glomerellaceae	*C. siamense*	Sen trắng	Lá	Đông Ba	Phú Xuân	Chậu
64	VNHUCC.NEL79	*Colletotrichum*	Glomerellaceae	*C. siamense*	Sen trắng	Lá	Thuận Hòa	Phú Xuân	Hồ
65	VNHUCC.NEL91	*Colletotrichum*	Glomerellaceae	*C. fructicola*	Sen trắng	Lá	Đông Ba	Phú Xuân	Hồ
66	VNHUCC.NEL92	*Colletotrichum*	Glomerellaceae	*C. plurivorum*	Sen trắng	Lá	Đông Ba	Phú Xuân	Hồ
67	VNHUCC.NEL98	*Colletotrichum*	Glomerellaceae	*Colletotrichum* sp.	Sen trắng	Lá	Phong Hiền	Phong Điền	Ruộng
68	VNHUCC.NEL102	*Colletotrichum*	Glomerellaceae	*C. plurivorum*	Sen trắng	Lá	Đông Ba	Phú Xuân	Hồ
69	VNHUCC.NEL282	*Colletotrichum*	Glomerellaceae	*C. fructicola*	Sen hồng	Lá	Hương Chữ	Hương Trà	Ruộng
70	VNHUCC.NEL39D1	*Colletotrichum*	Glomerellaceae	*C. fructicola*	Sen trắng	Lá	Thủy Bằng	Thuận Hóa	Ruộng
71	VNHUCC.NEL40	*Diaporthe*	Diaporthaceae	*Diaporthe* sp.	Sen trắng	Lá	Đông Ba	Phú Xuân	Chậu

72	VNHUCC.NEL4	*Diaporthe*	Diaporthaceae	*Diaporthe* sp.	Sen trắng	Lá	Xuân Phú	Thuận Hóa	Chậu
73	VNHUCC.NEL88	*Diaporthe*	Diaporthaceae	*Diaporthe* sp.	Sen hồng	Lá	Đông Ba	Phú Xuân	Hồ
74	VNHUCC.NEL20	*Diaporthe*	Diaporthaceae	*D. hongkongensis*	Sen hồng	Lá	Đông Ba	Phú Xuân	Hồ
75	VNHUCC.NEL77	*Diaporthe*	Diaporthaceae	*Diaporthe* sp.	Sen hồng	Lá	Tây Lộc	Phú Xuân	Chậu
76	VNHUCC.NEL83	*Diaporthe*	Diaporthaceae	*D. tectonae*	Sen hồng	Lá	Hương Chữ	Hương Trà	Ruộng
77	VNHUCC.NEL89	*Diaporthe*	Diaporthaceae	*D. tectonae*	Sen trắng	Lá	Đông Ba	Phú Xuân	Hồ
78	VNHUCC.NEL21	*Diaporthe*	Diaporthaceae	*D. hongkongensis*	Sen hồng	Lá	Đông Ba	Phú Xuân	Hồ
79	VNHUCC.NEL3	*Aspergillus*	Aspergillaceae	*A. fumigatus*	Sen hồng	Lá	Đông Ba	Phú Xuân	Hồ
80	VNHUCC.NEL1	*Aspergillus*	Aspergillaceae	*A. aculeatus*	Sen hồng	Lá	Lộc Tiến	Phú Lộc	Ruộng
81	**VNHUCC.NEL160**	***Aspergillus***	**Aspergillaceae**	***A. niger***	**Sen hồng**	**Lá**	**La Chữ**	**Hương Trà**	**Ruộng**

Ghi chú: Khung đậm: 29 chủng phân lập được lựa chọn vào thử nghiệm đánh giá hiệu lực ức chế (5), và tính toán giá trị EC_{50}, cũng như các ghi nhận về đặc điểm tản nấm khi xử lý nano bạc. Trong 29 chủng này, 8 chủng phân lập **(font in đậm + khung đậm)** được lựa chọn đại diện trong các thử nghiệm đáp ứng sinh hóa với nano bạc nhằm tìm ra cơ chế phản ứng.

Bảng phụ lục 1.2. Sự phân bố các chi gây hại trên cây sen theo từng địa điểm (quận/huyện) tại Thành phố Huế

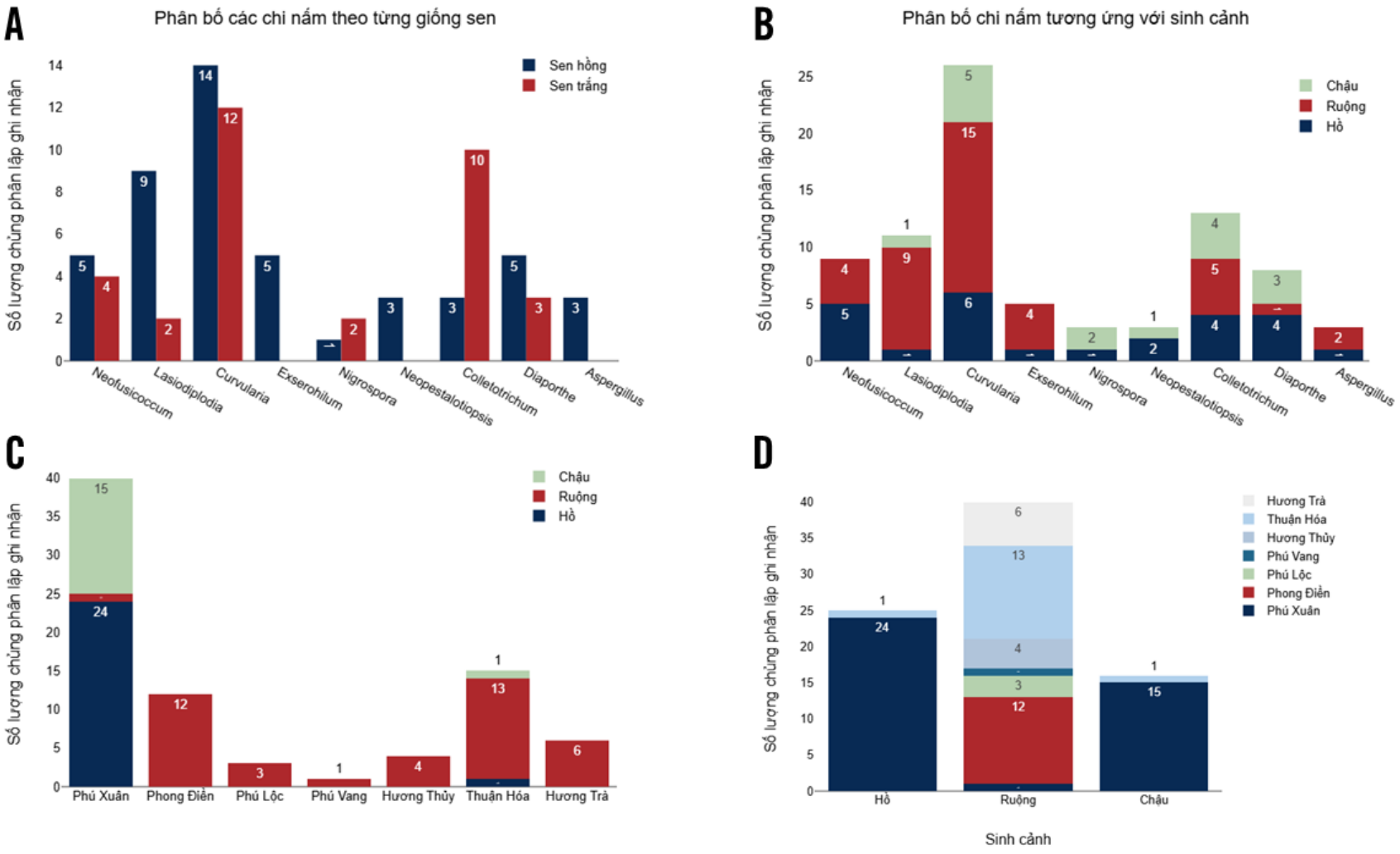
		Địa điểm phân lập (Location)							
		Phú Xuân	Phong Điền	Phú Lộc	Phú Vang	Hương Thủy	Thuận Hóa	Hương Trà	**Tổng**
Chi	*Neofusicoccum*	5	2	2	0	0	0	0	**9**
	Lasiodiplodia	3	2	0	1	2	1	2	**11**
	Curvularia	11	4	0	0	2	8	1	**26**
	Exserohilum	1	2	0	0	0	2	0	**5**
	Nigrospora	2	0	0	0	0	1	0	**3**
	Neopestalotiopsis	3	0	0	0	0	0	0	**3**
	Colletotrichum	8	2	0	0	0	2	1	**13**
	Diaporthe	6	0	0	0	0	1	1	**8**
	Aspergillus	1	0	1	0	0	0	1	**3**
	Tổng (Total)	**40**	**12**	**3**	**1**	**4**	**15**	**6**	**81**

Bảng phụ lục 1.3. Phân bố các chi nấm gây hại theo từng giống sen và sinh cảnh phân lập

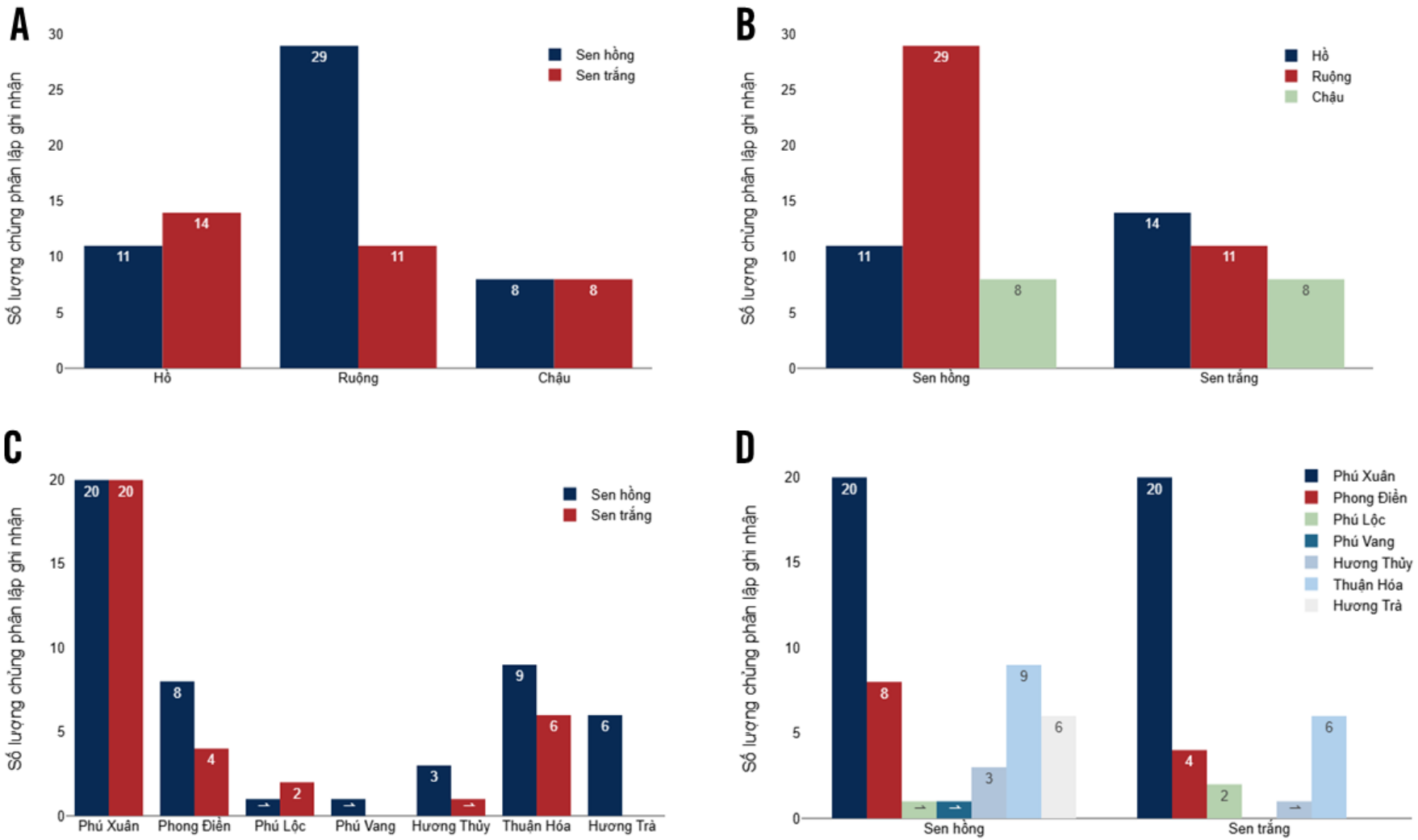
Chi	Giống		Tổng	Sinh cảnh			Tổng
	Sen hồng	Sen trắng		Hồ	Ruộng	Chậu	
Neofusicoccum	5	4	9	5	4	0	9
Lasiodiplodia	9	2	11	1	9	1	11
Curvularia	14	12	26	6	15	5	26
Exserohilum	5	0	5	1	4	0	5
Nigrospora	1	2	3	1	0	2	3
Neopestalotiopsis	3	0	3	2	0	1	3
Colletotrichum	3	10	13	4	5	4	13
Diaporthe	5	3	8	4	1	3	8
Aspergillus	3	0	3	1	2	0	3
Tổng	**48**	**33**	**81**	**25**	**40**	**16**	**81**

Bảng phụ lục 1.4. Phân bố các tác nhân gây hại (số lượng chủng phân lập) theo từng địa điểm phân lập và giống

		Địa điểm phân lập							
		Phú Xuân	Phong Điền	Phú Lộc	Phú Vang	Hương Thủy	Thuận Hóa	Hương Trà	Tổng
Giống	**Sen hồng**	20	8	1	1	3	9	6	**48**
	Sen trắng	20	4	2	0	1	6	0	**33**
	Tổng	**40**	**12**	**3**	**1**	**4**	**15**	**6**	**81**

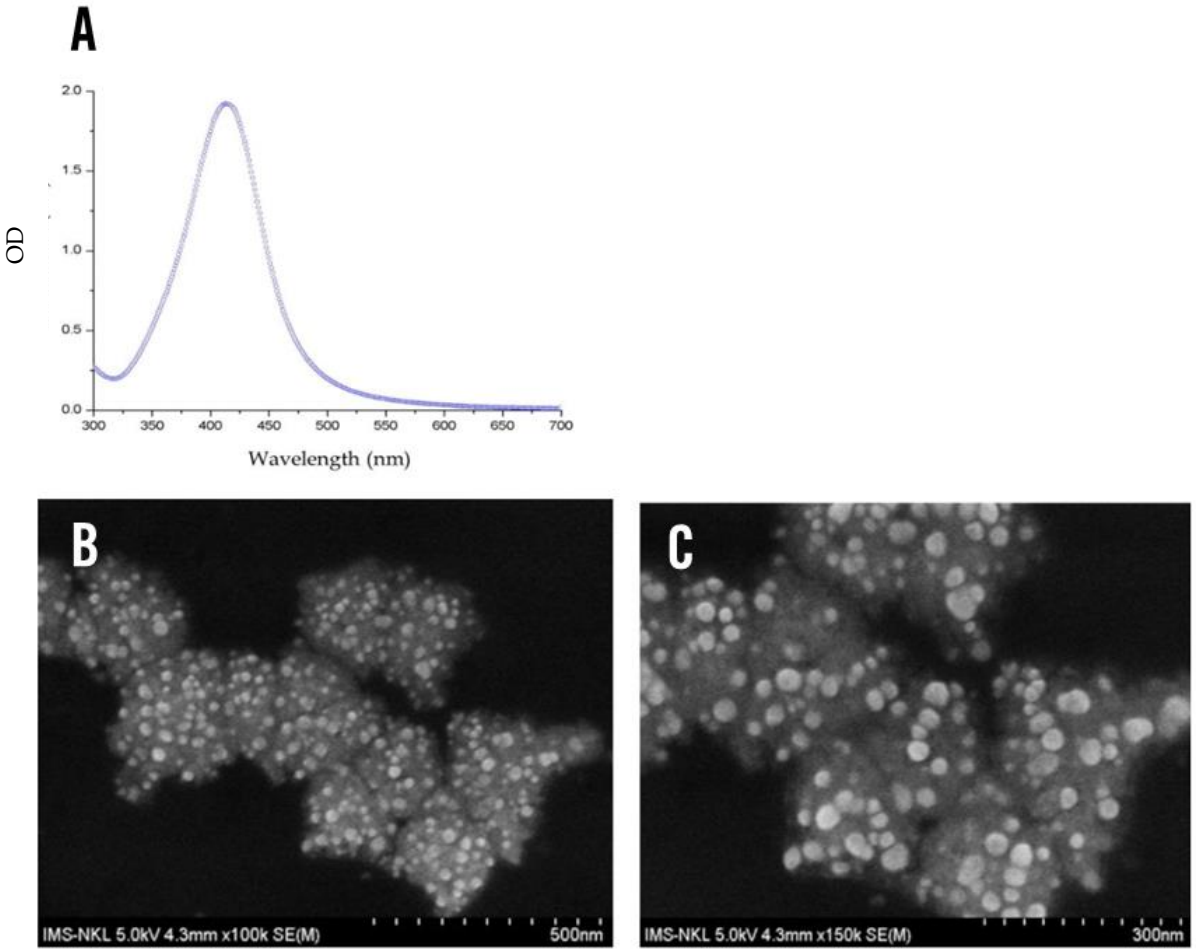


Phụ lục hình 1.1. A. Phân bố các chi nấm theo từng giống sen; B. Phân bố các chi nấmtheo môi trường sinh cảnh ghi nhận; C, D. Phân bố các chủng phân lập nấm theo sinh cảnh và địa điểm phân lập (quận/huyện) tương ứng.



Phụ lục hình 1.2. A, B. Sự phân bố các chủng nấm liên quan đến các triệu chứng bệnh hại theo sinh cảnh và giống phân lập tương ứng; C, D. Sự phân bố các chủng nấm theo giống sen và địa điểm phân lập (quận/huyện)

THÔNG TIN BỔ SUNG VỀ VẬT LIỆU SỬ DỤNG TRONG NGHIÊN CỨU – NANO BẠC



Dung dịch nano bạc được tổng hợp từ chiết xuất cây nha đam cung cấp bởi Khoa Vật lý, Đại học Khoa học Huế. Hạt nano có đường kính từ 5–40 nm. Nồng độ dung dịch gốc là 40 mg/L.

Phụ lục Hình 1.3. A. Sự hình thành các hạt nano bạc (AgNPs) được xác nhận bằng phổ UV–Vis. Một dải hấp thụ cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) rõ rệt xuất hiện tại khoảng 415 nm. B, C. Kết qủa SEM cho thấy, dung dịch nano bạc có đặc trưng dạng hình cầu, ít kết tụ

Bảng phụ lục 1.5. Phụ lục thông tin kết quả lây nhiễm nhân tạo các chủng phân lập đại diện

Loài	Chủng	Đường kính vết bệnh theo phương pháp lây nhiễm áp thạch (mm)		Đường kính vết bệnh theo phương pháp lây nhiễm bằng dịch bào tử (mm)	Bộ phận lây nhiễm/ Thời gian ghi nhận
		Gây tổn thương	Không gây tổn thương		
Neofusicoccum parvum	VNHUCC.NEL18	+ (82.60 ± 5.32)	+ (36.74 ± 1.06)	X	Cuống lá, 15 dpi
	VNHUCC.NEL104	+ (80,94 ± 5,11)	+ (35,76 ± 2,25)	X	Cuống lá, 15 dpi
	VNHUCC.NEL134	+ (67,38 ± 2,31)	+ (30,38 ± 1,99)	X	Cuống lá, 15 dpi
	VNHUCC.NEL203	+ (72,36 ± 4,54)	+ (31,94 ± 2,24)	X	Cuống lá, 15 dpi
Lasiodiplodia theobromae	VNHUCC.NEL38	+ (114,00 ± 4.30)	+ (24.34 ± 2.62)	X	Lá, 5 dpi
	VNHUCC.NEL16	+ (99,35 ± 15,87)	+ (30,23 ± 4,95)	X	Lá, 5 dpi
	VNHUCC.NEL19	+ (91,79 ± 12,01)	+ (47,87 ± 8,74)	X	Lá, 5 dpi
	VNHUCC.NEL180	+ (68,96 ± 9,24)	+ (35,43 ± 5,56)	X	Lá, 5 dpi
Curvularia plantarum	VNHUCC.NEL93	+ (30,86 ± 4,24)	+ (13,98 ± 3,25)	+ (15,68 ± 1,28)	Lá, 7 dpi
	VNHUCC.NEL32	X	X	+ (28,38 ± 1,67)	Lá, 7 dpi
	VNHUCC.NEL300	X	X	+ (26,74 ± 3,89)	Lá, 7 dpi
Curvularia lunata	VNHUCC.NEL100	+ (28,92 ± 2,78)	+ (16,55 ± 1,58)	X	Lá, 7 dpi
Curvularia dactyloctenicola	VNHUCC.NEL57	+ (28,71 ± 2,20)	+ (17,86 ± 2,73)	+ (22,39 ± 2,15)	Lá, 7 dpi

	VNHUCC.NEL101	+ (24,64 ± 1,50)	+ (18,90 ± 2,17)	X	Lá, 7 dpi
Curvularia asiatica	VNHUCC.NEL53	X	X	+ (30,96 ± 2,88)	Lá, 15 dpi
Curvularia senegalensis	VNHUCC.NEL95	X	X	+ (26,21 ± 1,75)	Lá, 15 dpi
	VNHUCC.NEL301	X	X	+ (23,79 ± 4,51)	Lá, 15 dpi
Curvularia radicifolligena	VNHUCC.NEL51	+ (34,83 ± 1,42)	-	+ (30,31 ± 1,76)	Lá, 15 dpi
Curvularia suttoniae	VNHUCC.NEL42	X	X	+ (13,67 ± 1,71)	Lá, 15 dpi
Curvularia verruculosa	VNHUCC.NEL74	+ (23,07 ± 1,92)	+ (8,56 ± 1,26)	+ (18,26 ± 3,35)	Lá, 7 dpi
Curvularia sp.	VNHUCC.NEL85	X	X	+ (29,13 ± 3,26)	Lá, 15 dpi
	VNHUCC.NEL80	+ (32,97 ± 5,17)	+ (9,93 ± 3,19)	+ (12,59 ± 1,76)	Lá, 7 dpi
	VNHUCC.NEL31	+ (25,03 ± 3,35)	+ (19,96 ± 2,15)	X	Lá, 7 dpi
	VNHUCC.NEL400	+ (26,74 ± 3,55)	-	X	Lá, 15 dpi
	VNHUCC.NEL94	+ (35,65 ± 4,52)	+ (17,16 ± 2,52)	X	Lá, 7 dpi
Exserohilum rostratum	VNHUCC.NEL56	+ (25,68 ± 2,97)	+ (21,14 ± 2,91)	X	Lá, 7 dpi
Neopestalotitopsis sp.	VNHUCC.NEL13	+ (21,79 ± 2,27)	+ (10,84 ± 2,59)	X	Lá, 7 dpi
Diaporthe tectonae	VNHUCC.NEL89	+ (17,14 ± 5,49)	+ (13,35 ± 3,66)	X	Lá, 15 dpi
Diaporthe hongkongensis	VNHUCC.NEL20	+ (15,18 ± 2,55)	+ (8,80 + 1,14)	X	Lá, 15 dpi
Diaporthe sp.	VNHUCC.NEL40	+ (13,41 ± 3,83)	-	X	Lá, 15 dpi

	VNHUCC.NEL04	+ (20,31 ± 2,88)	-	X	Lá, 15 dpi
Nigrospora lacticolonia	VNHUCC.NEL30	+ (121,27 ± 34,19)	+ (41,25 ± 6,71)	X	Lá, 15 dpi
Aspergillus sp.	VNHUCC.NEL160	+ (11,35 ± 3,42)	-	X	Lá, 15 dpi
Colletotrichum siamense	VNHUCC.NEL70	+ (139,6 ± 17,29)	+ (50,31 ± 6,34)	+	Lá, 7 dpi
	VNHUCC.NEL10	+ (41,3 ± 5,19)	+ (28,89 ± 6,34)	X	Lá, 7dpi
	VNHUCC.NEL72	+ (60,51 ± 4,31)	X	+ (40,69 ± 3,63)	Lá, 7 dpi
Colletotrichum tropicale	VNHUCC.NEL71	X	X	+ (29,.45 ± 2,30)	Lá, 7 dpi
Colletotrichum endophytica	VNHUCC.NEL52	+ (47,33 ± 5,86)	+ (24,07 ± 3,06)	+ (35,03 ± 1,13)	Lá, 7dpi
Colletotrichum fructicola	VNHUCC.NEL91	+ (40,4 ± 2,69)	+ (19,16 ± 3,18)	X	Lá, 7dpi
	VNHUCC.NEL39D1	+ (33,41 ± 3,76)	+ (26,73 ± 1,82)	X	Lá, 7dpi
Colletotrichum plurivorum	VNHUCC.NEL92	+ (37,15 ± 2,17)	+ (28,38 ± 1,76)	+ (32,51 ± 2,50)	Lá, 7dpi
	VNHUCC.NEL102	+ (30,55 ± 4,37)	+ (25,54 ± 2,87)	X	Lá, 7 dpi

Ghi chú: (+): biểu thị quá trình lây nhiễm nhân tạo biểu hiện triệu chứng bệnh; (-): biểu thị phép lây nhiễm nhân tạo không xuất hiện triệu chứng; X: không thực hiện; dpi: số ngày sau cấy (lây nhiễm)

Mục tiêu của quá trình lây nhiễm nhân tạo này không tập trung vào việc so sánh độc lực giữa các chủng phân lập, cũng như không nhằm đánh giá sự khác biệt giữa các chủng được thu thập. Lý do là số lượng chủng phân lập thu thập từ các mẫu triệu chứng trong nghiên cứu này khá lớn, đồng thời sự đa dạng về chi gây hại (đặc tính, thời gian hình thành bào tử) và thời gian phân lập (từ năm 2020 đến năm 2024). Do đó, quá trình lây nhiễm nhân tạo được thực hiện trong các thời điểm khác nhau và các kết quả thu nhận

trong Bảng phụ lục 1.5 sẽ không tiến hành phân tích kiểm định HSD (Honestly Significant Difference) giữa các giá trị thu nhận. Kết quả này chủ yếu nhằm xác nhận rằng các chủng phân lập là tác nhân gây hại (bất kể tác nhân chính hay mầm bệnh cơ hội), từ đó tạo tiền đề cho các phân tích, các nội dung tiếp theo của luận án.

PHỤ LỤC 2. CÁC PHÂN LẬP THAM CHIẾU SỬ DỤNG TRONG PHÂN TÍCH PHÁT SINH LOÀI ĐA LOCUS

Bảng phụ lục 2.1. Các chủng phân lập tham chiếu sử dụng trong phân tích phát sinh loài đa locus chi *Neofusicoccum*

Loài	**Chủng phân lập**	**Ký chủ**	**Nguồn gốc phân lập**	**Mã số truy cập Genbank**	
				ITS	***TUB-2***
N. arbuti	**CBS116131***	*Arbutus menziesii*	USA	AY819720	KF531793
N. australe	CMW6837 = CBS139662	*Acacia* sp.	Australia	AY339262	AY339254
N. batangarum	**CBS124924* = CMW28363**	*Terminalia catappa*	Cameroon	FJ900607	FJ900634
N. batangarum	CBS124923 = CMW28320	*Terminalia catappa*	Cameroon	FJ900608	FJ900635
N. brasiliense	**CMM1338***	*Mangifera indica*	Brazil	JX513630	KC794031
N. brasiliense	CMM1285	*Mangifera indica*	Brazil	JX513628	KC794030
N. cordaticola	**CBS123634***	*Syzygium cordatum*	Nam Phi	EU821898	EU821838
N. cordaticola	CBS123635	*Syzygium cordatum*	Nam Phi	EU821903	EU821843
N. cryptoaustrale	**CBS 122813* = CMW23785**	*Eucalyptus* sp.	Nam Phi	FJ752742	FJ752756
N. eucalypticola	**CBS115679* = CMW6539**	*Eucalyptus grandis*	Australia	AY615141	AY615125
N. eucalypticola	CBS115766 = CMW6217	*Eucalyptus rossi*	Australia	AY615143	AY615127
N. eucalyptorum	**CBS115791* = CMW10125**	*Eucalyptus grandis*	Nam Phi	AF283686	AY236920
N. hellenicum	**CERC1947***	*Pistacia vera*	Hy Lạp	KP217053	KP217069
N. hellenicum	CERC1948	*Pistacia vera*	Hy Lạp	KP217054	KP217070
N. hongkongense	**CERC2973***	*Araucaria cunninghamii*	Hồng Kông	KX278052	KX278261
N. hongkongense	CERC2967	*Araucaria cunninghamii*	Hồng Kông	KX278050	KX278259

Loài	**Chủng phân lập**	**Ký chủ**	**Nguồn gốc phân lập**	**Mã số truy cập Genbank**	
				ITS	***TUB-2***
N. kwambonambiense	CBS123641 = CMW14140	*Syzygium cordatum*	Nam Phi	EU821919	EU821859
N. kwambonambiense	**CBS 123639* = CMW14023**	*Syzygium cordatum*	Nam Phi	MH863317	EU821840
N. luteum	**CBS110299***	*Vitis vinifera*	Bồ Đào Nha	AY259091	DQ458848
N. luteum	CBS110497	*Vitis vinifera*	Bồ Đào Nha	EU673311	EU673092
N. lumnitzerae	**CMW 41469***	*Luminitzera racemosa*	Nam Phi	KP860881	KP860801
N. macroclavatum	**CBS118223***	*Eucalyptus globulus*	Australia	DQ093196	DQ093206
N. mediterraneum	PD82	*Hạnh nhân*	USA	GU251192	GU251852
N. mediterraneum	**CBS121718***	*Eucalyptus sp.*	Hy Lạp	GU251176	GU251836
N. nonquaesitum	**CBS126655*= PD484**	*Umbellularia californica*	USA	GU251163	GU251823
N. occulatum	**CBS 128008* = MUCC227**	*Eucalyptus grandis*	Australia	EU301030	EU339472
N. occulatum	MUCC 286	*Eucalyptus pellita*	Australia	EU736947	EU339474
N. parvum	CPC31234	*Persea americana*	Hy Lạp	MN860181	MN905746
N. parvum	CERC 3503	*E. urophylla* × *E. grandis*	Trung Quốc	KX278059	KX278268
N. parvum	MAN55	*Syzygium cordatum*	Nam Phi	KY052933	KY000117
N. parvum	MFLUCC 11-0184	*Linum usitatissimum*	Thái Lan	JX646795	JX646843
N. parvum	**CBS 138823* = ATCC58191 = CMW9081**	*Populus nigra*	New Zealand	AY236943	AY236917
N. parvum	LC013	*Macadamia*	Trung Quốc	OM392021	OM453641
N. pennatisporum	**MUCC510***	*Allocasuarina fraseriana*	Australia	EF591925	EF591959
N. ribis	**CBS 115475***	*Ribes* sp	Nam Phi	AY236935	AY236906
N. stellenboschiana	**CBS110864* = CPC4598**	*Vitis vinifera*	Nam Phi	AY343407	KX465047
N. stellenboschiana	CPC 31232	*Persea americana*	Hy Lạp	MN860179	MN905744
N. umdonicola	**CBS 123645* = CMW14058**	*Syzygium cordatum*	Nam Phi	EU821904	EU821844
N. umdonicola	CBS 123646 = CMW14060	*Syzygium cordatum*	Nam Phi	EU821905	EU821845
N. vitifusiforme	**CBS110887 = STE-U 5050***	*Vitis vinifera*	Nam Phi	AY343382	KX465061
Botryosphaeria dothidea	**CBS 115476***	*Prunus* sp.	Nam Phi	AY236949	AY236927

Bảng phụ lục 2.2. Các phân lập tham chiếu sử dụng trong phân tích phát sinh loài của chi *Lasiodiplodia*

Tên khoa học	Chủng (phân lập)	Ký chủ	Địa điểm phân lập	Mã số truy cập Genbank		
				ITS	*TUB2*	*TEF1-α*
Lasiodiplodia aquilariae	**GuoLD01961*= CGMCC 3.18471**	*Aquilaria crassna*	Lào	KY783442	KY848600	-
L. avicenniae	**CMW 41467 ***	*Avicennia marina*	Nam Phi	KP860835	KP860680	KP860758
L. avicenniarum	**MFLUCC 17-2591* = C376**	*Avicennia marina*	Thái Lan	MK347777	MK340867	-
L. americana	CERC1960	*Pistachia vera*	Hoa Kỳ	KP217058	KP217066	KP217074
L. americana	**CERC1961* = CFCC50065**	*Pistachia vera*	Hoa Kỳ	KP217059	KP217067	KP217075
L. brasiliense	IBL344	*Spondias purpurea*	Brazil	KT151808	KT151802	-
L. brasiliense	CMM2321	*Carica papaya*	Brazil	KC484797	KC481528	-
L. brasiliense	**CMM4015***	*Mangifera indica*	Brazil	JX464063	JX464049	-
L. bruguierae	**CMW41470***	*Bruguiera gymnorrhiza*	Nam Phi	KP860833	KP860678	KP860756
L. bruguierae	CMW 42480	*B. gymnorrhiza*	Nam Phi	KP860832	KP860677	-
L. caatinguensis	IBL271	*Anacardium occidentale*	Brazil	KT154756	KT154750	-
L. caatinguensis	IBL40	*Spondias mombin*	Brazil	KT154762	KT154755	-
L. caatinguensis	**CMM1325* = IBL366**	*Citrus sinensis*	Brazil	KT154760	KT008006	KT154767
L. citricola	IRAN1521C = CBS124706	*Citrus* sp.	Iran	GU945353	GU945339	-
L. citricola	**IRAN1522C = CBS124707***	*Citrus* sp.	Iran	GU945354	GU945340	KU887505
L. crassispora	**CBS118741* = WAC12533**	*Santalum album*	Australia	DQ103550	DQ103557	KU887506
L. crassispora	CMW22653	*Pterocarpus angolensis*	Africa	FJ888465	FJ888452	-
L. chiangraiensis	**MFLUCC 21-0003***	Không xác định	Thái Lan	MW760854	MW815630	MW815628
L. chinensis	**CGMCC3.18066***	*Hevea brasiliensis*	Trung Quốc	KX499899	KX499937	KX500012
L. chonburiensis	**MFLUCC 16-0376***	*Pandanus* sp	Thái Lan	MH275066	MH412773	MH412742
L. curvata	GuoLD01755	*Aquilaria crassna*	Lào	KY783443	KY848601	KY848532
L. endophytica	MFLUCC 18-1121	*Magnolia acuminata*	Trung Quốc	MK501838	MK584572	-
L. egyptiacae	CMM3611	*Jatropha curcas*	Brazil	KF234545	KF226691	KF254928
L. euphorbiaceicola = *L. euphorbicola*	IBL329	*Cocos nucifera*	Brazil	KT247490	KT247492	KT247494
L. euphorbiaceicola	CMW 33268	*Adansonia* sp.	Senegal	KU887131	KU887008	KU887430

L. euphorbiaceicola	**CMM3609***	*Jatropha curcas*	Brazil	KF234543	KF226689	KF254926
L. exigua	**CBS137785* = IBL104**	*Retama raetam*	Tunisia	KJ638317	KJ638336	KU887509
L. exigua	BL184	*Retama raetam*	Tunisia	KJ638318	KJ638337	-
L. gilanensis	**IRAN1523C* = CBS124704**	Không xác định	Iran	GU945351	GU945342	KU887511
L. gilanensis	IRAN1501C	Không xác định	Iran	GU945352	GU945341	KU887510
L. gonubiensis	**CMW 14077***	*Syzygium cordatum*	Nam Phi	AY639595	DQ103566	DQ458860
L. gonubiensis	CBS115812	*S. cordatum*	Nam Phi	DQ458892	DQ458877	-
L. gravistriata	CMM 4565	*Anacardium humile*	Brazil	KT250947	KT266812	-
L. gravistriata	**CMM 4564***	*A. humile*	Brazil	KT250949	KT250950	-
L. henanica	CGMCC 3.1917 = XCN6	*Vaccinium uliginosum*	Trung Quốc	MH729351	MH729357	-
L. hormozganensis	**IRAN1500C = CBS124709***	*Olea* sp.	Iran	GU945355	GU945343	KU887515
L. hormozganensis	IRAN1498C = CBS 124708	*Mangifera indica*	Iran	GU945356	GU945344	-
L. iraniensis	**CBS 124710* = IRAN1520C**	*Salvadora persica*	Iran	GU945348	GU945336	KU887516
L. iraniensis	IRAN1517C	*Citrus* sp.	Iran	GU945349	GU945337	-
L. iraniensis	IRAN1519C	*Mangifera indica*	Iran	GU945350	GU945338	-
L. iraniensis (L. jatrophicola)	CMM3610	*Jatropha curcas*	Brazil	KF234544	KF226690	KF254927
L. laeliocattleyae	**CBS 167.28***	*Mangifera indica*	Ai Cập	KU507487	KU507454	KU887508
L. laeliocattleyae	LPS10	Không xác định	Peru	MK860747	MN082384	-
L. laosensis	GuoLD01818	*Aquilaria crassna*	Lào	KY783471	KY848609	KY848552
L. laosensis	GuoLD01963	*Aquilaria crassna*	Lào	KY783450	KY848603	KY848536
L. mahajangana	**CMW27801***	*Terminalia catappa*	Madagascar	FJ900595	FJ900641	FJ900630
L. mahajangana	CMW27820	*T. catappa*	Madagascar	FJ900597	FJ900643	-
L. margaritacea	**CBS122519***	*Adansonia gibbosa*	Australia	EU144050	EU144065	KU887520
L. macrospora	**CMM3833***	*Jatropha curcas*	Brazil	KF234557	KF226718	KF254941
L. marypalme	**CMM 2275***	*Carica papaya*	Brazil	KC484843	KC481567	-
L. mediterranea	**CBS137783 =BL1***	*Quercus ilex*	Italy	KJ638312	KJ638331	KU887521
L. mediterranea	ALG36	*Citrus sinensis*	Algeria	KJ638314	KJ638333	-
L. microconidia	GuoLD01889	*Aquilaria crassna*	Lào	KY783441	KY848614	-
L. missouriana	UCD2193MO	*Vitis vinifera*	Hoa Kỳ	HQ288225	HQ288267	-
L. missouriana	UCD2199MO	*Vitis vinifera*	Hoa Kỳ	HQ288226	HQ288268	-
L. newvalleyensis	**EGY20113 ***	*Phoenix dactylifera*	Ai Cập	ON392175	OP080253	OP080271

L. parva	**CBS 456.78 ***	Mẫu đất trồng sắn	Colombia	EF622083	EF622063	KU887523
L. parva	CBS495.78	Mẫu đất trồng sắn	Colombia	EF622085	EF622065	EU673115
L. plurivora	**STE-U 5803 = CBS121103***	*Vitis vinifera*	Châu Phi	EF445362	EF445395	EF445362
L. pontae	**CMM1277* = IBL12**	*Spondias purpurea*	Brazil	KT151794	KT151791	KT151797
L. pontae	IBL14	*Anacardium occidentale*	Brazil	KT151796	KT151793	KT151799
L. pseudotheobromae	**CBS116459***	*Gmelina arborea*	Costa Rica	EF622077	EF622057	EU673111
L. pseudotheobromae	IBL266	*A. occidentale*	Brazil	KT247480	KT247484	-
L. pseudotheobromae	CMM3887	*Jatropha curcas*	Brazil	KF234559	KF226722	-
L. pyriformis	**CBS 121770***	*Acacia mellifera*	Namibia	EU101307	EU101352	KU887527
L. pyriformis	CBS 121771	*Acacia mellifera*	Namibia	EU101308	EU101353	-
L. rubropurpurea	**WAC12535***	*Eucalyptus grandis*	Australia	DQ103553	DQ103571	EU673136
L. rubropurpurea	WAC12536 = CMW15207	*Eucalyptus grandis*	Australia	DQ103554	DQ103572	-
L. subglobosa	**CMM3872***	*Jatropha curcas*	Brazil	KF234558	KF226721	KF254942
L. tenuiconidia	**GuoLD1857***	*Aquilaria crassna*	Lào	KY783466	KY848619	KY848586
L. thailandica	**CPC22795 ***	*Albizia chinensis*	Trung Quốc	KJ193637	KJ193681	KY751301
L. theobromae	IBL340	*Spondias purpurea*	Brazil	KT247466	KT247472	-
L. theobromae	CBS16496	Không xác định	Papua New Guinea	AY640255	AY640258	-
L. theobromae	IBL375	*Talisia esculenta*	Brazil	KT247467	KT247473	-
L. theobromae	CMW28571	*Terminalia ivorensis*	Cameroon	GQ469924	GQ469897	-
L. theobromae	**CBS111530***	Không xác định	Không xác định	EF622074	EF622054	KU887531
L. theobromae	CMM3831	*Jatropha curcas*	Brazil	KF234556	KF226717	-
L. theobromae	CMM3612	*Jatropha curcas*	Brazil	KF234546	KF226692	-
L. tropica	**CGMCC 3.18477 = GuLD01846**	*Aquilaria crassna*	Lào	KY783454	KY848616	KY848540
L. vitis	**CBS 124060 ***	*Vitis vinifera*	Italy	KX464148	KX464642	KX464917
L. viticola	UCD2553AR	*Vitis vinifera*	Hoa Kỳ	HQ288227	HQ288269	HQ288306
L. viticola	**UCD2604MO***	*Vitis vinifera*	Hoa Kỳ	HQ288228	HQ288270	HQ288307
L. venezuelensis	**WAC12539 = CBS 118739***	*Acacia mangium*	Venezuela	DQ103547	DQ103568	KU887533
L. venezuelensis	CMW13513	*Acacia mangium*	Venezuela	DQ103549	DQ103570	-
Diplodia multila	**CMW 7060***	*Fraxinus excelsior*	Hà Lan	AY236955	AY236904	AY236933

Bảng phụ lục 2.3. Các phân lập tham chiếu sử dụng trong phân tích phát sinh loài của chi *Nigrospora*

Loài	**Chủng phân lập**	**Ký chủ**	**Nguồn gốc phân lập**	**Mã số truy cập Genbank**		
				ITS	***TUB2***	***TEF1-α***
Nigrospora aurantiaca	**CGMCC 3.18130* = LC 7302**	*Nelumbo* sp.	Trung Quốc	KX986064	KY019465	KY019295
N. bambusae	**CGMCC 3.18327* = LC 7114**	Tre (lá)	Trung Quốc	KY385307	KY385319	KY385313
N. cooperae	**BRIP 72440a***	*Heteropogon contortus*	Australia	OP035048	OP039540	OP039539
N. camelliae-sinensis	**CGMCC 3.18125* = LC 3500**	*Camellia sinensis*	Trung Quốc	KX985986	KY019460	KY019293
N. covidalis	**CGMCC 3.20538***	*Lithocarpus* sp.	Trung Quốc	OK335209	OK431479	OK431485
N. chinensis	**CGMCC 3.18127* = LC 4575**	*Machilus breviflora*	Trung Quốc	KX986023	KY019462	KY019422
N. falsivesicularis	**CGMCC 3.19678***	*Saccharum officinarum*	Trung Quốc	MN215778	MN329942	MN264017
N. globosa	**CGMCC 3.19633* = LC12440**	Đất thu thập ở các hang động	Trung Quốc	MK329121	MK336134	–
N. globospora	**CGMCC 3.20539***	*Petasites hybridus*	Trung Quốc	OK335211	OK431481	OK431487
N. gorlenkoana	**CBS 480.73***	*Vitis vinifera*	Kazakhstan	KX986048	KY019456	KY019420
N. guangdongensis	CFCC 53917	*Cunninghamia lanceolata* (th)	Trung Quốc	MT017509	MT024495	MT024493
N. guilinensis	LC 7301	*Nelumbo* sp. (cuống lá)	Trung Quốc	KX986063	KY019608	KY019404
N. guilinensis	**CGMCC 3.18124* = LC 3481**	*Camellia sinensis*	Trung Quốc	KX985983	KY019459	KY019292
N. hainanensis	**CGMCC 3.18129* = LC 7030**	*Musa paradisiaca* (lá)	Trung Quốc	KX986091	KY019464	KY019415
N. lacticolonia	**CGMCC 3.18123* = LC 3324**	*Camellia sinensis*	Trung Quốc	KX985978	KY019458	KY019291

N. lacticolonia	LC 7009	*Musa paradisiaca* (lá)	Trung Quốc	KX986087	KY019594	–
N. lacticolonia	SFC20230324-M06	*Sargassum* sp. (Phaeophyceae)	Hàn Quốc	OQ726357	OQ735182	–
N. macarangae	**MFLUCC 19-0141***	*Macaranga tanarius*	Đài Loan,TQ	MW114318	–	–
N. macarangae	NCYUCC 19-0177	*Macaranga tanarius*	Đài Loan,TQ	MW114319	–	–
N. magnoliae	**MFLUCC 19-0112***	*Magnolia liliifera*	Trung Quốc	MW285092	MW438334	–
N. musae	**CBS 319.34***	*Musa paradisiaca* (quả)	Australia	KX986076	KY019455	KY019419
N. oryzae	LC 7306	*Nelumbo* sp. (lá)	Trung Quốc	KX986068	KY019612	KY019408
N. oryzae	LC 2689	*Rhododendron* sp.	Trung Quốc	KX985942	KY019469	KY019423
N. oryzae	LC 4338	*Camellia s*p.	Trung Quốc	KX986008	KY019532	KY019349
N. osmanthi	**CGMCC 3.18126* = LC 4350**	*Osmanthus* sp.	Trung Quốc	KX986010	KY019461	KY019421
N. philosophiae-doctoris	**CGMCC 3.20540***	*Disporum sessile*	Trung Quốc	OK335213	OK431483	OK431489
N. pyriformis	**CGMCC 3.18122* = LC 2045**	*Citrus sinensis*	Trung Quốc	KX985940	KY019457	KY019290
N. pyriformis	LC 6988	*Musa paradisiaca* (lá)	Trung Quốc	KX986082	KY019589	KY019452
N. pyriformis	SFC20230324-M16	*Laurencia* sp. (Rhodophyta)	Hàn Quốc	OQ726365	OQ735192	OQ735209
N. rubi	**CGMCC 3.18326* = LC 2698**	*Rubus* sp.	Trung Quốc	KX985948	KY019475	KY019302
N. saccharicola	**CGMCC 3.19362***	*Saccharum officinarum*	Trung Quốc	MN215788	MN329951	MN264027
N. sacchari-officinarum	**CGMCC 3.19335***	*Saccharum officinarum*	Trung Quốc	MN215791	MN329954	MN264030
N. singularis	**CGMCC 3.19334***	*Saccharum officinarum*	Trung Quốc	MN215793	MN329956	MN264032
N. sphaerica	LC 2840	*Harpullia longipetala*	Trung Quốc	KX985965	KY019492	KY019318

N. sphaerica	LC 7295	*Nelumbo* sp. (lá)	Trung Quốc	KX985933	KY019603	KY019398
N. sphaerica	LC 2958	*Cleyera japonica*	Trung Quốc	KX985966	KY019493	KY019319
N. sphaerica	LC 6969	*Musa paradisiaca* (lá)	Trung Quốc	KX986077	KY019584	KY019386
N. vesicularifera	**CGMCC 3.19333***	*Saccharum officinarum*	Trung Quốc	MN215812	MN329975	MN264051
N. vesicularis	**CGMCC 3.18128* = LC 7010**	*Musa paradisiaca* (lá)	Trung Quốc	KX986088	KY019463	KY019294
N. zimmermanii	**CBS 290.62***	*Saccharum officinarum* (lá)	Ecuador	KY385309	KY385317	KY385311
Arthrinium malaysianum **(OUTGROUP)**	CBS102053	*Macaranga hullettii*	Malaysia	NR120273	KF144988	KF145030
Apiospora obovata **(OUTGROUP)**	**LC4940***	*Lithocarpus* sp.	Trung Quốc	KY494696	KY705166	KY705095

Bảng phụ lục 2.4. Các phân lập tham chiếu sử dụng trong phân tích phát sinh loài của chi *Colletotrichum* – **phức hợp gloeosporioides theo từng locus (6 locus)**

Loài	**Chủng phân lập**	**Ký chủ**	**Nguồn gốc phân lập**	**Mã số truy cập Genbank**					
				ITS	***GAPDH***	***CHS-1***	***ACT***	***TUB2***	***ApMAT***
Colletotrichum aenigma	**ICMP 18608***	***Persea americana***	**Israel**	**JX010244**	**JX010044**	**JX009774**	**JX009443**	**JX010389**	**KM360143**
C. aeschynomenes	**ICMP 17673* = ATCC 201874**	***Aeschynomene virginica***	Hoa Kỳ	**JX010176**	**JX009930**	**JX009799**	**JX009483**	**JX010392**	**KM360145**
C. alatae	**CBS 304.67* = ICMP17919**	***Dioscorea alata***	**Ấn Độ**	**JX010190**	**JX009990**	**JX009837**	**JX009471**	**JX010383**	**KC888932**
C. alienum	**ICMP 12071* = C824**	***Malus domestica***	**New Zealand**	**JX010251**	**JX010028**	**JX009882**	**JX009572**	**JX010411**	**KM360144**
C. analogum	**CGMCC3.16079 = YMF 1.06943***	***Ageratina adenophora***	**Trung Quốc**	**OK030860**	**OK513663**	**OK513559**	**OK513599**	**OK513629**	**N/A**

C. aotearoa	**ICMP 18537* = C1282.4**	***Coprosma* sp.**	**New Zealand**	**JX010205**	**JX010005**	**JX009853**	**JX009564**	**JX010420**	**KC888930**
C. arecicola	**CGMCC 3.19667***	***Areca catechu***	**Trung Quốc**	**MK914635**	**MK935455**	**MK935541**	**MK935374**	**MK935498**	**N/A**
C. artocarpicola	**MFLUCC 18-1167***	***Artocarpus heterophyllus***	**Thái Lan**	**MN415991**	**MN435568**	**MN435569**	**MN435570**	**MN435567**	**N/A**
C. asianum	**ICMP 18580* = CBS 130418 = C1315.4**	***Coffea arabica***	**Thái Lan**	**JX010196**	**JX010053**	**JX009867**	**JX009584**	**JX010406**	**FR718814**
C. australianum	**VPRI 43075* = UMC002**	***Citrus sinensis***	**Australia, Vic**	**MG572138**	**MG572127**	**MW091987**	**MN442109**	**MG572149**	**MG572171**
C. cangyuanense	**CGMCC3.18969, YMF 1.05001***	***Ageratina adenophora***	**Trung Quốc**	**OK030864**	**OK513667**	**OK513563**	**OK513603**	**OK513633**	**N/A**
C. camelliae	**CGMCC 3.14925 = LC1364***	***Camellia sinensis***	**Trung Quốc**	**KJ955081**	**KJ954782**	**MZ799255**	**KJ954363**	**KJ955230**	**KJ954497**
C. castaneae	**GUCC 21268.4***	***Castanea mollissima***	**Trung Quốc**	**OP722991**	**OP737973**	**OP715778**	**OP715812**	**OP720868**	
C. changpingense	**MFLUCC 15-0022 = CGMCC 3.17582* = SA0016**	***Fragaria ×ananassa***	**Trung Quốc**	**KP683152**	**KP852469**	**KP852449**	**KP683093**	**KP852490**	**N/A**
C. chiangmaiense	**MFLUCC 18-0945***	***Magnolia garrettii***	**Thái Lan**	**MW346499**	**MW548592**	**MW623653**	**MW655578**	**N/A**	**N/A**
C. chrysophilum	**CMM 4268* = URM7368**	***Musa* sp.**	**Brazil**	**KX094252**	**KX094183**	**KX094083**	**KX093982**	**KX094285**	**KX094325**
	AFK17			MN625458	MN632506	N/A	MN622831	MN622860	MN622877
C. cigarro	**ICMP 18539* = UWS124**	***Olea europaea***	**Australia**	**JX010230**	**JX009966**	**JX009800**	**JX009523**	**JX010434**	**N/A**
C. citrulli	CAASZT54	*Citrullus lanatus*	Trung Quốc	MZ475134	OL456686	OL901154	OL449284	OL456645	N/A
	CAASZT52*	***Citrullus lanatus***	**Trung Quốc**	**MZ475133**	**OL456685**	**OL901153**	**OL449283**	**OL456644**	**N/A**
C. clidemiae	**ICMP 18658* = C1317.1**	***Clidemia hirta***	**USA, Hawaii**	**JX010265**	**JX009989**	**JX009877**	**JX009537**	**JX010438**	**KC888929**
C. cobbittiense	**BRIP 66219***	***Cordyline stricta* × *C. australis***	**Australia**	**MH087016**	**MH094133**	**MH094135**	**MH094134**	**MH094137**	
C. cycadis	**BRIP 71326a* = VA-2021a 371351**	***Cycas revoluta***	**Trung Quốc**	**MT439915**	**MT439919**	**MT439917**	**N/A**	**MT439921**	**N/A**

C. conoides	**CGMCC 3.17615 = CAUG17* = LC6226**	***Capsicum annuum***	**Trung Quốc**	**KP890168**	**KP890162**	**KP890156**	**KP890144**	**KP890174**	**N/A**
C. cordylinicola	GUCC 12079	*Cordyline fruticose*	Trung Quốc	OP722972	OP784099	OP730652	OP740194	OP761965	N/A
	MFLUCC 090551, BCC38872, LC0856*	***Cordyline fruticosa***	**Thailand**	**HM470246**	**HM470240**	**JX009864**	**HM470235**	**HM470249**	**JQ899274**
C. dimorphum	**CGMCC 3.16083***	***Ageratina adenophora***	**Trung Quốc**	**OK030867**	**OK513670**	**OK513566**	**OK513606**	**OK513636**	**N/A**
	YMF 1.07303	*Ageratina adenophora*	Trung Quốc	OK030866	OK513669	OK513565	OK513605	OK513635	N/A
C. dracaenigenum	**MFLUCC 19-0430***	***Dracaena* sp.**	**Thái Lan**	**MN921250**	**MT215577**	**MT215575**	**MT313686**	**N/A**	**N/A**
C. endophytica	YTJ6	*Bauhinia blakeana* (đốm lá)	Trung Quốc	OK560626	OK562584	N/A	OK562583	OK562585	N/A
	CAUG28	*Capsicum* sp.	Trung Quốc	KP145441	KP145413	KP145385	KP145329	KP145469	N/A
	EIPP 33	*Coffea arabica*	Trung Quốc	MK330020	MK344238	MK344261	MK344284	MK344215	MK344199
	MFLUCC 13-0418* = LC0324	***Pennisetum purpureum***	**Thái Lan**	**KC633854**	**KC832854**	**MZ799261**	**KF306258**	**MZ673954**	**N/A**
C. fici-septicae	**MFLU 19-2770***	***Ficus septica***	**Đài Loan, TQ**	**MW114367**	**MW183774**	**MW177701**	**MW151585**	**N/A**	**N/A**
C. fructicola	LC2923, LF130	*Camellia sinensis*	Trung Quốc	KJ955083	KJ954784	N/A	KJ954365	KJ955232	KJ954499
	GUCC 12054	*Zingiber officinale*	Trung Quốc	OP722955	N/A	OP730615	OP740157	OP761928	
	ML348	*Fragaria × ananassa*	Đài Loan, TQ	MK908461	MK908513	MK908564	MK908615	MK908666	MK908758
	ICMP 18581* = CBS 130416* = BPDI16 = C1315.3	***Coffea arabica***	**Thái Lan**	**JX010165**	**JX010033**	**JX009866**	**FJ907426**	**JX010405**	**JQ807838**
C. fructivorum	**CBS 133125* = Coll1414 = BPI884103**	***Vaccinium macrocarpon***	**Hoa Kỳ (Burlington)**	**JX145145**	**MZ664047**	**MZ799259**	**MZ664126**	**JX145196**	
C. gloeosporioides	**IMI 356878* = ICMP 17821 = CBS 112999**	***Citrus sinensis***	**Italy**	**JX010152**	**JX010056**	**JX009818**	**JX009531**	**JX010445**	**JQ807843**

	LC3312, LF534	*Camellia sinensis*, pathogen	Trung Quốc	KJ955158	KJ954859	N/A	KJ954434	KJ955305	KJ954569
	CBS 273.51 = ICMP 19121	*Citrus limon*	Italy	JX010148	JX010054	JX009903	JX009558	N/A	N/A
	DAR 76936 = ICMP 18738	*Carya illinoinensis*	Australia	JX010151	JX009976	JX009797	JX009542	N/A	N/A
	ICMP12939 = C1014.6	*Citrus* sp.	New Zealand	JX010149	JX009931	JX009747	JX009462	N/A	N/A
	CBS 119204 = ICMP 18678	*Pueraria labata*	Hoa Kỳ	JX010150	JX010013	JX009790	JX009502	N/A	N/A
	GUCC 12116	*Ilex chinensis*	Trung Quốc	OP723021	OP784138	OP730685	OP740223	OP762002	N/A
	GUCC 12051	*Rhododendron simsii*	Trung Quốc	OP723007	OP784052	OP730606	OP740148	OP761919	N/A
	GUCC 12120	*Viburnum dilatatum*		OP723014	OP784141	N/A	N/A	OP762006	N/A
	ICMP 18694 = C1258.7	*Mangifera indica*	Nam Phi	JX010155	JX009980	JX009796	JX009481	N/A	N/A
	ICMP 18697 = C1254.4	***Vitis vinifera***	**Hoa Kỳ**	**JX010154**	**JX009987**	**JX009780**	**JX009557**	**N/A**	**N/A**
C. gardeniae	GUCC 12050	*Gardenia jasminoides*	Trung Quốc	OP722956	OP737964	OP715768	OP715803	OP720860	N/A
	GUCC 12049*	***Gardenia jasminoides***	**Trung Quốc**	**OP722995**	**OP737963**	**OP715766**	**OP715801**	**OP720858**	**N/A**
C. gracile	**CGMCC 3.16075, YMF 1.06939***	***Ageratina adenophora***	**Trung Quốc**	**OK030868**	**OK513671**	**OK513567**	**OK513607**	**OK513637**	**N/A**
C. grevilleae	**CBS 132879* = CPC 15481***	***Grevillea* sp.**	**Italy**	**KC297078**	**KC297010**	**KC296987**	**KC296941**	**KC297102**	**N/A**
C. grossum	**CGMCC 3.17614***	**Chili pepper**	**Trung Quốc**	**KP890165**	**KP890159**	**KP890153**	**KP890141**	**KP890171**	**N/A**
C. hebeiense	**MFLUCC 13-0726* = K3**	***Vitis vinifera***	**Trung Quốc**	**KF156863**	**KF377495**	**KF289008**	**KF377532**	**KF288975**	**N/A**
C. hederiicola	**MFLU 15-0689***	***Hedera helix***	**Italy**	**MN631384**	**N/A**	**MN635794**	**MN635795**	**N/A**	**N/A**
C. helleniense	**CBS 142418* = CPC28644**	***Poncirus trifoliata***	**Hy Lạp (Arta)**	**KY856446**	**KY856270**	**KY856186**	**KY856019**	**KY856528**	**N/A**
C. henanense	**CGMCC 3.17354* = LC3030 =LF238**	***Camellia sinensis***	**Trung Quốc**	**KJ955109**	**KJ954810**	**MZ799256**	**KM023257**	**KJ955257**	**KJ954524**

C. horii	**NBRC 7478* = ICMP 10492 = MTCC 10841**	***Diospyros kaki***	**Nhật Bản**	**GQ329690**	**GQ329681**	**JX009752**	**JX009438**	**JX010450**	**JQ807840**
C. hystricis	**CBS 142411* = CPC28153**	***Citrus hystrix***	**Italy, Catania**	**KY856450**	**KY856274**	**KY856190**	**KY856023**	**KY856532**	**N/A**
C. jiangxiense	GUCC 12045	*Illicium simonsii*	Trung Quốc	OP723001	OP784039	OP730596	OP740136	OP761907	N/A
	LC3463 = CGMCC 3.17363 = LF687*	***Camellia sinensis***	**Trung Quốc**	**KJ955201**	**KJ954902**	**N/A**	**KJ954471**	**KJ955348**	**KJ954607**
C. *kahawae* subsp. *ciggaro*	ICMP 18534 = C1266.1	*Kunzea ericoides*	New Zealand	JX010227	JX009904	N/A	JX009473	JX010427	HE655657
C. kahawae* subsp. *kahawae	**IMI 319418* = ICMP 17816***	***Coffea arabica***	**Kenya**	**JX010231**	**JX010012**	**JX009813**	**JX009452**	**JX010444**	**JQ894579**
C. ligustri	**GUCC 12111***	***Ilex chinensis***	**Trung Quốc**	**OP722988**	**OP737968**	**OP715773**	**OP740216**	**OP720864**	**N/A**
C. ledongense	**CGMCC3.18888* = LD1680**	*Quercus palustris*	Trung Quốc	MG242008	MG242016	MG242018	MG242014	MG242010	N/A
C. kunmingense	**GUCC 12053***	***Ophiopogon japonicus***	**Trung Quốc**	**OP722975**	**OP737965**	**OP715769**	**OP715804**	**OP720861**	**N/A**
C. makassarense	**CBS 143664***	***Capsicum annuum***	**Indonesia**	**MH728812**	**MH728820**	**MH805850**	**MH781480**	**MH846563**	**MH728831**
C. mengyinense	**SAUCC200702***	***Rosa chinensis***	**Trung Quốc**	**MW786742**	**MW846240**	**MW883686**	**MW883695**	**MW888970**	**N/A**
	SAUCC200983	*Juglans regia*	Trung Quốc	MW786642	MW876476	MW883691	MW883700	MW888975	N/A
C. musae	**CBS 116870* = ICMP 19119 = MTCC 11349**	***Musa* sp.**	**Hoa Kỳ**	**JX010146**	**JX010050**	**JX009896**	**JX009433**	**HQ596280**	**KC888926**
C. nanhuaensis	**CGMCC3.18962 = YMF1.04993***	***Ageratina adenophora***	**Trung Quốc**	**OK030870**	**OK513673**	**OK513569**	**OK513609**	**OK513639**	**N/A**
	YMF 1.04990	*Ageratina adenophora*	Trung Quốc	OK030871	OK513674	OK513570	OK513610	OK513640	N/A
C. nullisetosum	**CGMCC3.16080 = YMF1.06946***	***Mangifera indica***	**Trung Quốc**	**OK030872**	**OK513675**	**OK513571**	**OK513611**	**OK513641**	**N/A**
C. nupharicola	**CBS 470.96* = ICMP 18187* = C1275.25**	***Nuphar lutea* subsp. *polysepala***	**Hoa Kỳ**	**JX010187**	**JX009972**	**JX009835**	**JX009437**	**JX010398**	**JX145319**
C. nupharicola	**ICMP 17938 = CBS 469.96**	***Nuphar lutea* subsp. *polysepala***	**Hoa Kỳ**	**JX010189**	**JX009936**	**JX009834**	**JX009486**	**JX010397**	**N/A**

C. oblongisporum	**CGMCC3.16074, YMF1.06938***	***Ageratina adenophora***	**Trung Quốc**	**OK030874**	**OK513677**	**OK513573**	**N/A**	**OK513643**	**N/A**
C. pandanicola	ZHKUCC 210080	*Reineckea carnea*	Trung Quốc	N/A	OL672738	OL672728	OL672718	OL739541	N/A
	MFLUCC 17-0571*	***Pandanaceae***	**Thailand**	**MG646967**	**MG646934**	**MG646931**	**MG646938**	**MG646926**	**N/A**
C. parvisporum	**CGMCC3.16078 = YMF 1.06942***	***Ageratina adenophora***		**OK030876**	**OK513679**	**OK513575**	**OK513613**	**OK513645**	**N/A**
C. perseae	**CBS 141365* =GA100**	**Avocado**	**Israel**	**KX620308**	**KX620242**	**MZ799260**	**KX620145**	**KX620341**	**KX620177**
C. proteae	**CBS 132882***	***Protea* sp.**	**Nam Phi**	**KC297079**	**KC297009**	**KC296986**	**KC296940**	**KC297101**	**N/A**
C. pseudotheobromicola	**MFLUCC 18-1602***	***Prunus avium***	**Trung Quốc**	**MH817395**	**MH853675**	**MH853678**	**MH853681**	**MH853684**	**N/A**
C. psidii	**CBS 145.29* = ICMP 19120**	***Psidium* sp.**	**Italy**	**JX010219**	**JX009967**	**JX009901**	**JX009515**	**JX010443**	**KC888931**
C. queenslandicum	ICMP 18705 = C956.1	*Coffea* sp.	Fiji	JX010185	JX010036	JX009890	JX009490	JX010412	N/A
	ICMP 1778*	***Carica papaya***	**Australia**	**JX010276**	**JX009934**	**JX009899**	**JX009447**	**JX010414**	**KC888928**
C. rhexiae	**CBS 133134 * = Coll1026**	***Rhexia virginica***	**USA**	**JX145128**	**MZ664046**	**MZ799258**	**MZ664127**	**JX145179**	**JX145290**
C. salsolae	**ICMP 19051* = C1314**	***Salsola tragus***	**Hungary**	**JX010242**	**JX009916**	**JX009863**	**JX009562**	**JX010403**	**KC888925**
C. siamense	**LC2931 = CGMCC 3.17353 = LF139**	***Camellia* sp., pathogen**	**Trung Quốc**	**KJ955087**	**KJ954788**	**N/A**	**KJ954369**	**KJ955236**	**KJ954503**
C. siamense	**ICMP 18578* = CBS 130417 =BPDI2 = C1315.2**	***Coffea arabica***	**Thái Lan**	**JX010171**	**JX009924**	**JX009865**	**FJ907423**	**JX010404**	**JQ899289**
C. siamense (syn. *C. hymenocallidis*)	CBS 125378, ICMP 18642, LC0043	*Hymenocallis americana*	Trung Quốc	JX010278	JX010019	GQ856730	JX009441	JX010410	JQ899283
C. siamense (syn. *C. jasmini-sambac*)	CBS 130420, ICMP 19118 = LLTA01 = LC921	*Jasminum sambac*	Việt Nam	HM131511	HM131497	JX009895	HM131507	JX010415	JQ807841
C. siamense	GUCC 12101	*Curcuma phaeocaulis*	Trung Quốc	OP723012	OP784114	OP730666	OP740202	OP761980	N/A

C. *siamense* (syn. *C. murrayae*)	GZAAS 5.09506	*Murraya* sp.	Trung Quốc	JQ247633	JQ247609	N/A	JQ247657	JQ247644	N/A
C. siamense	ZCGWF1501	Litchi chinensis	Trung Quốc	MK457191	MK457189	N/A	MK457187	MK457186	N/A
C. siamense	DL71	*Litchi chinensis*	Trung Quốc	OR461255	OR455991	OR456029	OR456067	OR456105	OR456133
C. syzygicola	**MFLUCC 10-0624***	***Syzygium samarangense***	**Thái Lan**	**KF242094**	**KF242156**	**N/A**	**KF157801**	**KF254880**	**N/A**
C. tainanense	**CBS 143666***	***Capsicum annuum***	**Đài Loan, TQ**	**MH728818**	**MH728823**	**MH805845**	**MH781475**	**MH846558**	**MH728836**
C. temperatum	**CBS 133122***	***Vaccinium macrocarpon***	**Bronx**	**JX145159**	**MZ664045**	**MZ799254**	**MZ664125**	**JX145211**	**JX145298**
C. tengchongense	**YMF 1.04950 = YMF 1.04950***	***Isoetes sinensis***	**Trung Quốc**	**OL842169**	**OL981264**	**OL981290**	**OL981238**	**N/A**	**N/A**
C. theobromicola	**MTCC 11350 = CBS 124945* = ICMP 18649**	***Theobroma cacao***	**Panama**	**JX010294**	**JX010006**	**JX009869**	**JX009444**	**JX010447**	**KC790726**
C. ti	**ICMP 4832***	***Cordyline sp.***	**New Zealand**	**JX010269**	**JX009952**	**JX009898**	**JX009520**	**JX010442**	**KM360146**
C. tropicale	**CBS 124949* = ICMP 18653**	***Theobroma cacao***	**Panama**	**JX010264**	**JX010007**	**JX009870**	**JX009489**	**JX010407**	**KC790728**
	CCLF186	*Hylocereus spp.*	Mexico	OP269659	OP302778	N/A	OP302777	N/A	OP302779
	GC3 = FC1	*Ficus carica*		MT192648	MT155819	MW684717	MT199873	MT199874	MT221652
C. viniferum	**GZAAS 5.08601 * = yg1**	***Vitis vinifera*, cv. 'Shuijing'**	**Trung Quốc**	**JN412804**	**JN412798**	**N/A**	**JN412795**	**JN412813**	**JN412787**
C. vulgaris	**CGMCC3.18940 = YMF 1.04940***	***Hippuris vulgaris***	**Trung Quốc**	**OL842170**	**OL981265**	**OL981291**	**OL981239**	**N/A**	**N/A**
C. wuxiense	**CGMCC 3.17894* = JS1A32**	***Camellia sinensis***	**Trung Quốc**	**KU251591**	**KU252045**	**KU251939**	**KU251672**	**KU252200**	**KU252101**
C. xanthorrhoeae	**BRIP 45094* = ICMP 17903 = CBS 127831 = C1271**	***Xanthorrhoea preissii***	**Australia**	**JX010261**	**JX009927**	**JX009823**	**JX009478**	**JX010448**	**KC790689**
C. xishuangbannaense	**MFLUCC 19-0107***	***Magnolia liliifera***	**Trung Quốc**	**MW346469**	**MW537586**	**MW660832**	**MW652294**	**N/A**	**N/A**
C. yulongense	**CFCC 50818***	***Vaccinium dunalianum* var. *urophyllum***	**Trung Quốc**	**MH751507**	**MK108986**	**MH793605**	**MH777394**	**MK108987**	**N/A**
C. yunanjiangensis	**CGMCC3.18964 = YMF 1.04996***	***Ageratina adenophora***	**Trung Quốc**	**OK030885**	**OK513686**	**OK513583**	**OK513620**	**OK513649**	**N/A**

***C. truncatum* (OUTGROUP)**	**CBS 151.35***	***Phaseolus lunatus***	**USA**	GU227862	GU228254	GU228352	GU227960	GU228156	**N/A**
	MFLUCC 22-0110 = PM130	***Durio zibethinus***	**Thái Lan**	OP740247	OP744517	OP744516	OP744515	OP744518	**N/A**
***C. boninense* (OUTGROUP)**	**CBS 123755 ***	***Crinum asiaticum var. sinicum***	**Nhật Bản**	JQ005153	JQ005240	JQ005327	JQ005501	JQ005588	**N/A**

Bảng phụ lục 2.5. Các phân lập tham chiếu sử dụng trong phân tích phát sinh loài của chi *Colletotrichum* – **phức hợp orchiaderum (5 locus)**

Loài	**Chủng phân lập**	**Ký chủ**	**Nguồn gốc phân lập**	**Mã số truy cập Genbank**				
				ITS	***GAPDH***	***CHS-1***	***ACT***	***TUB2***
Colletotrichum cattleyicola	**CBS 170.49***	*Cattleya* sp.	Bỉ	MG600758	MG600819	MG600866	MG600963	MG601025
C. cliviicola	**CBS 125375***	*Clivia miniata*	Trung Quốc	MG600733	MG600795	MG600850	MG600939	MG601000
C. monsterae	**LC13871 = NN055214***	*Monstera deliciosa*	Trung Quốc	MZ595897	MZ664121	MZ799351	MZ664195	MZ674015
C. musicola	**CBS 132885***	*Musa* sp.	Mexico	MG600736	MG600798	MG600853	MG600942	MG601003
C. orchidearum	**CBS 135131***	*Dendrobium nobile*	Hà Lan	MG600738	MG600800	MG600855	MG600944	MG601005
C. pereskiae	**VIC 47381* = COAD 2995**	*Pereskia aculeata*	Brazil	MZ262421	MZ265337	N/A	N/A	N/A
C. piperis	**IMI 71397 = CPC 21195***	*Piper nigrum*	Malaysia	MG600760	MG600820	MG600867	MG600964	MG601027
C. plurivorum	**CBS 125474***	*Coffea* sp.	Việt Nam	MG600718	MG600781	MG600841	MG600925	MG600985
	LC8240 = M51	*Paederia foetida*	Trung Quốc	MZ595848	MZ664113	MZ799291	MZ664146	MZ673969
	ZHKUCC 23-0867	*Impatiens balsamina*	Trung Quốc	OR286376	OR493878	OR493850	OR493822	OR453364
	GUCC 12141	*Piper sarmentosum*	Trung Quốc	OP723084	OP784117	OP730669	OP740205	OP761983
C. sojae	**ATCC 62257***	*Glycine max*	USA	MG600749	MG600810	MG600860	MG600954	MG601016
C. syngoniicola	**LC8894 = M745***	*Syngonium* sp.	Trung Quốc	MZ595863	MZ664117	MZ799296	MZ664161	MZ673982

C. vittalense	**CBS 181.82***	*Theobroma cacao*	Ấn Độ	MG600734	MG600796	MG600851	MG600940	MG601001
	GUCC 12144	*Piper sarmentosum*	Trung Quốc	OP723092	OP784120	OP730672	OP740208	OP761986
C. reniforme	**LC8230***	*Smilax cocculoides*	Trung Quốc	MZ595847	MZ664110	MZ799290	MZ664145	MZ673968
C. magnum **(OUTGROUP)**	**CBS519.97**	*Citrullus lanatus*	USA	MG600769	MG600829	MG600875	MG600973	MG601036
C. merremiae **(OUTGROUP)**	**CBS 124955**	*Merremia umbellata*	Panama	MG600765	MG600825	MG600872	MG600969	MG601032

Bảng phụ lục 2.6. Các phân lập tham chiếu sử dụng trong phân tích phát sinh loài đa locus của chi *Curvularia*

Loài	Chủng phân lập	Ký chủ	Nguồn gốc phân lập	Mã số truy cập Genbank	
				ITS	*GAPDH*
Curvularia aeria	**CBS 294.61 T**	**Mẫu thu thập từ không khí**	**Brazil**	**HF934910**	**HG779148**
C. affinis	**CBS 154.34 T**	**Không có dữ liệu**	**Indonesia**	**KJ909780**	**KM230401**
C. ahvazensis	**CBS 144673 T**	***Zinnia elegans***	**Iran**	**KX139029**	**MG428693**
C. akaii	CBS 317.86	*Themada triandra* subsp. *japonica*	Nhật Bản	KJ909782	KM230402
C. akaiiensis	**BRIP 16080 T**	**Không có dữ liệu**	**Ấn Độ**	**KJ415539**	**KJ415407**
C. alcornii	**MFLUCC 10-0703 T**	***Z. mays***	**Thái Lan**	**JX256420**	**JX276433**
C. americana	**UTHSC 08-3414 T**	**Mẫu mô người**	**USA**	**HE861833**	**HF565488**
	UTHSC 07-2649	Mẫu mô người (ngón chân)	USA	HE861834	HF565486
C. annelliconidiophori	**CGMCC3.19352 T**	***Saccharum officinarum***	**Trung Quốc**	**MN215641**	**MN264077**
	LC12013	*Saccharum officinarum*	Trung Quốc	MN215645	MN264081
C. asiatica	**MFLUCC 10-0711 T**	***Panicum* sp.**	**Thái Lan**	**JX256424**	**JX276436**
	USJCC–0074	*Oryza sativa*	SriLanka	OQ275215	OQ269626
	LC11959	*Saccharum officinarum* (rễ)	Trung Quốc	MN215647	MN264083
C. australiensis	**BRIP 12044 T**	***Oryza sativa***	**Australia**	**KJ415540**	**KJ415406**
	CBS 172.57	*O. sativa* (mẫu thu từ hạt)	Việt Nam	JN601026	JN601036
C. australis	**BRIP 12521 T**	***Sporobolus caroli***	**Australia**	**KJ415541**	**KJ415405**
C. bannonii	**BRIP 16732 T**	***Jacquemontia tamnifolia***	**Hoa Kỳ**	**KJ415542**	**KJ415404**

C. beasleyi	**BRIP 10972 [T]**	***Chloris gayana***	**Australia**	**MH414892**	**MH433638**
	BRIP 15854	*Leersia hexandra*	Australia	MH414893	MH433639
C. beerburrumensis	**BRIP 12942 [T]**	***Eragrostis bahiensis***	**Australia**	**MH414895**	**MH433634**
C. boeremae	**IMI 164633 [T]**	***Portulaca oleracea***	**Ấn Độ**	**MH414911**	**MH433641**
C. borreriae	CBS 859.73	Mẫu tro núi lửa	Chile	HE861848	HF565455
C. bothriochloae	**BRIP 12522 [T]**	***Bothriochloa bladhii***	**Australia**	**KJ415543**	**KJ415403**
C. brachyspora	CBS 186.50	Mẫu đất	Indonesia	KJ922372	KM061784
C. buchloes	**CBS 246.49 [T]**	***Buchloë dactyloides***	**Hoa Kỳ**	**KJ909765**	**KM061789**
C. canadensis	CBS 109239	Overwinter grass	Canada	MN688804	MN688831
C. carica-papayae	**CBS 135941 [T]**	***Carica papaya***	**Ấn Độ**	**HG778984**	**HG779146**
C. chiangmaiensis	**CPC 28829 [T]**	***Z. mays***	**Thái Lan**	**MF490814**	**MF490836**
	LC12030	*S. officinarum*	Trung Quốc	MN215650	MN264086
	LC12044	*S. officinarum*	Trung Quốc	MN215651	MN264087
C. chlamydospora	**UTHSC 07-2764 [T]**	**Mẫu móng chân (người)**	**Hoa Kỳ**	**HG779021**	**HG779151**
C. clavata	BRIP 61680	*Oryza* sp.	Australia	KU552205	KU552167
C. cymbopogonis	CBS 419.78	*Yucca* sp. (đốm lá)	Hà Lan	HG778985	HG779129
C. coatesiae	**BRIP 24261 [T]**	***Litchi chinensis***	**Australia**	**MH414897**	**MH433636**
C. coicis	**CBS 192.29 [T]**	***Coix lacryma-jobi***	**Nhật Bản**	**MH855040**	**HG779130**
C. coimbatorensis	**SZMC 22225 [T]**	**Mẫu giác mạc người**	**Ấn Độ**	**MN628310**	**MN628306**
C. colbranii	**BRIP 13066 [T]**	***Crinum zeylanicum***	**Australia**	**MH414898**	**MH433642**
C. comoriensis	CBS 110673	Không có dữ liệu	N/A	LT631357	LT715841

C. crassiseptum	**CBS 503.90 [T]**	**Plant material**	**Nigeria**	**LT631310**	**LT715882**
C. crustacea	**BRIP 13524 [T]**	***Sporobolus* sp.**	**Indonesia**	**KJ415544**	**KJ415402**
C. dactyloctenicola	**CPC 28810[T]**	***Dactyloctenium aegyptium***	**Thái Lan (Chiangmai)**	**MF490815**	**MF490837**
	MFLUCC 23-0142	*Ananas comosus*	Thái Lan	OR438362	OR567318
C. dactyloctenii	**BRIP 12846 [T]**	***Dactyloctenium radulans***	**Australia**	**KJ415545**	**KJ415401**
C. deightonii	CBS 537.70	*Sorghum vulgare*	Denmark	LT631356	LT715839
C. determinata	LC12034	*S. officinarum*	Trung Quốc	MN215654	MN264089
	CGMCC3.19340[T] = LC12038	***S. officinarum* (lá)**	**Trung Quốc**	**MN215653**	**MN264088**
C. deserticola	CN025B5	*Stipagrostis ciliata*	Namibia: Far East	ON074982	ON355397
	CMW-IA 6946 = CMW 64029 = CN037D9	Mẫu đất	Namibia: Far East	OR992658	ON355434
	CMW-IA 6932 = CMW 58190 = CBS 151410 = CN025G1[T]	***Stipagrostis ciliata***	**Namibia: Far East**	**ON074985**	**ON355399**
C. elliptiformis	LC12004	*S. officinarum*	Trung Quốc	MN215659	MN264092
	CGMCC3.19351 = LC12005[T]	***S. officinarum* (rễ)**	**Trung Quốc**	**MN215656**	**MN264091**
	MFLUCC 23- 0103	*Ananas comosus*	Thái Lan	OR438363	N/A
C. ellisii	**CBS 193.62 [T]**	**Mẫu thu thập từ không khí**	**Pakistan**	**JN192375**	**JN600963**
C. eragrosticola	**BRIP 12538 [T]**	***Eragrostis pilosa***	**Australia**	**MH414899**	**MH433643**
C. eragrostidis	CBS 189.48	Sorghum seed	Indonesia	HG778986	HG779154
C. falsilunata	**CGMCC3.19329 [T]**	***S. officinarum* (rễ)**	**Trung Quốc**	**MN215660**	**MN264093**

	USJCC–0140	*Panicum maximum*	SriLanka	OQ275222	OQ269633
C. flexuosa	**CGMCC3.19447 [T]**	***S. officinarum* (rễ)**	**Trung Quốc**	**MN215663**	**MN264096**
	LC13491	*S. officinarum*	Trung Quốc	MN215664	MN264097
C. gladioli	CBS 210.79	Gladiolus (lá)	Romania	HG778987	HG779123
C. geniculata	CBS 187.50	*Andropogon sorghum* (hạt)	Indonesia	KJ909781	KM083609
	USJCC–0021 = HSF004	*Oryza sativa*	SriLanka	MT410573	MZ971269
	USJCC–0063	*Panicum virgatum*	SriLanka	MZ948817	MZ971263
	USJCC–0073	*Saccharum officinarum*	SriLanka	ON514024	ON561894
C. graminícola	**BRIP 23186 [T]**	***Aristida ingrata***	**Australia**	**JN192376**	**JN600964**
C. guangxiensis	**CGMCC3.19330 [T]**	***S. officinarum* (rễ)**	**Trung Quốc**	**MN215667**	**MN264100**
	LC12001	*S. officinarum*	Trung Quốc	MN215672	MN264105
C. gudauskasii	**DAOM 165085**	**Không có dữ liệu**	**N/A**	**AF071338**	**AF081393**
C. harveyi	**BRIP 57412 [T]**	***Triticum aestivum***	**Australia**	**KJ415546**	**KJ415400**
C. hawaiiensis	**BRIP 11987 [T]**	***O. sativa***	**Hoa Kỳ**	**KJ415547**	**KJ415399**
C. heteropogonicola	**BRIP 14579 [T]**	***Heteropogon contortus***	**Ấn Độ**	**KJ415548**	**KJ415398**
C. heteropogonis	**CBS 284.91 [T]**	***H. contortus***	**Australia**	**KJ415549**	**JN600969**
C. hominis	Cu_RgMdu	*Luffa acutangula*	Ấn Độ	MK737953	MK737951
	UTHSC 08.849	Mẫu giác mạc (người)	**Hoa Kỳ**	N/A	HF565483
	UTHSC 09.464 = CBS 136985 [T]	**Mẫu giác mạc (người)**	**Hoa Kỳ**	**HG779011**	**HG779106**
C. homomorpha	**CBS 156.60 [T]**	**Mẫu thu thập từ không khí**	**Hoa Kỳ**	**JN192380**	**JN600970**
C. inaequalis	**CBS 102.42 [T]**	**Mẫu đất**	**Pháp**	**KJ922375**	**KM061787**

C. intermedia	**CBS 334.64**	***Avena versicolor***	**Hoa Kỳ**	**HG778991**	**HG779155**
C. ischaemi	**CBS 630.82 [T] = ICMP 6172**	***Ischaemum indicum***	**Quần đảo Solomon**	**MH861533**	**JX276440**
C. kenpeggii	**BRIP 14530 [T]**	***Triticum aestivum***	**Australia**	**MH414900**	**MH433644**
C. kusanoi	**CBS 137.29**	***Eragrostis major***	**Nhật Bản**	**JN192381**	**LT715862**
C. lamingtonensis	**BRIP 12259 [T]**	***Microlaena stipoides***	**Australia**	**MH414901**	**MH433645**
C. lunata	USJCC–0023	*Panicum virgatum*	SriLanka	MT410575	MZ971271
	CBS 730.96 [T]	**Mẫu sinh thiết phổi (người)**	**USA**	**JX256429**	**JX276441**
	E13	*Zea mays*	Ấn Độ	MH183189	LC524133
C. malina	**CBS 131274 [T]**	***Zoysia matrella***	**USA**	**JF812154**	**KP153179**
C. manamgodae	**CGMCC3.19446 [T]**	***S. officinarum* (rễ)**	**Trung Quốc**	**MN215677**	**MN264110**
	LC13495	*S. officinarum* (rễ)	Trung Quốc	MN215678	MN264111
C. mebaldsii	**BRIP 12900 [T]**	***Cynodon transvaalensis***	**Australia**	**MH414902**	**MH433646**
	BRIP 13983	*Cynodon dactylon x C. transvaalensis*	Australia	MH414903	MH433647
C. micropus	**CBS 127235 [ET]**	***Paspalum notatum***	**Georgia**	**HE792934**	**LT715859**
C. microspora	**GUCC 6272 [T]**	***Hippeastrum striatum***	**Trung Quốc**	**MF139088**	**MF139106**
C. miyakei	**CBS 197.29 [T]**	***Eragrostis pilosa***	**Nhật Bản**	**KJ909770**	**KM083611**
C. mosaddeghii	**IRAN 3131C [T]**	***Syzygium cumini***	**Iran**	**MG846737**	**MH392155**
C. moringae	CPC38873 = CBS146828	*Moringa ovalifolia*	Namibia	MW175363	MW173105
	CBS 146828 [T]	***Moringa ovalifolia***	**Namibia**	**MW175363**	**MW173105**
C. muehlenbeckiae	USJCC–0027	*Sorghum* sp.	SriLanka	MZ948813	MZ971259

	CBS 144.63 T	***Sorghum* sp.**	**USA**	**MH858242**	**HG779108**
C. neergaardii	**BRIP 12919 T**	***O. sativa***	**Ghana**	**KJ415550**	**KJ415397**
	CBS 276.91	Không có dữ liệu	Australia	LT631362	LT715848
C. neoindica	**IMI 129790 T**	***Brassica nigra***	**Ấn Độ**	**MH414910**	**MH433649**
C. nicotiae	**BRIP 11983 T**	**Mẫu đất**	**Algeria**	**KJ415551**	**KJ415396**
C. nodosa	**CPC 28800 T**	***Digitaria ciliaris***	**Thái Lan**	**MF490816**	**MF490838**
	CPC 28801	*Brachiaria reptans*	Thái Lan	MF490817	MF490839
C. nodulosa	**CBS 160.58**	***Eleusine indica***	**N/A**	**JN601033**	**JN600975**
C. oryzae	**CBS 169.53 T**	***O. sativa***	**Việt Nam**	**KP400650**	**KP645344**
C. ovariicola	**CBS 470.90 T =BRIP 15882**	***Eragrostis interrupta***	**Australia**	**JN192384**	**JN600976**
C. pallescens	**CBS 156.35 T**	**Mẫu thu thập từ không khí**	**Indonesia**	**KJ922380**	**KM083606**
C. palmicola	**MFLUCC 14-0404 T**	***Acoelorrhaphe wrightii* (cành khô)**	**Thái Lan**	**MF621582**	**–**
C. pandanicola	**MFLUCC 15-0746 T**	***Pandanus* sp. (mẫu lá chết khô)**	**Thái Lan**	**MH275056**	**MH412748**
C. papendorfii	**CBS 308.67 T**	***Acacia karroo***	**Nam Phi**	**KJ909774**	**KM083617**
C. paraverruculosa	**FMR 17656T**	**Mẫu đất**	**Mexico**	**LR736641**	**LR736646**
C. petersonii	**BRIP 14642 T**	***D. aegyptium***	**Australia**	**MH414905**	**MH433650**
C. perotidis	**CBS 350.90 T =BRIP14642**	***Perotis rara***	**Australia**	**JN192385**	**KJ415394**
C. phaeospara	**CGMCC3.19448 T**	***S. officinarum* (rễ)**	**Trung Quốc**	**MN215686**	**MN264118**
C. pisi	**CBS 190.48 T**	***Pisum sativum***	**Canada**	**KY905678**	**KY905690**
C. plantarum	**CGMCC3.19342 T**	***S. officinarum* (rễ)**	**Trung Quốc**	**MN215688**	**MN264120**

	USJCC–0068	*Echinochloa crus-galli*	SriLanka	OQ275228	OQ269639
	USJCC–0033	*O. sativa*	SriLanka	OQ275226	OQ269637
C. platzii	**BRIP 27703b [T]**	***Cenchrus clandestinum***	**Australia**	**MH414906**	**MH433651**
C. polytrata	**CGMCC3.19338 [T]**	***S. officinarum* (rễ)**	**Trung Quốc**	**MN215691**	**MN264123**
C. portulacae	**BRIP 14541 [T]**	***Portulaca oleracea***	**Hoa Kỳ**	**KJ415553**	**KJ415393**
C. prasadii	**CBS 143.64 [T]**	***Jasminum sambac***	**Ấn Độ**	**KJ922373**	**KM061785**
C. protuberans	**CGMCC3.19360 [T]**	***S. officinarum* (lá)**	**Trung Quốc**	**MN215693**	**MN264125**
C. protuberata	**CBS 376.65 [T]**	***Deschampsia flexuosa***	**Anh**	**KJ922376**	**KM083605**
C. pseudobrachyspora	**CPC 28808 [T]**	***Eleusine indica***	**Thái Lan**	**MF490819**	**MF490841**
C. pseudolunata	**UTHSC 09-2092 [T]**	**Mẫu thu thập từ xoang mũi (người)**	**USA**	**HE861842**	**HF565459**
C. pseudorobusta	**UTHSC 08-3458**	**Mẫu thu thập từ xoang mũi (người)**	**USA**	**HE861838**	**HF565476**
C. quinzhouensis	**CGMCC3.25225**	***Curcuma kwangsiensis***	**Trung Quốc**	**OR575729**	**OR576898**
C. radici-foliigena	**CGMCC3.19328 [T]**	***S. officinarum* (rễ)**	**Trung Quốc**	**MN215695**	**MN264127**
	LC11956	*S. officinarum* (rễ)	Trung Quốc	MN215698	MN264130
C. radicicola	**CGMCC3.19327 [T]**	***S. officinarum* (rễ)**	**Trung Quốc**	**MN215699**	**MN264131**
	LC11953	*S. officinarum* (rễ)	Trung Quốc	MN215700	MN264132
C. ravenelii	**BRIP 13165 [T]**	***Sporobolus fertilis***	**Australia**	**JN192386**	**JN600978**
C. reesii	**BRIP 4358 [T]**	**Mẫu thu thập từ không khí**	**Australia**	**MH414907**	**MH433637**
C. richardiae	**BRIP 4371 [T]**	***Richardia brasiliensis***	**Australia**	**KJ415555**	**KJ415391**
C. robusta	**CBS 624.68 [T]**	***Dichanthium annulatum***	**Hoa Kỳ**	**KJ909783**	**KM083613**
C. rouhanii	**CBS 144674 [T]**	***Syngonium vellozianum***	**Iran**	**KX139030**	**MG428694**

C. ryleyi	**BRIP 12554 [T]**	***Sporobolus creber***	**Australia**	**KJ415556**	**KJ415390**
C. saccharicola	LC12023	*S. officinarum*	Trung Quốc	MN215704	MN264136
	CGMCC3.19344 = LC12019[T]	***S. officinarum* (rễ)**	**Trung Quốc**	**MN215701**	**MN264133**
C. sacchari-officinarum	**CGMCC3.19331 [T]**	***S. officinarum* (lá)**	**Trung Quốc**	**MN215705**	**MN264137**
C. senegalensis	CBS 149.71	Không có dữ liệu	Nigeria	HG779001	HG779128
	LIST 01122022-230-CT4	*Solanum lycopersicum*	**Hoa Kỳ**	OQ657947	OQ689441
	CWj	*Zinnia elegans*	SriLanka	MW353711	MW358932
C. shahidchamranensis	**IRAN 3133C [T]**	**Crude oil-contaminated Mẫu đất**	**Iran**	**MH550084**	**MH550083**
C. soli	**CBS 222.96 [T]**	**Mẫu đất**	**Papua New Guinea**	**KY905679**	**KY905691**
C. sorghina	**BRIP 15900 [T]**	***Sorghum bicolor***	**Australia**	**KJ415558**	**KJ415388**
C. spicifera	CBS 198.31	*Capsicum anuum*	Cyprus	HF934916	HG779136
	CBS 274.52	Mẫu đất	Spain	JN192387	JN600979
C. sporobolicola	**BRIP 23040b [T]**	***Sporobolus australasicus***	**Australia**	**MH414908**	**MH433652**
C. subpapendorfii	**CBS 656.74 [T]**	**Mẫu đất**	**Egypt**	**KJ909777**	**KM061791**
C. suttoniae	**FMR 10992 [T]**	**Mẫu vết thương ở chân (người)**	**USA**	**HE861828**	**HF565479**
	FMR 11690	Mẫu mô ở xoang bướm – cánh mũi (người)	USA	HE861826	HF565477
C. tamilnaduensis	**SZMC 22226 [T]**	**Mẫu giác mạc người**	**Ấn Độ**	**MN628311**	**MN628307**
	SZMC 26758	Mẫu giác mạc người	Ấn Độ	MN628308	MN628304
	SZMC 26759	Mẫu giác mạc người	Ấn Độ	MN628309	MN628305
C. thailandicum	**MFLUCC 15-0747 [T]**	***Pandanus* sp. (mẫu lá đang phân hủy)**	**Thái Lan**	**MH275057**	**MH412749**
C. trifolii	**CBS 173.55**	***Trifolium repens***	**USA**	**HG779023**	**HG779124**

C. tripogonis	**BRIP 12375 T**	***Tripogon loliiformis***	**Australia**	**JN192388**	**JN600980**
C. tropicalis	**BRIP 14834 T**	***Coffea arabica***	**Ấn Độ**	**KJ415559**	**KJ415387**
C. tsudae	**ATCC 44764 T**	***Chloris gayana***	**Nhật Bản**	**KC424596**	**KC747745**
	BRIP 10967	*C. gayana* (lá)	Australia	KC424604	KC747754
C. tuberculata	**CBS 146.63 T**	***Z. may***	**Ấn Độ**	**JX256433**	**JX276445**
C. umbiliciformis	**CGMCC3.19346 T**	***S. officinarum* (rễ)**	**Trung Quốc**	**MN215711**	**MN264142**
C. uncinata	**CBS 221.52 T**	***O. sativa***	**Việt Nam**	**HG779024**	**HG779134**
C. variabilis	**CPC 28815 T**	***Chloris barbata***	**Thái Lan**	**MF490822**	**MF490844**
	CPC 28816	*Imperata cylindrica*	Thái Lan	MF490823	MF490845
C. verruciformis	**CBS 537.75**	***Lobibyx* sp. *feather***	**New Zealand**	**HG779026**	**HG779133**
C. verruculosa	MFLUCC 10-690	*O. sativa*	Thái Lan	JX256437	JX276448
	LC11951	*S. officinarum* (rễ)	Trung Quốc	MN215714	MN264145
	CBS 149.63	*Elaeis guineensis*	Nigeria	HF934909	HG779110
	CBS 150.63T	***Punica granatum* (Lá)**	**Ấn Độ**	**KP400652**	**KP645346**
	CPC 28792	*C. dactylon*	Thái Lan	MF490825	MF490847
	CPC 28809	*E. indica*	Thái Lan	MF490824	MF490846
C. vietnamensis	**FMR 17659 T**	**Lá (của loài không xác định)**	**Việt Nam**	**LR736642**	**LR736644**
	FMR 11956	*Sorghum seed*	Indonesia	LR736652	LR736643
C. vidyodayana	USJCC–0029	*Oryza sativa*	SriLanka	OQ275234	OQ269645
C. warraberensis	**BRIP 14817 T**	***D. aegyptium***	**Australia**	**MH414909**	**MH433653**
C. xishuangbannaensis	**KUMCC 17-0185 T**	***Pandanus amaryllifollus* (lá đang phân hủy)**	**Trung Quốc**	**MH275058**	**MH412750**
***Bipolaris maydis* (OUTGROUP)**	**CBS 136.29 T**	***Zea mays***	**USA**	**AF071325**	**KM034846**
***B. saccharicola* (OUTGROUP)**	**CBS 155.26 T**	**Không có dữ liệu**	**N/A**	**KY905674**	**KY905686**

Bảng phụ lục 2.7. Các phân lập tham chiếu sử dụng trong phân tích phát sinh loài của chi *Exserohilum*

Loài	Chủng phân lập	Ký chủ	Nguồn gốc phân lập	Mã số truy cập Genbank	
				ITS	***GAPDH***
Exserohilum corniculatum	**BRIP 11426T**	***Oryza sativa***	**Australia**	**LT837453**	**LT883533**
E. holmii	CBS 318.64	*Dactyloctenium aegyptium*		LT837457	LT883537
	CBS 413.65^{IsoT}	***Dactyloctenium aegyptium***	**Hoa Kỳ**	**LT837459**	**LT715890**
	CBS 505.90	*Sorghum vulgare*	Venezuela	KT265252	LT715889
	CBS 128053 = BRIP 12792	*Dactyloctenium aegyptium*	Thái Lan	KT265253	LT882555
E. khartoumensis	**IMI 249194^{IsoT} = CBS132708**	***Sorghum bicolor* var. *mayo***	**Sudan**	**LT837461**	**LT715888**
E. minor	BRIP 14612	Ascocarps formed by BRIP 13597	Australia	LT837467	LT715884
	BRIP 14614	*Dactyloctenium aegyptium*	Australia	LT837468	LT715885
	BRIP 14616^{T}	***Dactyloctenium aegyptium***	**Australia**	**LT837470**	**LT883545**
E. monoceras	**BRIP 11542**			**LT837473**	**LT883546**
	BRIP 12236	***Echinochloa colona***	**Australia**	**LT837472**	**LT715876**
	BRIP 12271A	***Echinochloa colona***	**Australia**	**LT837475**	**LT883548**
E. neoregeliae	**CBS 132832^{T}**	***Neoregelia carolinae***	**Nhật Bản**	**LT837476**	**LT715886**
E. neoregeliae	CBS 132833^{IsoT}	*Neoregelia carolinae*	Nhật Bản	LT837477	LT715887
E. oryzicola	**CBS 502.90^{IsoT}**	***Oryza sativa***	**Colombia**	**HF934949**	**LT715878**
	CBS 376.76	*Oryza sativa*	Thổ Nhĩ Kỳ	LT837456	LT883535
E. pedicellatum	**CBS 322.64^{ET}**	***Triticum aestivum***	**USA**	**KT265258**	**LT715902**
	BRIP 12040	*Oryza sativa*	Australia	LT837452	LT883532
E. persianum	IRAN 3503C	*Festuca* sp.	Iran	OQ119789	OQ123392
	FCCUU 1201	*Festuca sp.*	Iran	OQ119790	OQ123393

E. protrudens	**BRIP 14816^{T}**	***Dactyloctenium aegyptium***	**Australia**	**LT631309**	**LT715881**
E. rostratum	BRIP 10995	*Zea mays*	Australia	LT837823	LT882566
E. rostratum	BRIP 14916	*Zea mays*	Australia	LT837835	LT882552
E. rostratum	BRIP 16078	*Spinifex hirsutus*	Australia	LT837826	LT882563
E. rostratum (syn. *E. leptochloae*)	CBS 196.29	*Leptochloa chinensis*	Nhật Bản	LT837462	LT715896
E. rostratum	**CBS 297.80**	***Sorghum bicolor***	**Sudan**	**KT265244**	**LT715895**
E. rostratum (sync *E. macginnisii*)	CBS 325.87	*Homo sapiens*	**Hoa Kỳ**	KT265237	LT715898
E. rostratum (sync. E. antillanum	CBS 412.93	Plant debris from forest soil	Cuba	KT265246	LT715894
E. rostratum (sync. *E. prolatum*)	CBS 571.73	*Zea mays*	USA	LT837831	LT715892
E. turcicum	BRIP 12267	*Sorghum bicolor*	Australia	LT837482	LT883553
	BRIP 13326	*Sorghum sudanense*	Australia	LT837480	LT883551
	CBS 690.71^{ET}	***Zea mays***	**Đức**	**LT837487**	**LT882581**
Bipolaris maydis	**CBS 13629**	***Zea mays***	**Hoa Kỳ**	**MH855024**	**LT715779**
B. oryzae	**MFLUCC 10-0715^{T}**	***Oryza sativa***	**Thái Lan**	**JX256416**	**JX276430**

Bảng phụ lục 2.8. Các phân lập tham chiếu sử dụng trong phân tích phát sinh loài đa locus của chi ***Neopestalotiopsis***

Loài	Chủng phân lập	Ký chủ	Nguồn gốc phân lập	Mã số truy cập Genbank		
				ITS	*TUB2*	*TEF*
Neopestalotiopsis acrostichi	**MFLUCC 17-1754 ***	***Acrostichum aureum***	**Thái Lan**	**MK764272**	**MK764338**	**MK764316**
N. alpapicalis	**MFLUCC 17-2544 ***	***Rhizophora mucronata***	**Thái Lan**	**MK357772**	**MK463545**	**MK463547**
N. aotearoa	**CBS 367.54 ***	***Canvas***	**New Zealand**	**KM199369**	**KM199454**	**KM199526**
N. asiatica	**MFLUCC 12-0286 ***	***Prunus dulcis***	**Trung Quốc**	**JX398983**	**JX399018**	**JX399049**
N. australis	**CBS 114159 ***	***Telopea sp.***	**Australia**	**KM199348**	**KM199432**	**KM199537**
N. brasiliensis	**COAD 2166 ***	***Psidium guajava***	**Brazil**	**MG686469**	**MG692400**	**MG692402**
N. camelliae-oleiferae	**CSUFTCC81 ***	***Camellia oleifera***	**Trung Quốc**	**OK493585**	**OK562360**	**OK507955**
N. camelliae-oleiferae	CSUFTCC82 = LHNJ82	*Camellia oleifera*	Trung Quốc	OK493586	OK562361	OK507956
N. chiangmaiensis	**MFLUCC 18-0113 ***	***Pandanus sp.***	**Thái Lan**	N/A	**MH412725**	**MH388404**
N. cocoës	**MFLUCC 15-0152 ***	***Cocos nucifera***	**Thái Lan**	N/A	**N/A**	**KX789689**
N. coffeae-arabicae	HGUP4015	*Coffea arabica*	Trung Quốc	KF412647	KF412641	KF412644
N. coffeae-arabicae	**HGUP4019 ***	***Coffea arabica***	**Trung Quốc**	**KF412649**	**KF412643**	**KF412646**
N. cubana	**CBS 600.96 ***	**Leaf litter**	**Cuba**	**KM199347**	**KM199438**	**KM199521**
N. cubana	CSUFTCC37	*Camellia oleifera*	Trung Quốc	OK493583	OK562358	OK507953
N. dendrobii	**MFLUCC 14-0106 ***	***Dendrobium cariniferum***	**Thái Lan**	**MK993571**	**MK975835**	**MK975829**
N. dendrobii	MFLUCC 14-0099	*D. cariniferum*	Thái Lan	MK993570	MK975834	MK975828
N. drenthii	BRIP 72263a	*Macadamia integrifolia*	Australia	MZ303786	MZ312679	MZ344171
N. drenthii	**BRIP 72264a ***	***Macadamia integrifolia***	**Australia**	MZ303787	**MZ312680**	**MZ344172**
N. egyptiaca	CBS 1401628 = PEST1	*Mangifera indica*	Egypt	KP943747	KP943746	KP943748
N. elaeidis	MFLUCC 15-0801	Cây cọ	Thái Lan	ON650690	N/A	ON734011
N. ellipsospora	CBS 115113; HKUCC 9136	*Ardisia crenata*	Hồng Kông	KM199343	KM199450	KM199544
N. eucalyptorum	**CBS 147684 * = MEAN1308**	***Eucalyptus globulus***	**Bồ Đào Nha**	MW794108	**MW802841**	**MW805397**

N. eucalypticola	**CBS 264.37 ***	***Eucalyptus globulus***	**N/A**	KM199376	**KM199431**	**KM199551**
N. foedans	**CGMCC 3.9123 ***	**Mangrove plant**	**Trung Quốc**	JX398987	**JX399022**	**JX399053**
N. formicarum	**CBS 362.72 ***	**Dead ant**	**Cuba**	KM199358	**KM199455**	**KM199517**
N. formicarum	CBS 115.83	Mẫu thực vật phân mảnh	Cuba	KM199344	KM199444	KM199519
N. guajavae	**FMBCC 11.1 ***	***Guava***	**Pakistan**	MF783085	**MH460871**	**MH460868**
N. hydeana	**MFLUCC 20-0132 ***	***Artocarpus heterophyllus***	**Thái Lan**	MW266069	**MW251119**	**MW251129**
N. iberica	CSUFTCC93	*Camellia oleifera*	Trung Quốc	OK493589	OK562364	OK507959
N. iberica	**CBS 147688 ***	***Eucalyptus globulus***	**Bồ Đào Nha**	MW794111	**MW802844**	**MW805402**
N. iraniensis	**CBS 137768 ***	***Fragaria ananassa***	**Iran**	KM074048	**KM074057**	**KM074051**
N. iraniensis	CBS 137767	*Fragaria ananassa*	Iran	KM074045	KM074056	KM074053
N. javaensis	**CBS 257.31 ***	***Cocos nucifera***	**Indonesia**	KM199357	**KM199437**	**KM199543.1**
N. keteleerie	**MFLUCC 13-0915 ***	***Keteleeria pubescens***	**Trung Quốc**	KJ503820	**KJ503821**	**KJ503822**
N. lusitanica	**MEAN1317 = PE256**			MW794110	**MW802843**	**MW805406**
N. longiappendiculata	**CBS 147690 ***	***Eucalyptus globulus***	**Bồ Đào Nha**	MW794110	**MW802845**	**MW805404**
N. macadamiae	**BRIP 63737c ***	***Macadamia integrifolia***	**Australia**	KX186604	**KX186654**	**KX186627**
N. magna	**MFLUCC 12-0652 * = ICMP 20011**	***Pteridium* sp.**	**Pháp**	KF582795	**KF582793**	**KF582791**
N. mesopotamica	**CBS 336.86 ***	***Pinus brutia***	**Iraq**	KM199362	**KM199441**	**KM199555**
N. musae	**MFLUCC 15-0776 ***	***Musa* sp.**	**Thái Lan**	KX789683	**KX789686**	**KX789685**
N. natalensis	**CBS 138.41 ***	***Acacia mollissima***	**Nam Phi**	KM199377	**KM199466**	**KM199552**
N. nebuloides	**BRIP 66617 ***	***Sporobolus elongatus***	**Australia**	MK966338	**MK977632**	**MK977633**
N. olumideae	**BRIP 72273a ***	***Macadamia integrifolia***	**Australia**	MZ303790	**MZ312683**	**MZ344175**
N. pandanicola	KUMCC 17-0175	*Pandanus* sp.	Trung Quốc	NA	MH412720	MH388389
N. pernambucana	**URM7148-01 ***	***Vismia guianensis***	**Brazil**	KJ792466	**NA**	**KU306739**
N. perukae	**FMBCC 11.3 ***	***Guava***	**Pakistan**	MH209077	**MH460876**	**MH523647**
N. petila	**MFLUCC 17-1737 ***	***Rhizophora mucronata***	**Thái Lan**	MK764276	**MK764342**	**MK764320**
N. phangngaensis	**MFLUCC 18-0119 ***	***Pandanus sp.***	**Thái Lan**	MH388354	**MH412721**	**MH388390**
N. photiniae	**GUCC21-0820**			OP806524	**OP896200**	**OP828691**
N. piceana	CBS 254.32	*Cocos nucifera*	Indonesia	KM199372	KM199452	KM199529

N. piceana	**CBS 394.48 ***	***Picea sp.***	**Anh**	KM199368	**KM199453**	**KM199527**
N. protearum	**CBS 114178 ***	***Leucospermum cuneiforme* cv. *"Sunbird"***	**Zimbabwe**	JN712498	**KM199463**	**LT853201**
N. psidii	**FMBCC 11.2 ***	**Guava**	**Pakistan**	MF783082	**MH477870**	**MH460874**
N. rhapidis	**GUCC 21501 ***	***Rhododendron simsii***	**Trung Quốc**	MW931620	**MW980441**	**MW980442**
N. rhizophorae	**MFLUCC 17-1550 ***	***Rhizophora mucronata***	**Thái Lan**	MK764277	**MK764343**	**MK764321**
N. rhododendri	**GUCC 21504 ***	***Rhododendron simsii***	**Trung Quốc**	MW979577	**MW980443**	**MW980444**
N. rosae	**CBS 101057 ***	***Rosa* sp.**	**New Zealand**	KM199359	**KM199429**	**KM199523**
N. rosae	CBS 124745	*Paeonia suffruticosa*	USA	KM199360	KM199430	KM199524
N. rosicola	**CFCC 51992 ***	***Rosa chinensis***	**Trung Quốc**	KY885239	**KY885245**	**KY885243**
N. rosicola	CFCC 51993	*Rosa chinensis*	Trung Quốc	KY885240	KY885246	KY885244
N. saprophytica	**CBS 115452**	***Magnolia* sp.**	**Trung Quốc**	JX398982	KM199433	**JX399048**
N. scalabiensis	**MUM 21.34 ***	***Vaccinium corymbosum***	**Bồ Đào Nha**	MW969748	**MW934611**	**MW959100**
N. sichuanensis	**CFCC 54338 ***	***Castanea mollissima***	**Trung Quốc**	MW166231	**MW218524**	**MW199750**
N. sichuanensis	SM15-1C	*Castanea mollissima*	Trung Quốc	MW166232	MW218525	MW199751
N. sonneratae	**MFLUCC 17-1745 ***	***Sonneronata alba***	**Thái Lan**	MK764279	**MK764345**	**MK764323**
N. surinamensis	**CBS 450.74 ***	**Soil under *Elaeis guineensis***	**Suriname**	KM199351	**KM199465**	**KM199518**
N. suphanburiensis	**MFLUCC22-0216**			OP497994	**OP752135**	**OP753372**
N. thailandica	**MFLUCC 17-1730 ***	***Rhizophora mucronata***	**Thái Lan**	MK764281	**MK764347**	**MK764325**
N. vaccinii	**MUM 21.36 * = CAA1059**	***V. corymbosum***	**Bồ Đào Nha**	MW969747	**MW934610**	**MW959099**
N. vacciniicola	**MUM 21.35 ***	***V. corymbosum***	**Bồ Đào Nha**	MW969751	**MW934614**	**MW959103**
N. vitis	**MFLUCC 15-1265 ***	***Vitis vinifera* cv. *"Summer black"***	**Trung Quốc**	KU140694	**KU140685**	**KU140676**
N. vitis	MFLUCC 15-1270	*V. vinifera* cv. *"Kyoho"*	Trung Quốc	KU140699	KU140690	KU140681
N. zakeelii	**BRIP 72282a ***	***Macadamia integrifolia***	**Australia**	MZ303789	**MZ312682**	**MZ344174**
N. zimbabwana	**CBS 111495 * =STE-U1777**	***L. cunciforme***	**Zimbabwe**	JX556231	**KM199456**	**KM199545**
***Pseudopestalotiopsis cocos* (OUTGROUP)**	**CBS 272.29***	***Cocos nucifera***	**Indonesia (đảo Java)**	KM199378	**KM199467**	**KM199553**
***Pestalotiopsis abietis* (OUTGROUP)**	**CFCC 53011 ***	***Abies fargesii***	**Trung Quốc**	MK397013	**MK622280**	**MK622277**

Bảng phụ lục 2.9. Các phân lập tham chiếu sử dụng trong phân tích phát sinh loài đa locus của chi ***Diaporthe*** ***(theo từng phân chi và phức hợp)***

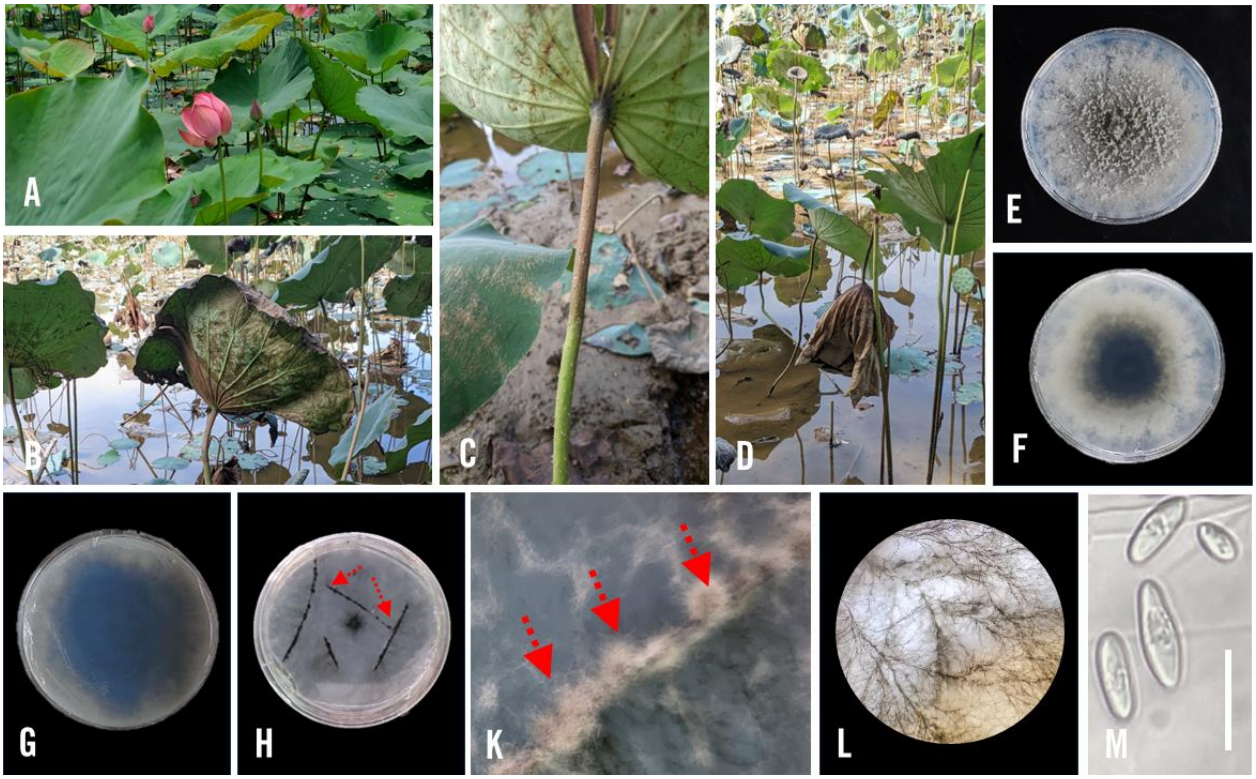
Loài	Chủng phân lập tham chiếu	Mã số truy cập Genbank		
		ITS	***TEF***	***TUB2***
Phân nhánh Foeniculina (Clade Arecae)				
Diaporthe acutispora	**CGMCC3.18285 = LC6161***	**KX986764**	**KX999155**	**KX999195**
D. anacardii	**CBS 720.97***	**KC343024**	**KC343750**	**KC343992**
D. anacardii (*D. phillipsii*)	CAA817	MK792305	MK828076	MN000351
D. arecae	**CBS 161.64***	**KC343032**	**KC343758**	**KC344000**
D. arecae	CBS 535.75	KC343033	KC343759	KC344001
***D. arecae* (*D. eugeniae*)**	**CBS 444.82***	**KC343098**	**KC343824**	**KC344066**
D. arecae (*D. fraxini-angustifoliae*)	BRIP 54781	JX862528	JX862534	KF170920
D. arecae (*D. fulvicolor*)	**PSCG051***	**MK626859**	**MK654806**	**MK691236**
D. arecae (*D. guangxiensis*)	**JZB320094***	**MK335772**	**MK523566**	**MK500168**
D. arecae (*D. krabiensis*)	**MFLUCC 17-2481***	**MN047101**	**MN433215**	**MN431495**
D. arecae (*D. limonicola*)	**CBS 142549***	MF418422	MF418501	MF418582
D. arecae (*D. nelumbonis*)	**R Kirschner 4114***	**KT821501**	**N/A**	**LC086652**
D. arecae (*D. nelumbonis*)	A-SER3	MK907914	N/A	N/A
D. arecae (*D. taiwanensis*)	**NTUCC 18-105-1***	**MT241257**	**MT251199**	**MT251202**
D. aseana	**MFLUCC 12-0299a***	**KT459414**	**KT459448**	**KT459432**
D. aseana (*D. tectonigena*)	MFLUCC 12-0767 = LC6512	KX986782	KX999174	KX999214
D. biconispora	**ZJUD62***	**KJ490597**	**KJ490476**	**KJ490418**
D. biconispora (*D. longiconidialis*)	ZHKUCC 22-0058	ON322888	ON315045	ON315077
D. biconispora (*D. pometiae*)	SAUCC 194.72	MT822600	MT855912	MT855797
D. camelliae-sinensis	**SAUCC194.92***	**MT822620**	**MT855932**	**MT855817**

D. donglingensis	**CFCC 56581***	**OM956090**	**ON157986**	**ON158021**
D. donglingensis	CFCC 57432	OM956091	ON157987	ON158022
D. foeniculina	**CBS 111553***	**KC343101**	**KC343827**	**KC344069**
D. foeniculina	CBS 123208	KC343104	KC343830	KC344072
D. hongkongensis	**CBS 115448***	**KC343119**	**KC343845**	**KC344087**
D. hongkongensis	ZJUD74	KJ490609	KJ490488	KJ490430
D. hongkongensis (*D. araliaechinensis*)	GUCC 412.7	OP581218	OP688523	OP688548
D. hongkongensis (*D. araliaechinensis*)	GUCC 412.71	OP581219	OP688524	OP688549
D. hongkongensis (*D. araliaechinensis*)	GUCC 412.17	OP581220	OP688525	OP688550
D. hongkongensis (*D. australiana*)	BRIP 66145	MN708222	MN696522	MN696530
D. hongkongensis (*D. eucalyptorum*)	CBS 132525	JX069862	N/A	N/A
D. hongkongensis (*D. eucommiae*)	SCHM 0020	AY601921	N/A	N/A
D. hongkongensis (*D. lagerstroemiae*)	SCHM 3608	AY622994	N/A	N/A
D. hongkongensis (*D. lithocarpus*)	CGMCC3.15175	KC153104	KC153095	KF576311
D. hongkongensis (*D. lithocarpus*)	CGMCC3.15178	KC153103	KC153094	N/A
D. hongkongensis (*D. rhodomyrti*)	CFCC 53101	MK432643	MK578119	MK578046
D. hongkongensis (*D. rhodomyrti*)	CFCC 53102	MK432644	MK578120	MK578047
D. hongkongensis (*D. salinicola*)	MFLUCC 18-0553	MN047098	MN077073	N/A
D. hongkongensis (*D. salinicola*)	MFLU 17-2592	MN047099	MN077074	N/A
D. hsinchuensis	**NTUPPMCC18-153-1***	**MZ268409**	**MZ268472**	**MZ268430**
D. hsinchuensis	NTUPPMCC 18-153-2	MZ268410	MZ268473	MZ268431
D. tanakae	MAFF 410127	AB245075	N/A	N/A
D. tanakae	MAFF 410600	AB245077	N/A	N/A
D. undulata	**CGMCC3.18293 = LC6624***	**KX986798**	**KX999190**	**KX999230**
D. undulata	LC8111	KY491546	**KY491546**	**KY491556**
D. pungensis	**SAUCC194.112***	**MT822640**	**MT855952**	**MT855837**

D. pungensis	SAUCC 194.89	MT822617	MT855929	MT855814
D. saccharata	**CBS 116311***	**KC343190**	**KC343916**	**KC344158**
D. melatosmatis	**SAUCC194.55***	**MT822583**	**MT855896**	**MT855780**
D. zhaoqingensis	**ZHKUCC 22-0056***	**ON322885**	**N/A**	**ON315074**
D. zhaoqingensis	ZHKUCC 22-0057	ON322886	ON315043	ON315075
D. xishuangbanica	**CGMCC3.18283 = LC6744***	**KX986784**	**KX999176**	**KX999217**
D. xishuangbanica	CGMCC3.18282 = LC6707	KX986783	KX999175	KX999216
D. corylicola	**CFCC 53986***	**MW839880**	**MW815894**	**MW883977**
D. eucalyptorum	MFLUCC 12-0306	KT459419	KT459453	KT459437

PHỤ LỤC 3 – MỘT SỐ THÔNG TIN BỔ SUNG VỀ ĐẶC ĐIỂM HÌNH THÁI, CÁC PHÂN TÍCH PHÁT SINH LOÀI, RANH GIỚI LOÀI

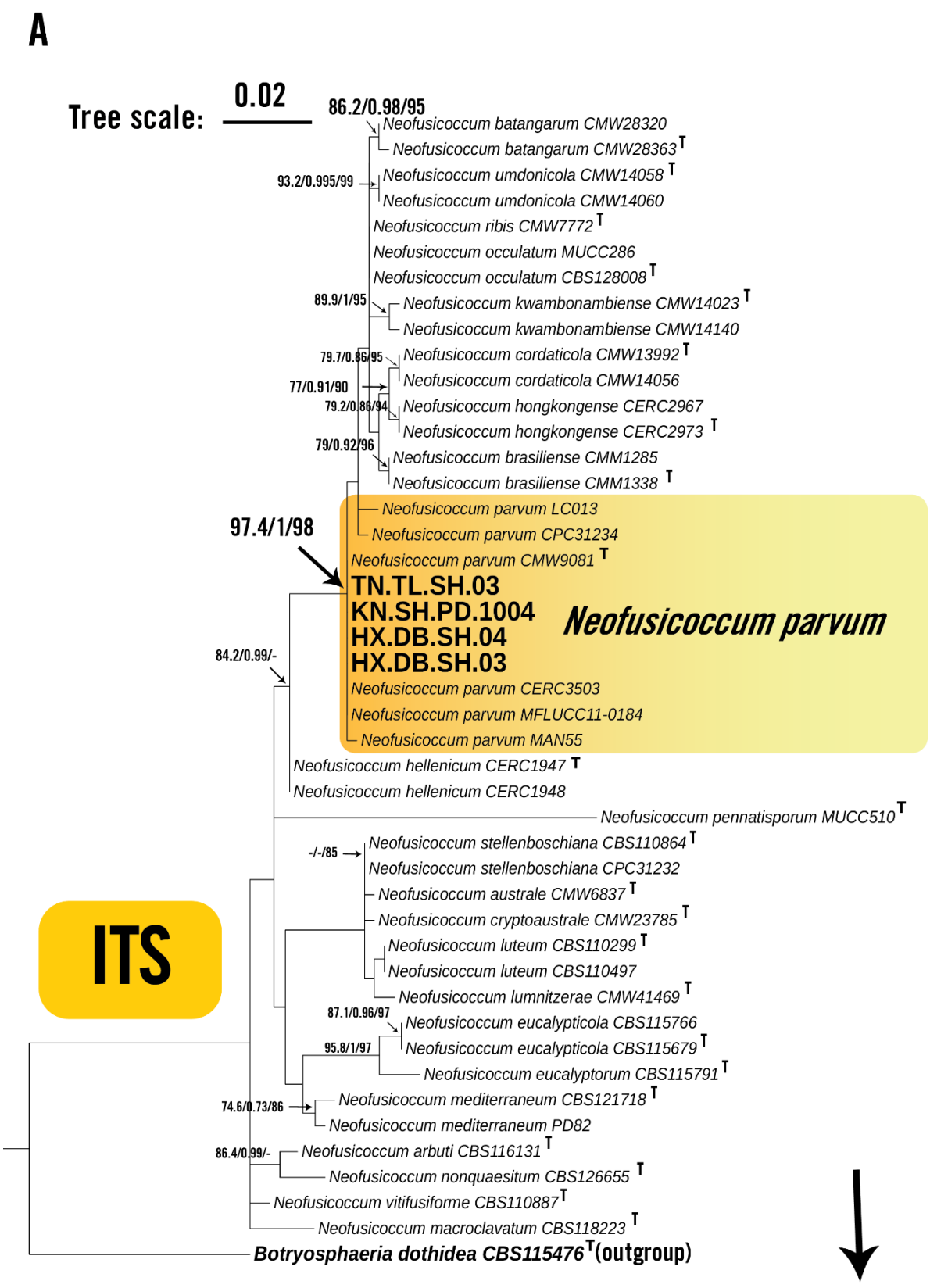
Chi *Neofusicoccum*

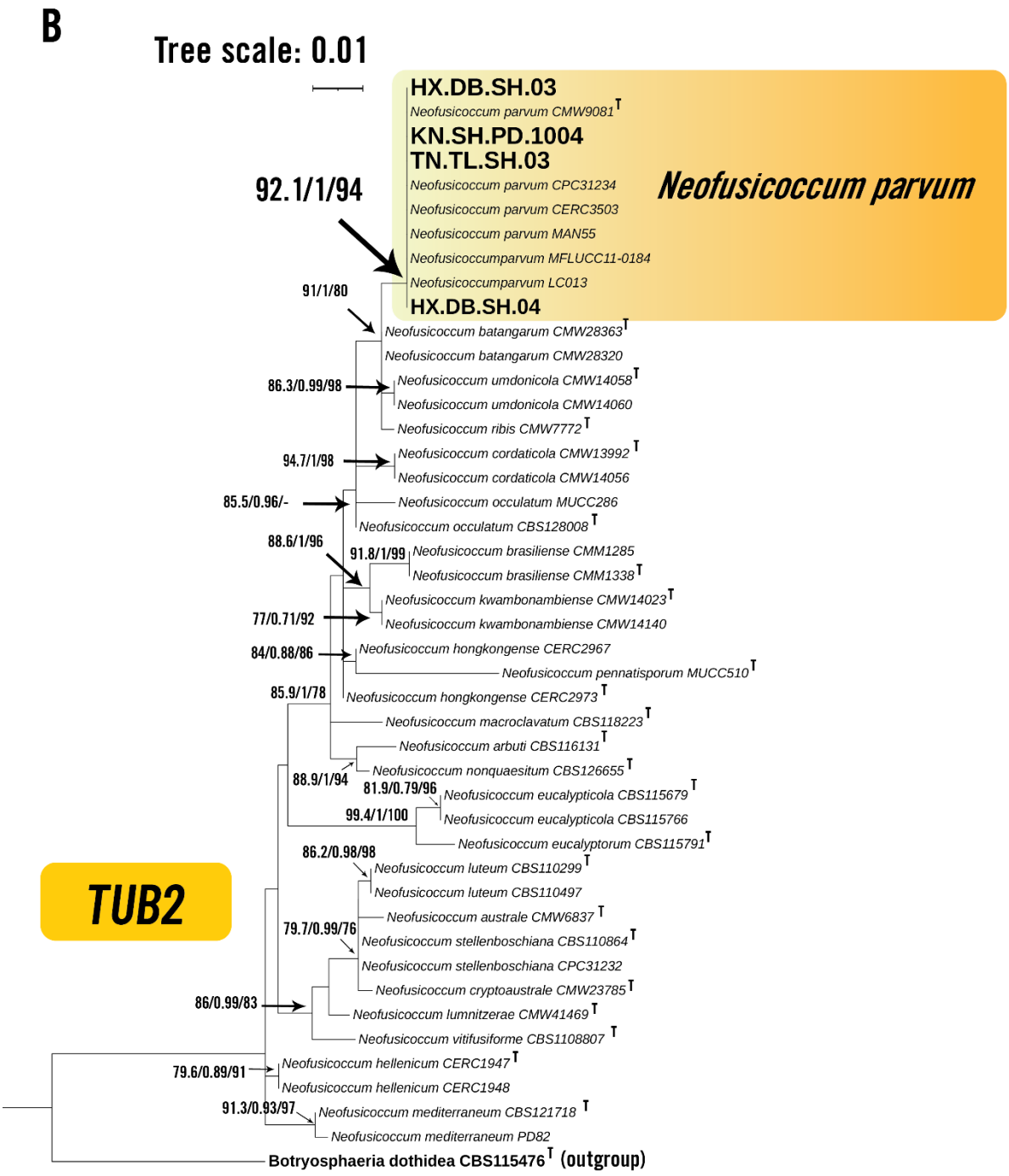


Phụ lục Hình 3.1. Đặc điểm hình thái *Neofusicoccum parvum* và triệu chứng bệnh do tác nhân này gây ra. A. Cây sen khỏe không có triệu chứng bệnh. B-D: Triệu chứng bệnh do *Neofusicoccum parvum* gây ra trên cây sen. E-G: Đặc điểm hình thái tản nấm ở mặt trước (Hình E) và sau (Hình F) của *N. parvum* (chủng phân lập VNHUCC.NEL18) sau 7 ngày và sau 15 ngày (Hình G). H, K: Đặc điểm sinh bào tử thử nghiệm trên môi trường WA + mảnh cắt lá thông khử trùng. L: Hình thái hệ sợi nấm của *N. parvum* dưới kính hiển vi – độ phóng đại 10X. M: Hình thái bào tử *N. parvum*

Đặc điểm hình thái tản nấm (nuôi cấy) và bào tử của *Neofusicoccum parvum*: Trên môi trường PDA, đặc trưng với sợi nấm khí sinh phát triển mạnh ở vùng trung tâm, màu trắng ở giai đoạn ban đầu và chuyển sang màu xám đen (Davy's Grey, Color code: ##5B5F5F) theo thời gian (sau 4-5 ngày nuôi cấy). Mặt ngược (reverse side) màu xanh than đến đen ở trung tâm, phần trắng xám ở phần phía ngoài đến rìa. Tuy nhiên, phần trắng xám theo thời gian chuyển dần sang màu xanh than đen (Color code: #2A3646, #222F3E) đến đen (sau 14 – 15 ngày nuôi cấy). Cấu trúc thể quả (pycnidia) được ghi nhận sau 20 ngày khi nuôi

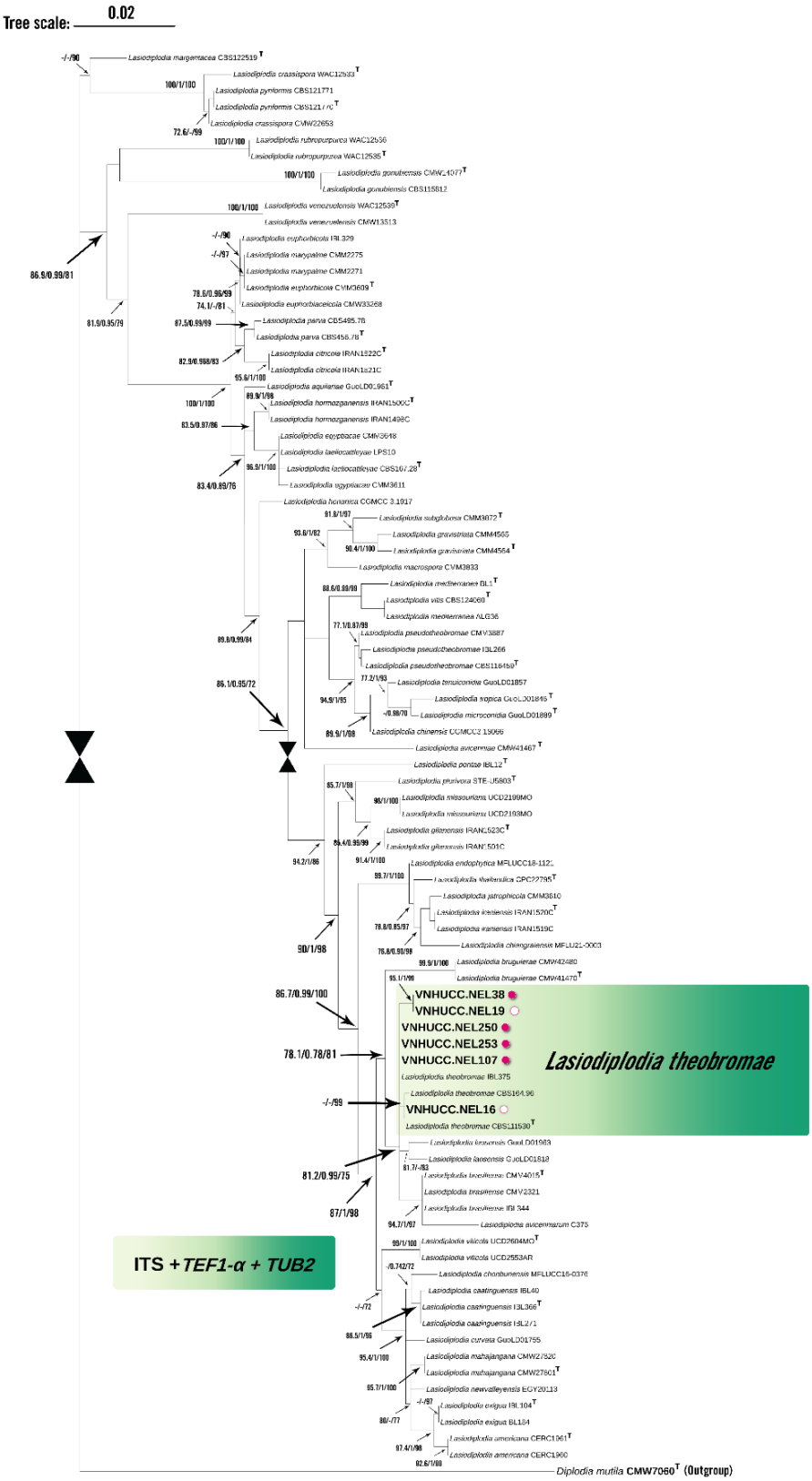
cấy trên môi trường thạch nước (WA) 2% có bổ sung lá thông hấp khử trùng. Bào tử có dạng hình thoi hay elip thuôn dài, hơi nhọn ở 2 đầu, thành mỏng.



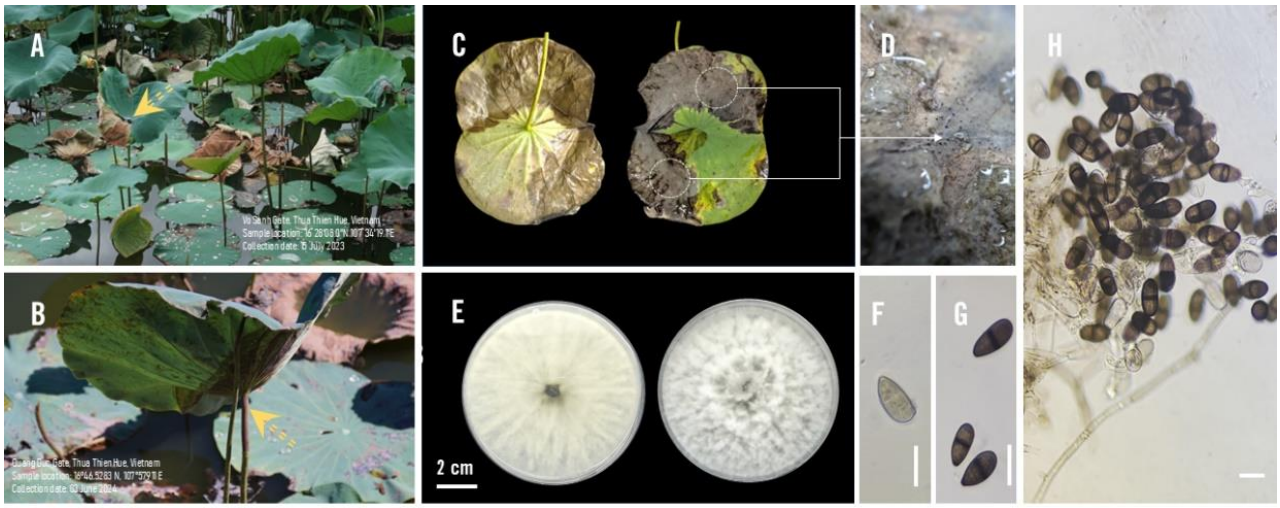


Phụ lục Hình 3.2. Cây phát sinh loài Maximum likelihood (ML) các chủng phân lập *Neofuscoccum parvum* được xây dựng từ tệp dữ liệu trình tự căn chỉnh của từng vùng gene: A. ITS, B. *TUB2*. Các chủng loại TYPE (Ex-TYPE) được biểu thị bằng chữ "**T**" in đậm ở cuối mỗi nhãn phân loại. Thanh tỷ lệ biểu thị số lượng thay thế ước tính trên mỗi vị trí nucleotide

Chi *Lasiodiplodia*



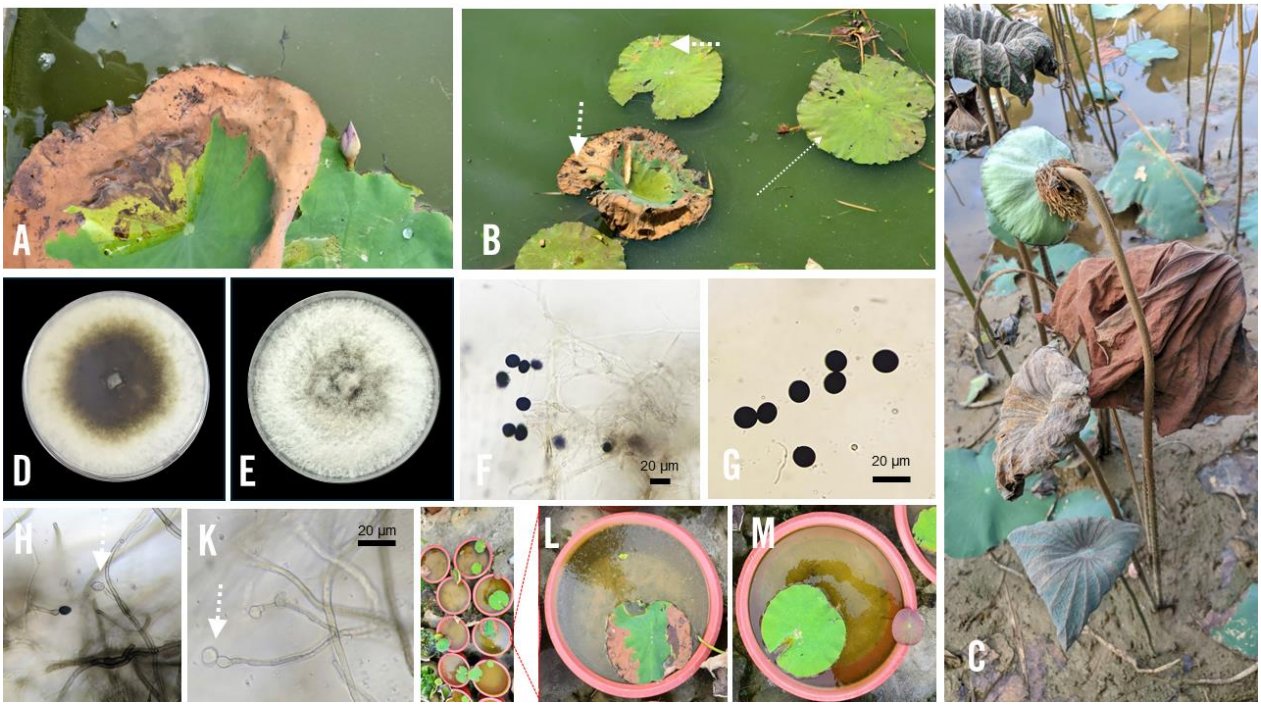
Phụ lục Hình 3.3. Cây phát sinh loài Maximum likelihood (ML) của chi *Lasiodiplodia* được xây dựng từ tệp dữ liệu trình tự căn chỉnh ghép nối của 3 locus ITS + *TUB2* + *TEF1-α*. Các giá trị hỗ trợ SH-aLRT > 70%/aBayes > 0,75/ML bootstrap (%) > 70% được hiển thị tại mỗi nút. *Diplodia mutila* CMW7060 được sử dụng làm nhóm ngoài (outgroup). Các chủng loại Ex (TYPE) được biểu thị bằng chữ "**T**" in đậm ở cuối mỗi nhãn phân loại. Thanh tỷ lệ biểu thị số lượng thay thế ước tính trên mỗi vị trí nucleotide.



Phụ lục Hình 3.4. Đặc điểm hình thái *Lasiodiplodia theobromae* và triệu chứng bệnh ghi nhận. A-C: Triệu chứng bệnh do *L. theobromae* gây ra trên cây sen. D: Các khối bào tử màu đen có thể quan sát trên vết bệnh E: Đặc điểm hình thái tản nấm của *L. theobromae* (chủng phân lập VNHUCC.NEL38) sau 3 ngày cấy. F: Bào tử chưa trưởng thành; G-H: Bào tử trưởng thành.

Chi *Nigrospora*

Thông tin mẫu đại diện (VNHUCC.NEL30): Trong chậu sen tại một vườn bán cây cảnh – khu vực cửa Thượng Tứ, phường Đông Ba, Thành phố Huế, Việt Nam. Phân lập từ lá **sen hồng** (*Nelumbo nucifera*) có triệu chứng cháy lá (có các khối bào tử màu đen trên bề mặt lá có triệu chứng). Ngày ghi nhận triệu chứng và thu thập mẫu: 01 tháng 05 năm 2023. Tọa độ: 16°28'15.13" N, 107°34'59.70" E. Holotype: KN.TT.SH.020501D1-2. Ex-Holotype (mẫu nuôi cấy sống): VNHUCC.NEL30



Phụ lục Hình 3.5. Triệu chứng cháy lá cây sen và đặc điểm hình thái của tác nhân gây hại *Nigrospora*. A. Triệu chứng cháy lá ghi nhận trên cây sen hồng ở Thượng Tứ, Đông Ba, Thành phố Huế. B. Triệu chứng cháy lá ghi nhận trên cây sen trắng ở hồ Tịnh Tâm (phía đảo Phương Trượng), Đông Ba, Thành phố Huế. D, E: Hình thái tản nấm của phân lập đại diện VNHUCC.NEL30 trên môi trường PDA. F, G: Bào tử trưởng thành. H: Bào tử chưa trưởng thành; L, M: Thử nghiệm lây nhiễm nhân tạo trên chậu.

Đặc điểm hình thái tản nấm (nuôi cấy) và bào tử của *Nigrospora lacticolonia*

Đặc điểm nuôi cấy: Tản nấm trên PDA có dạng bông, viền mép nguyên, ban đầu có màu trắng, chuyển sang màu xám ngà (Mã màu/color code: **#D8DAC8, Timberwolf)** đến xám nâu hay nâu (#9C9B84, Grullo) theo tuổi (ban đầu ở tâm và lan rộng dần). Tương tự, mặt ngược (reverse side) ban đầu có màu trắng, sau đó chuyển màu nâu nhạt (Color code: #A3986E, Light Taupe), đến xám khói hoặc nâu đất đậm (Mã màu/Color code: #5C534A, Umber) theo thời gian. Tản nấm đạt đường kính 85 mm sau 7 ngày

Đặc điểm bào tử: Các sợi nấm phân nhánh và có vách ngăn. Bào tử đơn bào, có dạng hình cầu hoặc gần hình cầu. Các bào tử chưa trưởng thành có dạng trong suốt, sau đó chuyển dần sang màu đen đậm khi trưởng thành.

Các địa điểm ghi nhận triệu chứng và các thông tin chủng phân lập khác trong nghiên cứu:

+ Khu vực trồng **sen trắng** ở hồ Tịnh Tâm (phía đảo Phương Trượng, và đảo Bồng Lai), phường Đông Ba, Thành phố Huế. Ngày ghi nhận: 23 tháng 04 năm 2023

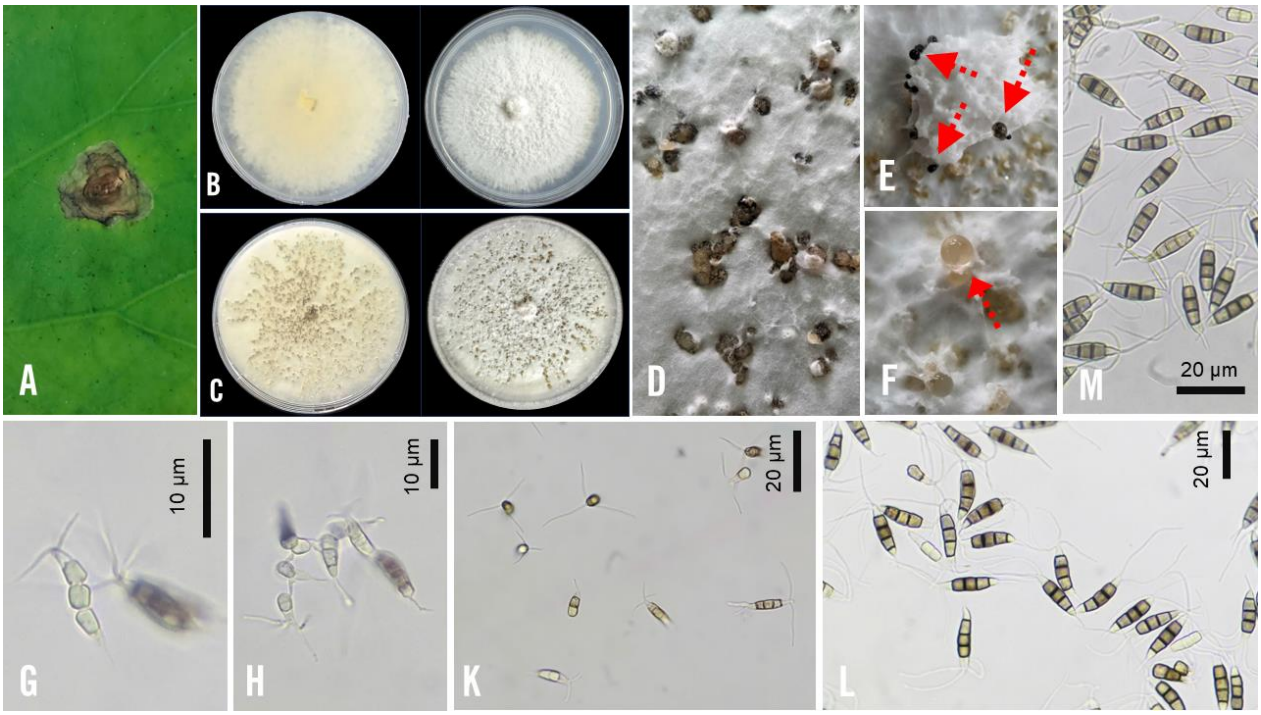
+ Chậu trồng sen cảnh (**sen trắng**) của một hộ dân kinh doanh sen hạt tại phường Đông Ba, Thành phố Huế (chủng phân lập VNHUCC.NEL431)

+ Hồ trồng sen (hồ này trồng lẫn sen hồng và sen trắng) trước mặt lăng vua Đồng Khánh (Tư Lăng), đường Đoàn Nhữ Hải phường Thủy Xuân, Thành phố Huế (VNHUCC.NEL233, mẫu ghi nhận triệu chứng thu thập trên cây sen trắng). Ngày thu thập: 03 tháng 10 năm 2022

+ Ruộng trồng sen trắng**,** tại xã Phong Hiền, Phong Điền (giống sen được mua từ một hộ dân trồng sen ở hồ Tịnh Tâm). Ngày ghi nhận: 30 tháng 03 năm 2021

Chi *Neopestalotiopsis*

Thông tin mẫu đại diện: Hệ thống khu vực hồ/thủy đạo trồng sen trước mặt Đông Khuyết Đài, Cửa Hiển Nhơn, Thành phố Huế, Việt Nam. Phân lập từ lá sen hồng (*Nelumbo nucifera*) có triệu chứng đốm lá (đặc trưng màu nâu nhạt ở tâm, có các lớp đồng tâm xếp chồng lên nhau). Ngày ghi nhận triệu chứng và thu thập mẫu: 05 tháng 03 năm 2023. Tọa độ: 16°28'17.58" N, 107°34' 48.85" E ± 12.44m. **Holotype**: DNDT.DB.SH.04. **Ex-Holotype** (mẫu nuôi cấy sống): VNHUCC.NEL13



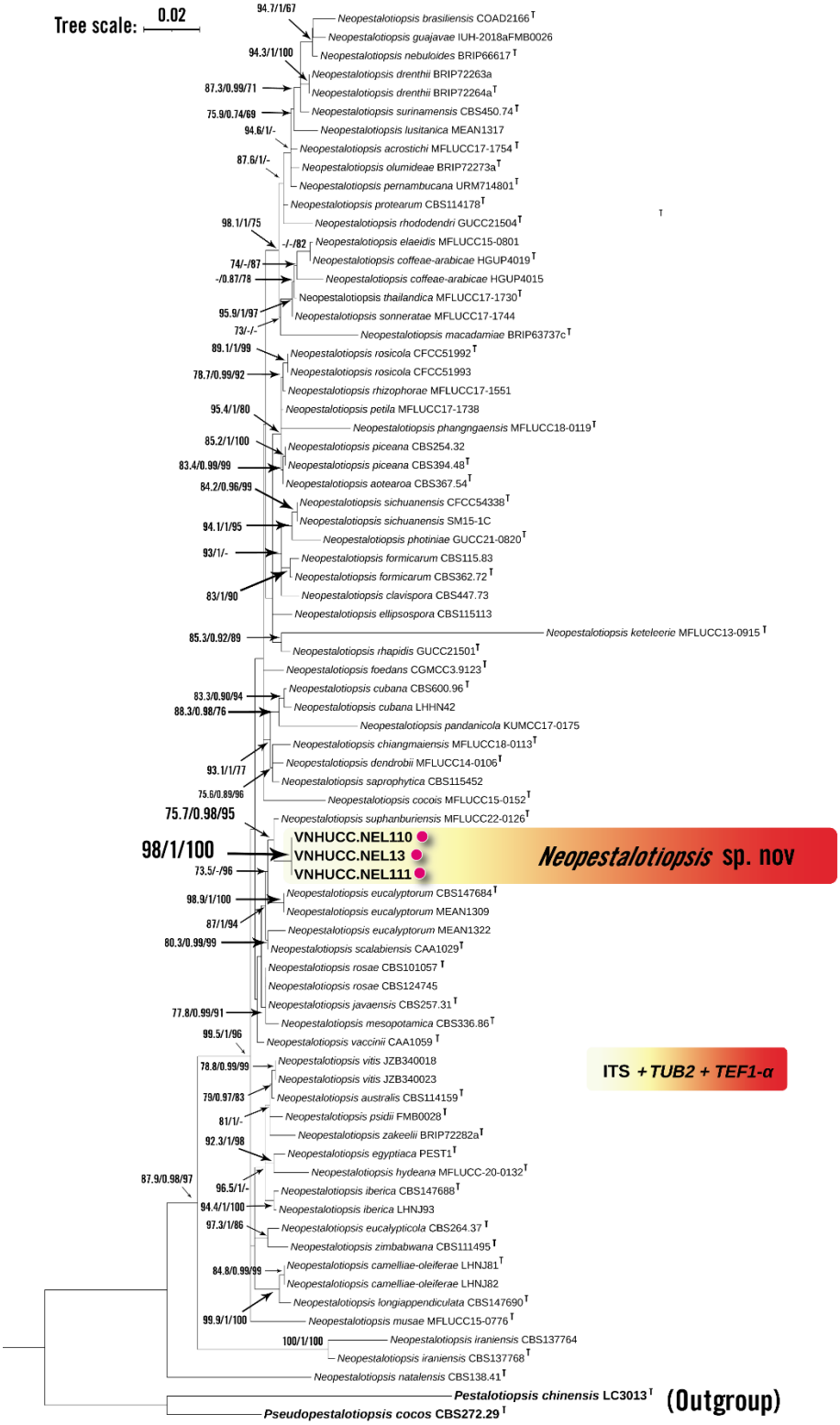
Phụ lục hình 3.6. Triệu chứng đốm lá trên cây sen hồng và đặc điểm hình thái của tác nhân gây hại *Neopestalotiopsis* sp. (chủng phân lập VNHUCC.NEL13). A. Triệu chứng đốm lá ghi nhận trên cây sen hồng. B, C: Hình thái tản nấm của phân lập đại diện VNHUCC.NEL13 trên môi trường PDA sau 7 và 15 ngày. G-K: Các dạng bào tử chưa trưởng thành; L-M: Bào tử trưởng thành. Thanh tỷ lệ biểu thị kích thước tương ứng

Đặc điểm hình thái tản nấm (nuôi cấy) và bào tử:

Đặc điểm nuôi cấy: Tản nấm của *Neopestalotiopsis* sp. trên PDA đạt đường kính trung bình là 79-82,4 mm khi nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C sau bảy ngày. Viền tản nấm có mép hơi gợn

sóng, sợi nấm khí sinh (aerial mycelia) dày đặc, mặt chính tản nấm có màu trắng đến trắng ngà. Mặt ngược (reverse side): có màu vàng nhạt (Hình 3.6B). Các khối bào tử hình thành và dễ dàng quan sát ở cả 2 mặt sau 15 ngày nuôi cấy trên môi trường PDA (Hình 3.6C).

Đặc điểm bào tử: Cụm bào tử (conidiomata) thường đơn lẻ (nhưng thường hình thành tập trung tại một khu vực), dạng rỉ dịch có màu đen đậm (phần lớn), một số có dạng cam cá hồi, dạng các khối bào tử có màu cam cá hồi (nhạt) đến nâu đậm (Phụ lục Hình 3.6E). Bào tử trưởng thành có kích thước (18–32) × (5–7) µm, bốn vách ngăn, nhẵn và hơi thắt lại ở vách ngăn. Các tế bào bào tử (conidiogenous cells) có dạng hình trụ tương đối. Tế bào đáy có hình nón cụt, thành mỏng, hơi trong suốt, trong khi ba tế bào giữa hình trụ, thành nhẵn; tế bào bào tử thứ hai tính từ đáy có màu nâu nhạt hơn; tế bào thứ ba và thứ tư (tính từ tế bào đáy) có màu nâu đậm hơn và giữa 2 tế bào này có đặc trưng với vách ngăn giữa rõ hơn, rộng hơn và có có màu sẫm hơn các vách ngăn khác. Tế bào bào tử ở đỉnh hình nón, thành mỏng, nhẵn, trong suốt, và có 2–4 phần phụ đỉnh (phần lớn có 2). Phần phụ đỉnh (appendages) ở các bào tử trưởng thành không phân nhánh, thẳng đến hơi uốn cong nhẹ, dài 15–26 µm (giai đoạn trưởng thành, n = 50). Phần phụ gốc (tế bào đáy) thường ở dạng đơn, hình chỉ, không phân nhánh, dài 6–8 µm (n =30). Các phần phụ đỉnh và gốc cũng được ghi nhận ở các bào tử chưa trưởng thành nhưng có sự khác biệt với trưởng thành ở độ dài, độ dày.



Phụ lục Hình 3.7. Cây phát sinh loài (ML) của 3 phân lập đại diện và các phân lập tham chiếu thuộc *Neopestalotiopsis* dựa trên tệp dữ liệu kết hợp 2 locus ITS + *TUB2* + *TEF1-α*

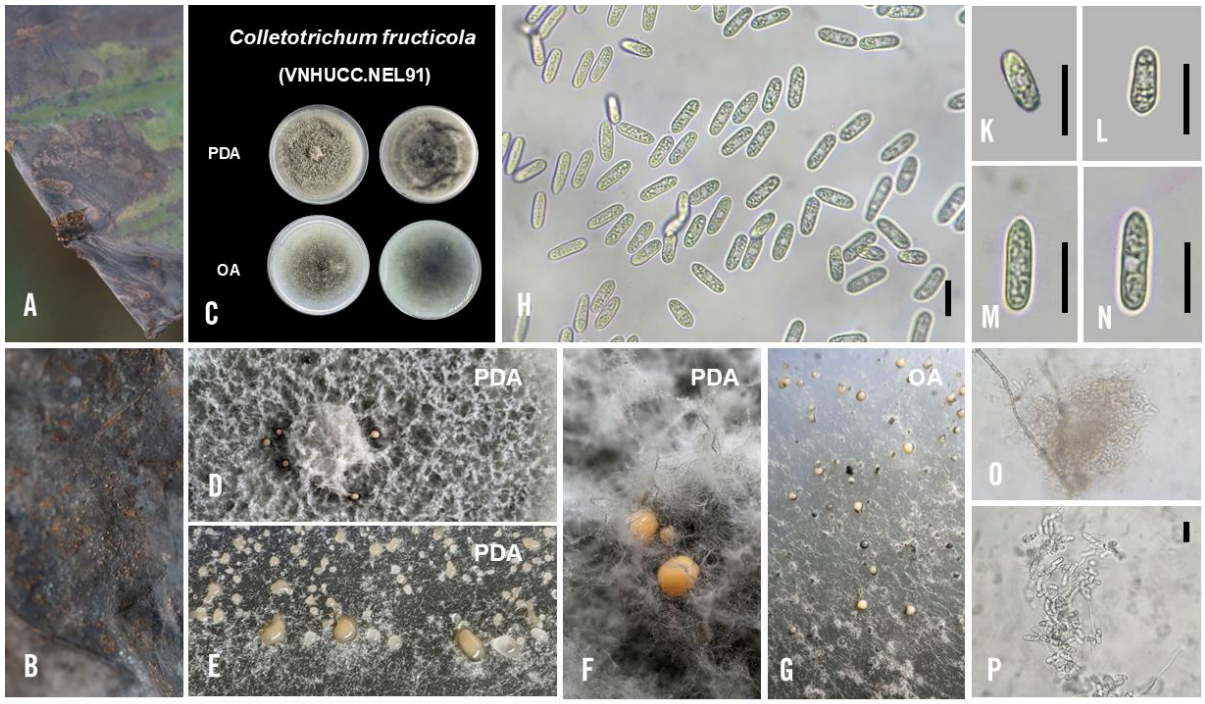
Chi *Colletotrichum*

Bảng phụ lục 3.1. Các loài *Colletotrichum* và các triệu chứng liên quan trên cây sen

Phức hợp loài	Loài/loài phức hợp được xác định	Chủng phân lập đại diện	Triệu chứng điển hình
gloeosporioides	*C. fructicola*	VNHUCC.NEL91	Ghi nhận trên hối nâu đậm (màu nâu sẫm hơn so với các dạng vết bệnh khác) – Sen trắng
	C. siamense	VNHUCC.NEL10	Liên quan đến 2 dạng triệu chứng chính: thối xám đen, ngấn nước trên lá sen (đặc biệt là lá trải) và dạng đốm nâu viền vàng. Tuy nhiên, dạng thối xám đen là dạng phổ biến nhất.
	C. endophytica	VNHUCC.NEL52	Liên quan đến các triệu chứng hỗn hợp khô nâu + các vết thối nâu đồng tâm
	C. tropicale	VNHUCC.NEL71	Liên quan đến triệu chứng thối nâu (phần lớn phía dưới vết bệnh có màu sáng)
orchidearum	*C. plurivorum*	VNHUCC.NEL92	Liên quan đến các triệu chứng thối nâu có các vòng đồng tâm màu nâu ở phía trong và kèm thêm 1-3 lớp đồng tâm màu đen xám không đều ở vòng ngoài. Ghi nhận trên cây sen trắng (phần lớn lá dù ở giai đoạn sớm- lá dù còn thấp)

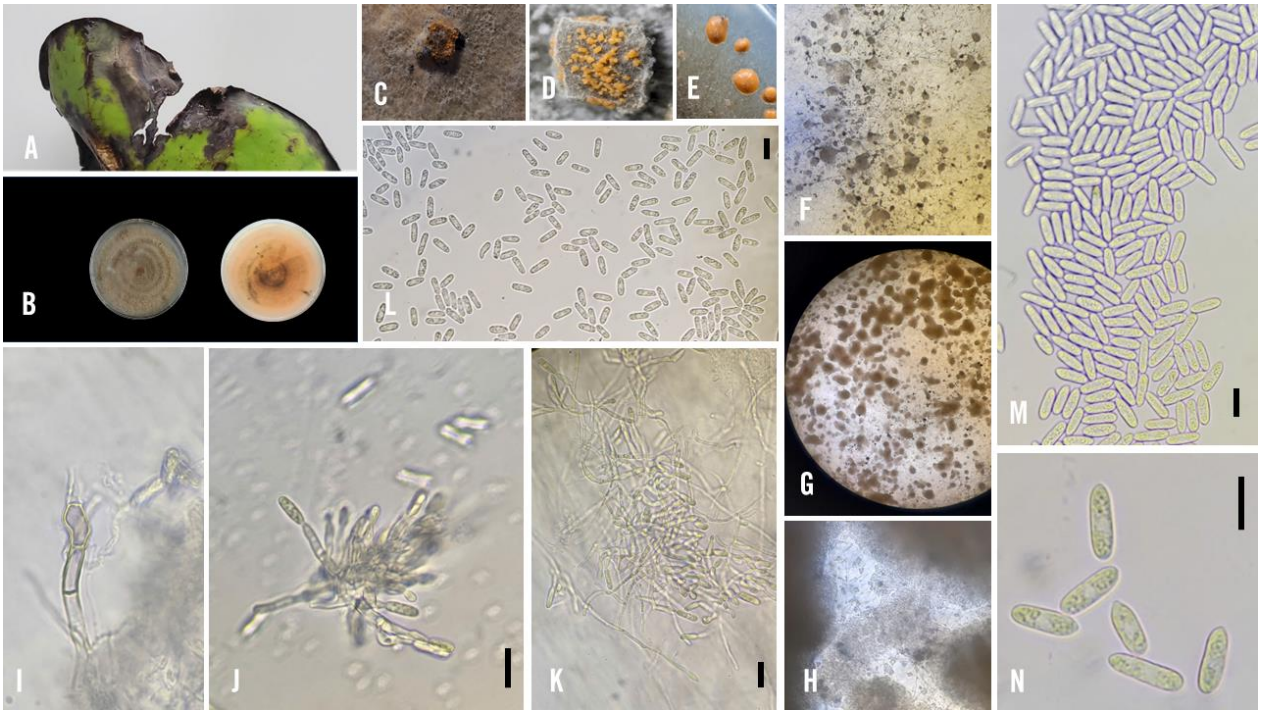
Thông tin mẫu đại diện

VNHUCC.NEL91: Mẫu được thu thập trên lá sen trắng tại Hồ Tịnh Tâm (phường Đông Ba, Thành phố Huế) với triệu chứng thối nâu (màu nâu đậm – sẫm màu hơn các triệu chứng khác). Holotype: TND.TITAM.ST.2. Ex-holotype (mẫu nuôi cấy sống): VNHUCC.NEL91



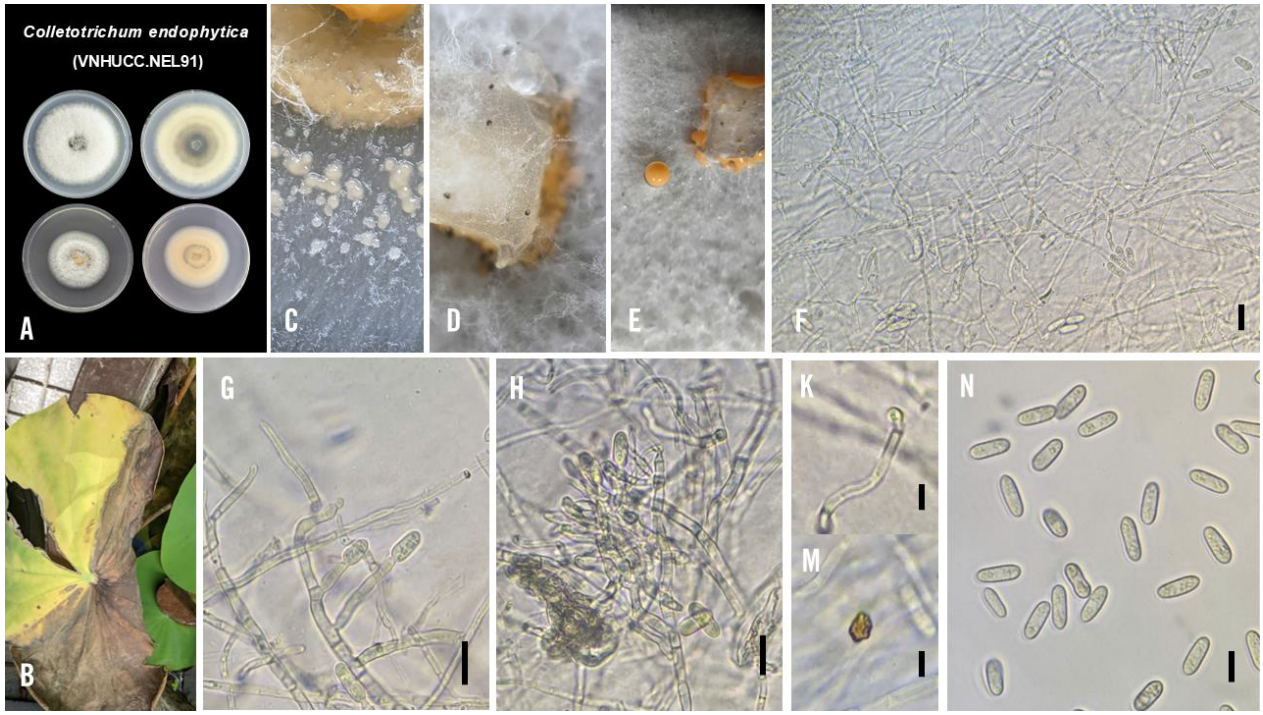
Phụ lục hình 3.8. Triệu chứng bệnh và đặc điểm hình thái của *C. fructicola* (chủng phân lập VNHUCC.NEL91)**. A**. Triệu chứng thối nâu đậm trên trên sen hồng; B. Các khối bào tử màu cam có thể quan sát trên các vết bệnh khi lây nhiễm nhân tạo sau 15 ngày; C. Đặc điểm hình thái tản nấm của *C. fructicola* trên môi trường PDA và OA ở thời điểm 7 ngày sau cấy; D-G Các Khối bào tử (conidiomata = conidial mass) và kết cấu tản nấm trên môi trường PDA; H-N: Bào tử vô tính; O: cấu trúc của quả thể; P: cuống sinh bào tử và các bào tử (conidiophore – conidia)

VNHUCC.NEL10: Mẫu được thu thập trên lá sen trắng có triệu chứng thối đen (kéo dài từ khí khổng trung tâm đến bìa lá, một số vết bệnh quan sát thấy các khối bào tử màu cam có thể nhìn thấy bằng mắt thường) tại Phường Xuân Phú, Thành phố Huế. Ngày thu thập: 22 tháng 10 năm 2022. **Holotype**: L4[2]D2quan. **Ex-Holotype** (mẫu nuôi cấy sống): VNHUCC.NEL10



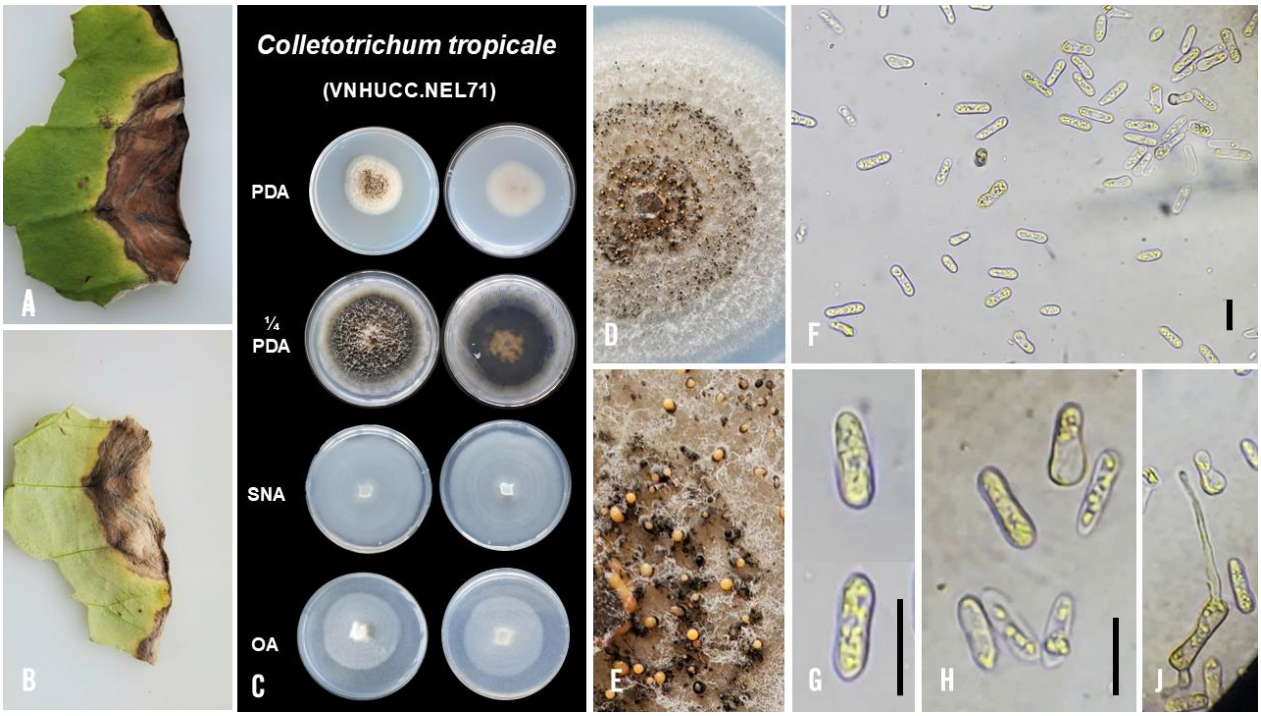
Phụ lục hình 3.9. Triệu chứng bệnh và đặc điểm hình thái của *C. siamense* (chủng phân lập VNHUCC.NEL10)**. A**. Triệu chứng thối xám đen sen hồng; B. Đặc điểm hình thái tản nấm của *C. siamense* trên môi trường PDA ở thời điểm 10 ngày sau cấy; C-E Các khối bào tử (conidiomata = conidial mass) và kết cấu tản nấm trên môi trường PDA; F-H: Khối bào tử chứa dày đặc các bào tử quan sát dưới kính hiển vi; L-N: bào tử vô tính trên môi trường PDA; I: đĩa áp (appressoria); J, K: cuống sinh bào tử và các bào tử (conidiophore – conidia)

VNHUCC.NEL52: Mẫu được thu thập trên sen hồng trong một chậu trồng sen cảnh tại phường Đông Ba, Thành phố Huế. **Holotype**: KN.TT.SH.020501.D2(5). **Ex-holotype (mẫu nuôi cấy sống)**: VNHUCC.NEL52



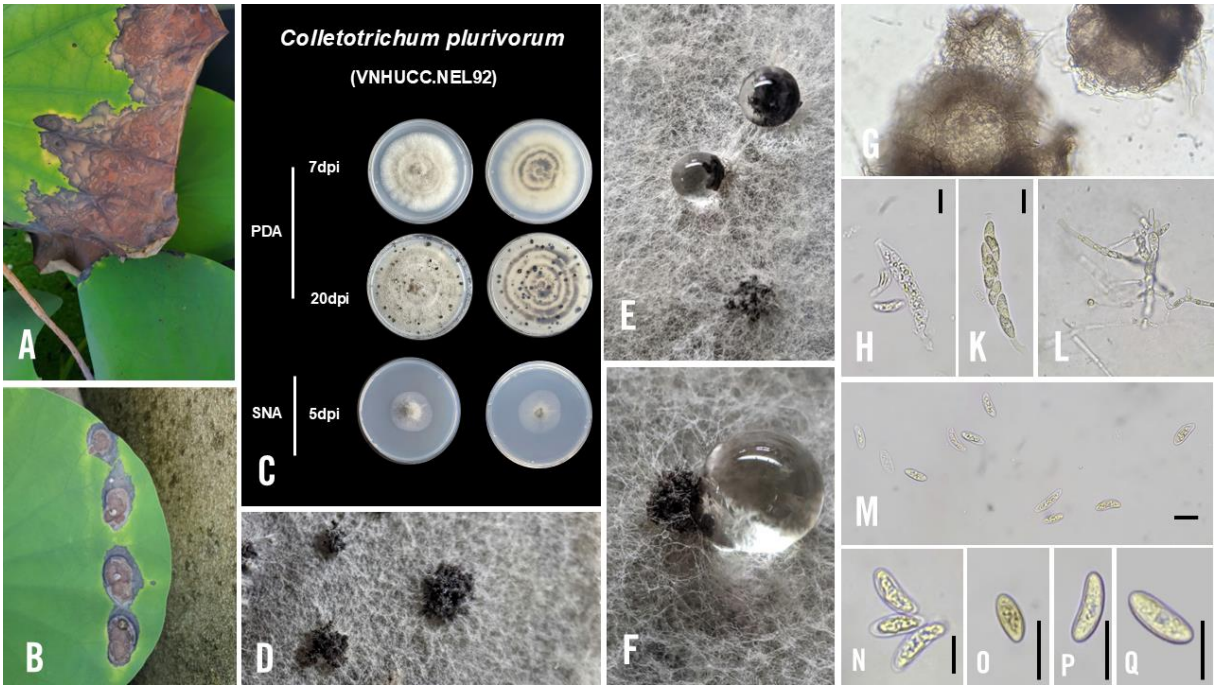
Phụ lục hình 3.10. Triệu chứng bệnh và đặc điểm hình thái của *C. endophytica* (chủng phân lập VNHUCC.NEL52)**.** A: Các biến thể màu sắc khác nhau của tản nấm *C. endophytica* trên môi trường PDA ở thời điểm 10 ngày sau cấy; **B**: Triệu chứng hỗn hợp (khô nâu + các vết đồng tâm) trên sen hồng; C-E Các khối bào tử (conidiomata = conidial mass) và kết cấu tản nấm trên môi trường PDA; F: Mạng lưới sợi nấm; G, H: cuống sinh bào tử và các bào tử (conidiophore – conidia); K, M: đĩa áp (appressoria); N: bào tử vô tính. Thanh tỷ lệ: 10µm

VNHUCC.NEL71: Mẫu được thu thập trên lá cây sen trắng trồng làm cảnh tại phường Tây Lộc, Thành phố Huế. **Holotype**: DNVV.NHA.0406[3.1]. **Ex-holotype**: VNHUCC.NEL71



Phụ lục hình 3.11. Triệu chứng bệnh và đặc điểm hình thái của *C. tropicale* (chủng phân lập VNHUCC.NEL71)**. A-B**. Triệu chứng thối nâu trên sen hồng tương ứng với mặt trên và dưới của vết bệnh; C. Đặc điểm hình thái tản nấm của *C. tropicale* trên môi trường PDA (3 ngày sau cấy), PDA ¼ (10 ngày sau cấy), SNA (7 ngày sau cấy) và OA (5 ngày sau cấy); D-E Các Khối bào tử (conidiomata = conidial mass) và kết cấu tản nấm trên môi trường PDA; F-H: Bào tử vô tính trên môi trường PDA; J: Bào tử đang nảy nầm.Thanh tỷ lệ: 10µm

VNHUCC.NEL92: Mẫu được thu thập trên lá cây sen trắng có triệu chứng thối nâu đồng tâm (tâm vết bệnh màu nâu sáng, các lớp đồng tâm không đều, phía ngoài vết bệnh từ 2-3 lớp đồng tâm màu đen xám) tại chậu trồng sen trắng tại phường Tây Lộc, Thành phố Huế. Holotype: DNDT.ST.021023. Ex-holotype: VNHUCC.NEL92. Ngày ghi nhận triệu chứng và thu thập mẫu: 02 tháng 10 năm 2023.



Phụ lục Hình 3.12. Triệu chứng bệnh và đặc điểm hình thái của *C. plurivorum* (chủng phân lập VNHUCC.NEL92) A. Triệu chứng bệnh thối nâu đồng tâm ghi nhận trên cây sen trắng; B. Vết bệnh khi tiến hành lây nhiễm nhân tạo; C. Đặc điểm hình thái tản nấm trên môi trường PDA (sau 7 và 20 ngày sau cấy – dpi) và SNA (5 ngày sau cấy); D – F: Kết cấu tản nấm và hình thái các quả thể (ascomata) trên môi trường PDA; G: Mặt cắt cấu trúc quả thể và lớp vỏ bọc ngoài quả thể (Ascoma & ascoma peridium); H: Túi bào tử chưa trưởng thành; K: Túi bào tử (asci) trưởng thành; L: Conidiophores; M-Q: Ascopores. Thanh tỷ lệ: 10µm

Đặc điểm hình thái (nuôi cấy) tản nấm: Trên môi trường PDA, sau 7 ngày nuôi cấy, đường kính tản nấm *C. plurivorum* – phức hợp loài orchiaderum (VNHUCC.NEL92) đạt trung bình từ 78,8 đến 80,6 mm. Ban đầu, tản nấm có màu trắng ngà với kết cấu bông nhẹ và viền

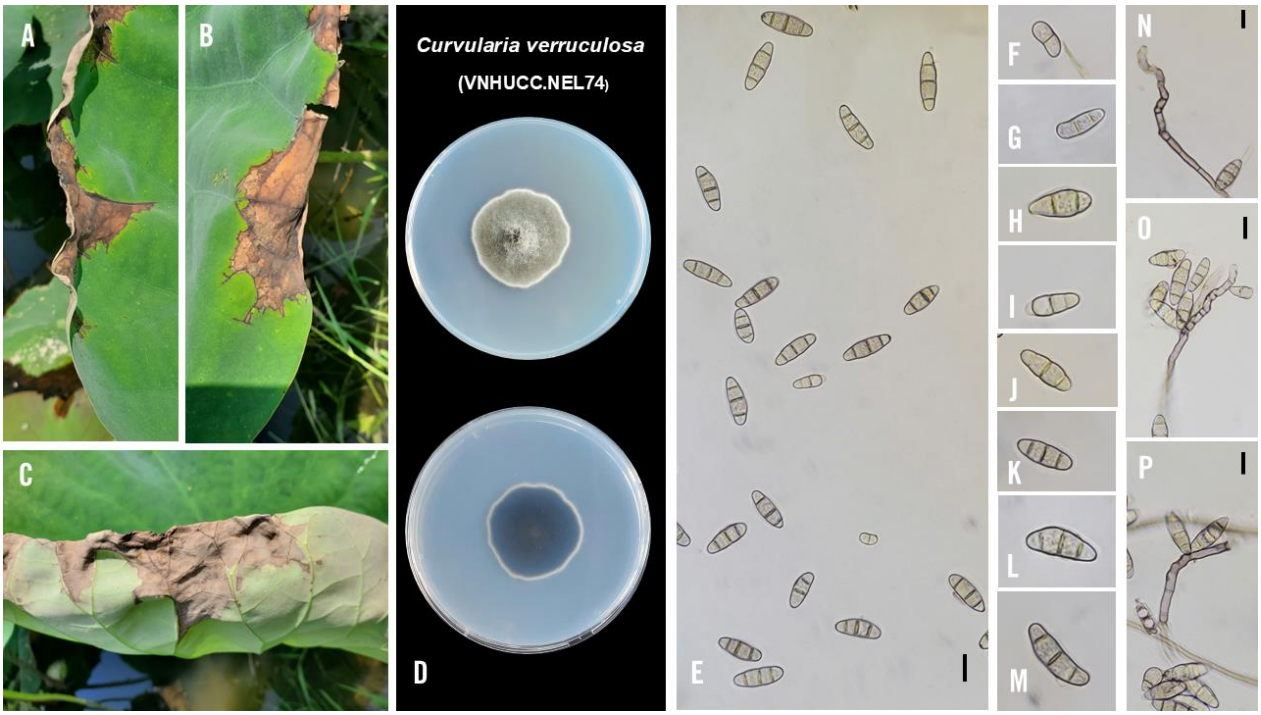
đều, trong khi mặt dưới của tản nấm xuất hiện các vòng đồng tâm, trong đó các vòng ở trung tâm có sắc tố đậm hơn và màu sắc nhạt dần khi ra xa tâm vòng (Hình 3.12C). Sau 20 ngày, màu sắc của tản nấm chuyển sang trắng ngà đến xám nhạt (Hình 3.12C); đồng thời, các cấu trúc quả thể nhìn phía trên có màu đen phân bố rải rác trên bề mặt tản nấm (Hình 3.12 D-F).

Đặc điểm vi thể: Hình thái hữu tính (sexual morph) ghi nhận trên PDA. Quan sát trên kính hiển vi, các cấu trúc thể quả (ascomata) có màu nâu nhạt, đến nâu sẫm, lớp vỏ quả thể gồm các tế bào nhỏ xếp liên tiếp. Túi bào tử (asci) 2 lớp hình chùy đến hình trụ hơi cong, thành nhẵn, có 6–8 bào tử, có buồng đỉnh nhìn thấy được, trong suốt. Bào tử túi (Ascospore) trong suốt, thành nhẵn, hình khuyên đến hình bán nguyệt, hơi nhọn ở 2 đầu (Hình 3.12 M-Q)

Chi *Curvularia & Exserohilum*

VNHUCC.NEL74: Mẫu được thu thập trên ruộng sen hồng ở Hương Trà, Huế với triệu chứng điển hình vết đốm nâu (sáng) thường xuất hiện từ mép lá mở rộng và lan dần vào bên trong. Mặt dưới màu nâu xám/nâu tro (Mã màu/color code: #a9907c, Muted tan). Hiếm khi có quầng halo vàng quanh vết bệnh. Các vết bệnh ban đầu tăng dần kích thước theo hướng từ ngoại vi vào trung tâm phiến lá. Khi hợp lại thành mảng lớn, mép tổn thương có xu hướng co rút, làm phiến lá cong xoăn vào phía trong theo chiều tiến triển của vết bệnh.

Holotype: TNXL.TL8HT.SH01(3) **Ex-holotype**: VNHUCC.NEL74

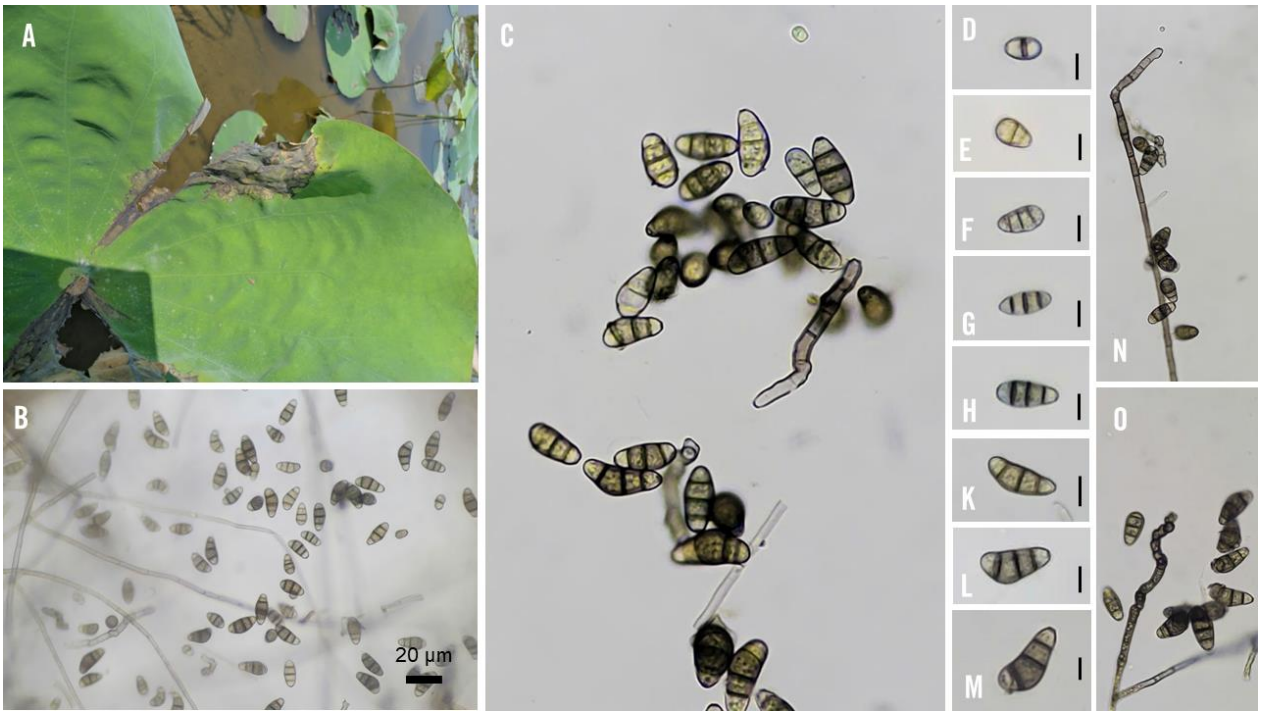


Phụ lục hình 3.13. Triệu chứng bệnh và đặc điểm hình thái của *Curvularia verruculosa* (chủng phân lập VNHUCC.NEL74)**.** A-C. Triệu chứng bệnh thối nâu, kèm theo hiện tượng xoăn lá ghi nhận trên ruộng trồng cây sen hồng tại thị xã Hương Trà; D. Đặc điểm hình thái tản nấm trên môi trường PDA (5 ngày sau cấy – dpi); E-M: Bào tử phân sinh; N-P: Cuống sinh bào tử mang các bào tử (conidiophore và conidia). Thanh tỷ lệ: 10µm

Đặc điểm vi thể và bào tử (VNHUCC.NEL74): Trên môi trường PDA, kích thước tản nấm 45-52.4 mm sau 5 ngày, màu lông chuột đến xám than oliu đậm đặc trưng (Black olive,

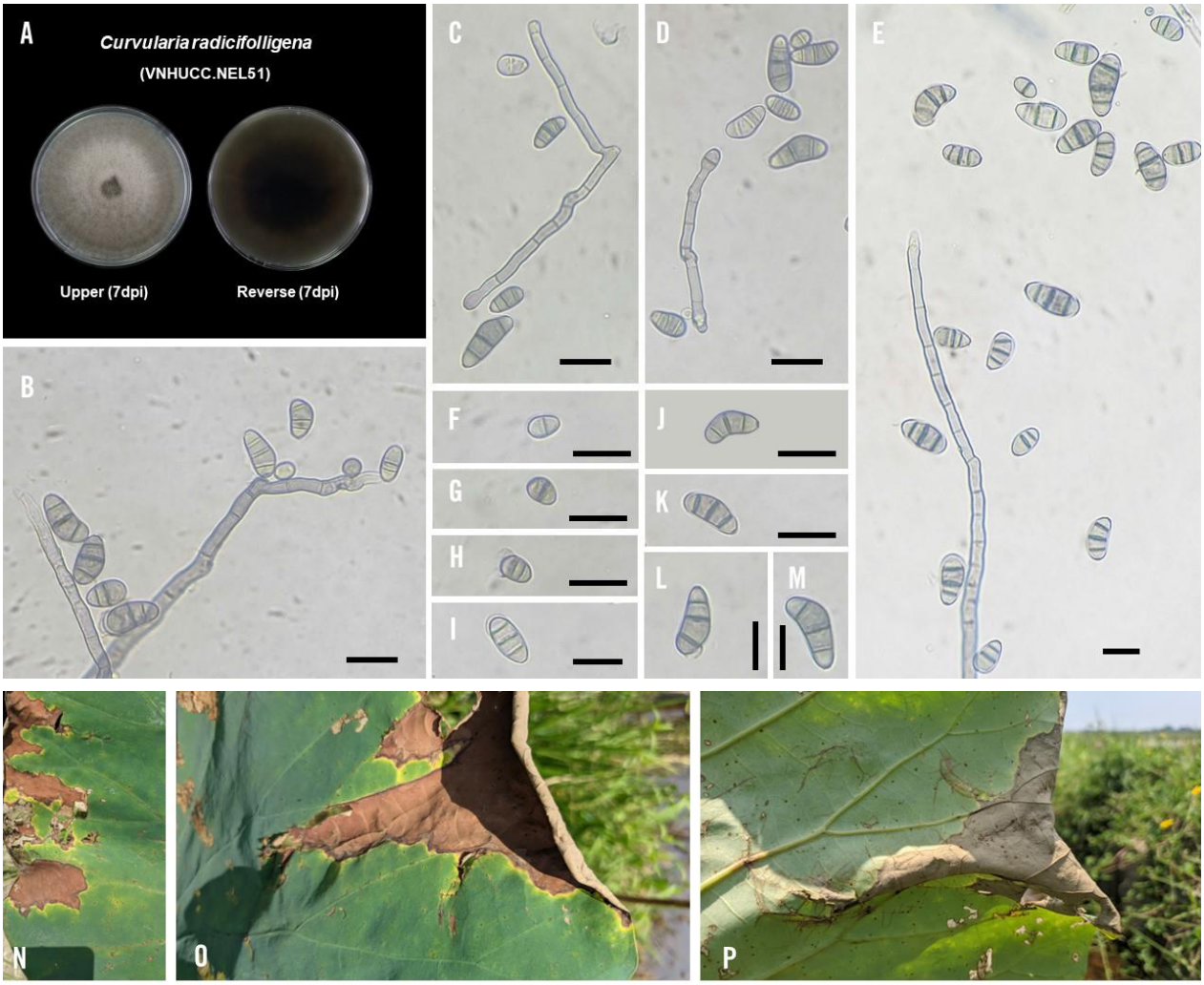
Hex code: #40413D), mặt ngược tản nấm màu than rêu đen đến đen theo thời gian, viền có màu trắng ngà. Các tế bào sinh bào tử (conidiogenous cells) dạng tích hợp, hình thành một phần của chính sợi nấm (không tách rời), có thể xuất hiện ở đầu mút của sợi. Sợi nấm màu nâu nhạt, có vách ngăn. Trong quá trình sinh bào tử, các đầu sợi phát triển theo kiểu sympodial, tạo nên các đoạn gấp khúc liên tiếp đặc trưng. Hình ảnh vi thể thường thấy là một sợi mang nhiều "mấu gối" và các sẹo bào tử xếp lệch dọc theo các khúc gấp. Bào tử màu nâu nhạt, dạng thẳng hoặc hơi cong nhẹ, elip. Bào tử trưởng thành có 3 vách ngăn, tế bào bào tử thứ 3 có kích thước lớn hơn, màu sắc cũng thường sẫm hơn các tế bào còn lại. Các tế bào đáy (basal cells) và các tế bào đỉnh (apical cells) gần như không màu, đôi khi nâu nhạt

VNHUCC.NEL53 (*Curvularia asiatica*)



Phụ lục hình 3.14. Triệu chứng bệnh và đặc điểm hình thái của *Curvularia asiatica* (chủng phân lập VNHUCC.NEL53)**.** A. Triệu chứng bệnh thối nâu (phía trên vết bệnh màu nâu, dưới màu nâu nhạt) ghi nhận trên sen hồng làng Dạ Lê Chánh; B-M: Bào tử phân sinh (D-M tương ứng với thanh tỷ lệ 10 µm); N, O: Cuống sinh bào tử mang các bào tử (Conidiophore và conidia).

VNHUCC.NEL51 (*Curvularia radicifoliigena*):



Phụ lục Hình 3.15. Đặc điểm hình thái của *Curvularia radicifoliigena* (chủng phân lập VNHUCC.NEL51). A. Hình thái tản nấm của chủng phân lập VNHUCC.NEL51 trên các môi trường PDA sau 7 ngày cấy (dpi); B-E: Cuống sinh bào tử, các tế bào sinh bào tử và bào tử; F-M: Bào tử. Thanh tỷ lệ: 10 µm.

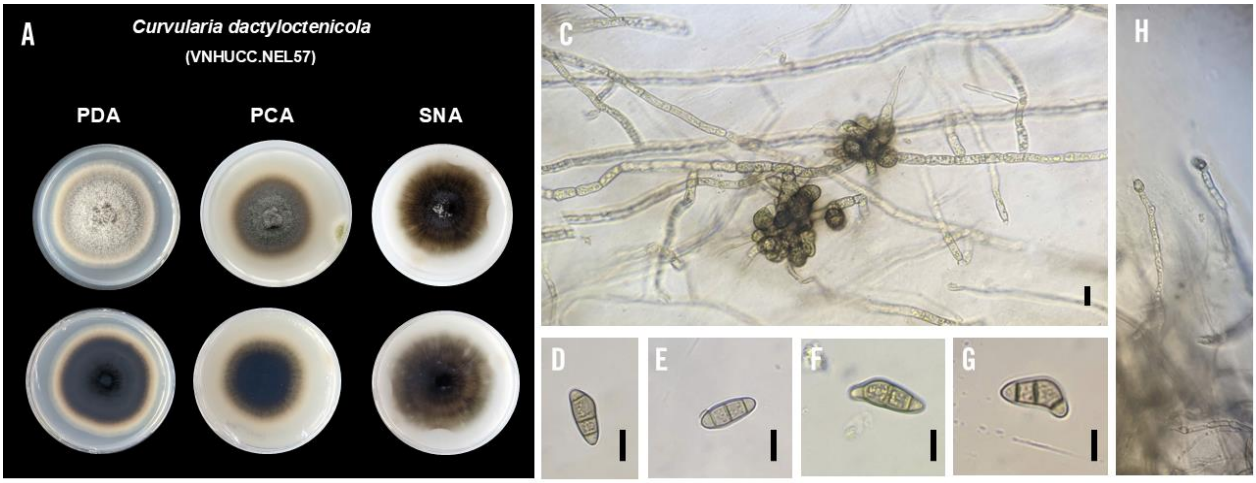
Chủng đại diện VNHUCC.NEL51 được phân lập từ mẫu vết bệnh thối nâu trên ruộng sen hồng ở Phong Hiền, Phong Điền. Mẫu VNHUCC.NEL305 được thu thập với triệu chứng tương tự tại ruộng sen liền kề cũng được xác định dựa trên các đặc điểm hình thái và phân tử (ITS, *GAPDH*) là *C. radicifoliigena*. Vết bệnh do tác nhân này đặc trưng với các mảng hoại tử màu nâu sáng đến nâu đậm ở trung tâm. Rìa tổn thương có quầng vàng–xanh. Các mô vết bệnh theo thời gian trở nên khô và giòn. Mặt dưới vết bệnh có màu nâu xám đến

xám tro. Vết bệnh lan nhanh theo mảng lớn, gây những tổn hại lớn ở bề mặt lá dù – lá đảm nhiệm nhiệm vụ quang hợp chính của cây sen.

Holotype: TN.PHPD.SH.R1.6 **Ex-holotype**: VNHUCC.NEL51

Đặc điểm vi thể và bào tử (VNHUCC.NEL51): Nuôi cấy trên PDA, sau 7 ngày. Mặt trên màu xám nhạt đến xám ô-liu, bề mặt mờ, dạng bông mịn; vùng trung tâm nhạt màu hơn, trong khi vùng ngoại vi đậm hơn nhẹ, tạo gradient sắc thái từ tâm ra rìa khuẩn lạc. Mặt dưới tản nấm có nâu đen đến gần như đen, phân bố màu tương đối đồng nhất; khu vực trung tâm sẫm rõ và lan đều ra xung quanh, rìa có thể nhạt hơn nhưng vẫn nằm trong phổ nâu đen. Cuống sinh bào tử (conidiophore) dạng thẳng đến hơi cong, có vách ngăn rõ và thành nhẵn (Phụ lục Hình 3.15B-E), thường đơn lẻ hoặc một số trường hợp phân nhánh đơn giản (Phụ lục Hình 3.15C, D). Tế bào sinh bào tử (conidiogenous cell) dạng tích hợp trên conidiophore, kiểu holoblastic–porogenous, phát triển theo lối sympodial – theo kiểu gấp khúc đặc trưng; vết sẹo nhỏ ở đầu hoặc dọc bên hông. Bào tử đơn hơi cong nhẹ, một số dạng elip đến lưỡi liềm, hai đầu thuôn, tế bào giữa phình và thường sẫm màu hơn. Bào tử có 3 vách ngăn

VNHUCC.NEL57 (*C. dactyloctenicola*)

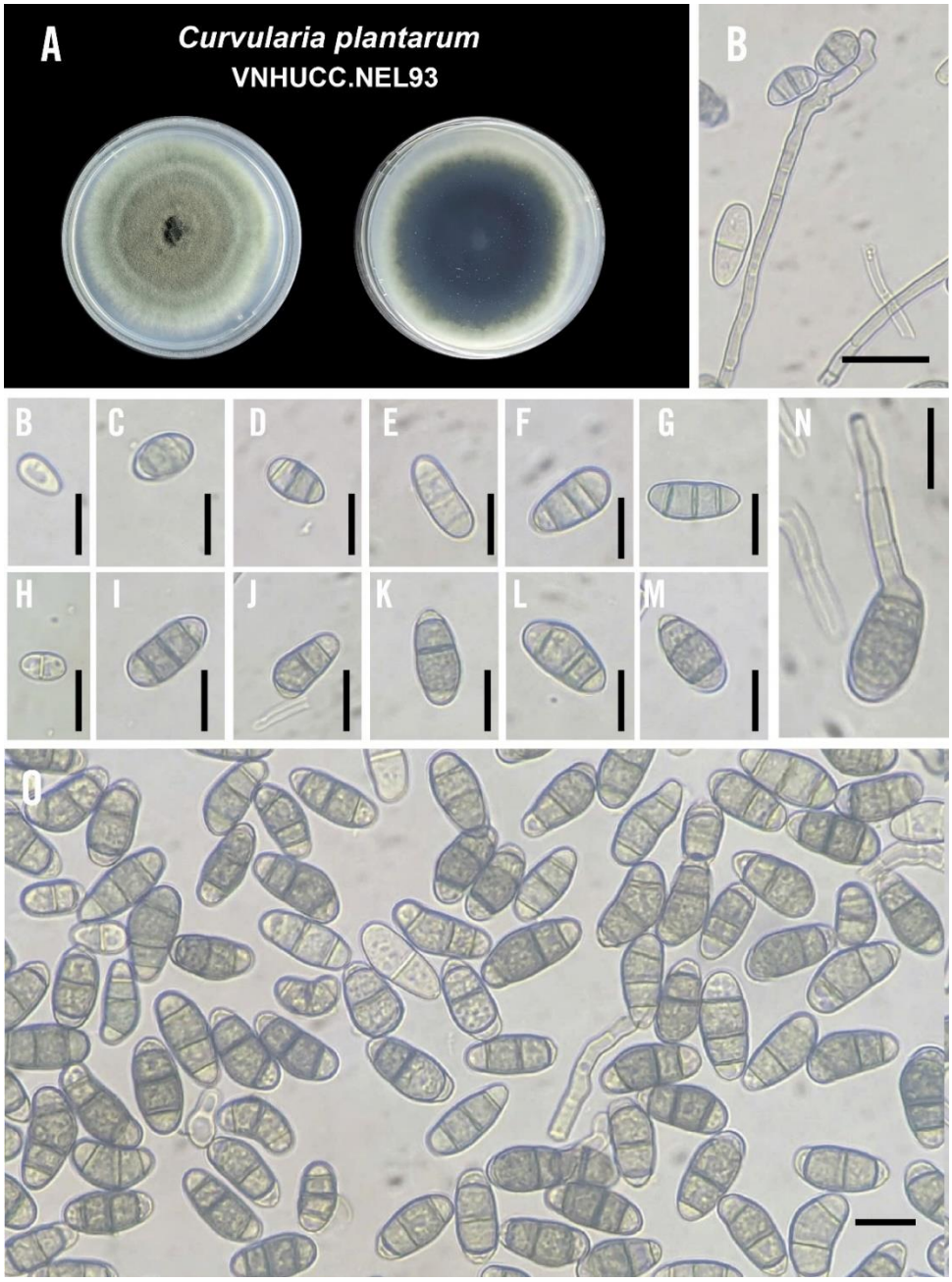


Phụ lục hình 3.16. Đặc điểm hình thái của *Curvularia dactyloctenicola* (chủng phân lập VNHUCC.NEL57). A. Hình thái tản nấm của chủng phân lập VNHUCC.NEL57 trên các môi trường PDA, PCA và SNA; B, C: Cuống sinh bào tử và các tế bào sinh bào tử; D-G: Bào tử phân sinh. Thanh tỷ lệ: 10 µm.

VNHUCC.NEL93 (*C. plantarum*): Chủng đại diện của loài *Curvularia plantarum* được phân lập từ giống sen trắng tại Hồ Tịnh Tâm (Thừa Thiên Huế), ký hiệu VNHUCC.NEL93. Trên cùng giống sen trắng, nghiên cứu còn ghi nhận ba chủng khác cũng được các định là *C. plantarum*, bao gồm: VNHUCC.NEL68, VNHUCC.NEL66 và VNHUCC.NEL69. Ngoài ra, loài này cũng được phát hiện trên giống sen hồng cao sản, với các chủng tương ứng: VHUCC.NEL32, VNHUCC.NEL35 và VNHUCC.NEL300. Cùng với đó, các chủng này được ghi nhận trên cả 3 phân dạng sinh cảnh trong nghiên cứu cứu: ruộng, hồ, chậu. Vết bệnh đặc trưng của loài này là dạng thối nâu đậm, lan từ tìa mở rộng vào trung tâm, không ghi nhận sự xuất hiện các quầng halo ở rìa vết bệnh.

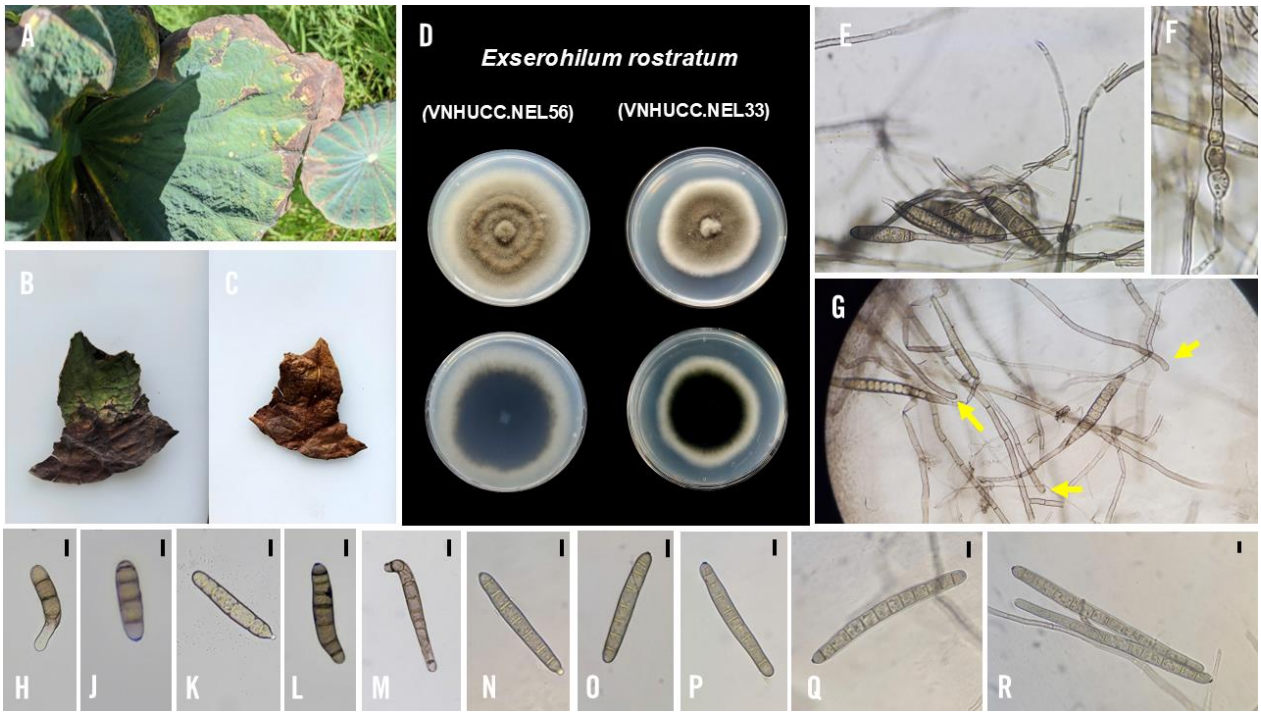
Đặc điểm nuôi cấy và vi thể: Trên môi trường PDA, khuẩn lạc sau 7 ngày có dạng tròn đều, mặt chính tản nấm xám lục nhạt đến ô liu xám, trung tâm sẫm hơn; bề mặt mịn đến hơi bột, có vòng đồng tâm mờ. Mặt ngược (reverse) nâu xám đến xanh đen, vùng rìa có màu trắng ngà. Cuống sinh bào tử lớn, phát triển gối lên nhau, vách ngăn rõ (septate), thành nhẵn, màu nhạt đến nâu nhạt. Conidiophore có thể đơn lẻ hoặc phân nhánh đơn giản, chủ yếu mọc đơn phát từ sợi nấm. Đỉnh và các vị trí cận đỉnh mang tế bào sinh bào tử tích hợp. Tế bào sinh bào tử (conidiogenous cells) dạng tích hợp trên conidiophore, kiểu phát sinh theo lối gấp khúc tại vùng đỉnh hoặc cận đỉnh. Bào tử thẳng hoặc phần lớn hơi cong nhẹ, hai đầu thuôn (phần lớn nhọn hơn rõ rệt ở đầu), có 3 vách ngăn khi ở dạng trưởng thành. Các tế bào bào tử thứ 2 và thứ 3 (tế bào bào tử trung gian) có màu sắc sẫm hơn so với các

loại tế bào bào tử còn lại. Đặc biệt, tế bào bào tử thứ 3 có kích thước lớn nhất. Kích thước 15–22(–25) × 4.2 -5.3 µm (6-9 µm tại phần rộng nhất của tế bào bào tử thứ 3). Rốn (hilum) rõ ở đầu của tế bào bào tử đỉnh



Phụ lục Hình 3.17. Đặc điểm hình thái của *Curvularia plantarum* (chủng phân lập VNHUCC.NEL93). A. Hình thái tản nấm của chủng phân lập VNHUCC.NEL93 trên các môi trường PDA sau 7 ngày cấy (dpi); B: Cuống sinh bào tử, các tế bào sinh bào tử và bào tử; F-M: Bào tử. Thanh tỷ lệ: 10 µm.

Exserohilum



Phụ lục hình 3.18. Triệu chứng bệnh và đặc điểm hình thái của *Exserohilum rostratum* (chủng phân lập VNHUCC.NEL56)**.** A-C. Triệu chứng bệnh khô nâu nhưng có quần (viền) vàng ghi nhận trên ruộng trồng cây sen hồng tại Lăng Thiệu Trị, Thủy Bằng, Thành phố Huế; D. Đặc điểm hình thái tản nấm trên môi trường PDA của 2 chủng phân lập VNHUCC.NEL56 và VNHUCC.NEL33 (5 ngày sau cấy – dpi); E: Cuống sinh bào tử mang các bào tử (Conidiophore và conidia); F: Chlamydospore; G: các tế bào sinh bào tử (conidiogenous cells, mũi tên màu vàng). H-R: bào tử. Thanh tỷ lệ: 10µm

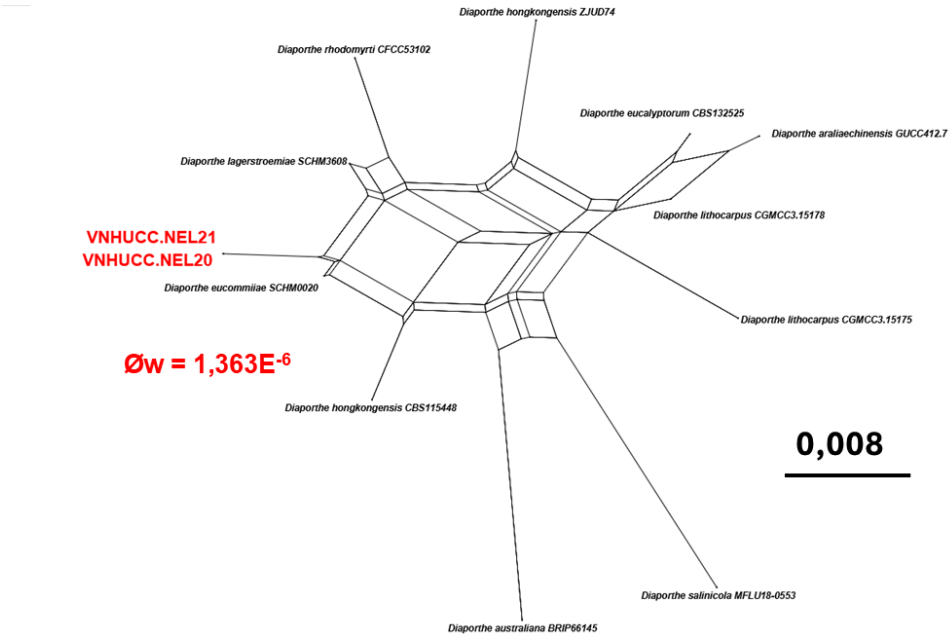
VNHUCC.NEL56: Mẫu được thu thập tại ruộng sen trước mặt Lăng Thiệu Trị, Thủy Bằng, Thủy Xuân. Triệu chứng điển hình là đốm không đều và có màu nâu sẫm đến đen, với quầng vàng, theo thời gian cháy lá và khô héo, có rất nhiều vết nhăn ở bề mặt lá. Mặt dưới vết bệnh màu nâu đỏ hạt dẻ (Mã màu/color code: #914825 - chesnut) đến nâu sẫm (#582a13 - seal brown). Trên môi trường PDA, đường kính tản nấm sau 5 ngày dao động từ 74-80mm. Các chủng đều đạt đường kính tối đa của đĩa Petri 90mm sau 7 ngày. Tản nấm bông (sợi nấm khí sinh dày đặc) ở vùng trung tâm có màu nâu nhạt đến nâu xám (French bistre, color code #856d4d), sắc nâu nhạt dần khi ra đến rìa. Mặt ngược tản nấm có màu xám rêu, xám

xanh (Gunmetal, color code #212e3e) chiếm phần lớn (5/6 diện tích), vòng rìa chiếm (1/6) có màu trắng rõ rệt. Theo thời gian, màu sắc chuyển dần sang rêu xẫm đến đen. Bào tử thẳng, hơi cong nhẹ, có màu nâu nhạt hay nâu oliu, có kích thước lớn, vách ngăn rõ rệt, một số bào tử trưởng thành có thể đạt 13-14 vách ngăn (số lượng vách ngăn dao động từ 2-14 tùy mức độ trưởng thành). Chlamydospore: ghi nhận trên môi trường PDA. Cuống sinh bào tử màu nâu nhạt, phần lớn dạng đơn, một số có phân nhánh. Có rốn lồi (protuberant hilum) đặc trưng ở một đầu của bào tử.

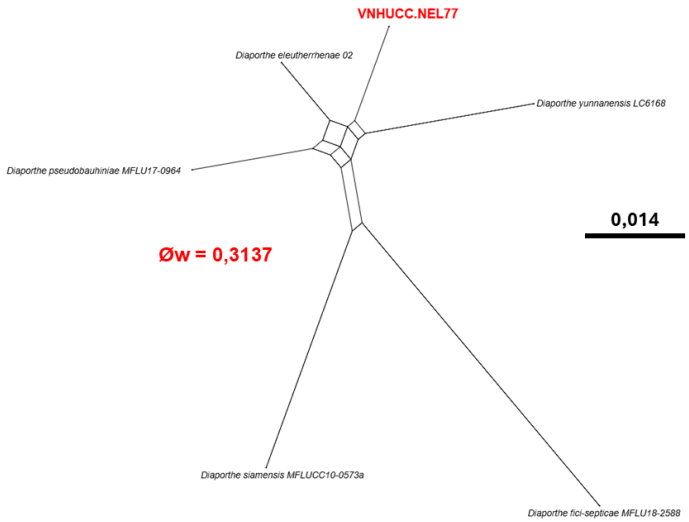
Chi *Diaporthe*

Phụ lục Hình 3.19. Đặc điểm hình thái của các chủng phân lập thuộc chi *Diaporthe* và các khối bào tử (conidiomata) trên bề mặt tản nấm

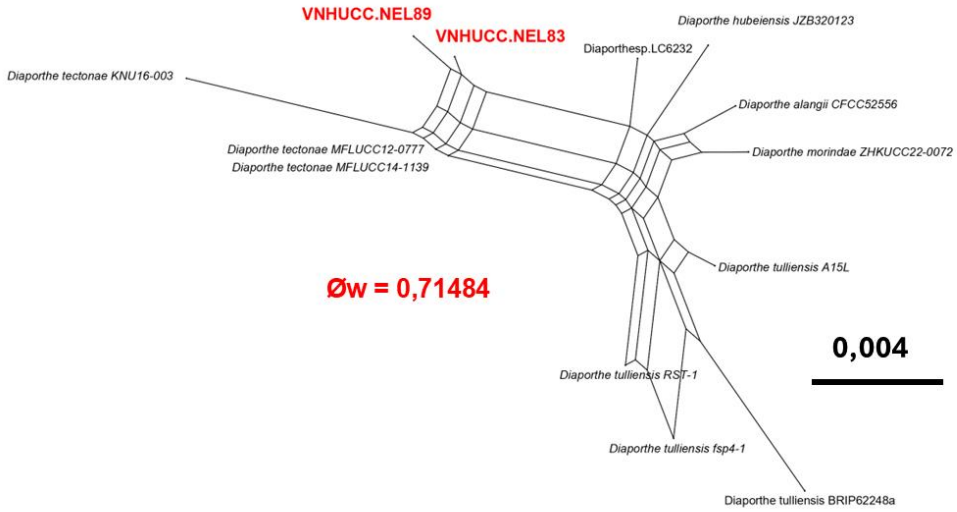
Phân tích ranh giới loài của các chủng ghi nhận trong chi *Diaporthe* của nghiên cứu này



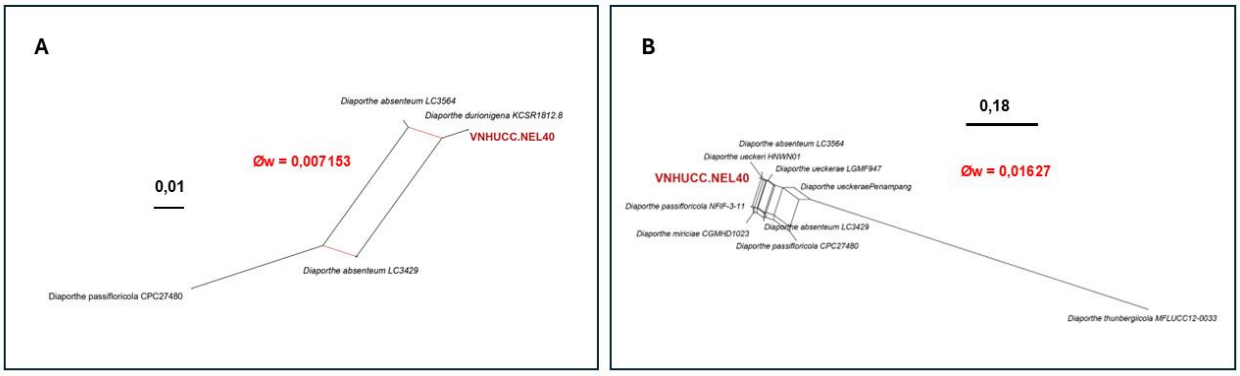
Phụ lục Hình 3.20. Biểu đồ phân tích ranh giới loài theo phương pháp GCPSR của chủng phân lập VNHUCC.NEL20, VNHUCC.NEL21 với các đơn vị phân loại liên quan



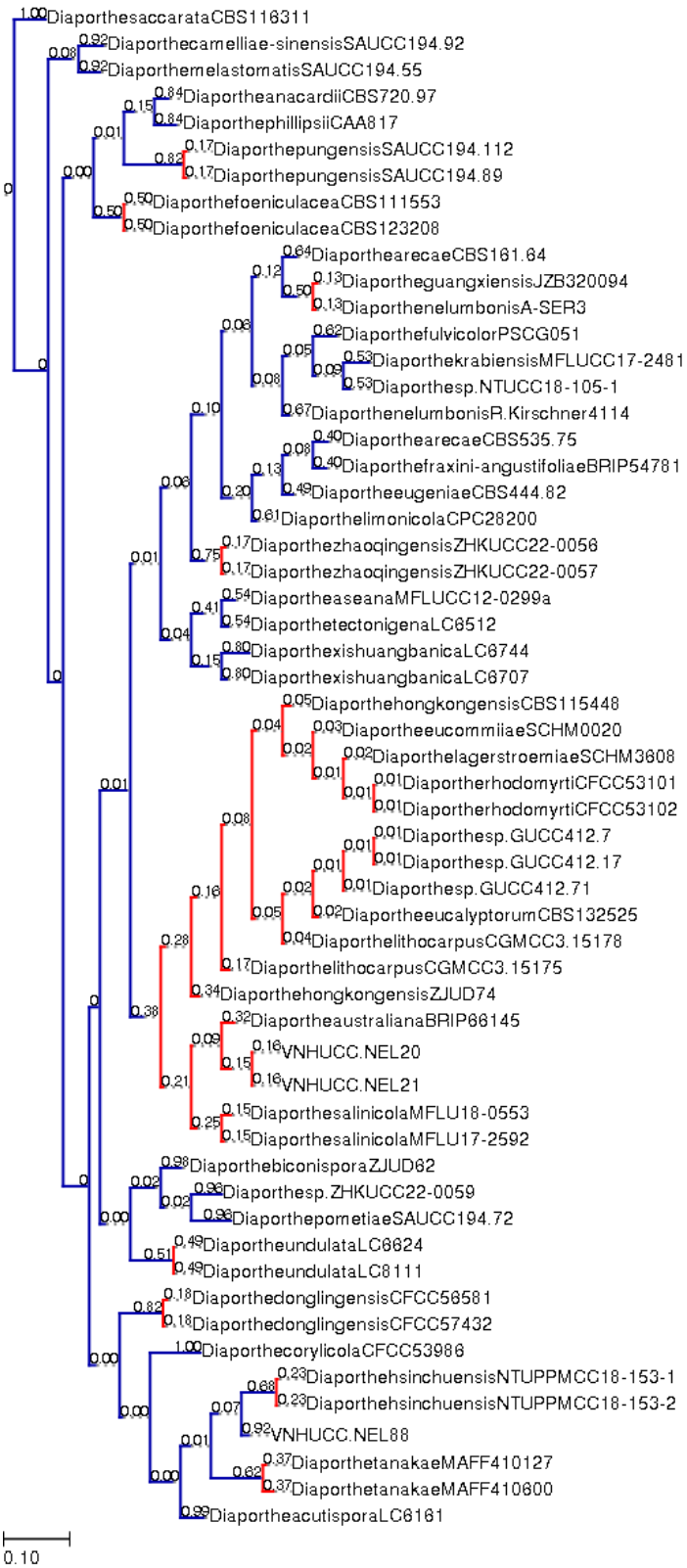
Phụ lục Hình 3.21. Biểu đồ phân tích ranh giới loài theo phương pháp GCPSR của chủng phân lập VNHUCC.NEL77 với các đơn vị phân loại liên quan



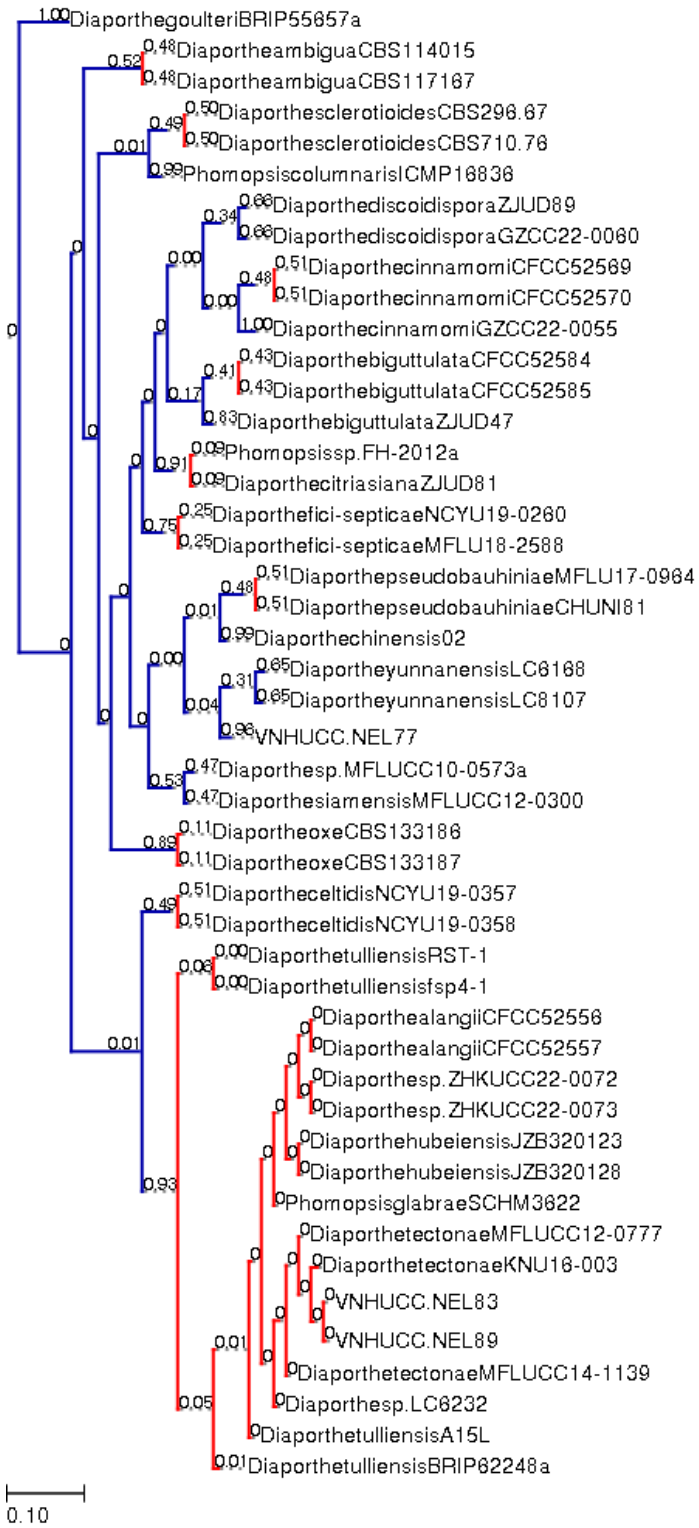
Phụ lục Hình 3.22. Biểu đồ phân tích ranh giới loài theo phương pháp GCPSR của chủng phân lập VNHUCC.NEL83, VNHUCC.NEL89 với các đơn vị phân loại liên quan



Phụ lục Hình 3.23. Biểu đồ phân tích ranh giới loài theo phương pháp GCPSR của chủng phân lập VNHUCC.NEL40 với các đơn vị phân loại liên quan



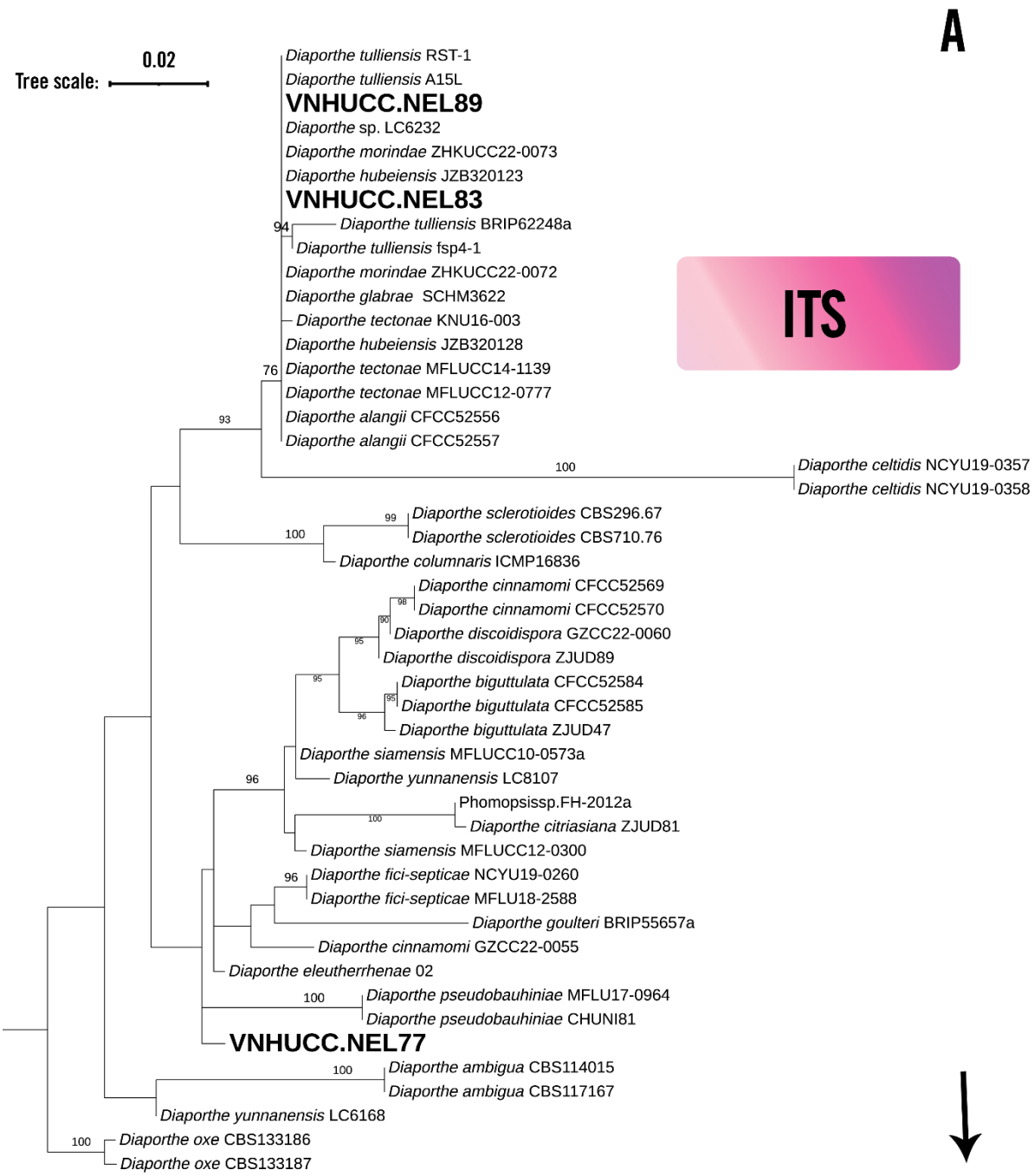
Phụ lục Hình 3.24. Kết quả phân tích cây phát sinh theo phương pháp đồng tổ tiên PTP (Poisson tree processes) của 3 chủng phân lập VNHUCC.NEL20, VNHUCC.NEL21 và VNHUCC.NEL88 – đây là một phương pháp phân loại loài dựa trên phân bố Poisson theo các sự kiện đột biến trên cây phát sinh loài.

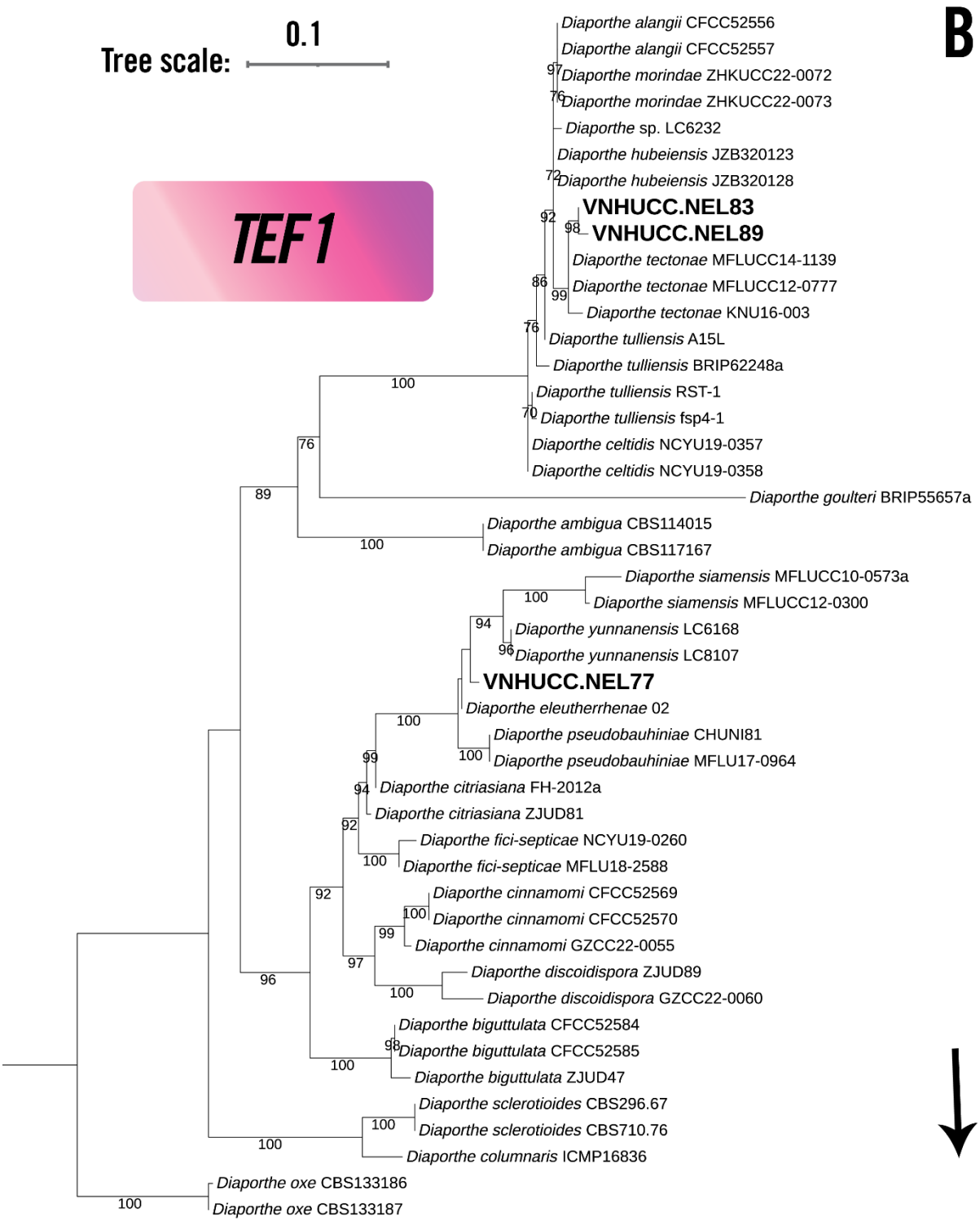


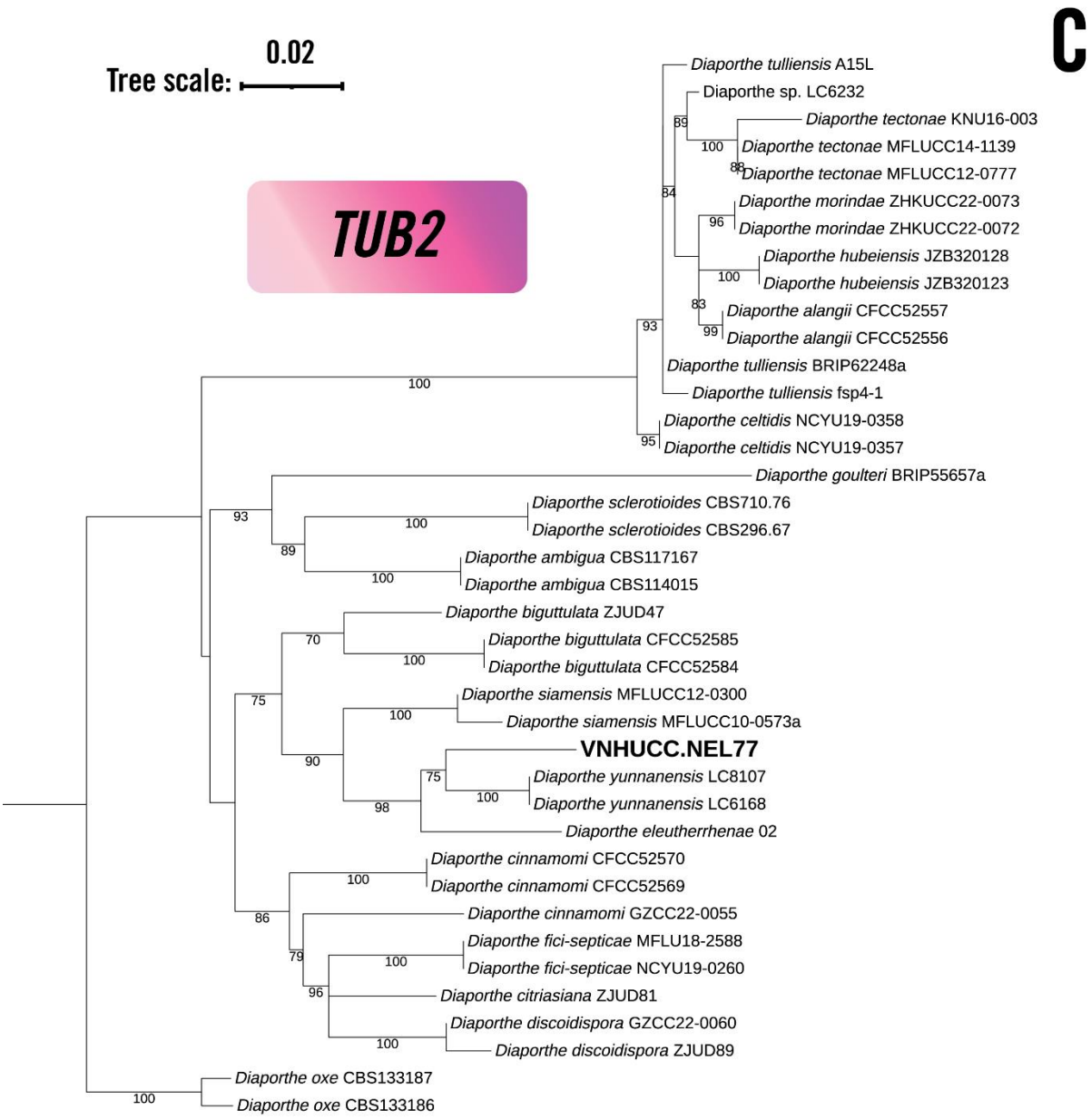
Hình 3.25. Kết quả phân tích cây phát sinh theo phương pháp đồng tổ tiên (hợp nhất) PTP (Poisson tree processes) của 3 chủng phân lập VNHUCC.NEL83, VNHUCC.NEL89 và VNHUCC.NEL77

Khi phân tích ranh giới loài của 2 chủng phân lập VNHUCC.NEL83, VNHUCC.NEL89 của chi *Diaporthe*, nghiên cứu này đã tiến hành 4 phân tích độc lập bao gồm phân tích phát sinh loài đa locus/đơn locus, GCPSR, và phương pháp hợp nhất đồng tổ tiên PTP - và các kết quả được xem như từng bằng chứng độc lập (Hình 3.16, Phụ lục Hình 3.20, 3.23). Tuy nhiên, đối 2 với chủng phân lập VNHUCC.NEL83, VNHUCC.NEL89 trong khi 2 phương pháp phân tích phát sinh loài đa locus và GCPSR đều cho thấy, 2 chủng phân lập này được chỉ định cho loài *D. tectonae* độc lập và tách biệt, không có sự tái tổ hợp với các loài có mối quan hệ phát sinh gần (*D. tuliensis*, *D. hubeiensis, D. alangii, D. morindae, D. glabrae*). Bên cạnh đó, có 1 đặc điểm hình thái rất khác biệt trong nhóm này là các khối bào tử (conidiomata) của *D. tectonae* rất lớn so với các phân loại có mối quan hệ phát sinh gần. Tuy nhiên, phân tích sử dụng phương pháp hợp nhất đồng tổ tiên PTP lại chỉ ra rằng các loài này có chung 1 tổ tiên và nên chỉ định cho 1 loài duy nhất (Phụ lục Hình 3.23).

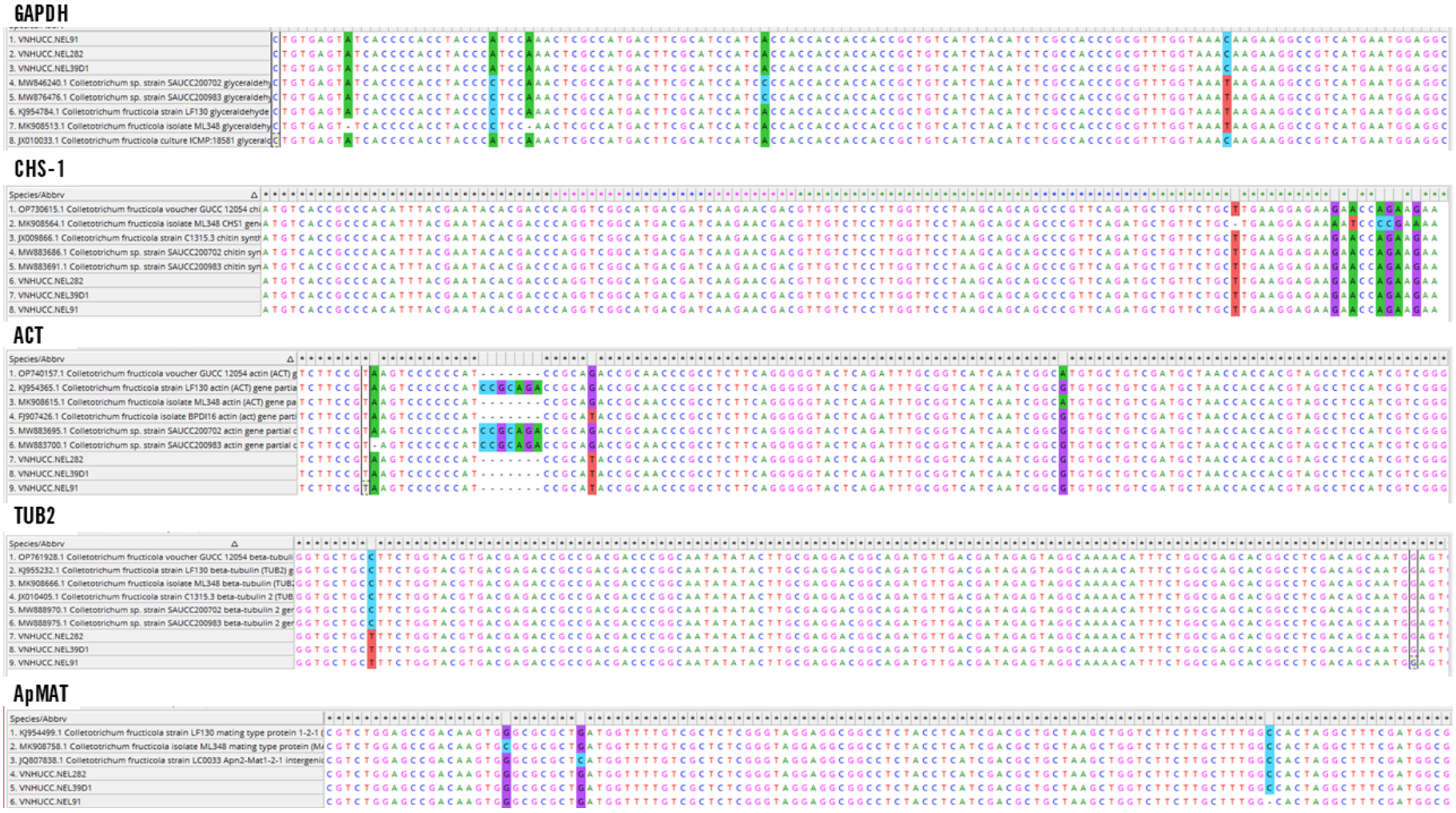
Trong trường hợp của VNHUCC.NEL20, VNHUCC.NEL21 tất cả các bằng chứng (phát sinh loài đa locus, GCPSR, PTP) đều chỉ ra rằng các phân loại này nên chỉ định cho 1 loài duy nhất. Xét về lịch sự ghi nhận cũng như các ký chủ được báo cáo, *Diaporthe hongkongensis* do Gomes và cộng sự báo cáo (2013). Tiếp theo, *D. lithocarpus* được Gao và cộng sự (2014) mô tả lần đầu từ cây sồi (*Lithocarpus glabra)* ở Trung Quốc, trong khi *D. eucalyptorum* được Crous và cộng sự (2012) báo cáo từ một loài *Eucalyptus* sp. ở Úc. Năm 2017, Gao và cộng sự tiếp tục mô tả *D. lagerstroemiae*, tên gọi được lấy theo tên ký chủ phân lập cây Tường vi - *Lagerstroemia indica* ở Trung Quốc. Năm 2018, *D. eucommiae* được phân lập từ *Eucommia ulmoides* được báo cáo bởi Jiang và cộng sự (2018) cũng ở Trung Quốc. *Diaporthe australiana* được phát hiện trên cây macca (*Macadamia* sp.) tại Úc (Wrona và cộng sự, 2020), trong khi *D. salinicola* được báo cáo từ rừng ngập mặn ở Thái Lan (Dayarathne và cộng sự, 2020). *D. rhodomyrti* là loài mới nhất được giới thiệu trong nhóm này và được phân lập trên *Rhodomyrtus tomentosa* tại Trung Quốc (Cao và cộng sự, 2022). Do đó, dựa trên các kết quả và các bằng chứng ghi nhận về ranh giới loài trong nghiên cứu này, tám loài kể trên được đề xuất là đồng nghĩa danh pháp với *D. hongkongensis* và 2 chủng phân lập VNHUCC.NEL20, VNHUCC.NEL21 cũng được chỉ định cho danh pháp *Diaporthe hongkongensis*.


A
0.02
Tree scale:
ITS
Diaporthe tulliensis RST-1
Diaporthe tulliensis A15L
VNHUCC.NEL89
Diaporthe sp. LC6232
Diaporthe morindae ZHKUCC22-0073
Diaporthe hubeiensis JZB320123
VNHUCC.NEL83
Diaporthe tulliensis BRIP62248a
Diaporthe tulliensis fsp4-1
Diaporthe morindae ZHKUCC22-0072
Diaporthe glabrae SCHM3622
Diaporthe tectonae KNU16-003
Diaporthe hubeiensis JZB320128
Diaporthe tectonae MFLUCC14-1139
Diaporthe tectonae MFLUCC12-0777
Diaporthe alangii CFCC52556
Diaporthe alangii CFCC52557
Diaporthe celtidis NCYU19-0357
Diaporthe celtidis NCYU19-0358
Diaporthe sclerotioides CBS296.67
Diaporthe sclerotioides CBS710.76
Diaporthe columnaris ICMP16836
Diaporthe cinnamomi CFCC52569
Diaporthe cinnamomi CFCC52570
Diaporthe discoidispora GZCC22-0060
Diaporthe discoidispora ZJUD89
Diaporthe biguttulata CFCC52584
Diaporthe biguttulata CFCC52585
Diaporthe biguttulata ZJUD47
Diaporthe siamensis MFLUCC10-0573a
Diaporthe yunnanensis LC8107
Phomopsissp.FH-2012a
Diaporthe citriasiana ZJUD81
Diaporthe siamensis MFLUCC12-0300
Diaporthe fici-septicae NCYU19-0260
Diaporthe fici-septicae MFLU18-2588
Diaporthe goulteri BRIP55657a
Diaporthe cinnamomi GZCC22-0055
Diaporthe eleutherrhenae 02
Diaporthe pseudobauhiniae MFLU17-0964
Diaporthe pseudobauhiniae CHUNI81
VNHUCC.NEL77
Diaporthe ambigua CBS114015
Diaporthe ambigua CBS117167
Diaporthe yunnanensis LC6168
Diaporthe oxe CBS133186
Diaporthe oxe CBS133187


Tree scale: 0.1
B
TEF1
Diaporthe alangii CFCC52556
Diaporthe alangii CFCC52557
Diaporthe morindae ZHKUCC22-0072
Diaporthe morindae ZHKUCC22-0073
Diaporthe sp. LC6232
Diaporthe hubeiensis JZB320123
Diaporthe hubeiensis JZB320128
VNHUCC.NEL83
VNHUCC.NEL89
Diaporthe tectonae MFLUCC14-1139
Diaporthe tectonae MFLUCC12-0777
Diaporthe tectonae KNU16-003
Diaporthe tulliensis A15L
Diaporthe tulliensis BRIP62248a
Diaporthe tulliensis RST-1
Diaporthe tulliensis fsp4-1
Diaporthe celtidis NCYU19-0357
Diaporthe celtidis NCYU19-0358
Diaporthe goulteri BRIP55657a
Diaporthe ambigua CBS114015
Diaporthe ambigua CBS117167
Diaporthe siamensis MFLUCC10-0573a
Diaporthe siamensis MFLUCC12-0300
Diaporthe yunnanensis LC6168
Diaporthe yunnanensis LC8107
VNHUCC.NEL77
Diaporthe eleutherrhenae 02
Diaporthe pseudobauhiniae CHUNI81
Diaporthe pseudobauhiniae MFLU17-0964
Diaporthe citriasiana FH-2012a
Diaporthe citriasiana ZJUD81
Diaporthe fici-septicae NCYU19-0260
Diaporthe fici-septicae MFLU18-2588
Diaporthe cinnamomi CFCC52569
Diaporthe cinnamomi CFCC52570
Diaporthe cinnamomi GZCC22-0055
Diaporthe discoidispora ZJUD89
Diaporthe discoidispora GZCC22-0060
Diaporthe biguttulata CFCC52584
Diaporthe biguttulata CFCC52585
Diaporthe biguttulata ZJUD47
Diaporthe sclerotioides CBS296.67
Diaporthe sclerotioides CBS710.76
Diaporthe columnaris ICMP16836
Diaporthe oxe CBS133186
Diaporthe oxe CBS133187



Phụ lục Hình 3.26. Các cây phát sinh loài ML đơn gene tương ứng với từng locus: A. ITS, B. *TEF1-a,* C. *TUB2* của 3 chủng phân lập VNHUCC.NEL83, VNHUCC.NEL89 và VNHUCC.NEL77. Thanh tỷ lệ biểu thị số lượng thay thế ước tính trên mỗi vị trí nucleotide.



Phụ lục Hình 3.27. Sự khác biệt trình tự nucleotide giữa các phân lập tham chiếu và chủng phân lập VNHUCC.NEL92, VNHUCC.NEL39D1, VNHUCC.NEL282 ở 6 locus

PHỤ LỤC 4 – PHÂN TÍCH VỀ CÁC TÁC ĐỘNG CỦA VẬT LIỆU NANO BẠC LÊN CÁC TÁC NHÂN GÂY HẠI TRÊN CÂY SEN

Phụ lục Bảng 4.1. Hiệu lực ức chế (%) của 29 chủng phân lập thử nghiệm trên môi trường PDA sau 7 ngày

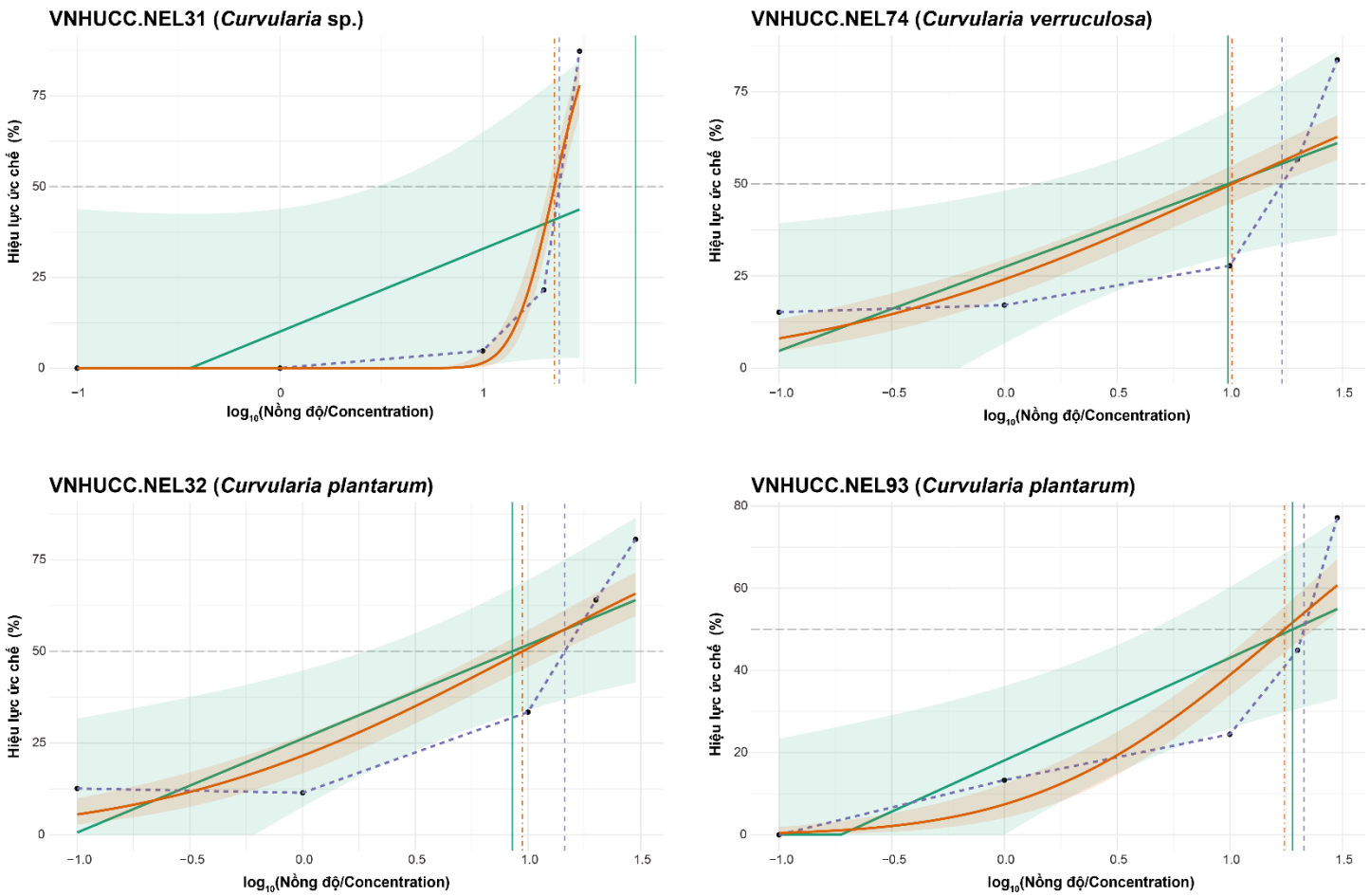
Chi	Chủng phân lập thử nghiệm	Hiệu lực ức chế (%)						
		Đối chứng	Nano bạc (mg/L)					PC (Hex)
			0,1 (mg/L)	1 (mg/L)	10 (mg/L)	20 (mg/L)	30 (mg/L)	
Exserohilum	VNHUCC.NEL56	0	0,000	0,000	49,667	69,333	73,292	7,000
Curvularia	VNHUCC.NEL57	0	-2,583	25,534	68,902	71,088	79,185	3,428
Curvularia	VNHUCC.NEL82	0	0,000	0,000	27,875	54,167	65,292	26,583
Curvularia	VNHUCC.NEL80	0	0,000	0,000	0,000	1,042	24,208	0,000
Curvularia	VNHUCC.NEL51	0	4,422	18,848	76,954	82,180	90,085	42,251
Curvularia	VNHUCC.NEL94	0	0,000	0,000	4,583	7,083	67,583	0,000
Curvularia	VNHUCC.NEL37	0	4,167	3,000	39,792	41,750	72,417	100,000
Curvularia	VNHUCC.NEL95	0	0,000	0,000	23,208	28,958	53,958	2,667
Curvularia	VNHUCC.NEL93	0	0,000	13,292	24,458	44,917	77,167	45,875
Curvularia	VNHUCC.NEL31	0	0,000	0,000	4,750	21,542	87,333	100,000
Curvularia	VNHUCC.NEL32	0	12,619	11,433	33,444	63,994	80,550	49,715
Curvularia	VNHUCC.NEL42	0	11,685	8,822	10,934	48,569	69,404	100,000
Curvularia	VNHUCC.NEL74	0	15,189	17,083	27,797	56,670	83,649	34,122
Colletotrichum	VNHUCC.NEL71	0	0,000	0,542	18,833	34,250	63,750	79,042
Colletotrichum	VNHUCC.NEL10	0	3,237	1,925	36,177	44,269	71,522	5,293
Colletotrichum	VNHUCC.NEL91	0	0,000	7,333	13,917	27,625	66,833	4,750

Colletotrichum	VNHUCC.NEL52	0	0,000	0,000	1,833	29,792	58,417	45,417
Colletotrichum	VNHUCC.NEL92	0	0,000	0,000	18,083	34,375	70,750	32,417
Colletotrichum	VNHUCC.NEL72	0	0,000	0,000	1,375	6,000	26,833	0,000
Colletotrichum	VNHUCC.NEL70	0	2,849	0,407	9,815	24,514	100,000	0,407
Lasiodiplodia	VUNHUCC.NEL38	0	0,000	0,000	0,000	0,000	65,625	0,000
Neofusicoccum	VNHUCC.NEL18	0	0,000	0,000	54,750	58,958	78,583	5,958
Neopestalotiopsis	VNHUCC.NEL13	0	0,000	0,000	61,292	83,375	76,083	1,542
Diaporthe	VNHUCC.NEL77	0	0,000	0,000	98,750	99,500	100,000	24,292
Diaporthe	VNHUCC.NEL20	0	0,000	0,000	9,542	69,333	77,500	0,000
Diaporthe	VNHUCC.NEL88	0	0,000	0,000	3,208	64,958	69,458	0,000
Diaporthe	VNHUCC.NEL89	0	0,000	0,000	0,000	60,042	63,292	100,000
Nigrospoera	VNHUCC.NEL30	0	0,000	0,000	49,667	69,333	73,625	0,000
Aspergillus	VNHUCC.NEL160	0	0,000	1,725	45,020	56,471	73,647	86,784

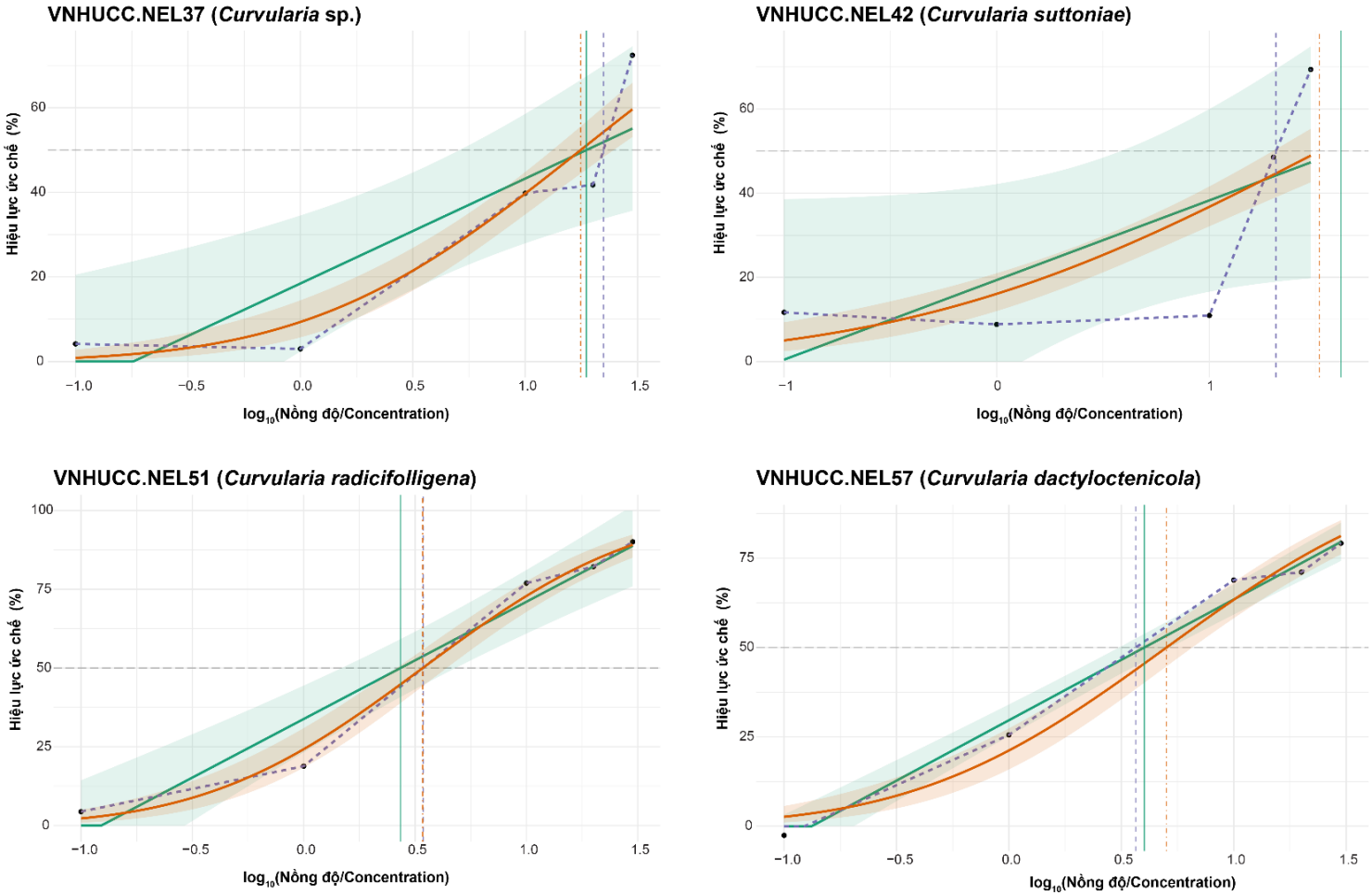
Phụ lục Bảng 4.2. Giá trị EC_{50} theo đường cong liều lượng-đáp ứng (dose-response) của các chủng phân lập đại diện dựa trên ba mô hình hồi quy logarit tuyến tính, nội suy theo trục nồng độ log_{10} và hồi quy Probit với phép chuyển đổi log_{10}

Chi/Loài	Chủng phân lập	EC_{50} (theo hồi quy logarit tuyến tính)	R^2 (Logarit tuyến tính)	EC_{50} (nội suy theo trục nồng độ log_{10})	EC_{50} (theo hồi quy Probit-log_{10})	R^2 (Probit log_{10})
Exserohilum rostratum	VNHUCC.NEL56	8,117	0,878	10,118	12,075	0,929
Curvularia dactyloctenicola	VNHUCC.NEL57	3,871	0,986	3,666	5,022	0,886
Curvularia sp.	VNHUCC.NEL80	**EC_{50} >30** (974800664)	0,267	**NA**	10,739	0,919
Curvularia sp.	VNHUCC.NEL82	22,035	0,811	17,919	18,876	0,933
C. plantarum	VNHUCC.NEL93	18,980	0,741	21,320	17,486	0,774
Curvularia sp.	VNHUCC.NEL94	**EC_{50} >30** (479,552)	0,331	26,665	27,715	0,816
C. senegalensis	VNHUCC.NEL95	**EC_{50} >30** (120,915)	0,755	28,135	**EC_{50} >30** (30,012)	0,879
Curvularia sp.	VNHUCC.NEL31	**EC_{50} >30** (56,639)	0,406	23,834	22,543	0,895
C. plantarum	VNHUCC.NEL32	8,522	0,740	14,559	9,442	0,677
Curvularia sp.	VNHUCC.NEL37	18,728	0,782	22,305	17,656	0,778
C. suttoniae	VNHUCC.NEL42	**EC_{50} >30** (41,586)	0,509	20,565	**EC_{50} >30** (32,949)	0,488
C. radicifoliigena	VNHUCC.NEL51	2,721	0,949	3,436	3,422	0,919
C. verruculosa	VNHUCC.NEL74	9,810	0,645	17,041	10,235	0,590
Colletotrichum siamense	VNHUCC.NEL10	19,700	0,791	21,779	18,051	0,802
C. endophyticum	VNHUCC.NEL52	**EC_{50} >30** (228,298)	0,508	26,628	26,703	0,938
C. siamense	VNHUCC.NEL70	27,532	0,405	22,934	20,853	0,511

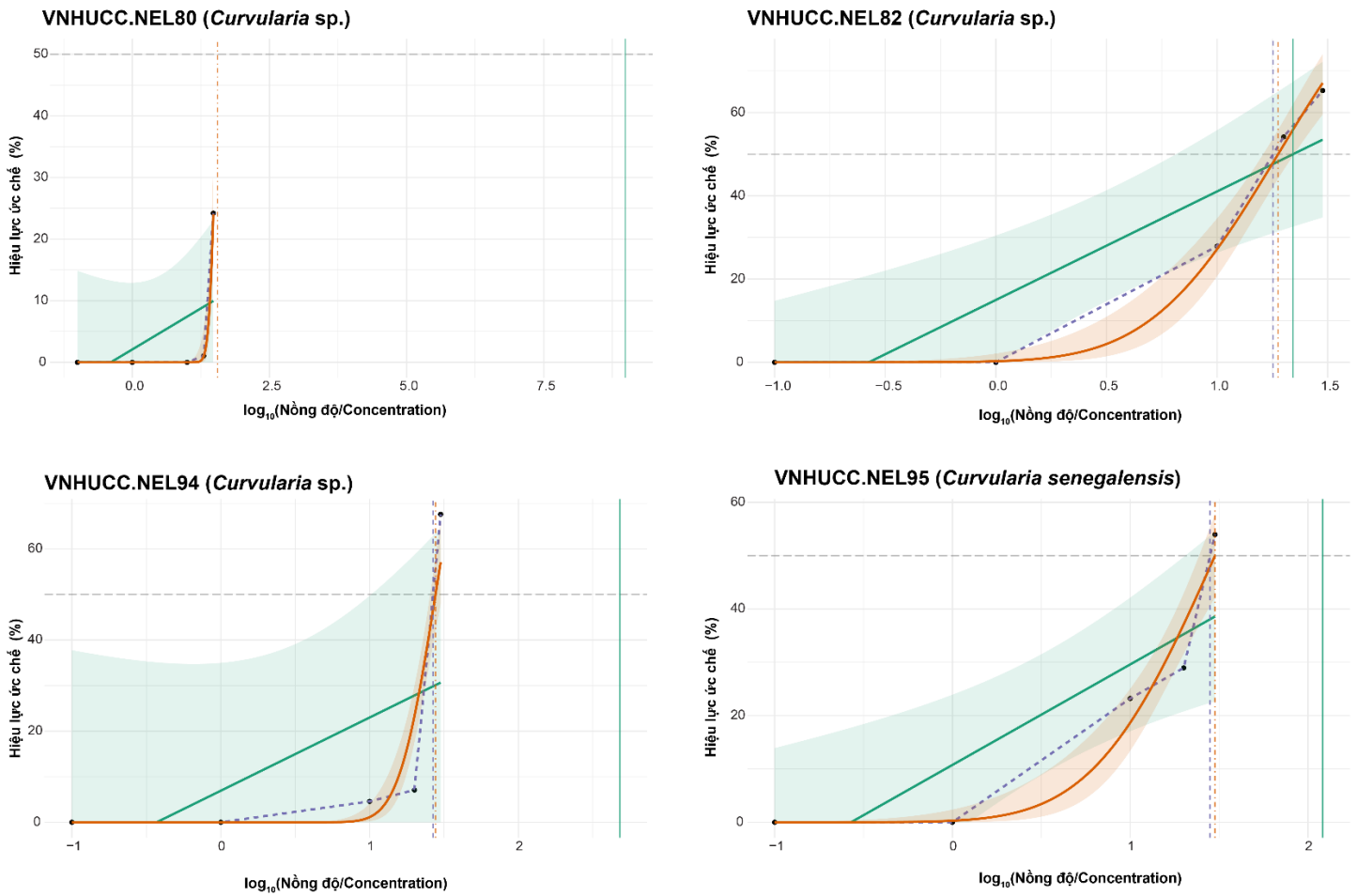
C. tropicale	VNHUCC.NEL71	**EC_{50} >30** (63,047)	0,694	24,833	25,339	0,881
C. siamense	VNHUCC.NEL72	**EC_{50} >30** (6696763)	0,393	**NA**	**EC_{50} >30** (43,543)	0,861
C. fructicola	VNHUCC.NEL91	**EC_{50} >30** (86,236)	0,586	25,207	**EC_{50} >30** (32,670)	0,720
C. plurivorum	VNHUCC.NEL92	46,410	0,648	23,805	22,418	0,907
Neopestalotiopsis sp.	VNHUCC.NEL13	5,182	0,870	6,543	9,139	0,915
Neofusicoccum parvum	VNHUCC.NEL18	8,146	0,870	8,189	11,897	0,915
Nigrospora lacticolonia	VNHUCC.NEL30	8,065	0,878	10,118	11,983	0,932
Lasiodiplodia theobromae	VNHUCC.NEL38	**EC_{50} >30** (1572,324)	0,245	27,239	29,279	0,981
Aspergillus niger	VNHUCC.NEL160	11,135	0,876	13,518	13,657	0,924
Diaporthe hongkongensis	VNHUCC.NEL20	15,578	0,622	15,984	17,876	0,936
Diaporthe sp.	VNHUCC.NEL77	2,274	0,860	3,209	3,871	0,984
Diaporthe sp.	VNHUCC.NEL88	25,738	0,568	16,908	20,299	0,899
Diaporthe tectonae	VNHUCC.NEL89	**EC_{50} >30** (41,690)	0,537	17,811	22,069	0,870



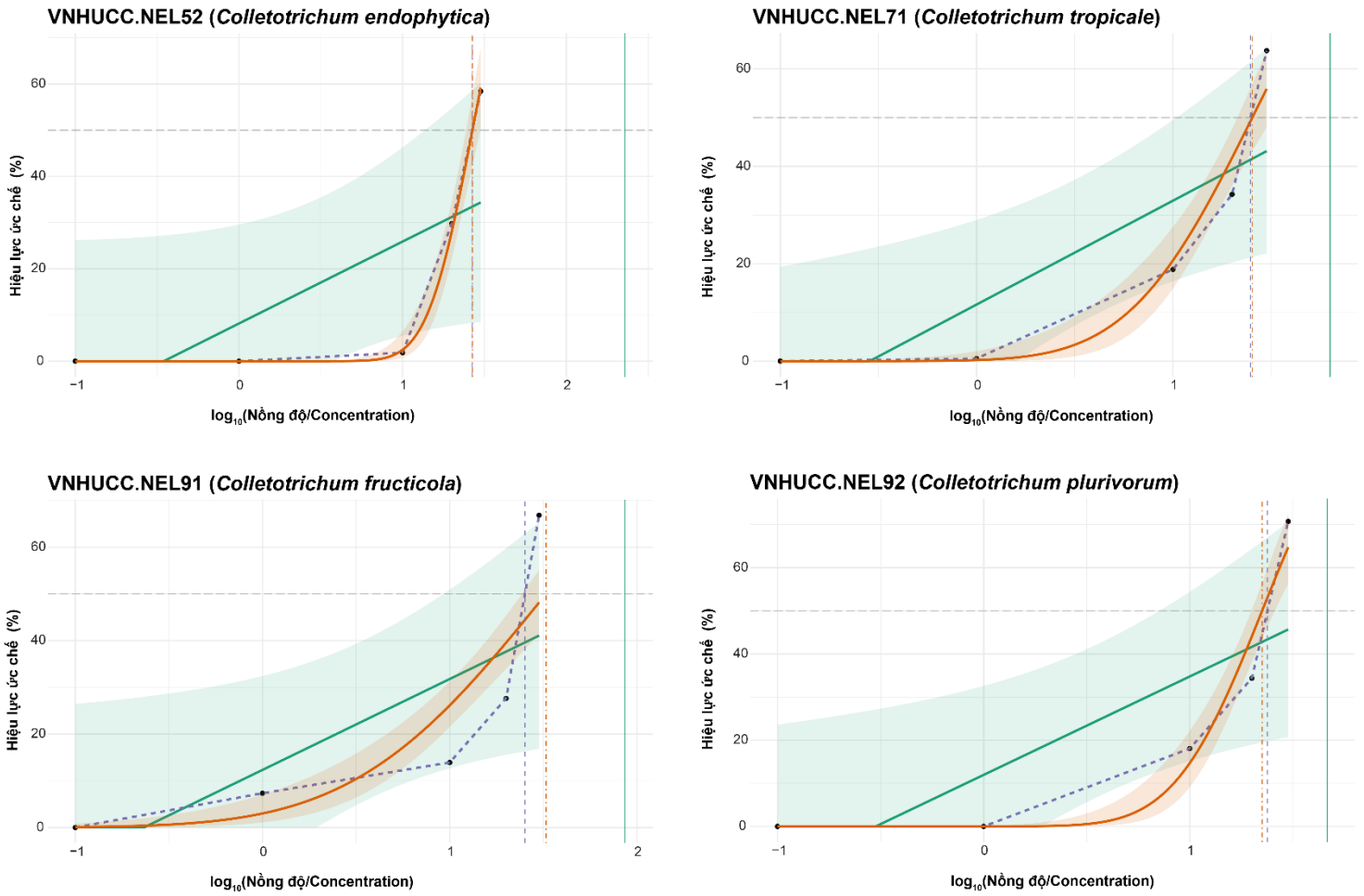
Phụ lục Hình 4.1. Đường (cong) nồng độ - đáp ứng cùng với vị trí xác định ngưỡng EC_{50} của các chủng phân lập đại diện tương ứng theo các điểm dữ liệu thực nghiệm. Các đường màu xanh lục: thể hiện đường đáp ứng theo mô hình logarit tuyến tính (Linear-log regression), màu tím: thể hiện đường đáp ứng theo phương pháp nội suy theo trục nồng độ log_{10} (log interpolation), đường màu cam: thể hiện đường đáp ứng theo mô hình Probit log_{10}. Các đường dọc đánh dấu giá trị EC_{50} theo từng mô hình tương ứng với cùng màu sắc. Các dải mờ màu biểu thị khoảng tin cậy 95% của các ước tính.



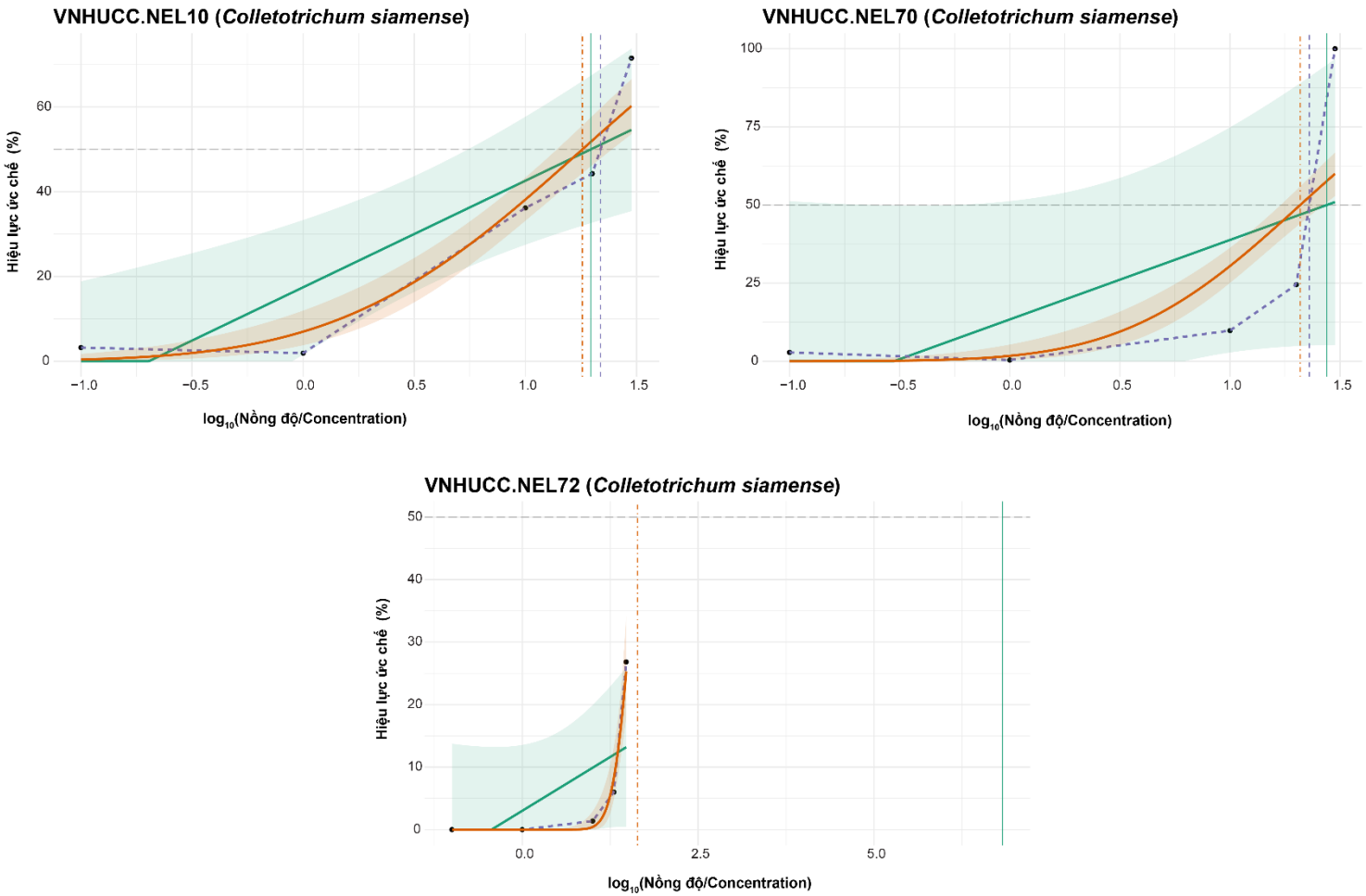
Phụ lục Hình 4.2. Đường (cong) nồng độ - đáp ứng cùng với vị trí xác định ngưỡng EC_{50} của các chủng phân lập đại diện tương ứng theo các điểm dữ liệu thực nghiệm. Các đường màu xanh lục: thể hiện đường đáp ứng theo mô hình logarit tuyến tính (Linear-log regression), màu tím: thể hiện đường đáp ứng theo phương pháp nội suy theo trục nồng độ $\log_{10}$ (log interpolation), đường màu cam: thể hiện đường đáp ứng theo mô hình Probit $\log_{10}$. Các đường dọc đánh dấu giá trị EC50 theo từng mô hình tương ứng với cùng màu sắc. Các dải mờ màu biểu thị khoảng tin cậy 95% của các ước tính.



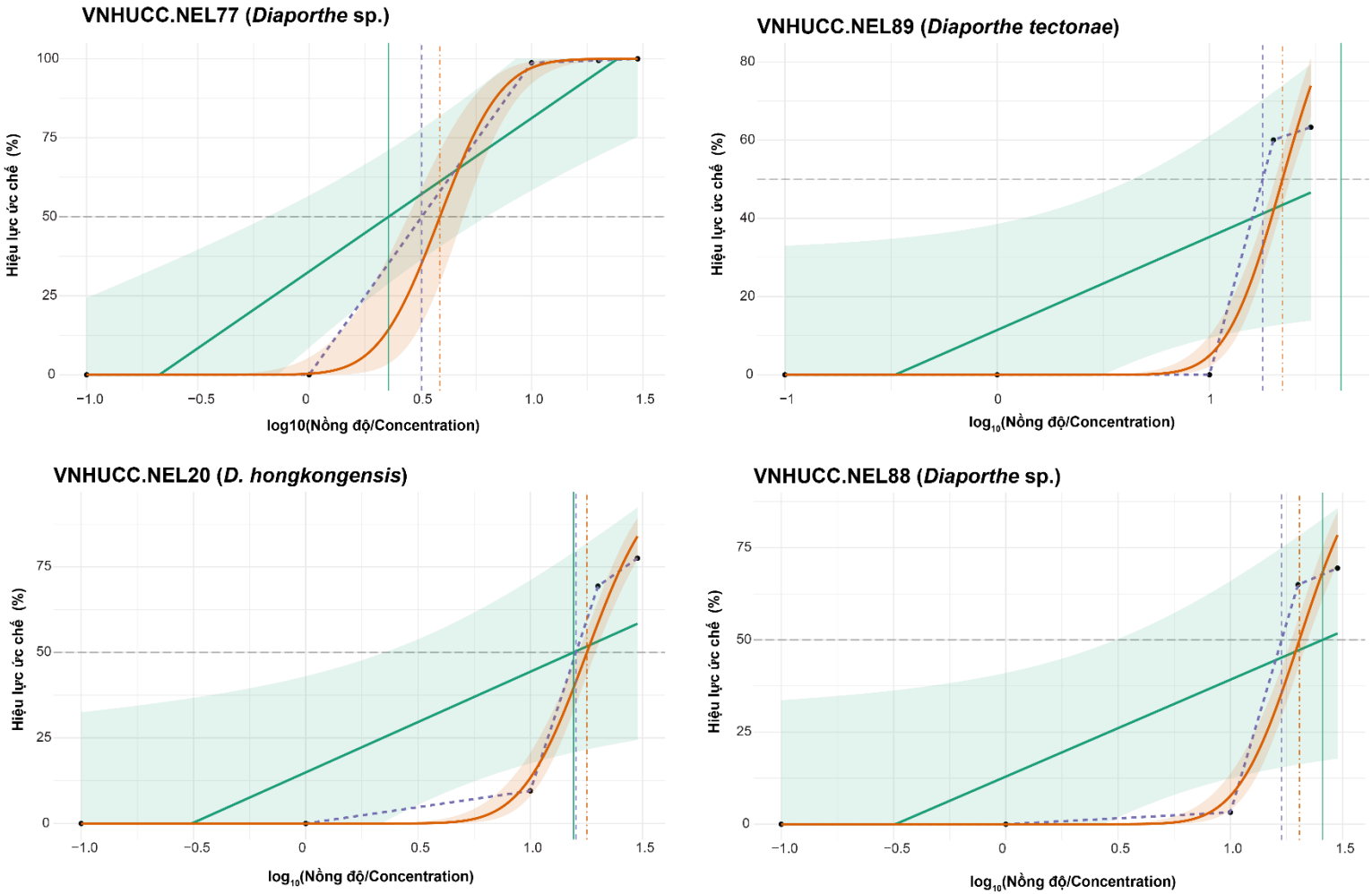
Phụ lục Hình 4.3. Đường (cong) nồng độ - đáp ứng cùng với vị trí xác định ngưỡng EC_{50} của các chủng phân lập đại diện tương ứng theo các điểm dữ liệu thực nghiệm. Các đường màu xanh lục: thể hiện đường đáp ứng theo mô hình logarit tuyến tính (Linear-log regression), màu tím: thể hiện đường đáp ứng theo phương pháp nội suy theo trục nồng độ $\log_{10}$ (log interpolation), đường màu cam: thể hiện đường đáp ứng theo mô hình Probit $\log_{10}$. Các đường dọc đánh dấu giá trị EC50 theo từng mô hình tương ứng với cùng màu sắc. Các dải mờ màu biểu thị khoảng tin cậy 95% của các ước tính.



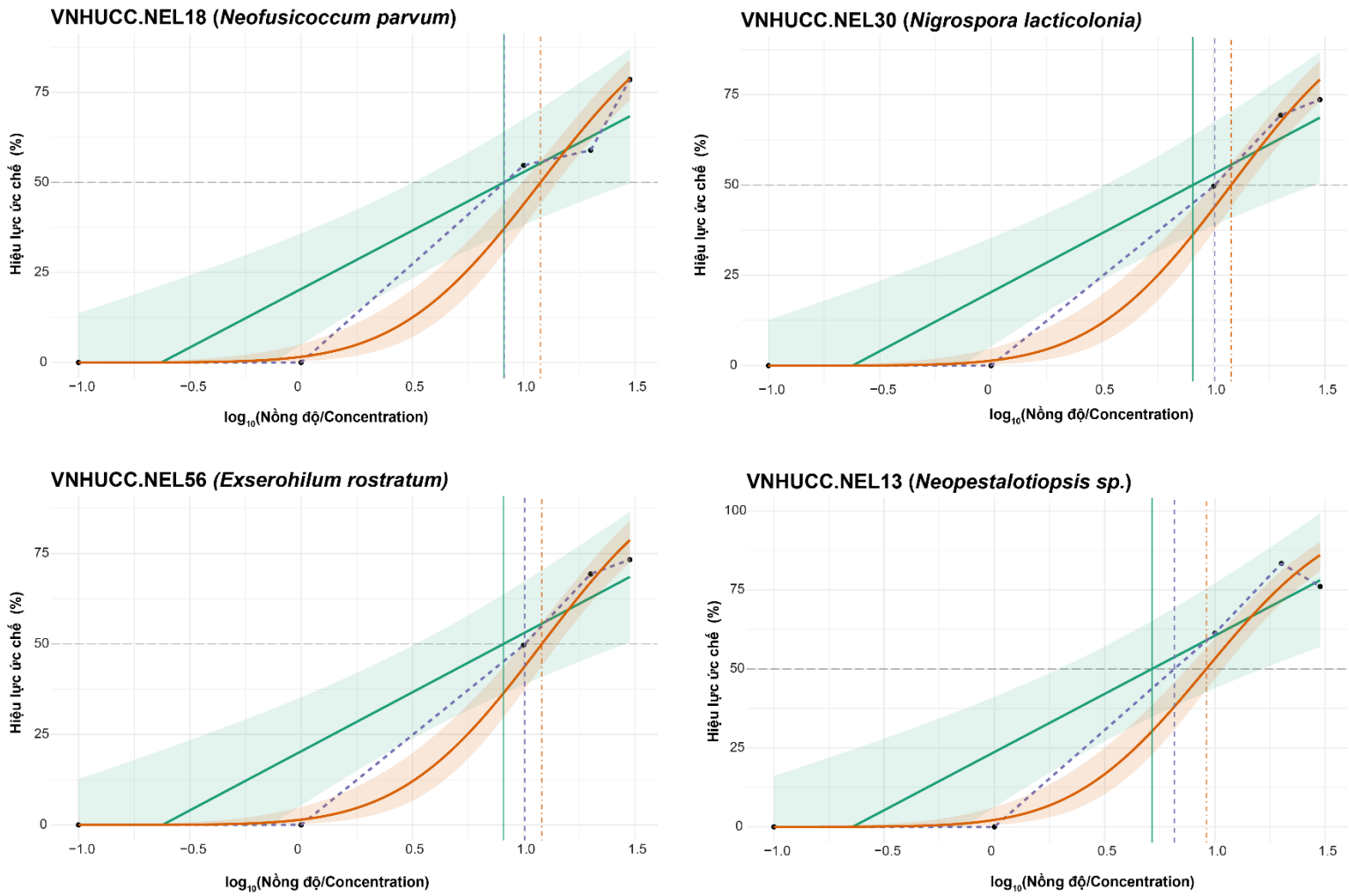
Phụ lục Hình 4.4. Đường (cong) nồng độ - đáp ứng cùng với vị trí xác định ngưỡng EC_{50} của các chủng phân lập đại diện tương ứng theo các điểm dữ liệu thực nghiệm. Các đường màu xanh lục: thể hiện đường đáp ứng theo mô hình logarit tuyến tính (Linear-log regression), màu tím: thể hiện đường đáp ứng theo phương pháp nội suy theo trục nồng độ $\log_{10}$ (log interpolation), đường màu cam: thể hiện đường đáp ứng theo mô hình Probit $\log_{10}$. Các đường dọc đánh dấu giá trị EC_{50} theo từng mô hình tương ứng với cùng màu sắc. Các dải mờ màu biểu thị khoảng tin cậy 95% của các ước tính.



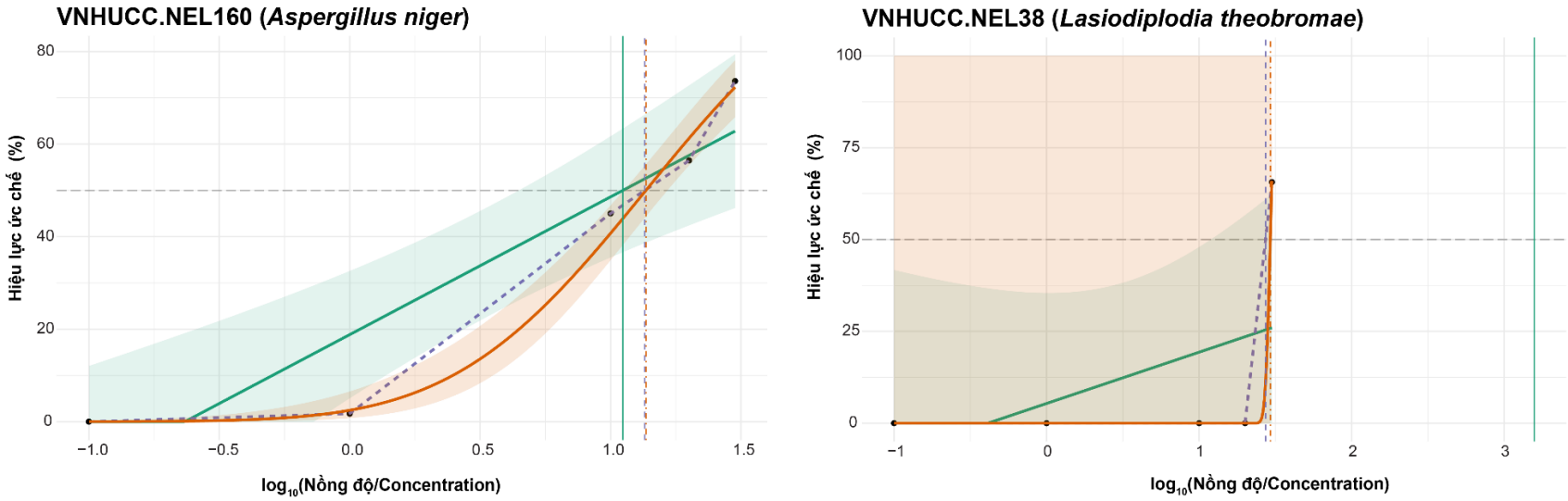
Phụ lục Hình 4.5. Đường (cong) nồng độ - đáp ứng cùng với vị trí xác định ngưỡng EC_{50} của các chủng phân lập đại diện tương ứng theo các điểm dữ liệu thực nghiệm. Các đường màu xanh lục: thể hiện đường đáp ứng theo mô hình logarit tuyến tính (Linear-log regression), màu tím: thể hiện đường đáp ứng theo phương pháp nội suy theo trục nồng độ log_{10} (log interpolation), đường màu cam: thể hiện đường đáp ứng theo mô hình Probit log_{10}. Các đường dọc đánh dấu giá trị EC_{50} theo từng mô hình tương ứng với cùng màu sắc. Các dải mờ màu biểu thị khoảng tin cậy 95% của các ước tính.



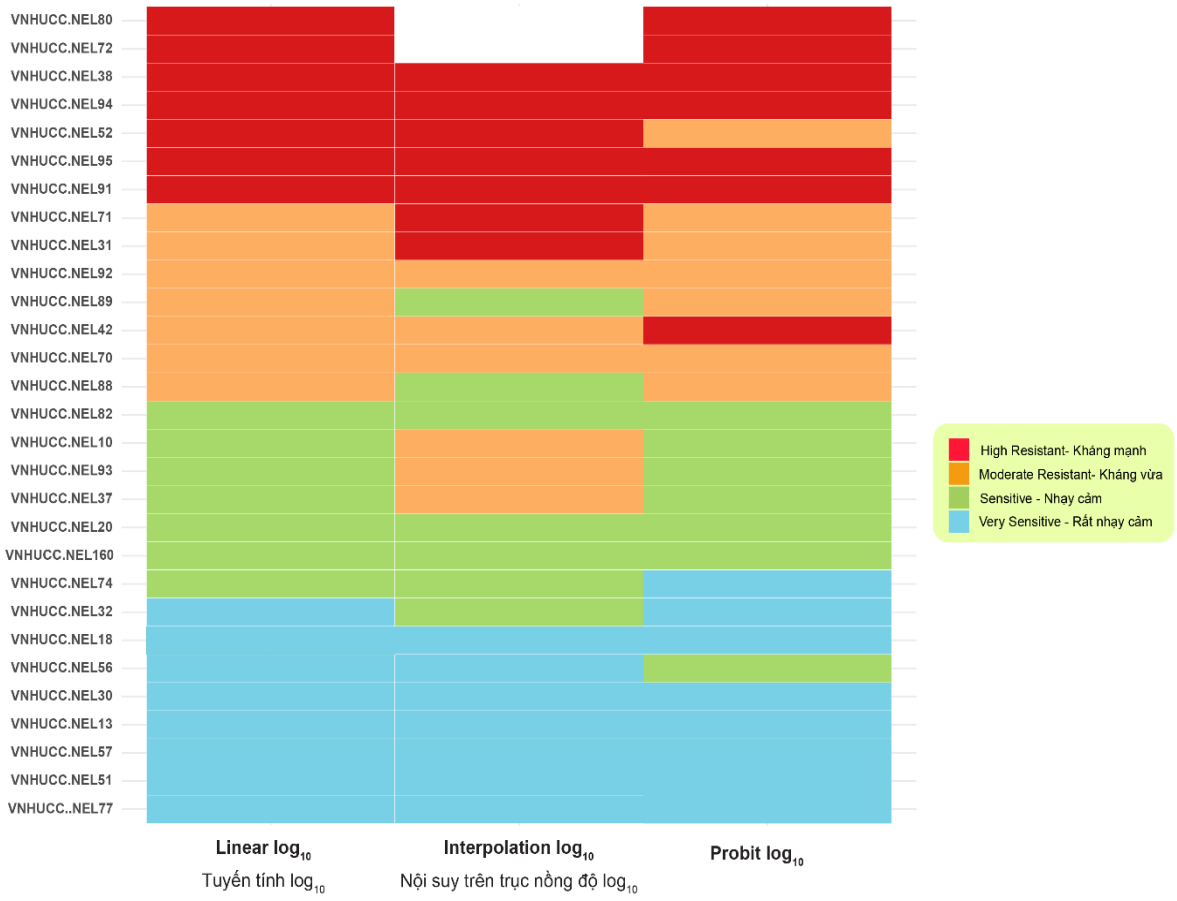
Phụ lục Hình 4.6. Đường (cong) nồng độ - đáp ứng cùng với vị trí xác định ngưỡng EC_{50} của các chủng phân lập đại diện tương ứng theo các điểm dữ liệu thực nghiệm. Các đường màu xanh lục: thể hiện đường đáp ứng theo mô hình logarit tuyến tính (Linear-log regression), màu tím: thể hiện đường đáp ứng theo phương pháp nội suy theo trục nồng độ log_{10} (log interpolation), đường màu cam: thể hiện đường đáp ứng theo mô hình Probit log_{10}. Các đường dọc đánh dấu giá trị EC_{50} theo từng mô hình tương ứng với cùng màu sắc. Các dải mờ màu biểu thị khoảng tin cậy 95% của các ước tính.



Phụ lục Hình 4.7. Đường (cong) nồng độ - đáp ứng cùng với vị trí xác định ngưỡng EC_{50} của các chủng phân lập đại diện tương ứng theo các điểm dữ liệu thực nghiệm. Các đường màu xanh lục: thể hiện đường đáp ứng theo mô hình logarit tuyến tính (Linear-log regression), màu tím: thể hiện đường đáp ứng theo phương pháp nội suy theo trục nồng độ log_{10} (log interpolation), đường màu cam: thể hiện đường đáp ứng theo mô hình Probit log_{10}. Các đường dọc đánh dấu giá trị EC50 theo từng mô hình tương ứng với cùng màu sắc. Các dải mờ màu biểu thị khoảng tin cậy 95% của các ước tính.



Phụ lục Hình 4.8. Đường (cong) nồng độ - đáp ứng cùng với vị trí xác định ngưỡng EC_{50} của các chủng phân lập đại diện tương ứng theo các điểm dữ liệu thực nghiệm. Các đường màu xanh lục: thể hiện đường đáp ứng theo mô hình logarit tuyến tính (Linear-log regression), màu tím: thể hiện đường đáp ứng theo phương pháp nội suy theo trục nồng độ log_{10} (log interpolation), đường màu cam: thể hiện đường đáp ứng theo mô hình Probit log_{10}. Các đường dọc đánh dấu giá trị EC_{50} theo từng mô hình tương ứng với cùng màu sắc. Các dải mờ màu biểu thị khoảng tin cậy 95% của các ước tính.



Phụ lục Hình 4.9. Sự khác biệt trong phân bố mức độ nhạy cảm của các chủng phân lập theo dữ liệu giá trị ước tính EC_{50} tương ứng với các mô hình ước tính khác nhau

Bảng phụ lục 4.3. Giá trị OD_{260} trung bình theo các mốc thời gian (3, 12, 24, 36, 48 giờ) dưới các điều kiện xử lý khác nhau (Control – Đối chứng, AgNPs 5 mg/L và AgNPs 30 mg/L.

ID	Time	Control	AgNPs 5	AgNPs30
NEL10	**3**	0,155333	0,193667	0,198333
	12	0,165	0,202667	0,219
	24	0,174	0,247	0,297333
	36	0,174333	0,263	0,357333
	48	0,177667	0,274667	0,362
NEL160	**3**	0,221667	0,255333	0,296667
	12	0,246333	0,279667	0,339
	24	0,256	0,304667	0,384667
	36	0,265333	0,330667	0,413333
	48	0,262333	0,362333	0,450667
NEL38	**3**	0,143	0,165667	0,174667
	12	0,156	0,170667	0,191333
	24	0,166	0,206	0,256667
	36	0,173333	0,247667	0,303333
	48	0,181333	0,281	0,311333
NEL51	**3**	0,054333	0,127333	0,223333
	12	0,088333	0,168667	0,270333
	24	0,119333	0,191333	0,330667
	36	0,137333	0,252333	0,408333
	48	0,172667	0,293	0,451333
NEL56	**3**	0,134667	0,138333	0,152
	12	0,142667	0,151667	0,175667
	24	0,184	0,221667	0,295333
	36	0,204	0,260333	0,354667
	48	0,213667	0,289667	0,414
NEL74	**3**	0,098667	0,110333	0,122667
	12	0,123	0,147333	0,155333
	24	0,129667	0,211333	0,291
	36	0,134667	0,233333	0,321333
	48	0,138667	0,238	0,331667
NEL80	**3**	0,084	0,095333	0,122333
	12	0,092333	0,113667	0,194667
	24	0,123333	0,146667	0,258
	36	0,144	0,166	0,293667
	48	0,162667	0,189333	0,325333
NEL93	**3**	0,123333	0,136	0,153333
	12	0,138333	0,184	0,24
	24	0,156667	0,216667	0,260667
	36	0,18	0,235667	0,304
	48	0,194333	0,263	0,39

Bảng phụ lục 4.4. Giá trị độ dẫn diện ngoại bào (EEC) theo các mốc thời gian (3, 12, 24, 36, 48 giờ) dưới các điều kiện xử lý khác nhau.

ID	Time	Treatment	Mean	SD
NEL10	3	AgNPs30	97	2
NEL10	3	AgNPs5	90,66667	1,154701
NEL10	3	Control	88	2,645751
NEL10	12	AgNPs30	103	2,645751
NEL10	12	AgNPs5	96	1
NEL10	12	Control	90,66667	0,57735
NEL10	24	AgNPs30	125,3333	2,309401
NEL10	24	AgNPs5	105,3333	1,527525
NEL10	24	Control	93,33333	1,154701
NEL10	36	AgNPs30	155,6667	1,154701
NEL10	36	AgNPs5	129,6667	0,57735
NEL10	36	Control	95,33333	1,527525
NEL10	48	AgNPs30	190,6667	4,041452
NEL10	48	AgNPs5	139	2,645751
NEL10	48	Control	100,3333	1,527525
NEL160	3	AgNPs30	123	2,645751
NEL160	3	AgNPs5	117,3333	2,516611
NEL160	3	Control	95	2
NEL160	12	AgNPs30	134,6667	3,785939
NEL160	12	AgNPs5	127	1,732051
NEL160	12	Control	101	1
NEL160	24	AgNPs30	146,3333	3,05505
NEL160	24	AgNPs5	135,3333	1,527525
NEL160	24	Control	103,6667	1,527525
NEL160	36	AgNPs30	182,3333	3,05505
NEL160	36	AgNPs5	156,6667	2,081666
NEL160	36	Control	107	1
NEL160	48	AgNPs30	217,3333	3,05505
NEL160	48	AgNPs5	177	2,645751
NEL160	48	Control	112	3
NEL38	3	AgNPs30	97	0
NEL38	3	AgNPs5	85,66667	3,511885
NEL38	3	Control	85,33333	1,527525
NEL38	12	AgNPs30	104	1,732051
NEL38	12	AgNPs5	91,66667	0,57735
NEL38	12	Control	88,66667	0,57735
NEL38	24	AgNPs30	114	2
NEL38	24	AgNPs5	102	2,645751
NEL38	24	Control	92,33333	1,527525
NEL38	36	AgNPs30	121	1
NEL38	36	AgNPs5	110	1
NEL38	36	Control	94,66667	0,57735

NEL38	48	AgNPs30	164,3333	2,081666
NEL38	48	AgNPs5	134,3333	3,05505
NEL38	48	Control	100	1,732051
NEL51	3	AgNPs30	89,33333	4,041452
NEL51	3	AgNPs5	90,66667	1,527525
NEL51	3	Control	79,33333	1,154701
NEL51	12	AgNPs30	116,6667	2,081666
NEL51	12	AgNPs5	101	4,582576
NEL51	12	Control	66,33333	1,527525
NEL51	24	AgNPs30	124,3333	2,886751
NEL51	24	AgNPs5	111,6667	2,886751
NEL51	24	Control	71	1,732051
NEL51	36	AgNPs30	147	1
NEL51	36	AgNPs5	138,6667	1,527525
NEL51	36	Control	84,66667	2,516611
NEL51	48	AgNPs30	182	4
NEL51	48	AgNPs5	156,3333	1,527525
NEL51	48	Control	94,33333	1,527525
NEL56	3	AgNPs30	108,3333	1,527525
NEL56	3	AgNPs5	103	1
NEL56	3	Control	102,3333	2,516611
NEL56	12	AgNPs30	129,6667	1,527525
NEL56	12	AgNPs5	121,3333	2,081666
NEL56	12	Control	114	2,645751
NEL56	24	AgNPs30	164,3333	2,081666
NEL56	24	AgNPs5	131,6667	1,527525
NEL56	24	Control	118,6667	1,527525
NEL56	36	AgNPs30	195,6667	3,05505
NEL56	36	AgNPs5	162,3333	2,516611
NEL56	36	Control	120	1
NEL56	48	AgNPs30	211,6667	3,05505
NEL56	48	AgNPs5	173,3333	3,511885
NEL56	48	Control	123	2
NEL74	3	AgNPs30	110,6667	3,05505
NEL74	3	AgNPs5	110,3333	1,527525
NEL74	3	Control	87,66667	2,081666
NEL74	12	AgNPs30	128	2,645751
NEL74	12	AgNPs5	128,3333	0,57735
NEL74	12	Control	90,33333	2,886751
NEL74	24	AgNPs30	148	3,605551
NEL74	24	AgNPs5	141,6667	2,886751
NEL74	24	Control	91	1
NEL74	36	AgNPs30	203,3333	3,511885
NEL74	36	AgNPs5	170	3
NEL74	36	Control	99	3,605551
NEL74	48	AgNPs30	235,3333	0,57735

NEL74	48	AgNPs5	193,3333	6,027714
NEL74	48	Control	104,6667	1,527525
NEL80	3	AgNPs30	108,6667	1,527525
NEL80	3	AgNPs5	100,6667	1,154701
NEL80	3	Control	96	2
NEL80	12	AgNPs30	117,3333	2,516611
NEL80	12	AgNPs5	106	2
NEL80	12	Control	99	1
NEL80	24	AgNPs30	155	2,645751
NEL80	24	AgNPs5	131,3333	3,511885
NEL80	24	Control	101	1
NEL80	36	AgNPs30	175,6667	3,21455
NEL80	36	AgNPs5	146,3333	2,309401
NEL80	36	Control	100	2
NEL80	48	AgNPs30	192,6667	2,081666
NEL80	48	AgNPs5	159,3333	3,05505
NEL80	48	Control	104,3333	2,081666
NEL93	3	AgNPs30	104,6667	1,154701
NEL93	3	AgNPs5	96	3,605551
NEL93	3	Control	84,33333	3,05505
NEL93	12	AgNPs30	125,6667	2,081666
NEL93	12	AgNPs5	110,3333	1,527525
NEL93	12	Control	89,33333	2,516611
NEL93	24	AgNPs30	144	1,732051
NEL93	24	AgNPs5	123,6667	4,50925
NEL93	24	Control	94	2
NEL93	36	AgNPs30	188,3333	1,527525
NEL93	36	AgNPs5	149,3333	3,05505
NEL93	36	Control	107,3333	2,516611
NEL93	48	AgNPs30	214,6667	4,50925
NEL93	48	AgNPs5	167	2
NEL93	48	Control	111,6667	1,527525

Bảng phụ lục 4.5. Giá trị hàm lượng MDA của 8 chủng phân lập dưới các điều kiện xử lý khác nhau.

	Chủng phân lập	**Hàm lượng MDA (%)**	**SD**
Control (Đối chứng)	NEL93	8,37	0,23
	NEL80	7,53	0,15
	NEL74	8,80	0,17
	NEL51	7,44	0,05
	NEL56	4,77	0,21
	NEL160	9,57	0,51
	NEL38	7,10	0,46
	NEL10	6,80	0,80

5 mg/L	NEL93	14,67	0,45
	NEL80	11,57	0,40
	NEL74	16,57	0,23
	NEL51	15,67	0,05
	NEL56	11,73	0,46
	NEL160	13,00	0,50
	NEL38	8,93	0,31
	NEL10	10,57	0,31
30 mg/L	NEL93	18,73	0,23
	NEL80	13,77	0,21
	NEL74	21,33	0,29
	NEL51	20,40	0,17
	NEL56	14,90	0,17
	NEL160	16,93	0,45
	NEL38	13,30	0,78
	NEL10	15,37	0,15

Phụ lục Bảng 4.6. Kết quả phân tích sự khác biệt có ý nghĩa thống kê theo từng cặp của MDA

		Posthoc Turkey Results (MDA)			
ID	**Comparison**	**diff**	**lwr**	**upr**	**p adj**
NEL93	5 mg/L-30 mg/L	-4,06667	-4,87199	-3,26135	1,09E-05
NEL93	Control-30 mg/L	-10,3667	-11,172	-9,56135	5,7E-08
NEL93	Control-5 mg/L	-6,3	-7,10532	-5,49468	1,01E-06
NEL80	5 mg/L-30 mg/L	-2,2	-2,89367	-1,50633	0,000167
NEL80	Control-30 mg/L	-6,23333	-6,927	-5,53967	5,63E-07
NEL80	Control-5 mg/L	-4,03333	-4,727	-3,33967	4,52E-06
NEL74	5 mg/L-30 mg/L	-4,76667	-5,35716	-4,17618	8,87E-07
NEL74	Control-30 mg/L	-12,5333	-13,1238	-11,9428	3,22E-11
NEL74	Control-5 mg/L	-7,76667	-8,35716	-7,17618	4,69E-08
NEL51	5 mg/L-30 mg/L	-4,72667	-4,99701	-4,45633	1,4E-09
NEL51	Control-30 mg/L	-12,96	-13,2303	-12,6897	6,42E-14
NEL51	Control-5 mg/L	-8,23333	-8,50367	-7,96299	6,44E-14
NEL56	5 mg/L-30 mg/L	-3,16667	-3,94109	-2,39225	3,87E-05
NEL56	Control-30 mg/L	-10,1333	-10,9078	-9,35891	4,92E-08

NEL56	Control-5 mg/L	-6,96667	-7,74109	-6,19225	5,61E-07
NEL160	5 mg/L-30 mg/L	-3,93333	-5,1578	-2,70887	0,000155
NEL160	Control-30 mg/L	-7,36667	-8,59113	-6,1422	3,67E-06
NEL160	Control-5 mg/L	-3,43333	-4,6578	-2,20887	0,000333
NEL38	5 mg/L-30 mg/L	-4,36667	-5,74897	-2,98437	0,00017
NEL38	Control-30 mg/L	-6,2	-7,5823	-4,8177	2,24E-05
NEL38	Control-5 mg/L	-1,83333	-3,21563	-0,45103	0,015497
NEL10	5 mg/L-30 mg/L	-4,8	-6,05817	-3,54183	5,79E-05
NEL10	Control-30 mg/L	-8,56667	-9,82484	-7,30849	1,86E-06
NEL10	Control-5 mg/L	-3,76667	-5,02484	-2,50849	0,000231

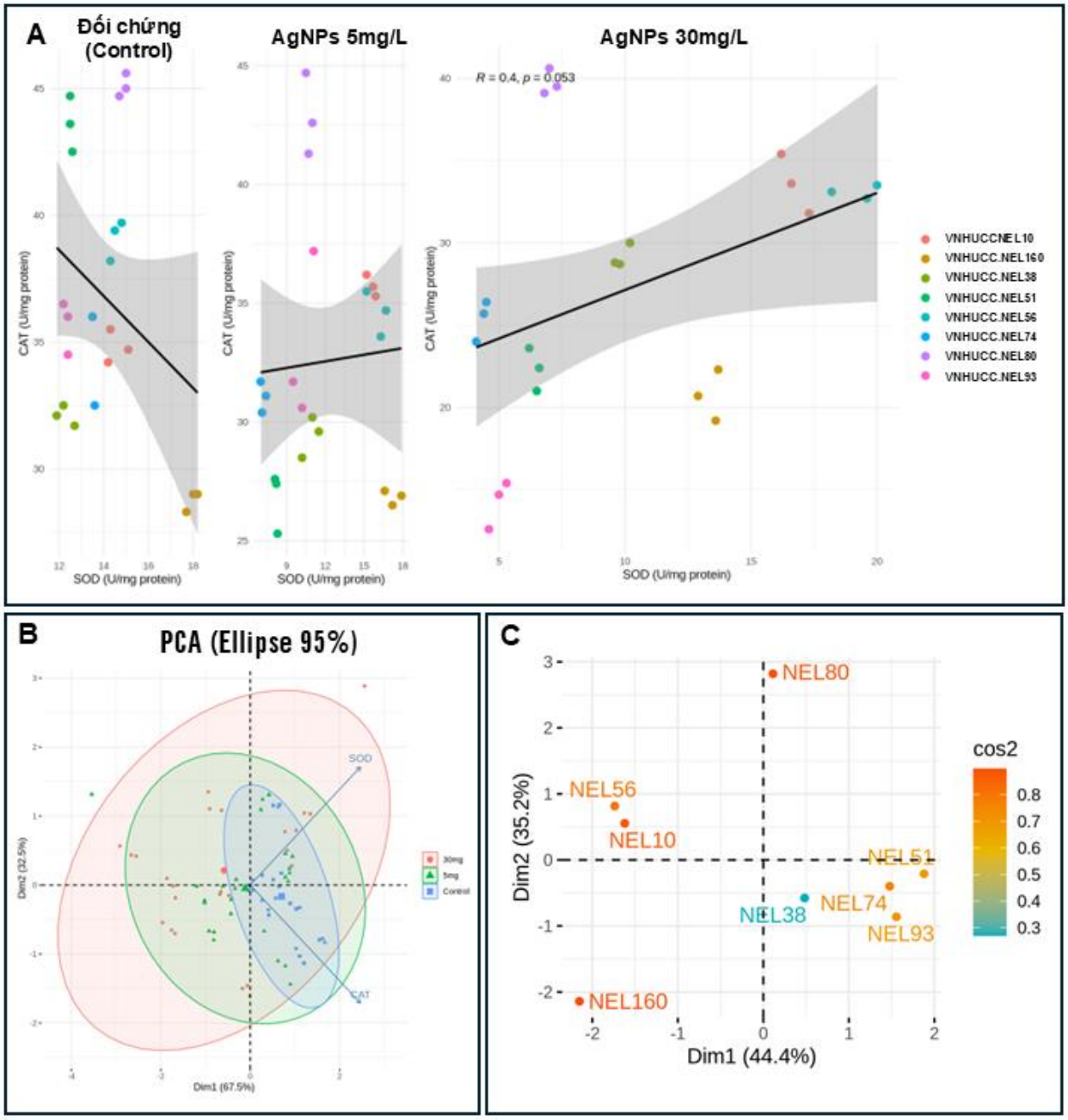
Phụ lục Bảng 4.7. Hàm lượng ergosterol (%) theo từng chủng phân lập

ID	Treatment	Mean	SD
NEL10	30 mg/L	0,026667	0,001528
NEL10	5 mg/L	0,033333	0,001528
NEL10	Control	0,042333	0,002517
NEL160	30 mg/L	0,036667	0,001528
NEL160	5 mg/L	0,043333	0,001528
NEL160	Control	0,062	0,003
NEL38	30 mg/L	0,032667	0,002082
NEL38	5 mg/L	0,037	0,003606
NEL38	Control	0,054667	0,005033
NEL51	30 mg/L	0,015333	0,002082
NEL51	5 mg/L	0,040667	0,001155
NEL51	Control	0,049667	0,002517
NEL56	30 mg/L	0,018667	0,001528
NEL56	5 mg/L	0,0225	0,0015
NEL56	Control	0,039	0,001732
NEL74	30 mg/L	0,022333	0,002517
NEL74	5 mg/L	0,041667	0,002517

NEL74	Control	0,052333	0,003215
NEL80	30 mg/L	0,022	0,002
NEL80	5 mg/L	0,026667	0,002309
NEL80	Control	0,045667	0,004041
NEL93	30 mg/L	0,012667	0,002082
NEL93	5 mg/L	0,03	0,002
NEL93	Control	0,050667	0,001155

Phụ lục Bảng 4.8. Kết quả phân tích kiểm định Turkey posthoc sự khác biệt có ý nghĩa thống kê của Ergrosterol khi so sánh cặp giữa các phương thức xử lý theo từng chủng phân lập

Turkey posthoc					
ID	**Comparison**	**diff**	**lwr**	**upr**	**p adj**
NEL10	5 mg/L-30 mg/L	0,006667	0,00187	0,011464	0,012533
NEL10	Control-30 mg/L	0,015667	0,01087	0,020464	0,000141
NEL10	Control-5 mg/L	0,009	0,004203	0,013797	0,002895
NEL160	5 mg/L-30 mg/L	0,006667	0,00132	0,012014	0,02037
NEL160	Control-30 mg/L	0,025333	0,019986	0,03068	1,61E-05
NEL160	Control-5 mg/L	0,018667	0,01332	0,024014	9,64E-05
NEL38	5 mg/L-30 mg/L	0,004333	-0,00511	0,013781	0,395343
NEL38	Control-30 mg/L	0,022	0,012552	0,031448	0,000925
NEL38	Control-5 mg/L	0,017667	0,008219	0,027115	0,002945
NEL51	5 mg/L-30 mg/L	0,025333	0,020323	0,030344	1,08E-05
NEL51	Control-30 mg/L	0,034333	0,029323	0,039344	1,8E-06
NEL51	Control-5 mg/L	0,009	0,00399	0,01401	0,003615
NEL56	5 mg/L-30 mg/L	0,003833	-0,00015	0,007816	0,057669
NEL56	Control-30 mg/L	0,020333	0,01635	0,024316	1,02E-05
NEL56	Control-5 mg/L	0,0165	0,012517	0,020483	3,58E-05
NEL74	5 mg/L-30 mg/L	0,019333	0,012397	0,02627	0,000344
NEL74	Control-30 mg/L	0,03	0,023063	0,036937	2,78E-05
NEL74	Control-5 mg/L	0,010667	0,00373	0,017603	0,007789
NEL80	5 mg/L-30 mg/L	-0,064	-0,22948	0,10148	0,502305
NEL80	Control-30 mg/L	-0,04233	-0,20781	0,123147	0,725193
NEL80	Control-5 mg/L	0,021667	-0,14381	0,187147	0,916084
NEL93	5 mg/L-30 mg/L	0,017333	0,012836	0,02183	5,45E-05
NEL93	Control-30 mg/L	0,038	0,033503	0,042497	7,35E-07
NEL93	Control-5 mg/L	0,020667	0,01617	0,025164	1,94E-05

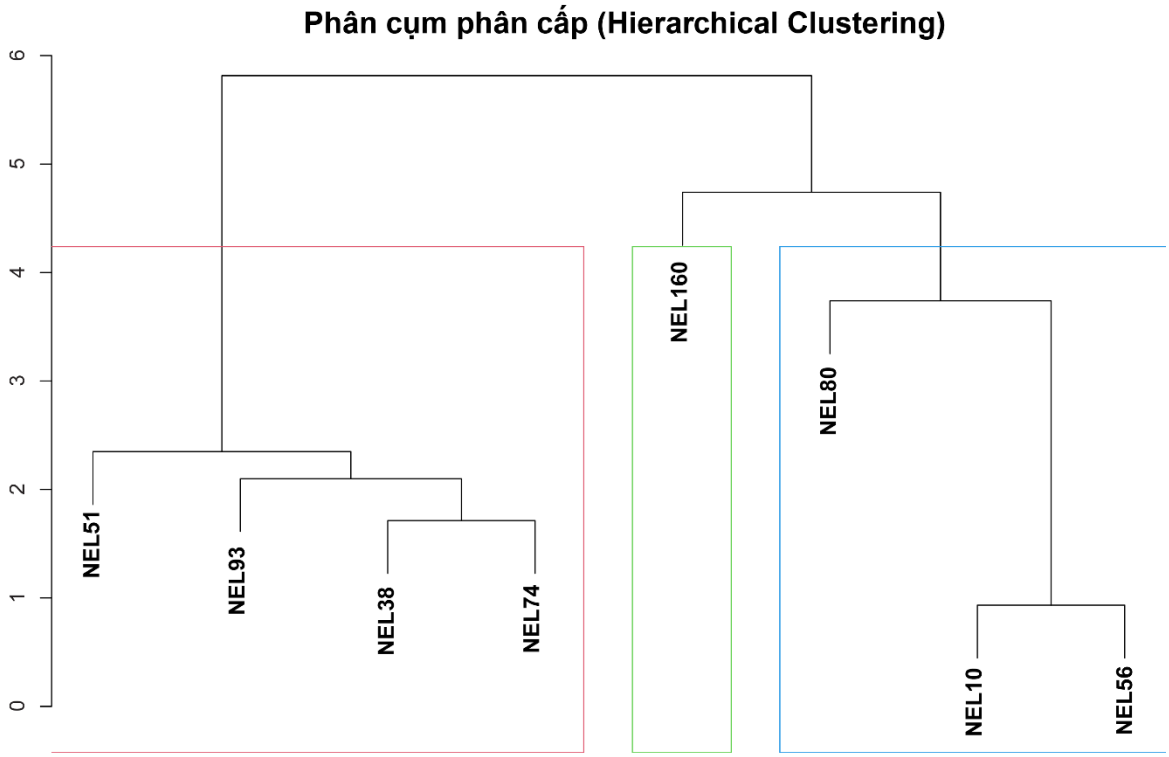


Phụ lục Hình 4.10. Mối tương quan giữa hai enzyme SOD và CAT và sự phân bố đáp ứng của chủng phân lập khi xử lý với nano bạc ở các nồng độ khác nhau. (A). Mức độ tương quan của 2 enzyme (B). Biểu đồ PCA (Ellipse với độ tin cậy 95%) theo tác động của các công thức xử lý (Màu hồng cam – AgNPs 30 mg/L, màu lục – AgNPs 5 mg/L và màu xanh dương – Đối chứng) (C). Biểu đồ PCA theo chủng phân lập. Màu sắc phản ánh giá trị cos^2 (mức độ đóng góp của từng mẫu vào các chiều PCA). Màu cam (giá trị cos^2 cao) thể hiện các mẫu có đóng góp lớn vào các thành phần chính, trong khi màu xanh (giá trị cos^2 thấp) thể hiện đóng góp thấp hơn.

Ngoài cái nhìn tổng thể về mối tương quan, nghiên cứu cũng tiến hành phân tích thành phần chính PCA (Principal components analysis) nhằm cung cấp bằng chứng về sự thay đổi

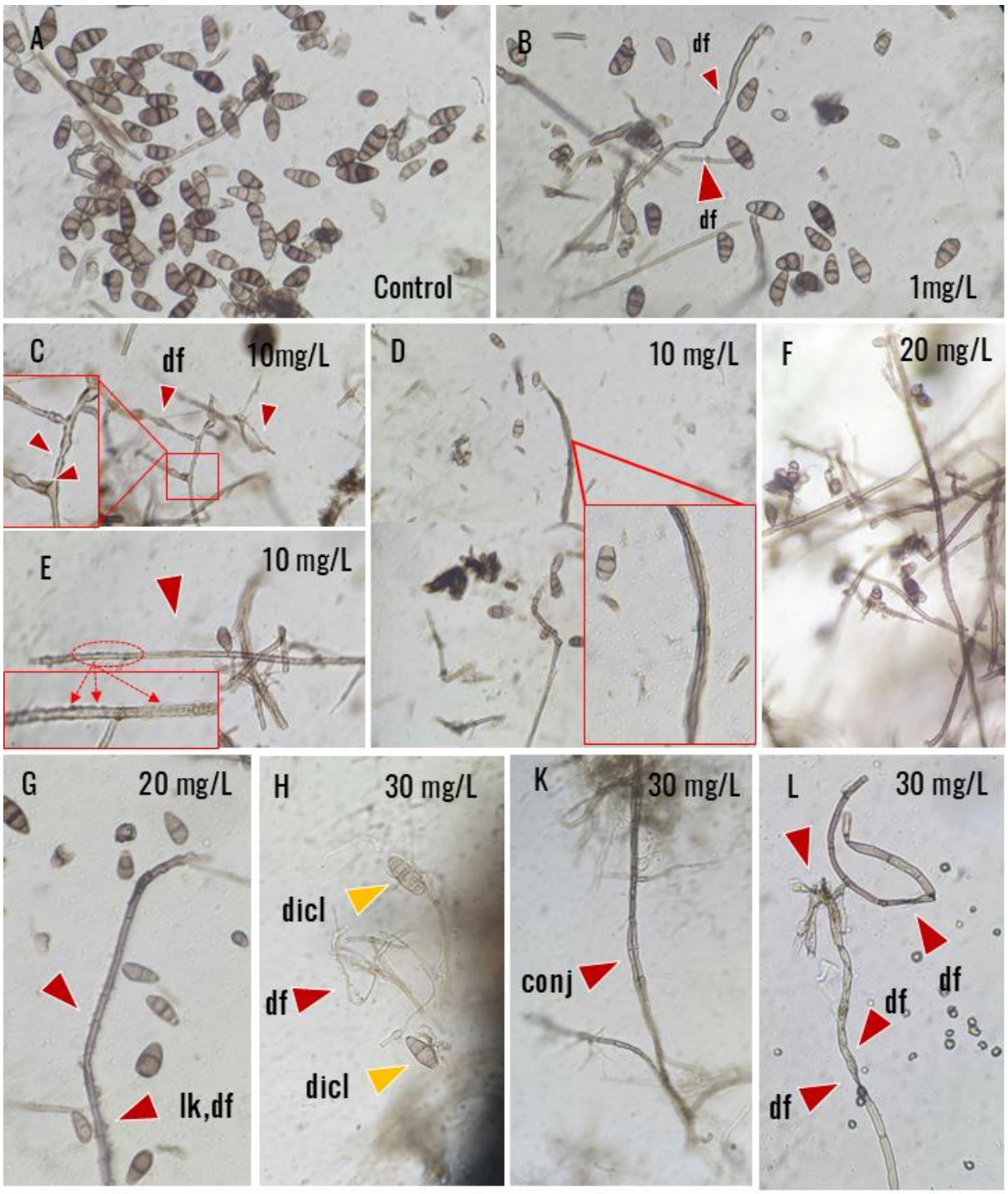
mối tương quan giữa hoạt động của SOD và CAT khi tiếp xúc với nano bạc của từng chủng phân lập khi tiến hành kết hợp dữ liệu quan sát của hai enzyme SOD và CAT (Hình 3.34). Kết quả phân tích PCA cho thấy rằng sự biến thiên của dữ liệu của 2 enzyme SOD và CAT chủ yếu tập trung vào một thành phần chính duy nhất (Dim.1), với cả hai biến đều đóng góp tương đương, tương tự nhau (Phụ lục Hình 4.10B). Các dữ liệu theo với các phương thức xử lý (nồng độ khác nhau) có thể được phân biệt một cách rõ rệt trực quan trên biểu đồ PCA với các hình elip (ellipse) cho thấy sự phân tán riêng biệt trong các điều kiện khác nhau (nồng độ xử lý khác nhau). Các mẫu đối chứng được ghi nhận phân bố gần trục ít phân tán, biến thiên, thể hiện ít sự biến động trong thay đổi hoạt độ enzyme. Trong khi, khi xử lý với nano bạc 30 mg/L đã ghi nhận sự phân bố rộng và lệch về phía bên trái, phản ánh sự biến động lớn và phản ứng tiêu cực rõ rệt khi xử lý nano bạc ở nồng độ cao.

Trong biểu đồ PCA theo chủng phân lập, cho thấy hai thành phần chính Dim1 và Dim2 giải thích lần lượt 44,4 và 35,2% độ biến thiên dữ liệu. Tổng 2 thành phần chính này giải thích được 79,6% tổng biến thiên dữ liệu, thể hiện tốt sự thay đổi trong hoạt độ enzyme SOD và CAT dưới tác động của nano bạc giữa các chủng phân lập. Biểu đồ cũng cho thấy các chủng phân lập nằm gần trung tâm hoặc phía bên phải: bao gồm 3 loài *Curvularia* sp. (VNHUCC.NEL51, VNHUCC.NEL74, VNHUCC.NEL93), và *Lasiodiplodia theobroame* (VNHUCC.NEL38) – là những mẫu có những phản ứng nhất quán và chung xu hướng phản ứng. Bên cạnh đó, có thể dễ dàng quan sát thấy như VNHUCC.NEL160 (*A. niger*) và VNHUCC.NEL80 (*Curvularia* sp.) nằm riêng biệt ở các góc phần tư (quadrant) khác, tách biệt với sự phân bố của các nhóm các phân lập khác, xa gốc trung tâm – điều này có nghĩa là có sự khác biệt trong đáp ứng của VNHUCC.NEL80 hay VNHUCC.NEL160 (*A. niger*) khi xử lý với nano bạc so với các mẫu còn lại, và cần được phân tích sâu hơn để hiểu rõ cơ chế và đặc tính tạo nên sự riêng biệt này.



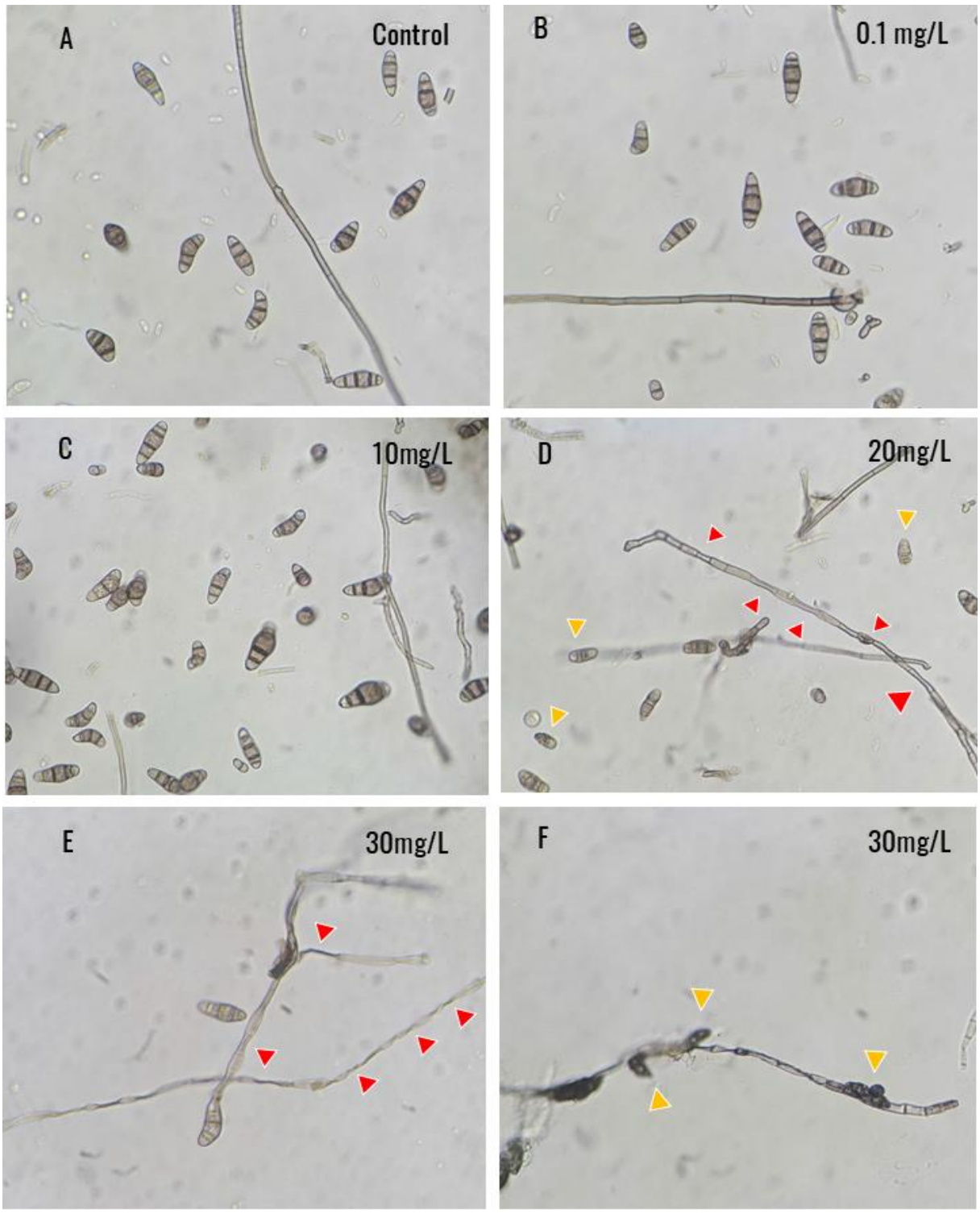
Phụ lục Hình 4.11. Biểu đồ phân cụm phân cấp (Hierarchical Clustering) đáp ứng của các chủng phân lập với sự biến động SOD và CAT

Dựa trên các kết quả thu thập về suy giảm sinh khối, rò rỉ vật chất nội bào (OD_{260}), độ dẫn điện ngoại bào (EEC), hàm lượng malondialdehyde (MDA), ergosterol (ERG) và hoạt tính của các enzyme chống oxy hóa (SOD, CAT), nghiên cứu đã tiến hành phân tích mối tương quan giữa các yếu tố này và sự suy giảm sinh khối, từ đó làm rõ ảnh hưởng của chúng đến quá trình suy giảm sinh khối.

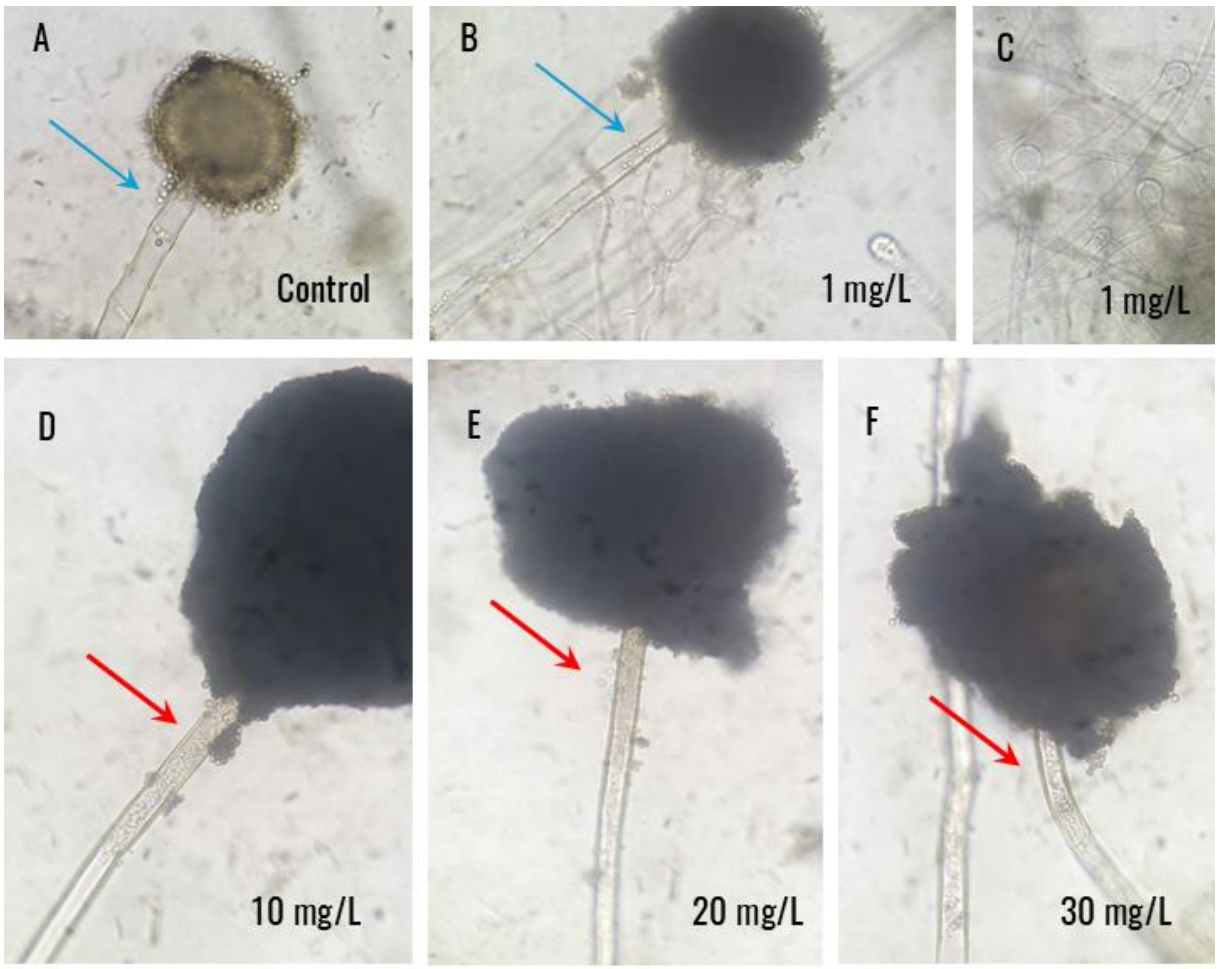


Phụ lục Hình 4.12. Những tác động vi thể của nano bạc ở các nồng độ khác nhau lên hình thái sợi nấm và bào tử *C. verrruculosa* (VNHUCC.NEL74) ở vật kính 40X

Ghi chú: Control: mẫu đối chứng; df: trạng thái bị biến dạng, teo nhỏ; Dicl: sự mất, giảm sắc tố, conj: biểu thị cho sự kết dính của sợi nấm khác nhau, lk: biểu thị cho trạng thái rò rỉ vật chất nội bào. Các tam giác màu đỏ chỉ dấu cho các tổn thương ở sợi nấm. Các tam giác màu vàng chỉ dấu cho các tổn thương ở các bào tử.



Phụ lục Hình 4.13. Những tác động vi thể của nano bạc ở các nồng độ khác nhau lên hình thái sợi nấm và bào tử *Curvularia* sp. (VNHUCC.NEL80) ở vật kính 40X. Control: mẫu đối chứng – không xử lý nano bạc. Các tam giác màu đỏ chỉ dấu cho các tổn thương ở sợi nấm. Các tam giác màu vàng chỉ dấu cho các tổn thương ở các bào tử.



Phụ lục Hình 4.14. Mức độ đông tụ tăng dần ở phần đầu ngọn cuống bào tử của *A. niger* tương ứng với sự gia tăng nồng độ nano bạc. Từ nồng độ nano bạc 10m/L trở lên ghi nhận hiện tượng đông tụ (mũi tên màu đỏ), trong khi ở nồng độ thấp hơn và đối chứng (Control) không ghi nhận hiện tương này.

PHÂN TÍCH TƯƠNG QUAN GIỮA CÁC YẾU TỐ KHẢO SÁT VÀ XÁC ĐỊNH YẾU TỐ CHÍNH ĐẾN SỰ SUY GIẢM SINH KHỐI, HIỆU LỰC ỨC CHẾ NẤM

Bỏ qua sự khác biệt yếu tố thời gian (thời điểm ghi nhận), phân tích này sử dụng tương quan Pearson giữa yếu tố mục tiêu (giá trị suy giảm sinh khối) và các yếu tố sinh hóa liên quan được thực hiện trong nghiên cứu như: giá trị OD_{260}, hàm lượng MDA, giá trị độ dẫn điện ngoại bào (EEC), hàm lượng MDA, hàm lượng ergosterol ERG, và hoạt độ của 2 enzyme SOD và CAT ở hai nồng độ 5 mg/L và 30 mg/L. Kết quả cho thấy, nhân tố chủ đạo ảnh hưởng đến sự biến đổi sinh khối là hàm lượng malondialdehyde (MDA) và đặc biệt là hàm lượng ergosterol (ERG).

Phân tích ảnh hưởng của nano bạc ở nồng độ 5 mg/L

Ở mức xử lý 5 mg/L, sinh khối thể hiện tương quan âm với MDA (-0.30) và tương quan dương yếu với ERG (0.24). Điều này cho thấy dưới tác động của nano bạc, sự gia tăng stress oxy hóa (được phản ánh qua hàm lượng MDA tăng) có xu hướng làm giảm sinh trưởng tế bào. Đồng thời, sự suy giảm ergosterol – một thành phần quan trọng của màng tế bào nấm – cũng góp phần làm giảm sinh khối, mặc dù mức độ tương quan dương giữa ERG và sinh khối không quá mạnh.

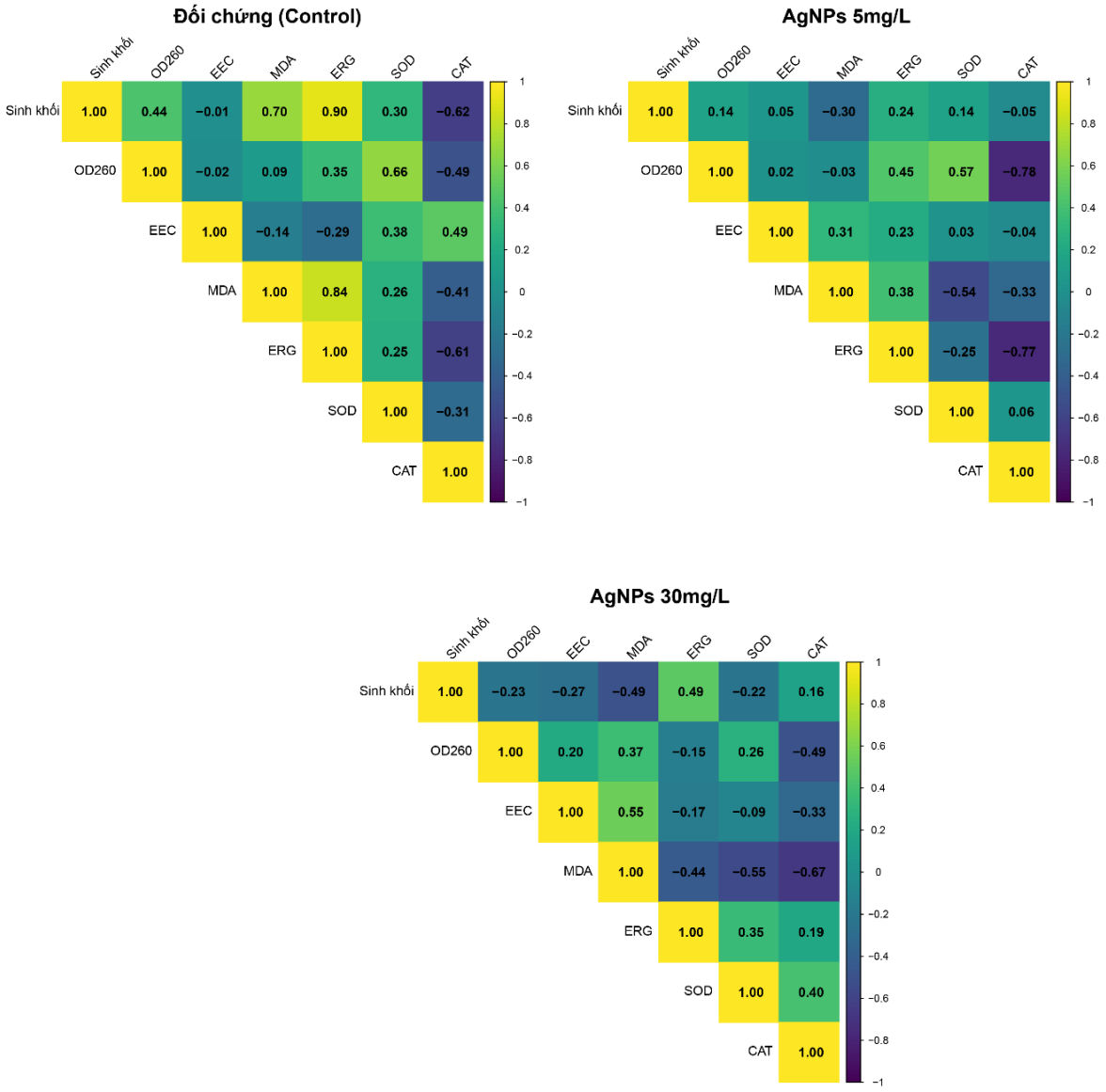
Bên cạnh đó, xét tương quan MDA và ERG cũng cho thấy có tương quan âm (-0.54), cho thấy peroxid hóa lipid có thể liên đới đến suy giảm ergosterol – phù hợp với vai trò ERG trong ổn định độ nhớt và tính chọn lọc màng. Điều này phản ánh sự gia tăng stress oxy hóa cũng có thể là yếu tố, động lực thúc đẩy làm giảm hàm lượng ergosterol, từ đó gây nên sự suy giảm sinh khối ở nồng độ xử lý này.

Ngoài ra, ở nồng độ này, ergosterol có tương quan âm mạnh với enzyme catalase (CAT) (-0,77), trong khi sinh khối gần như không tương quan với CAT (-0,05). Điều này có thể chỉ ra 2 thông tin: (i) CAT tăng chủ yếu như một đáp ứng ứng suất (mang tính bù trừ), không còn đồng biến với khả năng tăng trưởng. (ii). Khi tổn thương lipid màng tăng, tế bào kích hoạt mạnh hệ enzyme bảo vệ (CAT), nhưng việc này không đủ để bảo toàn ergosterol. Trong khi, phân tích cũng ghi nhận tương quan âm đáng kể (-0,54) giữa SOD và MDA, có nghĩa một khi tăng hoạt tính enzyme SOD đi kèm giảm peroxid hóa lipid, cho thấy SOD trở thành tuyến phòng thủ hàng đầu với superoxide, đẩy lùi chuỗi peroxid hóa.

Tổng hợp lại, việc tiếp xúc với nano bạc ở nồng độ 5 mg/L có thể xuất hiện một mức độ "stress" đối với tế bào nấm với trục thông tin: stress oxy hóa khởi phát (MDA tăng) → giảm ERG → màng kém ổn định → cản trở tích lũy sinh khối. Từ đó, có thể suy luận rằng sự suy giảm sinh khối ở nồng độ 5 mg/L chủ yếu do tác động kép của stress oxy hóa và tổn thương màng tế bào.

Ảnh hưởng của nano bạc ở nồng độ 30 mg/L

Ở nồng độ cao hơn 30 mg/L, hệ số tương quan âm giữa sinh khối và MDA tăng về độ lớn (r ≈ -0.49) so với 5 mg/L hay đối chứng, cho thấy peroxid hóa lipid trở thành yếu tố chi phối mạnh hơn đối với suy giảm tăng trưởng ở nồng độ này. Đồng thời, sinh khối thể hiện tương quan âm với giá trị OD_{260} (r ≈ -0.23). Như đã biết, OD_{260} đại diện cho rò rỉ vật chất nội bào, mối tương quan âm này ngụ ý rằng khi rò rỉ tăng (OD_{260} cao) thì sinh khối giảm – phù hợp với cơ chế phá hủy màng.



Phụ lục Hình 4.15. Biểu đồ tương quan của yếu tố (OD_{260}, MDA, EEC, MDA, ERG, SOD, CAT) đến sinh khối ở các nồng độ xử lý khác nhau.

Ngược lại, sinh khối vẫn duy trì tương quan dương đáng kể với ergosterol (0.49) và enzyme catalase (CAT) (0.16), khẳng định tính toàn vẹn sterol màng vẫn là yếu tố tiên quyết để duy trì tăng trưởng hay "bị ức chế" dưới áp lực stress cao. MDA và ERG

vẫn âm (r ≈ -0.44), củng cố chuỗi nhân quả: Tương tự với nồng độ 5 mg/L, MDA và ERG vẫn có tương quan âm mạnh (-0.44), khẳng định vai trò của stress oxy hóa trong việc làm giảm hàm lượng ergosterol, củng cố chuỗi dữ kiện: stress oxy hóa → peroxid hóa lipid → suy giảm ergosterol → rối loạn màng → ức chế tăng trưởng (giảm sinh khối). Hay nói cách khác, sự suy giảm ergosterol tiếp tục ảnh hưởng tiêu cực đến sinh trưởng tế bào, đồng thời stress oxy hóa gia tăng làm tổn thương cấu trúc tế bào và chức năng sinh lý, dẫn đến giảm sinh khối.

Tương quan dương nhẹ giữa sinh khối và CAT (r ≈ 0.16) ở nồng độ cao (30 mg/L) có thể ngụ ý rằng: (i) những mẫu duy trì hoạt tính CAT tốt hơn có khả năng bảo toàn ERG và sinh khối hơn ở một mức độ nhất định nào đó so với các chủng phân lập khác; tuy nhiên hiệu ứng này là không đủ và vẫn bị lấn át bởi mức độ peroxid hóa lipid. (ii) Khả năng "vượt ngưỡng" của hệ phòng vệ: khi stress vượt khả năng khử gốc tự do của SOD/CAT, tăng cường enzyme không còn đảo ngược được tốc độ tổn thương màng.

Nhìn chung, toàn bộ phân tích tương quan này cho thấy, dưới tác động của nano bạc ở cả hai nồng độ 5 mg/L và 30 mg/L, hàm lượng MDA và ergosterol là hai nhân tố/yếu tố chính, "chìa khóa" quyết định đến sự suy giảm sinh khối. SOD/CAT đóng vai trò "đệm" khi stress ở mức độ vừa phải, hai enzyme này nghịch biến với MDA/EEC (bảo vệ hiệu quả); khi căng thẳng cao, tương quan bảo vệ yếu đi do vượt ngưỡng. Cụ thể:

+ **MDA**, chỉ số phản ánh mức độ stress oxy hóa, có tương quan âm với sinh khối, cho thấy khi stress oxy hóa tăng cao, sinh trưởng tế bào bị ức chế rõ rệt.
+**Ergosterol**, thành phần cấu tạo quan trọng của màng tế bào nấm, có tương quan dương với sinh khối, minh chứng cho vai trò thiết yếu của ergosterol trong duy trì sự phát triển và ổn định màng tế bào.

Xét theo yếu tố tác động: MDA sẽ được xem là chỉ dấu trung tâm cho tổn thương, liên kết chặt chẽ với các yếu tố ERG và EEC. SOD/CAT chỉ dấu cho hệ thống đáp ứng – bảo vệ trước tổn thương và ERG là dấu hiệu chìa khóa cho trục đáp ứng, sức chống chịu của tế bào nấm khi có các tổn thương. Như vậy, sự suy giảm sinh khối dưới tác động của nano bạc chủ yếu được thúc đẩy bởi sự gia tăng stress oxy hóa (tăng MDA) và đồng thời là sự giảm sút hàm lượng ergosterol, gây tổn thương màng tế bào và làm suy yếu chức năng sinh lý của tế bào nấm.