

PHÂN LẬP NẤM *Fusarium solani* TRÊN TÔM THẺ CHÂN TRẮNG (*Litopenaeus vannamei*) BỊ BỆNH ĐỐM ĐEN VÀ THỬ NGHIỆM KHẢ NĂNG KHÁNG NẤM CỦA CAO CHIẾT THẢO DƯỢC

Trương Thị Hoa^{1*}, Lê Quang An¹, Nguyễn Văn Cường¹, Mai Hữu Vũ¹,
Nguyễn Đình Mai Duyên¹, Hồ Ngọc Thi¹, Trần Nam Hà¹

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm phân lập nấm *Fusarium solani* trên tôm thẻ chân trắng bị bệnh đốm đen và thử nghiệm khả năng kháng nấm của cao chiết bạch bộ, lá vối và tía tô. Kết quả phân lập nấm từ các mẫu tôm thẻ chân trắng bị bệnh đốm đen xác định được chủng nấm *Fusarium* (ký hiệu *Fusarium* - DHNL). Kết quả định danh bằng phân tích trình tự ITS của chủng nấm *Fusarium* - DHNL và dựa vào cây phân loại thể hiện mối quan hệ di truyền xác định chủng nấm phân lập là *Fusarium solani*. Nghiên cứu khả năng kháng nấm *Fusarium solani* của cao chiết thảo dược cho thấy nồng độ ức chế tối thiểu của cao chiết bạch bộ và lá vối đến sợi nấm *Fusarium solani* là 2.500 mg/L và tía tô 5.000 mg/L. Nồng độ tiêu diệt tối thiểu của cao chiết bạch bộ và tía tô đến sợi nấm *Fusarium solani* là 2.500 mg/L và tía tô là 5.000 mg/L khi ngâm trong 12 giờ, cao chiết lá vối là 2.500 mg/L (ngâm trong 6 giờ). Nồng độ tiêu diệt tối thiểu của cao chiết bạch bộ và lá vối đến bào tử nấm *Fusarium solani* là 2.500 mg/L (ngâm trong 24 giờ) và tía tô 5.000 mg/L (ngâm trong 24 giờ). Nghiên cứu này cho thấy, tiềm năng sử dụng cao chiết bạch bộ, lá vối và tía tô để phòng trị bệnh do nấm *Fusarium solani* gây ra trên tôm thẻ chân trắng.

Từ khóa: Tôm thẻ chân trắng, bệnh đốm đen, *Fusarium solani*, cao chiết thảo dược.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh đốm đen (Black Spot Disease – BSD) là một trong những bệnh phổ biến trên tôm thẻ chân trắng, bệnh gây chết tôm ở giai đoạn nuôi thương phẩm. Tôm bị bệnh đốm đen do nấm *Fusarium solani*, có hiện tượng giảm ăn, tách đàn, bơi lơ lửng trên mặt nước và có đốm đen trên mang và trên vỏ [1]. Tôm nuôi ở Việt Nam thường hay bị bệnh đen mang, có đốm đen trên mang và một trong những nguyên nhân chính là do nấm *Fusarium incarnatum*, *Fusarium solani* [2]. Một trong những nguyên nhân gây chết tôm thẻ chân trắng nuôi tại Phong Điền, Thừa Thiên Huế là tôm bị bệnh đốm đen do nấm *Fusarium solani* [3].

Trong nuôi trồng thủy sản, các sản phẩm có nguồn gốc từ thảo dược ngày càng được quan tâm

để thay thế hoá chất và thuốc kháng sinh. Sử dụng thảo dược là để phòng trị bệnh do nấm gây ra được đánh giá như liệu pháp hiệu quả mới và đang được quan tâm nghiên cứu. Nghiên cứu đánh giá hoạt tính kháng nấm của 40 chất chiết thảo dược cho thấy, các loại thảo dược như: Cây giần sàng (*Cnidium monnieri*), cây hậu phác (*Magnolia officinalis*) và cây vân mộc hương (*Aucklandia lappa*) có khả năng ức chế sự phát triển của nấm *Saprolegnia* sp. và *Achlya klebsiana* [4]. Chiết xuất từ cây thạch lựu (*Punica granatum*), cây họ đào (*Syzygium gratum*), cây chùm ruột núi (*Phyllanthus emblica*) và cây chiều liêu hồng (*Terminalia chebula*) có khả năng kháng nấm *Achlya* được phân lập từ cá rô phi ở Thái Lan [5]. Cây cỏ mực (*Eclipta alba*) và cây diệp hạ châu (*Phyllanthus amarus*) có khả năng ức chế sự phát triển của sợi nấm *Achlya bisexualis* phân lập trên cá lóc nuôi tại Việt Nam [6]. Nước ép lá hẹ (*Allium tuberosum*) có khả năng ức chế và tiêu diệt nấm *Saprolegnia* sp. ở nồng độ 15.000 ppm và 13.000 ppm với thời gian ngâm sau 6 và 24 giờ [7].

¹ Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế

*Email: truongthihoa@huan.edu.vn

Hiện nay, thảo dược và cao chiết thảo dược đã và đang được sử dụng phổ biến trong nuôi trồng thủy sản, tuy nhiên nghiên cứu về tác dụng kháng nấm của thảo dược đến nấm *Fusarium solani* vẫn còn hạn chế. Do đó nghiên cứu này được thực hiện nhằm xác định khả năng kháng nấm của một số cao chiết thảo dược (củ bách bộ, lá vối và lá tía tô) lên nấm *Fusarium solani* phân lập trên tôm thẻ chân trắng bị bệnh đốm đen, góp phần hạn chế thiệt hại của bệnh do nấm gây ra trên tôm.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Tôm thẻ chân trắng có các đốm đen trên mang, trên vỏ kitin và còn sống được thu ở 5 ao nuôi tôm tại huyện Phú Vang, tỉnh Thừa Thiên Huế. Mỗi ao thu 20 con, tổng số mẫu tôm thu để nuôi cấy, phân lập nấm là 100 con. Tôm có khối lượng trung bình là 9,6 g/con. Mẫu tôm sau khi thu được đóng trong thùng xốp và vận chuyển sống về Phòng thí nghiệm Khoa Thủy sản, trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế để nuôi cấy và phân lập nấm.

Môi trường Peptone Yeast-extract Glucose Salt Agar (PYGS agar- gồm: Peptone 1,25 g, yeast - extract 1,25 g, glucose 3 g, agar 12 g, muối NaCl 30 g và 1.000 mL nước cất); Peptone Yeast-extract Glucose Salt (PYGS); môi trường nước muối vô trùng (30 g muối NaCl và 1.000 mL nước cất); nước muối sinh lý (0,85% NaCl).

Các loại thảo dược bách bộ (*Stemona tuberosa*), lá vối (*Syzygium nervosum*) và tía tô (*Perilla frutescens*) được thu gom ở tỉnh Thừa Thiên Huế. Cao chiết thảo dược được chiết xuất theo phương pháp của Nguyễn Kim Phi Phụng (2007) [8]. Lá vối và tía tô thu lá, bách bộ thu phần rễ củ, mang về phòng thí nghiệm và rửa sạch với nước, để ráo. Các loại thảo dược được cắt nhỏ và cho vào tủ sấy để sấy khô ở nhiệt độ 55°C trong 24 giờ và xay thành bột nguyên liệu bằng máy xay sinh tố đa năng. Bột nguyên liệu được ngâm trong dung môi ethanol 96% với tỉ lệ 1: 10 trong 60 phút. Sau đó, dịch chiết được lọc qua giấy lọc Whatman No.1 và làm khô bằng cách sử dụng máy cô quay chân không (Rotavapor R-100, BUCHI, Thụy Sĩ) để loại bỏ dung môi thu được cao chiết thảo dược.

Cao chiết được bảo quản ở nhiệt độ 4°C để sử dụng cho các thí nghiệm.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp phân lập và định danh nấm

Phân lập nấm trên tôm thẻ chân trắng được tiến hành theo Khoa và cs (2004) [2], lấy mẫu từ vị trí bị đốm đen trên tôm nuôi cấy trên môi trường PYGS agar ở nhiệt độ 28°C từ 1 - 5 ngày và cấy chuyển để thu được khuẩn lạc nấm thuần. Sau đó nuôi cấy trên môi trường PYGS ở nhiệt độ 28°C sau 24 - 48 giờ để quan sát sự phát triển của sợi nấm và nuôi cấy trên môi trường nước muối vô trùng ở nhiệt độ 28°C, sau 24 - 48 giờ quan sát sự sinh bào tử của nấm và tiến hành thu bào tử để nuôi cấy thuần chủng trên môi trường PYGS agar. Tiến hành phân loại nấm dựa vào hình dạng và kích thước của khuẩn lạc, hình dạng sợi nấm và bào tử nấm theo mô tả của Burges và cs (1994) [9].

Định danh nấm bằng phương pháp giải trình tự ITS (internal transcribed spacer) của ribosome RNA, đây là vùng thể hiện mức độ biến thể cao hơn so với các vùng khác trong rRNA. Điều này cho phép phân biệt giữa các loài nấm có quan hệ gần nhau, so với các phương pháp khác trong định danh nấm, giải trình tự vùng ITS cho kết quả tin cậy cao hơn [10]. Sợi nấm được nuôi trong môi trường PYGS ở nhiệt độ 28°C trong 48 giờ. Sợi nấm được rửa 3 lần bằng dung dịch PBS (phosphate-buffered saline), lưu giữ và bảo quản ở -60°C cho đến khi sử dụng. ADN tổng số được tách chiết bằng QIAamp ADN minit kit (Qiagen) quy trình thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Vùng ITS có cặp mỗi: 5'-ACATACCTAAAACGTTGCTT-3'; 5'-TTCCTCCGCTTATTGATATG-3' được khuếch đại bằng phản ứng PCR theo tỷ lệ: 20 ng ADN, 1,2 U GoTaq ADN polymarse (Promega), 1X GoTaq buffer, 0,25 mM dNTPs và 0,25 μ M của mỗi ITS1, ITS2 [11]. Chu kỳ luân nhiệt của phản ứng khuếch đại như sau: 1 chu kỳ 95°C trong 5 phút, 35 chu kỳ của 94°C 30 giây, 55°C 30 giây, 72°C trong 1 phút và chu kỳ kết thúc 72°C trong 5 phút. Sản phẩm PCR được kiểm tra trên Gel agarose 1,2% và được tinh sạch bằng QIAquick Gel Extraction Kit

(Qiagen). Sản phẩm tinh sạch được gửi tới Công ty T&N Biosolution (Việt Nam) để giải trình tự nucleotide và sử dụng phần mềm MEGA6 để xây dựng cây xác định mối quan hệ di truyền.

2.2.2. Phương pháp xác định khả năng kháng nấm của thảo dược

Xác định khả năng kháng nấm của thảo dược tiến hành theo phương pháp của Panchai và cs (2015) [5].

Phương pháp xác định nồng độ ức chế tối thiểu của cao chiết thảo dược đến sợi nấm *Fusarium solani*: Nồng độ ban đầu của mỗi loại cao chiết thảo dược trong môi trường PYGS là 10.000 mg/L và pha loãng thành các nồng độ khác nhau theo cơ số 2 từ nồng độ gốc ban đầu. Cát viên ngoài của khuẩn lạc nấm *Fusarium solani* bằng đầu tip vô trùng có đường kính 6 mm và cho vào các ống nghiệm có chứa 5 mL cao chiết thảo dược ở các nồng độ trên. Lô đối chứng, nấm được nuôi trong môi trường Peptone Yeast-extract Glucose Salt (PYGS, thành phần gồm peptone 1,25 g, yeast - extract 1,25 g, glucose 3 g, muối NaCl 30 g và 1.000 mL nước cất) không bổ sung cao chiết thảo dược và mỗi nghiệm thức được lặp lại ba lần. Các ống nghiệm được nuôi cấy ở nhiệt độ 28°C và quan sát sự phát triển của sợi nấm sau 5 ngày nuôi cấy. Trong trường hợp không có sợi nấm phát triển, khối nấm được cấy trên môi trường PYGS agar và tiếp tục theo dõi sau 5 ngày nuôi cấy tiếp theo ở nhiệt độ 28°C. Kiểm tra sự phát triển của sợi nấm ở các nồng độ trên để xác định nồng độ ức chế tối thiểu sợi nấm [5].

Phương pháp xác định nồng độ tiêu diệt tối thiểu của cao chiết thảo dược đến sợi nấm *Fusarium solani*: Từ thí nghiệm trên, nồng độ cao chiết thảo dược có khả năng ức chế sự phát triển của sợi nấm được chọn để xác định nồng độ tiêu diệt sợi nấm. Cát viên ngoài của khuẩn lạc nấm bằng đầu tip vô trùng có đường kính 6 mm ngâm trong cao chiết thảo dược ở các nồng độ trên trong 1, 2, 6, 12 và 24 giờ. Lô đối chứng nấm được ngâm trong môi trường PYGS không bổ sung cao chiết thảo dược và mỗi nghiệm thức được lặp lại ba lần. Sau thời gian ngâm, khối nấm được lấy ra, rửa nhẹ qua nước muối sinh lý (0,85% NaCl) và cấy trên

môi trường PYGS agar. Nuôi cấy ở nhiệt độ 28°C và quan sát sự phát triển của sợi nấm sau 5 ngày nuôi cấy [5].

Phương pháp xác định nồng độ tiêu diệt tối thiểu của cao chiết thảo dược đến bào tử nấm *Fusarium solani*: Từ kết quả xác định nồng độ tiêu diệt tối thiểu của cao chiết thảo dược ở thí nghiệm trên, nồng độ thí nghiệm xác định khả năng tiêu diệt bào tử nấm của bách bộ và lá với là 2.500 mg/L và tía tô là 5.000 mg/L. Nấm được nuôi cấy trong môi trường PYGS ở 28°C trong 24 giờ. Thu các sợi nấm, rửa nhẹ qua nước muối sinh lý (0,85% NaCl) và cho sợi nấm vào 20 mL môi trường nước muối vô trùng (30 g muối NaCl và 1.000 mL nước cất) và ủ ở 28°C. Sau 24 giờ thu bào tử nấm và xác định mật độ bào tử bằng buồng đếm hồng cầu. Cho 100 μ L cao chiết thảo dược ở các nồng độ trên vào 900 μ L dung dịch bào tử nấm với mật độ 10^5 bào tử/mL. Nghiệm thức đối chứng gồm 100 μ L nước muối vô trùng và 900 μ L dung dịch bào tử nấm. Hỗn hợp được ủ trong tủ ấm ở 28°C trong 12 và 24 giờ. Sau đó lấy 100 μ L cấy sang môi trường PYGS agar và tiếp tục nuôi cấy ở 28°C. Quan sát sự phát triển của khuẩn lạc sau 5 ngày nuôi cấy và thí nghiệm được lặp lại ba lần [5].

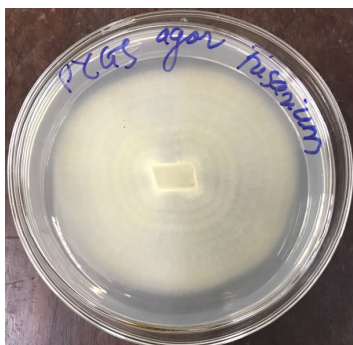
3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả phân lập và định danh nấm

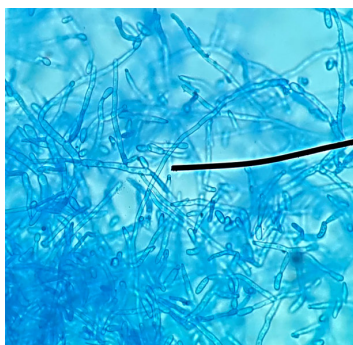
Kết quả nuôi cấy phân lập nấm trên tằm thể chân trắng bị bệnh đốm đen (Hình 1) xác định khuẩn lạc nấm có màu trắng hơi vàng nhạt và đường kính khuẩn lạc trung bình sau 07 ngày nuôi cấy là 5,3 cm (Hình 2). Bào tử của nấm có 2 loại gồm bào tử đỉnh lớn hình thuyền, có vách ngăn và bào tử đỉnh nhỏ hình bầu dục (Hình 3). Căn cứ vào đặc điểm của nấm phân lập được và so với đặc điểm mô tả phân loại nấm *Fusarium* của Burges và cs (1994) [9], xác định giống nấm phân lập trên tằm thể chân trắng bị đốm đen là *Fusarium*. Trong tổng số 100 mẫu tằm bệnh thu từ 5 ao nuôi đều phân lập được giống nấm *Fusarium*, các giống nấm này đều có các đặc điểm về khuẩn lạc, sợi nấm và bào tử tương tự nhau và được ký hiệu là *Fusarium* - DHNL.



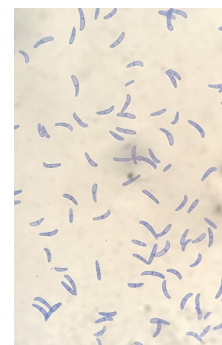
Hình 1. Tôm có các chấm đen trên vỏ và trên mang



Hình 2. Khuẩn lạc nấm *Fusarium* trên môi trường PYGS agar sau 7 ngày nuôi cấy



Hình 3. Hình dạng sợi nấm và bào tử nấm (mẫu nhuộm cotton blue, X40)



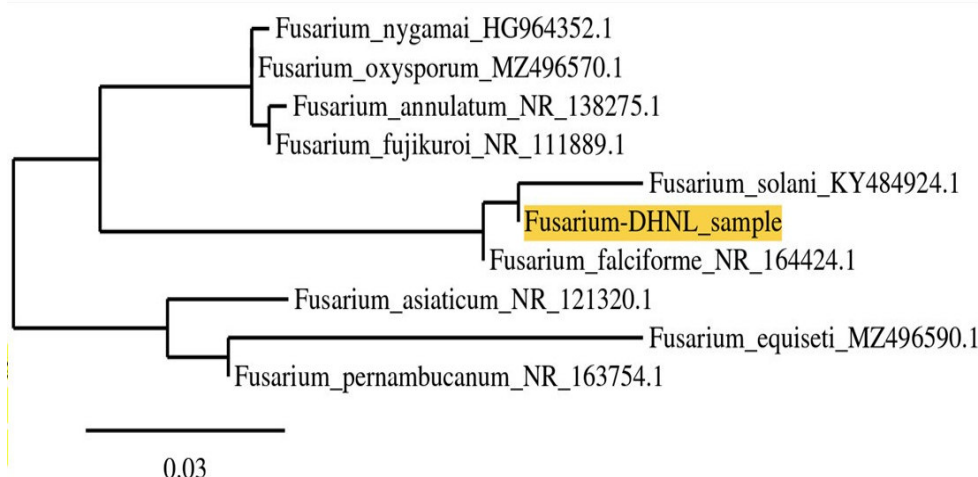
Hình 4. Hình dạng bào tử đỉnh lớn của nấm (X40)

Fusarium solani isolate Fs-2S internal transcribed spacer 1, partial sequence; spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial
Sequence ID: [KY484924.1](#) Length: 1106 Number of Matches: 1
[See 1 more title\(s\)](#) [See all Identical Proteins\(IPG\)](#)

Range 1: 25 to 545 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Pre](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
963 bits(521)	0.0	521/521(100%)	0/521(0%)	Plus/Plus
Query 1	AACCCCTGTGAACATACCTAAAACGTTGCTTCGGCGGGAAACAGACGGCCCCGTAACACGGG	60		
Sbjct 25	AACCCCTGTGAACATACCTAAAACGTTGCTTCGGCGGGAAACAGACGGCCCCGTAACACGGG	84		
Query 61	CCGCCCCCGCCAGAGGACCCCTAACTCTGTTTCTATTATGTTTCTTCTGAGTAAACAA	120		
Sbjct 85	CCGCCCCCGCCAGAGGACCCCTAACTCTGTTTCTATTATGTTTCTTCTGAGTAAACAA	144		
Query 121	GCAAAATAAATAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGCTCTGGCATCGATGAAGAACGCA	180		
Sbjct 145	GCAAAATAAATAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGCTCTGGCATCGATGAAGAACGCA	204		
Query 181	GCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGC	240		
Sbjct 205	GCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGC	264		
Query 241	ACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCGTTCGAGCGTCATTACAACCCCTCAG	300		
Sbjct 265	ACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCGTTCGAGCGTCATTACAACCCCTCAG	324		
Query 301	GCCCCCGGGCTTGGCGTTGGGGATCGGCGAGGCGCCCCCTGCGGGCACACGCCGTCCCC	360		
Sbjct 325	GCCCCCGGGCTTGGCGTTGGGGATCGGCGAGGCGCCCCCTGCGGGCACACGCCGTCCCC	384		
Query 361	AAATACAGTGGCGGTCCCGCCGAGCTTCATTGCGTAGTAGCTAACACCTCGCAACTGG	420		
Sbjct 385	AAATACAGTGGCGGTCCCGCCGAGCTTCATTGCGTAGTAGCTAACACCTCGCAACTGG	444		
Query 421	AGAGCGGCGCGGCCACGCCGTAAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGAATCAGGTA	480		
Sbjct 445	AGAGCGGCGCGGCCACGCCGTAAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGAATCAGGTA	504		
Query 481	GGAATACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA	521		
Sbjct 505	GGAATACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA	545		

Hình 5. Kết quả BLAST của chủng nấm *Fusarium* - DHNL đối chiếu với ngân hàng Genbank



Hình 6. Cây phân loại của chủng nấm *Fusarium* - DHNL so sánh với các loài khác thuộc giống *Fusarium* dựa trên vùng ITS

Trình tự của vùng ITS và phân loại đối với chủng nấm *Fusarium* - DHNL: Tiến hành khuếch đại vùng ITS1-5.8S-ITS 2 của rRNA (Hình 4) bằng các cặp mồi được mô tả ở phần phương pháp thí nghiệm. Sản phẩm khuếch đại được tiến hành giải trình tự và đối chiếu với ngân hàng dữ liệu Genbank để xác định chính xác loài nấm. Kết quả cho thấy chủng nấm *Fusarium* - DHNL có trình tự gen tương đồng 100% với trình tự gen của loài *Fusarium solani* (KY484924.1) (Hình 5). Kết quả xây dựng cây phân loại xác định mối quan hệ di truyền của chủng nấm *Fusarium* - DHNL cũng cho thấy, chủng *Fusarium* - DHNL nằm cùng một nhánh và có mối tương đồng rất gần với chủng *Fusarium solani* KY484924.1 (mức tương đồng 99,8%) (Hình 6). Qua các kết quả thu được cho thấy, nấm *Fusarium* - DHNL là loài *Fusarium*

solani. Kết quả này tương tự với nghiên cứu của Liang và cs (2022) [1], kết quả phân lập nấm trên tằm thể chân trắng có xuất hiện các đốm đen trên mang và trên vỏ kitin, đã phân lập và xác định nấm *Fusarium solani* là tác nhân gây bệnh đốm đen trên tằm thể chân trắng nuôi tại Trung Quốc. Theo Khoa và cs (2004) [2], nấm *Fusarium incarnatum*, *Fusarium solani* gây bệnh đen mang trên tằm sú nuôi tại Việt Nam. *Fusarium solani* là một trong những nguyên nhân gây chết tằm thể chân trắng nuôi tại huyện Phong Điền, tỉnh Thừa Thiên Huế trong năm 2022 [3].

3.2. Kết quả xác định khả năng kháng nấm *Fusarium solani* của cao chiết thảo dược

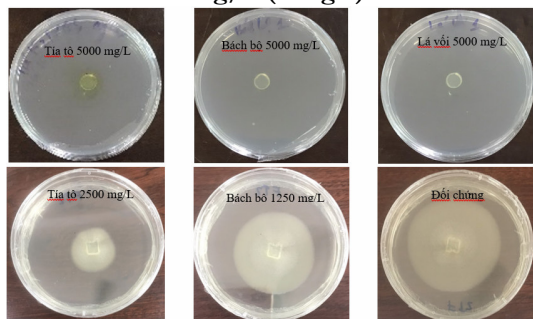
3.2.1. Kết quả xác định nồng độ ức chế tối thiểu của cao chiết thảo dược đến sợi nấm

Bảng 1. Nồng độ ức chế tối thiểu của cao chiết thảo dược đến sợi nấm *Fusarium solani*

Cao chiết thảo dược	Nồng độ các loại cao chiết thảo dược (mg/L)/đường kính khuẩn lạc sau 5 ngày nuôi cấy (mm); (TB ± SD)						
	10.000	5.000	2.500	1.250	625	312,5	0
Bách bộ	-	-	-	22,3 ± 1,6 ^a	31,5 ± 1,4	42,5 ± 1,0 ^a	52,0 ± 1,3 ^a
Lá vối	-	-	-	21,8 ± 1,9 ^a	30,3 ± 1,0	41,7 ± 0,8 ^a	52,3 ± 1,4 ^a
Tía tô	-	-	19,3 ± 1,2 ^a	25,2 ± 1,0 ^b	34,3 ± 1,4 ^b	45,0 ± 0,9 ^b	52,8 ± 1,0 ^a

Ghi chú: +: Sợi nấm phát triển; -: Sợi nấm không phát triển; các chữ cái a, b khác nhau trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Nồng độ ức chế tối thiểu của cao chiết bách bộ và lá vối đến sợi nấm *Fusarium solani* là 2.500 mg/L và tía tô 5.000 mg/L (Bảng 1).



Hình 7. Khuẩn lạc nấm *Fusarium solani* ngâm trong cao chiết bách bộ, lá vối và tía tô sau 5 ngày nuôi cấy trên môi trường PYGS agar

Theo Panchai và cs (2015) [5], nồng độ ức chế tối thiểu của cao chiết từ cây thạch lựu (*Punica granatum*) và cây chiều liêu hồng (*Terminalia chebula*) đến sợi nấm *Achlya* phân lập trên cá rô phi lần lượt là 4.000 mg/L và 2.000 mg/L. Tương tự, nồng độ ức chế tối thiểu cao chiết tía tô (*Perilla frutescens*) đến nấm *Saprolegnia* sp. phân lập trên cá lóc là 6.400 mg/L [6]. Cao chiết từ cỏ mực có thành phần alkaloids, flavonoid và saponins có khả

năng kháng *Fusarium solani* [12]. Theo Anita và Khati (2019) [13] cao chiết xuất thảo dược phá vỡ vách tế bào nấm, làm ảnh hưởng đến quá trình trao đổi chất và tổng hợp protein gây chết tế bào nấm, do đó cao chiết thảo dược có khả năng ức chế và tiêu diệt nấm.

3.2.2. Kết quả xác định nồng độ tiêu diệt tối thiểu của cao chiết thảo dược đến sợi nấm

Nồng độ tiêu diệt tối thiểu của cao chiết bách bộ và tía tô đến sợi nấm *Fusarium solani* là 2.500 mg/L và tía tô là 5.000 mg/L khi ngâm trong 12 giờ, cao chiết lá vối là 2.500 mg/L (ngâm trong 6 giờ) (Bảng 2). Kết quả này tương tự với nghiên cứu của Afolabi và Kareem (2018) [14], nồng độ tiêu diệt tối thiểu của cao chiết từ lá cây đu đủ đối với nấm *Fusarium* spp. là 0,625 mg/mL. Cao chiết cỏ lào (*Chromolaena odorata*) và cỏ xước (*Achyranthes aspera*) có khả năng tiêu diệt sợi nấm *Achlya* sp. (trong 24 giờ ngâm) và *Saprolegnia* sp. (trong 48 giờ ngâm) ở nồng độ 3,2 mg/mL [6].

Bảng 2. Nồng độ tiêu diệt tối thiểu của cao chiết thảo dược đến sợi nấm *Fusarium solani*

Cao chiết thảo dược	Nồng độ (mg/L)	Thời gian ngâm (giờ)				
		1	2	6	12	24
Bách bộ	2.500	+	+	+	-	-
Lá vối	2.500	+	+	-	-	-
Tía tô	5.000	+	+	+	-	-

Ghi chú: +: Sợi nấm phát triển; -: Sợi nấm không phát triển.

3.2.3. Kết quả xác định nồng độ tiêu diệt tối thiểu của cao chiết thảo dược đến bào tử nấm

Nồng độ tiêu diệt tối thiểu của cao chiết bách bộ và lá vối đến bào tử nấm *Fusarium solani* là 2.500 mg/L (ngâm trong 24 giờ) và tía tô 5.000 mg/L (ngâm trong 24 giờ) (Bảng 3). Cao chiết bách bộ và lá vối nồng độ 2.500 mg/L (ngâm nấm trong 12 giờ) và tía tô 5.000 mg/L (ngâm nấm trong 12 giờ), bào tử nấm *Fusarium solani* vẫn nảy mầm và phát triển với tỷ lệ nảy mầm từ 25 - 56%. Nồng độ tiêu diệt tối thiểu của cao chiết cây thạch lựu (*Punica granatum*), cây chiều liêu hồng (*Terminalia chebula*) và cây riềng nếp (*Alpinia galanga*) đến bào tử nấm *Achlya* lần lượt là 250 mg/L (trong 6 giờ ngâm), 2.000 mg/L (trong 24

giờ ngâm), 1.000 mg/L (trong 6 giờ ngâm) [5]. Bào tử vi nấm *Achlya* sp. và *Saprolegnia* sp. bị tiêu diệt khi ngâm trong cao chiết tía tô ở nồng độ 1,6 mg/mL và cỏ lào là 3,2 mg/mL trong 24 giờ [6].

Bảng 3. Nồng độ tiêu diệt tối thiểu của cao chiết thảo dược đến bào tử nấm *Fusarium solani*

Cao chiết thảo dược	Nồng độ thảo dược (mg/L)	Thời gian ngâm (giờ)	
		12	24
Bách bộ	2.500	+	-
Lá vối	2.500	+	-
Tía tô	5.000	+	-

Ghi chú: +: Bào tử nấm phát triển; -: Bào tử nấm không phát triển.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu phân lập, định danh nấm bằng phân tích trình tự ITS và dựa vào cây phân loại thể hiện mối quan hệ di truyền xác định chủng nấm phân lập là *Fusarium solani*. Nồng độ ức chế tối thiểu của cao chiết bách bộ và lá vối đến sợi nấm *Fusarium solani* là 2.500 mg/L và tia tồ 5.000 mg/L. Nồng độ tiêu diệt tối thiểu của cao chiết bách bộ và tia tồ đến sợi nấm *Fusarium solani* là 2.500 mg/L và tia tồ là 5.000 mg/L khi ngâm trong 12 giờ, cao chiết lá vối là 2.500 mg/L (ngâm trong 6 giờ). Nồng độ tiêu diệt tối thiểu của cao chiết bách bộ và lá vối đến bào tử nấm *Fusarium solani* là 2.500 mg/L (ngâm trong 24 giờ) và tia tồ 5.000 mg/L (ngâm trong 24 giờ).

LỜI CẢM ƠN

Nhóm nghiên cứu xin chân thành cảm ơn sự tài trợ kinh phí của Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế cho đề tài nghiên cứu khoa học cấp cơ sở năm 2023: “Nghiên cứu phân lập nấm *Fusarium* trên tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) bị bệnh đốm đen và thử nghiệm khả năng kháng nấm của một số loại thảo dược”.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Liang Y., Chong W., Ge L., Guosi X., Yan J., Wei W., Shuang L., Tingting X., Kun L., Qingli Z., and Jie K. (2022). Identification of *Fusarium solani* as a causal agent of black spot disease (BSD) of Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 548: 1 - 10.
2. Khoa, L. V., Hatai, K. and Aoki (2004). *Fusarium incarnatum* isolated from black tiger shrimp, *Penaeus monodon* Fabricus, with black gill disease cultured in Vietnam. *Journal of Fish Diseases*, 27, 507-511.
3. Trần Vinh Phương, Nguyễn Đức Quỳnh Anh, Nguyễn Thị Xuân Hồng, Nguyễn Ngọc Phước (2023). Nguyên nhân ban đầu gây chết tôm thẻ chân trắng *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) nuôi tại tỉnh Thừa Thiên Huế. *Tạp chí Khoa học Đại học Huế*, 132: 137 - 156.
4. Borisutpeth, P., Kanbutra, P., Hanjavanit, C., Chukanhom, K., Funaki, D. and Hatai, K. (2009). Effects of Thai herbs on the control of fungal

infection in tilapia eggs and the toxicity to the eggs. *Aquaculture Science*, 57 (3): 475 - 482

5. Panchai, K., Hanjavanit, C., Rujinanont, N., Wada, S., Kurata, O. and Hatai, K. (2015). Experimental pathogenicity of *Achlya* species from cultured Nile tilapia to Nile tilapia fry in Thailand. *AACL Bioflux*. 8 (1): 70 - 81

6. Đặng Thụy Mai Thy, Bùi Thị Bích Hằng và Trần Thị Tuyết Hoa (2020). Khảo sát hoạt tính kháng nấm của một số chất chiết thảo dược lên vi nấm gây bệnh trên cá lóc. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*: 56 (Số chuyên đề: Thủy sản) (1): 129 - 136.

7. Trương Thị Mỹ Hạnh, Nguyễn Thị Nguyên, Trương Thị Thành Vinh, Huỳnh Thị Mỹ Lệ và Phan Thị Vân (2018). Nghiên cứu khả năng diệt một số loài vi khuẩn và nấm của lá hẹ (*Allium tuberosum*). *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, 60 (7): 48 - 52.

8. Nguyễn Kim Phi Phụng (2007). *Phương pháp cô lập hợp chất hữu cơ*: Nhà xuất bản Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh.

9. Burges, L. W., Summerell, B. A., Bullock, S., Gott, K. P. and Backhouse, D. (1994). Laboratory Manual for *Fusarium* Research, Department of Crop Sciences, University of Sydney and Royal Botanic Gardens, Bibliography: p. 124

10. Irinyi, L., M. Lackner, G. Sybren de Hoog, W. Meyer (2016). DNA barcoding of fungi causing infections in humans and animals. *Fungal Biology*, 120 (2): 125 - 136

11. White, T. J., T. D. Bruns, S. B. Lee, and J. W. Taylor (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics. In book: PCR - Protocols and Applications - A Laboratory Manual (pp.315-322). Publisher: Academic Press.

12. Hussain, J., Khan, F. U., Ullah, R. et al., (2011). Nutrient evaluation and elemental analysis of four selected medicinal plants of Khyber Pakhtoon Khwa, Pakistan. *Pakistan Journal Botany*. 43 (1): 427 - 434.

13. Anita and Khati, A. (2019). Biomedicines and their role in fish health management.

International Journal of Fauna and Biological Studies 6 (1): 10 - 14.

14. Afolabi, Q. O. and Kareem, K. T. (2018). Antifungal activities of *Carica papaya* and sodium

bicarbonate against Soybean fungi. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*. 12 (5): 2085 - 2092.

ISOLATION OF *Fusarium solani* FROM WHITELEG SHRIMP (*Litopenaeus vannamei*) WITH BLACK SPOT DISEASE AND EVALUATION OF THE ANTIFUNGAL POTENTIAL OF HERBAL EXTRACTS

**Truong Thi Hoa¹, Le Quang An, Nguyen Van Cuong¹, Mai Huu Vu¹,
Nguyen Dinh Mai Duyen¹, Ho Ngoc Thi¹, Tran Nam Ha¹**

¹*University of Agriculture and Forestry, Hue University*

Summary

This study aimed to isolate *Fusarium solani* from white-leg shrimp afflicted with black spot disease and evaluate the antifungal potential of extracts from *Stemona* (*Stemona tuberosa*), *Syzygium* (*Syzygium nervosum*), and perilla leaves (*Perilla frutescens*). *Fusarium* strain (designated as *Fusarium* - DHNL) was isolated from whiteleg shrimp affected by black spot disease. Identification through ITS sequence analysis of the *Fusarium* - DHNL strain and phylogenetic tree analysis confirmed the isolated strain as *Fusarium solani*. The investigation of the antifungal potential against *Fusarium solani* demonstrated that the minimum inhibitory concentration (MIC) of *Stemona* and *Syzygium* extracts towards *Fusarium solani* mycelium was 2,500 mg/L, while *Perilla* extract exhibited a MIC of 5,000 mg/L. The minimum fungicidal concentration (MFC) of *Stemona* and *Syzygium* extracts towards *Fusarium solani* mycelium was 2,500 mg/L after 12 hours of exposure, while *perilla* extract required 5,000 mg/L for the same duration. Furthermore, the MFC *Stemona* and *Syzygium* extracts against *Fusarium solani* spores was 2,500 mg/L after 24 hours of exposure, whereas *perilla* extract required 5,000 mg/L for the same duration. This study highlights the antifungal potential of *Stemona* and *Syzygium*, and *Perilla* extracts for the prevention and treatment of diseases caused by *Fusarium solani* in white-leg shrimp.

Keywords: *Black spot disease, Fusarium solani, herbal extracts, white - leg shrimp.*

Người phản biện: TS. Đặng Thụy Mai Thy

Ngày nhận bài: 10/10/2023

Ngày thông qua phản biện: 24/10/2023

Ngày duyệt đăng: 8/11/2023