

ẢNH HƯỞNG CỦA CAO CHIẾT THẢO DƯỢC ĐẾN SỰ PHÁT TRIỂN CỦA VI NẤM *Fusarium* sp. GÂY BỆNH TRƯỞNG BÓNG HƠI TRÊN CÁ TRA

Đặng Thụy Mai Thy^{1*}, Nguyễn Thị Thu Hằng¹,
Nguyễn Trọng Tuấn², Trần Thị Tuyết Hoa¹

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm khảo sát ảnh hưởng của chất chiết thảo dược đến sự phát triển của *Fusarium* sp. phân lập từ cá tra bị bệnh trướng bóng hơi. Các chiết xuất từ thanh trà (*Bouea oppositifolia*), địa y (*Dirinaria applanata*), cỏ mực (*Eclipta prostrata*), ổi (*Psidium guajava*), lựu (*Punica granatum*) và bàng (*Teraminalia catppa*) được thử nghiệm trên 4 chủng *Fusarium* sp. Kết quả cho thấy, các cao chiết thanh trà, địa y và lựu có hiệu quả kháng nấm tốt hơn so với các cao chiết thảo dược còn lại khi khảo sát. Thanh trà, địa y và lựu ức chế hoàn toàn sự phát triển của sợi nấm và sự nảy mầm của bào tử ở các nồng độ lần lượt là 12,5; 6,25 và 25 mg/mL. Cỏ mực và ổi ghi nhận có hoạt tính kháng nấm ở nồng độ 100 mg/mL. Tỷ lệ ức chế tăng trưởng của sợi nấm từ 47,3% đến 65,5%. Vi nấm phát triển ở cao chiết bàng với các nồng độ 100, 50, 25, và 12,5 mg/mL.

Từ khóa: Chiết xuất thảo dược, MIC, MFC, *Fusarium* sp.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Vi nấm là một trong những tác nhân gây bệnh trên động vật thủy sản và bệnh do nấm thường được đánh giá là tác nhân thứ cấp hoặc liên quan đến yếu tố thay đổi môi trường gây căng thẳng cho cá. Trong đó, giống *Fusarium* đa dạng thành phần loài và thường được tìm thấy trong không khí, đất, nước và thực vật. *Fusarium* được báo cáo gây bệnh trên loài động vật dưới nước như động vật lưỡng cư, bò sát, cá heo, tôm,... (Salter *et al.*, 2012). Trong thủy sản, *F. moniliforme* và *F. udum* được phát hiện gây bệnh trên một số loài cá nuôi nước ngọt như cá lóc, cá trôi, cá chạch, cá chốt và cá leo ở Ấn Độ (Deepa *et al.*, 2000). Ngoài ra, *Fusarium oxysporum* được tìm thấy ở tôm he Nhật bệnh đen mang (Khoa and Hatai, 2005). Ở Việt Nam, *Fusarium* sp. nhiễm trên cá tra nuôi thương phẩm có các dấu hiệu bệnh lý như lở đờ, bỏ ăn và bụng trướng to (Đặng Thụy Mai Thy, 2017).

Các biện pháp quản lý và kiểm soát dịch bệnh trong nuôi trồng thủy sản đã và đang được sử dụng và đặc biệt phổ biến nhất là trên cá tôm. Việc sử dụng đa dạng các loại thuốc, hóa chất trong phòng và trị bệnh trong nuôi thủy sản gây ảnh hưởng đến sức khỏe con người và môi trường. Ngày nay, các sản phẩm có nguồn gốc từ thiên nhiên đang được quan tâm để thay thế hoá chất và thuốc kháng sinh trong nuôi trồng thủy sản. Việc sử dụng thảo dược

và cao chiết thảo dược được xem là một giải pháp xanh trong phòng trị bệnh có hiệu quả, an toàn và thân thiện với môi trường (Abad *et al.*, 2007). Hoạt tính kháng vi nấm gây bệnh trên động vật thủy sản của một số cây thảo dược đã được nghiên cứu trong những năm gần đây. Hơn nữa, cây thảo dược của vùng đồng bằng sông Cửu Long rất phong phú, các chiết xuất từ thực vật và chất chuyển hóa thứ cấp như phenol, flavonoid, limonoids, tannin, alkaloids được báo cáo có hoạt tính kháng nấm (Đỗ Huy Bích và *ctv.*, 2004). Tuy nhiên, sử dụng cao chiết thảo dược ức chế sự phát triển của vi nấm *Fusarium* gây bệnh chủ yếu trên thực vật. Nghiên cứu được thực hiện nhằm khảo sát hoạt tính kháng nấm *Fusarium* sp. của một số cao chiết thảo dược, từ đó cung cấp thông tin về phòng và trị bệnh trên động vật thủy sản.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Cây thảo dược sau khi thu về loại bỏ phần sâu bệnh, rửa sạch và sấy khô ở nhiệt độ từ 40 - 45°C và được xay nhuyễn thành bột nguyên liệu. Bột nguyên liệu được cho vào trong túi vải và ngâm trong dung môi methanol. Mẫu được ngâm 5 lần, mỗi lần ngâm khoảng 24 giờ, dịch chiết từ các lần ngâm được gom lại, cô quay đuổi methanol thu

¹ Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

² Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

* Tác giả chính: E-mail: dtmthy@ctu.edu.vn

được cao tổng thảo dược (Nguyễn Kim Phi Phụng, 2007). Chuẩn bị các chất chiết thảo dược bằng cách pha loãng trong dung dịch dimethyl sulfoxide - DMSO 10% để đạt được nồng độ thí nghiệm.

Bảng 1. Cây thảo dược sử dụng trong thí nghiệm

TT	Tên khoa học	Tên thảo dược	Họ	Bộ phận sử dụng
1	<i>Bouea oppositifolia</i>	Thanh trà	Anacardiaceae	Lá
2	<i>Dirinaria applanala</i>	Địa Y	Caliciaceae	Thân
3	<i>Eclipta prostrata</i>	Cỏ mực	Asteraceae	Thân lá
4	<i>Psidium guajava</i>	Ổi	Myrtaceae	Lá
5	<i>Punica granatum</i>	Lựu	Lythraceae	Lá
6	<i>Teraminalia catppa</i>	Bàng	Combretaceae	Lá

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập và định danh vi nấm trên cá tra bệnh trướng bóng hơi

Cá tra được thu tại Cần Thơ và 28 mẫu bóng hơi của cá tra có dấu hiệu trướng bóng hơi được rửa bằng nước muối sinh lý vô trùng, sau đó cho vào môi trường Potato Dextrose Agar (PDA) và ủ ở 28°C trong 7 ngày. Cho mỗi loại kháng sinh 250 µg ampicilline và 250 µg streptomycine xung quanh mẫu để vi khuẩn không phát triển và ủ mẫu ở 28°C trong 5 - 7 ngày. Vi nấm phát triển ở các cơ quan được cấy chuyển trên môi trường Glucose Yeast Agar (GYA) để có chủng vi nấm thuần. Vi nấm được định danh theo khóa phân loại của de Hoog và cộng tác viên (2000) dựa vào các đặc điểm màu sắc khuẩn lạc trên môi trường GYA, đặc điểm hình thái sợi nấm và kích thước, đặc điểm cuống bào tử và bào tử về hình dạng và kích thước trong quá trình sinh sản của các chủng vi nấm phân lập được.

2.2.2. Phương pháp xác định ảnh hưởng của cao chiết thảo dược đến sự phát triển của sợi nấm

Vi nấm *Fusarium* sp. chủng P1501F2, P1501F9, F1901 và F1902 được nuôi cấy trên môi trường PDA sau 7 ngày. Cao chiết thảo dược được pha loãng các nồng độ 3,13; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 và 200 mg/mL trong dung dịch 10% DMSO. Cắt mẫu agar có nấm thuần (5 × 5 mm) cho vào 2 mL các nồng độ cao chiết thảo dược. Đối chứng được cho vào dung dịch 10% DMSO và mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần. Các mẫu nấm được ủ trong tủ ẩm ở 28°C và sự phát triển của sợi nấm được quan sát sau 1 và 2 ngày. Trong trường hợp không có sợi nấm phát triển, khối nấm được rửa qua nước cất tiệt trùng và

cấy trên môi trường PDA; sau 3 ngày quan sát và đo đường kính khuẩn lạc vi nấm. So sánh sự phát triển của sợi nấm ở các nồng độ cao chiết thảo dược và đối chứng để xác định ảnh hưởng của tinh dầu lên sự phát triển của sợi nấm (Borisutpeth *et al.*, 2009; Panchai *et al.*, 2015).

Tỉ lệ phần trăm ức chế tăng trưởng của sợi nấm phát triển được tính theo công thức của Vincent (1947): $I (\%) = (C - T)/C \times 100$. Trong đó, *C* là đường kính khuẩn lạc ở mẫu đối chứng; *T* là đường kính khuẩn lạc ở mẫu cao chiết thảo dược.

2.2.3. Phương pháp xác định nồng độ diệt nấm tối thiểu (MFC) của sợi nấm

Cao chiết thảo dược có hoạt tính kháng nấm cao được chọn để xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) và nồng độ diệt nấm tối thiểu (MFC). Nồng độ cao chiết được thực hiện bằng phương pháp pha loãng trong dung dịch 10% DMSO. Dùng ống cắt nấm số 2 cắt mẫu agar có nấm thuần cho vào ống nghiệm ở các nồng độ cao chiết và quan sát sự phát triển của sợi nấm trong 6, 12, 24 và 48 giờ. Sau đó, khối agar có vi nấm này được rửa sạch bằng nước cất tiệt trùng, cấy vào môi trường PDA và ủ ở 28°C. Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần. Giá trị MIC và MFC được xác định là nồng độ thấp nhất của cao chiết không có sợi nấm phát triển (Panchai *et al.*, 2015).

2.2.4. Phương pháp xác định ảnh hưởng của cao chiết thảo dược đến sự phát triển của bào tử

Chủng vi nấm thí nghiệm được cấy trên môi trường PDA và ủ ở 28°C trong 7 ngày. Thu bào tử vi nấm và mật độ bào tử được kiểm tra bằng buồng đếm Neubauer và hiệu chỉnh đến nồng độ

1×10^3 bào tử/mL. Căn cứ vào nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của sợi nấm để thực hiện xác định các nồng độ cao chiết cho thí nghiệm sự phát triển của bào tử. Cho 100 μ L mỗi nồng độ chiết thảo dược khác nhau vào 900 μ L dung dịch bào tử nấm; mẫu đối chứng được thay thế bằng dung dịch 10% DMSO và mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần. Quan sát sự phát triển của bào tử trong 1, 6, 12, 24 và 48 giờ. Sau đó, cho 100 μ L hỗn hợp dung dịch thí nghiệm trải trên môi trường PDA và ủ ở 28°C. Sự phát triển của bào tử vi nấm được xác định sau 24 và 48 giờ. Giá trị MFC được xác định là nồng độ thấp nhất của cao chiết thảo dược không có bào tử nấm phát triển (Panchai *et al.*, 2015). Tỷ lệ nảy mầm của bào tử được tính theo Kiraly và cộng tác viên (1974):

Tỷ lệ nảy mầm (%) = Số bào tử nảy mầm/Tổng số bào tử thí nghiệm \times 100.

2.2.5. Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu được thu thập và tính trung bình bằng chương trình Microsoft Excel 2016. Số liệu % ức chế tăng trưởng và tỷ lệ nảy mầm của cao chiết thanh trà, địa y, lựu và bàng được chuyển đổi bằng công thức $(x+0,5)^{1/2}$ và số liệu % của cao chiết cỏ mực và ổi được chuyển đổi bằng $\arcsin(x)^{1/2}$ trước khi xử lý thống kê. Sự khác biệt giữa các nghiệm thức được phân tích và so sánh bằng phép thử ANOVA 1 nhân tố với phép thử Duncan ở mức ý nghĩa $p = 0,05$ bằng phần mềm phân tích thống kê Statistica 10.0.

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

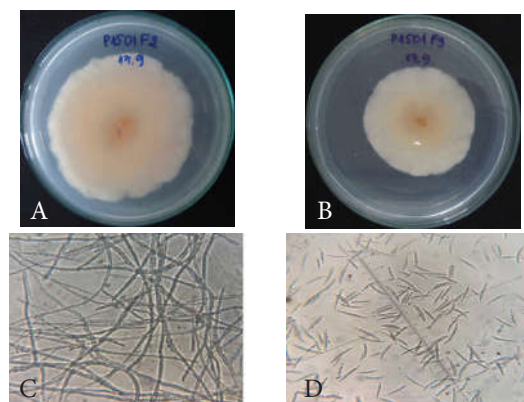
Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 7 năm 2020 đến tháng 9 năm 2021 tại Phòng thí nghiệm của Bộ môn Bệnh học thủy sản, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập và định danh vi nấm trên cá tra bệnh trương bóng hơi

Tổng số 18 chủng vi nấm phân lập ở bóng hơi cá tra, khuẩn lạc màu hồng nhạt hoặc vàng nhạt. Sợi nấm mịn, màu trắng mọc nhô khỏi môi trường nuôi cấy. Khuẩn lạc phát triển sau 7 ngày nuôi cấy trên môi trường PDA ở 28°C có đường kính 75 - 78 mm. Sợi nấm có vách ngăn và phân nhánh. Các đại bào tử có hình thuyền và nhỏ về hai đầu, có 1 - 4 vách ngăn. Căn cứ vào đặc điểm hình thái khuẩn lạc,

sợi nấm và bào tử đã định danh vi nấm thuộc bộ Hypocreales, họ Nectriaceae, giống *Fusarium* (Hình 1).



Hình 1. Vi nấm *Fusarium* sp. phân lập ở cá tra bệnh trương bóng hơi

Ghi chú: A: Khuẩn lạc chủng P1501F2 sau 3 ngày và B: Khuẩn lạc chủng P1501F9 sau 3 ngày trên môi trường PDA; C: Sợi nấm ở vật kính 40X; D: Đại bào tử hình thuyền ở vật kính 40X.

Fusarium sp. sinh sản vô tính tạo thành chủ yếu 3 dạng bào tử: tiểu bào tử, đại bào tử và bào tử vách dày. Tiểu bào tử có cấu trúc đơn giản hình cầu hoặc hình trứng thường đơn nhân và được hình thành từng cụm dính xung quanh các sợi nấm. Đại bào tử có kích thước dài, hình thuyền, có vách ngăn được hình thành từ các cụm bào tử dính ở phần đầu các sợi nấm. Tuy nhiên, không phải tất cả các loài đều sinh sản vô tính tạo thành 3 loại bào tử, nhưng chỉ có 20% loài *Fusarium* được phát hiện quá trình sinh sản (de Hoog *et al.*, 2000). *Fusarium* sp. đã được phát hiện ở cá tra nuôi thương phẩm có dấu hiệu bệnh lý như bơi lờ đờ, bỏ ăn, bụng trương to, bên trong nội quan thấy bóng hơi trương to, mềm, có màu vàng sẫm và có dịch vàng (Đặng Thụy Mai Thy, 2017).

3.2. Ảnh hưởng của cao chiết thảo dược đến sự phát triển của sợi nấm

Kết quả thử nghiệm ảnh hưởng của cao chiết thảo dược đến sợi nấm *Fusarium* sp. được trình bày ở bảng 2. Cao chiết cỏ mực, ổi và bàng ở nồng độ lần lượt là 3,13; 6,25; 12,5; 25; 50 và 100 mg/mL không có khả năng ức chế sự phát triển sợi nấm của 4 chủng *Fusarium* sp. P1501F2, P1501F9, F1901 và F1902 (Hình 2A). Cao chiết lựu ức chế sự phát triển của sợi nấm ở các nồng độ 25; 50 và 100 mg/mL. Tuy nhiên, nồng độ 3,13; 6,25; 12,5 mg/mL không ức chế sự phát triển của vi nấm. Tỷ lệ ức chế vi nấm thấp nhất $1,2 \pm 2,4\%$ ở nồng độ 3,13 mg/mL và khác biệt có ý nghĩa ($p < 0,05$) so với các nồng độ thí

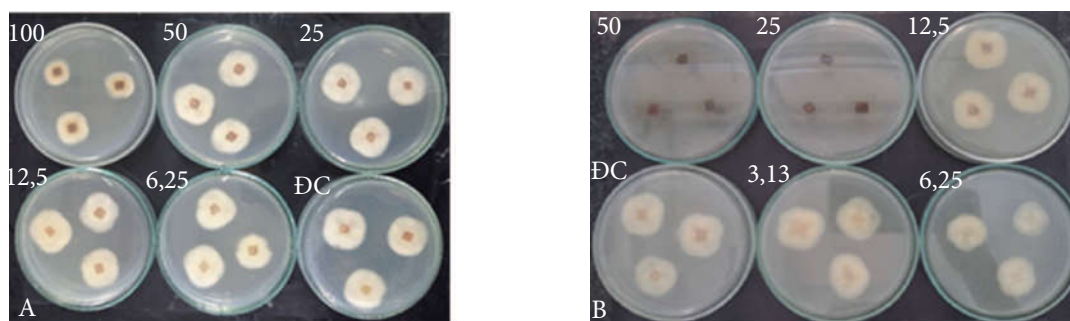
thí nghiệm khác (Hình 2B). Cao chiết thanh trà ức chế sợi nấm *Fusarium* sp. ở nồng độ 12,5 mg/mL. Ước chế tăng trưởng của sợi nấm với cao chiết thanh trà tỉ lệ từ 10,7 - 24,2% ở nồng độ 3,3 mg/mL và 20,3 - 29,7% ở nồng độ 6,25 mg/mL và khác biệt có

ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Các chủng *Fusarium* sp. bị ức chế hoàn toàn ở nồng độ 6,25 mg/mL ở cao chiết địa y. Tỉ lệ % ức chế tăng trưởng ở nồng độ 3,13 mg/mL dao động từ 20,3 - 35,1% (Bảng 2).

Bảng 2. Ảnh hưởng của cao chiết thảo dược đến sự phát triển của sợi nấm *Fusarium* sp.

Nồng độ mg/mL	Tỷ lệ ức chế tăng trưởng (%)					
	Thanh trà	Địa y	Cỏ mực	Ổi	Lựu	Bàng
3,13	16,6 ± 5,5 ^c	28,9 ± 5,7 ^b	4,5 ± 2,4 ^c	5,8 ± 4,8 ^f	1,2 ± 2,4 ^d	2,1 ± 2,9 ^c
6,25	26,6 ± 4,3 ^b	100 ^{a*}	7,7 ± 3,9 ^d	11,7 ± 2,9 ^e	3,7 ± 3,6 ^c	2,0 ± 2,6 ^c
12,5	100 ^{a*}	100 ^a	7,2 ± 1,6 ^d	22,2 ± 4,8 ^d	16,1 ± 2,8 ^b	2,4 ± 3,0 ^c
25	100 ^a	100 ^a	16,6 ± 5,5 ^c	35,4 ± 5,5 ^c	100 ^{a*}	10,0 ± 4,2 ^b
50	100 ^a	100 ^a	14,2 ± 5,5 ^b	48,4 ± 5,5 ^b	100 ^a	17,2 ± 3,9 ^a
100	100 ^a	100 ^a	51,3 ± 4,3 ^a	62,0 ± 3,5 ^a	100 ^a	17,9 ± 4,6 ^a

Ghi chú: Giá trị là trung bình ± sai số chuẩn; các giá trị có chữ cái giống nhau trong cùng một cột thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê với kiểm định Duncan, mức ý nghĩa 0,05. (*): Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của cao chiết.



Hình 2. Ảnh hưởng của chất chiết thảo dược đến sợi nấm *Fusarium* sp. sau 7 ngày

Ghi chú: A: Chủng F1501F9 và cao chiết cỏ mực; B: Chủng F1902 và cao chiết lựu.

Các chất chiết xuất từ cỏ mực (*Eclipta alba*) như saponins, alkaloid, flavonoid có thể kháng lại nấm *Fusarium solani*, *Aspergillus flavus* và *Aspergillus niger* (Hussain *et al.*, 2011). Theo Lenardon và cộng tác viên (2010), vách tế bào vi nấm là một cấu trúc phức tạp giúp tế bào tồn tại trong điều kiện thay đổi của môi trường. Chitin là thành phần chính của vách tế bào *Fusarium* và vi sợi chitin được hình thành nhờ vào enzyme chitin syntase. Trong điều kiện bất lợi của môi trường quá trình hình thành chitin sẽ gia tăng để bảo vệ vi nấm và quá trình sinh tổng hợp ở vách tế bào vi nấm giúp kháng lại các chất khi tiếp xúc. Kết quả thí nghiệm ở nồng độ 100 mg/mL cao cỏ mực ức chế 50% sự phát triển của vi nấm *Fusarium* sp. cao hơn so với nghiên cứu sử dụng cao cỏ mực *Eclipta alba* chiết bằng methanol ở nồng độ 60 mg/mL ức chế 50% sự phát triển của *F. thapsinum* và ức chế 80% tăng trưởng ở nồng

độ 100 mg/mL (Boregowda *et al.*, 2019). Ngoài ra, cao chiết ổi nồng độ 5% và 10% bằng acetone và 5% bằng ethanol không ức chế sự phát triển của *Fusarium* sp. (Neela *et al.*, 2014).

3.3. Nồng độ diệt nấm tối thiểu (MFC) của cao chiết thảo dược đến sự phát triển của sợi nấm

Nồng độ ức chế tối thiểu MIC của cao chiết lựu, thanh trà và địa y trên các chủng vi nấm *Fusarium* sp. lần lượt là 25; 12,5 và 6,25 mg/mL. Kết quả xác định nồng độ diệt nấm tối thiểu (MFC) được trình bày ở bảng 3. Sợi nấm *Fusarium* sp. vẫn phát triển ở các nồng độ 25; 12,5 và 6,25 mg/mL sau 1; 6 và 12 giờ. Nồng độ diệt nấm tối thiểu khác nhau ở các chủng *Fusarium* sp. thí nghiệm. Cụ thể, cao chiết lựu và thanh trà diệt sợi nấm ở nồng độ 25 mg/mL sau 24 giờ lần lượt trên chủng P1501F2 và P1501F9. Ở cùng nồng độ 25 mg/mL, sợi nấm chủng P1501F9 và F1901 không phát triển sau 48 giờ. Nồng độ diệt

nấm của cao chiết lựu trên chủng vi nấm F1902 là 50 mg/mL sau 48 giờ. Nồng độ diệt nấm tối thiểu của cao chiết thanh trà là 12,5 mg/mL. Sợi nấm các chủng *Fusarium* sp. không phát triển ở cao chiết địa y nồng độ 6,25 mg/mL sau 24 và 48 giờ.

Bảng 3. Nồng độ diệt nấm tối thiểu (MFC) của cao chiết thảo dược đến sợi nấm

Vi nấm	Nồng độ diệt nấm tối thiểu (mg/mL)/giờ		
	Thanh trà	Địa y	Lựu
P1501F2	12,5/48	6,25/48	25/24
P1501F9	25/24	6,25/48	25/48
F1901	12,5/24	6,25/24	25/48
F1902	12,5/48	6,25/24	50/48

Kết quả tương tự ở vi nấm *Fusarium incarnatum-equiseti* complex (FIESC) phân lập trên cá tra bị tương bóng hơi ít bị ảnh hưởng của cỏ mực chiết bằng phương pháp xay và nồng độ 20 g/L trong 24 - 48 giờ có thể ức chế khả năng phát triển của sợi nấm (Đặng Thụy Mai Thy, 2017). Bên cạnh đó, các hoạt chất flavonoid, alkaloid, terpenoid, tannin, và saponin được ly trích từ các bộ phận của cây có khả năng kháng một số loài vi nấm (Ogunjobi and Abiala, 2013). Theo Tsuzuki và cộng tác viên (2007), saponin cùng với các sterol tạo thành một phức hợp trong màng của nấm và gây ra sự phá vỡ màng tế bào

nấm bằng cách tạo các lỗ xuyên màng. α -tomatine là một saponin có thể gây chết tế bào ở *F. oxysporum* bằng cách kích hoạt tín hiệu G-protein và enzyme tyrosine kinase dẫn đến sự gia tăng trong tế bào Ca^{2+} và sự tích tụ oxy phản ứng (Ito *et al.*, 2007).

3.4. Ảnh hưởng của cao chiết thảo dược đến sự phát triển của bào tử

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của cao chiết đến sự phát triển của bào tử *Fusarium* sp. được trình bày ở bảng 4. Cao chiết thanh trà có khả năng ức chế hoàn toàn bào tử nấm nảy mầm đối với bốn chủng *Fusarium* sp. ở nồng độ 12,5 mg/mL. Tỷ lệ nảy mầm thấp nhất ở chủng F1902 (18,6 - 22,0%) và cao nhất ở chủng P1501F9 (27,3 - 32,0%) ở nồng độ 6,25 mg/mL. Tuy nhiên, cao chiết thanh trà ở nồng độ 3,13 mg/mL có hoạt tính ngăn khoảng 1/2 số lượng bào tử nảy mầm. Cụ thể, tỷ lệ nảy mầm của các chủng P1501F2, F1901, F1902 và P1501F9 lần lượt giảm từ 58,9% đến 37,8%. Đặc biệt, cao chiết địa y ức chế hoàn toàn sự nảy mầm của bào tử chủng F1902 ở nồng độ thấp nhất 3,13 mg/mL. Bào tử của chủng F1501F2, F1501F9 và F1901 không nảy mầm ở nồng độ 6,25 mg/mL. Cao chiết lựu có hoạt tính ngăn bào tử bốn chủng *Fusarium* sp. nảy mầm ở nồng độ 12,5 mg/mL (Hình 3).

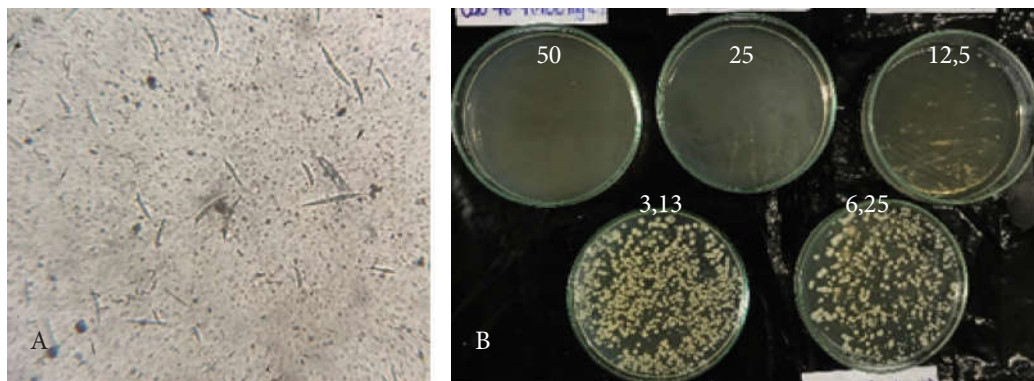
Bảng 4. Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của cao chiết thảo dược đến bào tử

Cao chiết	Nồng độ mg/mL	Tỷ lệ nảy mầm (%)			
		P1501F2	P1501F9	F1901	F1902
Thanh trà	3,13	54,7 ± 3,7 ^c	42,5 ± 4,4 ^c	51,5 ± 2,4 ^c	46,6 ± 2,9 ^c
	6,25	28,9 ± 1,9 ^b	29,1 ± 2,6 ^b	24,6 ± 0,9 ^b	22,2 ± 2,8 ^b
	12,5	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
	25	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
	50	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
Địa Y	1,57	68,0 ± 3,7 ^c	63,6 ± 2,0 ^c	65,3 ± 2,1 ^c	68,2 ± 3,4 ^c
	3,13	43,4 ± 4,2 ^b	32,3 ± 2,4 ^b	32,5 ± 2,1 ^b	0 ^a
	6,25	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
	12,5	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
	25	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
Lựu	3,13	65,5 ± 4,3 ^c	54,5 ± 2,8 ^c	54,3 ± 5,1 ^c	61,1 ± 3,5 ^c
	6,25	32,2 ± 3,4 ^b	26,4 ± 2,9 ^b	20,8 ± 1,9 ^b	23,7 ± 3,0 ^b
	12,5	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
	25	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
	50	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
Amphotericin B (µg/mL)	1,57	18,9 ± 6,5	17,6 ± 2,9	24,0 ± 2,1	20,9 ± 2,1
	3,13	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a

Giá trị là trung bình ± sai số chuẩn; các giá trị có chữ cái giống nhau trong cùng một cột thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê với kiểm định Duncan, mức ý nghĩa 0,05. (*): Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của cao chiết.

Shanshol và cộng tác viên (2013) cho rằng thảo dược được ngâm trong methanol cho hiệu quả ức chế sự phát triển của nấm cao hơn nhiều so với phương pháp ngâm trong dichloromethane và hexane. Ngoài ra, khi bào tử đã phát triển đến giai

đoạn ống mầm thì sợi nấm tiếp tục phát triển và không bị ảnh hưởng của điều kiện môi trường. Bào tử ở trạng thái ngủ trong điều kiện bất lợi của môi trường (Beyer *et al.*, 2004).



Hình 3. Ảnh hưởng của chất chiết thảo dược đến bào tử *Fusarium* sp. sau 3 ngày

Ghi chú: A: Bào tử không nảy mầm ở cao chiết lựu; B: Bào tử nảy mầm và phát triển trên môi trường PDA.

3.4. Nồng độ diệt nấm tối thiểu (MFC) của cao chiết thảo dược đến *Fusarium* sp.

Nồng độ diệt nấm tối thiểu của bốn chủng *Fusarium* sp. và cao chiết thanh trà, địa y và lựu được trình bày ở bảng 5. Tương tự ở sợi nấm, bào tử các chủng *Fusarium* sp. đều nảy mầm sau khi ngâm trong các cao chiết thí nghiệm sau 1, 6 và 12 giờ. Cao chiết địa y có nồng độ diệt nấm tối thiểu MFC là 3,13 mg/mL ở chủng F1902 sau 48 giờ thí nghiệm. Ba chủng P1501F2, P1501F9 và F1901 có giá trị MFC là 6,25 mg/mL sau 24 giờ. Nồng độ diệt nấm tối thiểu của cao chiết thanh trà với bào tử là 12,5 mg/mL sau 48 giờ. Bào tử vi nấm không phát triển sau 24 giờ và 48 giờ ở nồng độ MFC của cao chiết lựu là 25 mg/mL.

Bảng 5. Nồng độ diệt nấm tối thiểu của cao chiết thảo dược đến bào tử *Fusarium* sp.

Vi nấm	Nồng độ diệt nấm tối thiểu (mg/mL)/giờ		
	Thanh trà	Địa y	Lựu
P1501F2	12,5/48	6,25/24	25/24
P1501F9	12,5/48	6,25/24	25/48
F1901	12,5/48	6,25/24	25/48
F1902	12,5/48	3,13/48	25/48

Địa y là loài thực vật bậc thấp đặc biệt, địa y có tác dụng kháng khuẩn, kháng nấm. Các loài địa y *Cladonia amaurocraea*, *Cladonia rangiferina*

và *Usnea longissima* ở các nồng độ khác nhau 200, 400, 800, 1600 và 3200 mg/L cho hoạt tính kháng nấm *Saprolegnia parasitica* và *Achlya bisexualis* gây bệnh trên động vật thủy sản. Sự phát triển của sợi nấm *A. bisexualis* hoàn toàn ở nồng độ 1.600 mg/L và 3.200 mg/L và *S. parasitica* là 3.200 mg/L (Guo *et al.*, 2017). Theo Satish và cộng tác viên (2009), cao chiết lựu có hoạt tính kháng các loài nấm như *Fusarium equiseti*, *F. moniliforme*, *F. semitectum*, *F. graminearum*, *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. solani* và *F. lateritium*.

IV. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã phân lập được vi nấm *Fusarium* sp. ở cá tra bệnh trướng bóng hơi. Cao chiết cỏ mực, ổi và bàng không có khả năng ức chế bốn chủng *Fusarium* sp. Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) và nồng độ diệt nấm tối thiểu (MFC) của cao chiết địa y là 3,13 - 6,25 mg/mL; thanh trà 2,5 mg/mL và lựu 25 mg/mL.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Đỗ Huy Bích, Đặng Quang Chung, Bùi Xuân Chương, Nguyễn Thượng Dong, Đỗ Trung Đàm, Phạm Văn Hiến, Vũ Ngọc Lộ, Phạm Duy Mai, Phạm Kim Mãn, Đoàn Thị Thu, Nguyễn Tập và Trần Toàn, 2004. *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*. Tập II. NXB Khoa học và Kỹ thuật.

- 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. Thành phố Hồ Chí Minh.
- Đặng Thụy Mai Thy**, 2017. *Nghiên cứu vi nấm trong nuôi cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) và cá lóc (*Channa striata*) thâm canh*. Luận án Tiến sĩ, Ngành nuôi trồng thủy sản, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ: 111-113.
- Abad, M.J., M. Ansuategui and P. Bermejo**, 2007. Active antifungal substances from natural sources. *Arkivoc*, VII: 116-145.
- Beyer, M., M. Beyer, S. Roding S. Røding, A. Ludewig, A. Ludewig and J.A. Verreet**, 2004. Germination and survival of *Fusarium graminearum* macroconidia as affected by environmental factors. *Journal of Phytopathology*, 152: 92-97.
- Boregowda, R.S., N. Murali, A.C. Udayashankar, S.R. Niranjana, O.S. Lund and H.S. Prakash**, 2019. Antifungal activity of *Eclipta alba* metabolites against sorghum pathogens. *Plants*, 8: 72.
- Borisutpeth, P., P. Kanbutra, C. Hanjavanit, K. Chukanhom, D. Funaki and K. Hatai**, 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.
- De Hoog, G.S., J. Guarro, J. Gené and M.J. Figueras**, 2000. *Atlas of clinical fungi*. 2nd edition. Centraalbureau voor schimmelcultuur. 1126 pages.
- Deepa, B., G.S. Bisht and R.D. Khulbe**, 2000. *Fusarium* - A new threat to fish population in reservoirs of Kumaun, India. *Current Science*, 78 (10): 1241-1245.
- Guo, S.Y., W.X. Liu, L.F. Han and J.Z. Chen**, 2017. Antifungal activity of lichen extracts and usnic acid for controlling the saprolegniasis. *International Journal of Environmental and Agriculture Research*, 3 (5): 43-47.
- Hussain, I., N. Khan, R. Ullah, Shanzeb, S. Ahmed, F.A. Khan and S. Yaz**, 2011. Phytochemical, physiochemical and anti-fungal activity of *Eclipta alba*. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 5 (19): 2150-2155.
- Ito, S.I., T. Ihara, H. Tamura, S. Tanaka, T. Ikeda, H. Kajihara, C. Dissanayake, F.F. Abdel-Motaal, M.A. El-Sayed**, 2007. α -Tomatine, the major saponin in tomato, induces programmed cell death mediated by reactive oxygen species in the fungal pathogen *Fusarium oxysporum*. *FEBS Letters*, 581: 3217-3222.
- Kiraly, Z., Klement, S.J., Voros and Solymosy, K.**, 1974. *Methods in plant pathology with special reference to breeding for resistance to breeding for resistance*. Elsevier scientific publishing company, New York.
- Khoa, L. V. and K. Hatai**, 2005. First case of *Fusarium oxysporum* infection in culture Kuruma Prawn *Penaeus japonicus* in Japan. *Fish Pathology*, 40: 195-196.
- Lenardon, M.D., C.A. Munro and N.A.R. Gow**, 2010. Chitin synthesis and fungal pathogenesis. *Current Opinion in Microbiology*, 13 (4): 416-423.
- Neela, F.A., I.A. Sonia and S. Shamsi**, 2014. Antifungal activity of selected medicinal plant extract on *Fusarium oxysporum* schlechtthe causal agent of Fusarium wilt disease in tomato. *American Journal of Plant Sciences*, 5: 2665-2671.
- Ogunjobi, A.A and M.A. Abiala**, 2013. Antimicrobial activity of *Senna alata* and *Phyllanthus amarus*. *Global Journal of Pharmacology*, 7 (2): 198-202.
- Panchai, K., C. Hanjavanit, N. Rujinanont, S. Wada, O. Kurata and K. Hatai**, 2015. Experimental pathogenicity of *Achlya* species from cultured Nile tilapia to Nile tilapia fry in Thailand. *AACL Bioflux*, 8 (1): 70-81.
- Salter, C.E., K. O'Donnell, D.A. Sutton, D.P. Marancik, S. Knowles, T.M. Clauss, A.L. Berliner, and A. Camus**, 2012. Dermatitis and systemic mycosis in lined seahorses *Hippocampus erectus* associated with a marineadapted *Fusarium solani* species complex pathogen. *Diseases of Aquatic Organism*, 101: 23-31.
- Satish, S., M.P. Raghavendra and K.A. Raveesha**, 2009. Antifungal potential of some plant extracts against *Fusarium* sp. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 42 (7): 618-625.
- Shanshol, Z.A., M.A. Alaubydi and A. Sadik**, 2013. The extraction and partial purification of wedelolactone from local *Eclipta alba* plant. *Iraqi Journal of Science*, 54 (4): 1084-1089.
- Tsuzuki, J.K., T.I. Svidzinski, C.S. Shinobu, L.F. Silva, E. Rodrigues-Filho, D.A. Cortez, I.C. Ferreira**, 2007. Antifungal activity of the extracts and saponins from *Sapindus saponaria* L. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*, 79: 577-583.
- Vincent, J.M.**, 1947. The esters of 4-hydroxybenzoic acid and related compounds. Part I. Methods for the study of their fungistatic properties. *Journal of the Society of Chemical Industry*, 66: 149-155.

Effect of herbal extract on the growth of *Fusarium* sp. isolated from the swollen swim bladder of striped catfish

Dang Thuy Mai Thy, Nguyen Thi Thu Hang,
Nguyen Trong Tuan, Tran Thi Tuyet Hoa

Abstract

This study was conducted to determine the effect of herbal extract on the growth of *Fusarium* sp. isolated from the swollen swim bladder of striped catfish. The extract of 6 herbs including *Bouea oppositifolia*, *Dirinaria applanala*, *Eclipta prostrata*, *Psidium guajava*, *Punica granatum* and *Teraminalia catppa* were evaluated against four *Fusarium* sp. strains. The result revealed that extracts of *Bouea oppositifolia*, *Dirinaria applanala* and *Punica granatum* showed greater antifungal activity than those of the remaining herbs when the fungi were exposed to each herb. *Dirinaria applanala*, *Bouea oppositifolia* and *Punica granatum* completely inhibited the growth of mycelium and the germination of spores of four fungal strains at concentration of 6.25; 12.5 and 25 mg/mL, respectively. *Eclipta prostrata* and *Psidium guajava* were found to have antifungal activity at the concentration of 100 mg/mL. The inhibition rate of mycelium growth was from 47.3% to 65.5%. The fungal were grown on *Teraminalia catppa* at the concentration of 100; 50; 25 and 12.5 mg/mL.

Keywords: Herbal extract, MIC, MFC, *Fusarium* sp.

Ngày nhận bài: 10/11/2021

Ngày phản biện: 20/11/2021

Người phản biện: TS. Trương Đình Hoài

Ngày duyệt đăng: 30/11/2021

XÁC ĐỊNH NẤM *Phytophthora* spp. GÂY BỆNH THỐI RỄ, CHẢY GÔM TRÊN CÂY ĂN QUẢ CÓ MÚI TẠI CAO BẰNG

Nguyễn Nam Dương¹, Hà Minh Thanh¹, Nguyễn Thị Bích Ngọc¹,
Ngô Thị Thanh Hương¹, Vũ Duy Minh¹, Hà Việt Cường², Phạm Bích Hiền^{3*}

TÓM TẮT

Những năm gần đây cây ăn quả có múi là cây trồng thịnh hành và có giá trị kinh tế nhất của tỉnh Cao Bằng, tuy nhiên bệnh thối rễ, chảy gôm đã gây hại nghiêm trọng, làm giảm năng suất ở tất cả các vùng của tỉnh. Mục đích của nghiên cứu này là xác định loài và đặc điểm sinh học của tác nhân gây bệnh được phân lập từ các mẫu đất, rễ, mô cây cam, quýt, bưởi. Dựa vào đặc điểm hình thái của nấm, lây nhiễm nhân tạo, phân tích trình tự vùng ITS đã xác định được 3 loài nấm *Phytophthora palmivora*, *Phytophthora nicotianae* và *Phytophthora citrophthora* là nguyên nhân gây bệnh thối rễ, chảy gôm trên cây ăn quả có múi tại Cao Bằng. Môi trường V8, CRA và PDA ở pH 6 - 7 thích hợp cho sinh trưởng, phát triển của cả 3 loài *P. palmivora*, *P. nicotianae* và *P. citrophthora*. Nhiệt độ thích hợp nhất cho sinh trưởng, phát triển của *P. palmivora* là ở 25°C, *P. nicotianae* là 30°C và *P. citrophthora* là 20°C. Phạm vi pH thích hợp nhất cho sinh trưởng, phát triển của cả 3 loài là pH 5,0 - 6,0. Kết quả nghiên cứu này là cơ sở khoa học để tiếp tục nghiên cứu các biện pháp quản lý hiệu quả bệnh thối rễ, chảy gôm trên cây ăn quả có múi tại Cao Bằng.

Từ khóa: Cây ăn quả có múi, *Phytophthora palmivora*, *Phytophthora nicotianae*, *Phytophthora citrophthora*, bệnh thối rễ, chảy gôm

¹ Viện Bảo vệ thực vật;

² Học Viện Nông nghiệp Việt Nam;

³ Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam;

* Tác giả liên hệ: E-mail: phambichhien@vaas.vn