

VI NẤM *FUSARIUM OXYSPORUM* VL1.23: PHÂN LẬP, ĐỊNH DANH VÀ KHẢ NĂNG GÂY BỆNH TRÊN CÁ LÓC (*CHANNA STRIATA*)

Phạm Minh Đức*, Trần Ngọc Tuấn**

Title: *Fusarium* sp. VL1.23 infection on snakehead (*Channa striata*) farmed in the Mekong Delta

Từ khóa: cá lóc, *Fusarium oxysporum* VL1.23, cảm nhiễm

Keywords: snakehead fish, *Fusarium oxysporum* VL1.23, infection

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 27/3/2017;

Ngày nhận kết quả bình

duyet: 31/4/2017;

Ngày chấp nhận đăng bài:

06/9/2017.

Tác giả:

* PGS.TS., trường Đại học Cần Thơ

** NCS., Viện Thủy Sinh vật học, Viện Hàn lâm Khoa học Trung Quốc

pmduc@ctu.edu.vn

TÓM TẮT

Fusarium là tác nhân gây bệnh nấm trên nhiều loài cá và giáp xác. Nghiên cứu được thực hiện nhằm phân lập, định danh và xác định khả năng gây bệnh của chúng vi nấm phân lập trên cá lóc trong điều kiện thí nghiệm. Nghiên cứu này lần đầu tiên phân lập và định danh (dựa vào phương pháp nuôi cấy truyền thống và phương pháp sinh học phân tử) chủng *Fusarium oxysporum* VL1.23 từ 62 mẫu cá lóc được thu từ các ao nuôi tại An Giang, Đồng Tháp, Vĩnh Long, Hậu Giang và Cần Thơ. Kết quả nghiên cứu cho thấy *F. oxysporum* VL1.23 là tác nhân chính gây lở loét và mòn vây trên cá lóc (tỷ lệ cá chết tích lũy là 93,3% khi tiêm 2×10^5 bào tử/cá) sau 14 ngày cảm nhiễm. Ngoài ra, biến đổi cấu trúc mô mang, cơ và gan của cá nhiễm nấm ngoài tự nhiên cũng được quan sát.

ABSTRACT

Fusarium is a fungal pathogen infecting in many fish and crustacean species. This study aims to isolate, identify and determine the effect of fungal infection to snakehead fish under laboratory condition. This is the first case of isolation and identification (using both traditional culture-based and molecular-based methods) of *Fusarium oxysporum* VL1.23, isolated from 62 snakehead fish that sampled from cultured farms in An Giang, Dong Thap, Vinh Long, Hau Giang and Can Tho Provinces. The challenge test indicates the key role of the fungus *F. oxysporum* VL1.23 to infected snaked fish, causing high mortality of 93.3% after a 14-day injection with a dose of 2×10^5 conidia/fish. Histopathologically, the changes in the gill, muscular and liver tissues of naturally infected fish are also observed.

1. Giới thiệu

Vi nấm *Fusarium* thuộc ngành nấm Ascomycota, bao gồm vài trăm loài chủ yếu phân bố trong không khí, đất, các loài thực vật và hệ thống thủy vực (bao gồm cả nước ngọt và nước mặn) (Nelson, Dignani & Anaissie, 1994). Trên động vật thủy sản, nhiều loài thuộc giống *Fusarium* được xác định là tác nhân chính gây bệnh trên cá nước ngọt, cá biển và giáp xác biển (Yanong, 2003; Lightner & Fontaine, 1975; Khoa, Hatai & Aoki, 2004; Khoa, Hatai, Yuasa & Sawada,

2005; Khoa & Hatai, 2005). Cảm nhiễm do *Fusarium* thường gây ra các dấu hiệu như viêm da và tổn thương hệ thống, bệnh tiến triển thường hằng ngày hoặc hàng tuần tùy theo các yếu tố tác động khác như chất lượng nước và điều kiện ánh sáng (Yanong, 2003). Trước đây, *Fusarium* spp. được phân lập trên một số loài cá như: *Barbus rana*, *Channa punctatus*, *Labeo rohita*, *Mastaceambul armatus*, *Mystus tengra*, *Puntius sophore* và *Wallago attu* (Deepa, Bisht, Khulbe & Bisht, 2000), cá rô đồng (*Anabas testudineus*) (Trần

Ngọc Tuấn & Phạm Minh Đức, 2010), cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) (Duc, Thy, Hatai & Muraosa, 2015; Duc, Thy & Tuan, 2015) và cá tráp đầu vàng (*Sparus aurata*) (Abdel-Latif, Khalil, El-hofi, Saad & Zaiied, 2015). Trên giáp xác, vi nấm *Fusarium* được ghi nhận như là tác nhân chính gây bệnh đen mang (Phạm Minh Đức, Nguyễn Thanh Phương & Trần Ngọc Tuấn, 2010). Trong đó, *Fusarium oxysporum* được xem là loài phân bố rộng trong cả môi trường đất và môi trường nước, loài vi nấm này khả năng gây bệnh cho nhiều loài động vật (Kulatunga & cs., 2016). Trước đây, Hatai, Kubota, Kida & Udagawa (1986) đã ghi nhận trường hợp nhiễm vi nấm *F. oxysporum* trên cá tráp đỏ (*Pagrus* sp.), cá nhiễm không có dấu hiệu bất thường ngoại trừ thận sưng và mất màu. Tuy nhiên, trên cá rô phi vằn (*Oreochromis niloticus*), những dấu hiệu bệnh lý như mắt cá đỏ bất thường, xuất huyết dưới mô da đầu hoặc trên nắp mang được ghi nhận là có liên quan đến khả năng cảm nhiễm vi nấm *F. oxysporum* (khi đồng cảm nhiễm với vi khuẩn *Aeromonas hydrophila*) (Cutuli & cs., 2015). Trên cá ngựa vằn (*Danio rerio*), Kulatunga & cs. (2016) ghi nhận *F. oxysporum* gây nhiễm trên mang và vùng eo (isthmus) của cá.

Cá lóc (*Channa striata*) là đối tượng được nuôi phổ biến Đồng Bằng Sông Cửu Long (ĐBSCL) (Lê Xuân Sinh & Đỗ Minh Chung, 2009). Vấn đề dịch bệnh luôn xảy ra đồng thời với nghề nuôi cá lóc. Nhiều công bố liên quan đến tình hình dịch bệnh xảy ra trên cá lóc nuôi đã được thực hiện (Lê Xuân Sinh & Đỗ Minh Chung, 2009; Nguyễn Thị Diệp Thúy, 2010; Phạm Đăng Phương, 2010; Phạm Minh Đức và Nguyễn Thị Thúy Hằng, 2011; Phạm Minh Đức, Trần Ngọc Tuấn & Trần Thị Thanh Hiền, 2012). Tuy nhiên, vi nấm *F. oxysporum* chưa từng được công bố gây bệnh trên cá lóc nuôi ở ĐBSCL. Trong khảo sát trước đây, Phạm Minh Đức, Trần Ngọc Tuấn & Trần Thị Thanh Hiền (2012) ghi nhận sự hiện diện của nấm *Fusarium* trên cá lóc nuôi

thâm canh trong ao đất tại An Giang và Đồng Tháp, kết quả định danh đến loài vi nấm trong nghiên cứu này vẫn chưa được tiến hành. Vì thế, định danh loài vi nấm *Fusarium* phân lập từ cá lóc nuôi thương phẩm là cần thiết. Nghiên cứu này đã mô tả đặc điểm hình thái của chủng nấm *F. oxysporum* được phân lập từ cá lóc nuôi thương phẩm ở ĐBSCL có dấu hiệu lở loét và mòn vây nhằm cung cấp những dữ liệu cơ bản đầu tiên về khả năng nhiễm bệnh do vi nấm *F. oxysporum* trên cá lóc nuôi thương phẩm tại ĐBSCL.

2. Nội dung nghiên cứu

2.1. Phương pháp nghiên cứu

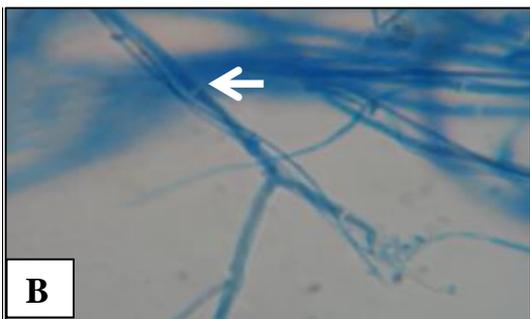
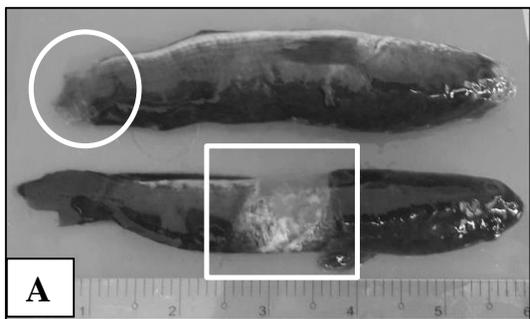
2.1.1. Thu mẫu

Tổng số 62 mẫu cá lóc được thu từ các ao nuôi cá lóc tại An Giang, Đồng Tháp, Vĩnh Long, Hậu Giang và Cần Thơ suốt trong thời gian từ tháng 6/2015 đến tháng 8/2016. Số lượng mẫu được thu từ 5 - 10 cá bệnh và 2 - 4 cá khỏe ở mỗi ao. Cá nhiễm vi nấm có dấu hiệu bơi lơ dờ trên mặt nước, thân cá có dấu hiệu lở loét và mòn vây (Hình 2.1A). Mẫu được phân tích tại phòng thí nghiệm Vi nấm, khoa Thủy sản, trường Đại học Cần Thơ.

2.1.2. Phân lập và định danh vi nấm

Qui trình phân lập vi nấm theo mô tả của Phạm Minh Đức, Nguyễn Thanh Phương & Trần Ngọc Tuấn (2010) được tiến hành như sau: Trước khi thao tác phân lập, mẫu bệnh phẩm được thực hiện quan sát tiêu bản tươi. Khi phát hiện có sự hiện diện của sợi nấm trên các mẫu quan sát (Hình 2.1B), tiến hành phân lập vi nấm. Mẫu được rửa 3 lần qua nước muối sinh lý vô trùng và cấy trực tiếp trên bề mặt đĩa môi trường thạch GYA (Glucose 1%, Yeast extract 0,25% và Agar 1,5%) (Hatai & Egusa, 1979). Hai loại kháng sinh ampiciline và streptomycin được rắc xung quanh mẫu cấy để hạn chế nhiễm khuẩn, nấm được ủ trong 4 ngày ở 28°C, quan sát nấm phát triển và cấy truyền nhiều lần để có được chủng nấm thuần.

Khi nấm đã thuần, từ môi trường GYA tiến hành nuôi cấy trên lame kính (De Hoog, Guarro, Gené & Figueras, 2000) theo mô tả của Phạm Minh Đức, Nguyễn Thanh Phương & Trần Ngọc Tuấn (2010) nhằm ghi nhận và mô tả đặc điểm hình thái của nấm trong quá trình sinh sản vô tính để định danh. Phương pháp nuôi cấy trên lame kính được tiến hành theo các bước sau: (b1) Chuẩn bị dụng cụ vô trùng: Gồm đĩa Petri, lame và lamên, que thủy tinh hình chữ V, giấy thấm và môi trường nuôi cấy như PYGSA hoặc PDA và nước muối sinh lý (0,85% NaCl); (b2) tạo khối môi trường agar: Dùng dao cắt một khối môi trường agar (1×1×1cm), đặt lên lame kính. Lame này để trên que thủy tinh hình chữ V, bên dưới có lớp giấy thấm (để giữ độ ẩm), tất cả đặt trong đĩa Petri; (b3) cấy nấm: Cắt nấm thuần cấy vào 4 mặt bên của khối môi trường agar, rồi đặt lamên lên khối agar này; (b4) ủ nấm: Ở nhiệt độ 20 - 30°C, cho đến khi quan sát thấy nấm phát triển khoảng 1 - 2 tuần; (b5) nhuộm và quan sát hình thái sinh sản vô tính: Lấy lamên và lame kính ra, đặt lên lame kính mới có sẵn giọt thuốc nhuộm cotton blue hay thuốc nhuộm huỳnh quang, cố định bằng keo để 24 giờ, quan sát dưới kính hiển vi ghi nhận kết quả và chụp hình.



Hình 2.1: Mẫu cá lóc nhiễm vi nấm: (A) cá lóc bị mòn vây (vòng tròn) và hoại tử ở thân (hình vuông) (B) quan sát tiêu bản tươi sợi nấm bạc cao có vách ngăn (mũi tên) nhuộm trên mô cơ cá lóc bị lở loét (nhuộm cotton blue), quan sát ở độ phóng đại 400X

Nấm được định danh theo hai phương pháp: (1) Quan sát đặc điểm hình thái của vi nấm (hình thái của khuẩn lạc trên môi trường nuôi cấy, đặc điểm hình thái và kích thước sợi nấm, quá trình sinh sản vô tính, đặc điểm cuống bào tử và bào tử về hình dạng và kích thước) được quan sát và căn cứ theo mô tả khoá phân loại của De Hoog, Guarro, Gené & Figueras (2000) để định danh các chủng nấm phân lập được; (2) giải trình tự đoạn gene ITS của vi nấm và tra cứu trên Blast search (dựa trên dữ liệu của NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) để so sánh tính tương đồng của đoạn gen với những loài vi nấm đã được định danh trong kho dữ liệu online nhằm định danh đến loài của chủng vi nấm này. Quy trình giải trình tự gene (bao gồm các bước như ly trích DNA, phản ứng PCR khuếch đại một đoạn sản phẩm bao gồm các vùng ITS1, 5.8S và ITS2, giải trình tự sử dụng bộ kit BigDye terminator trên thiết bị giải trình tự ABI3130XL (Applied Biosystems) và sau đó tiến hành phân tích kết quả định danh) được thực hiện tại phòng xét nghiệm NK-Biotek, Công ty TNHH dịch vụ và thương mại Nam Khoa, Tp. Hồ Chí Minh.

2.1.3. Thí nghiệm cảm nhiễm

Chuẩn bị bào tử vi nấm: Phương pháp chuẩn bị bào tử được tiến hành theo mô tả của Phạm Minh Đức, Nguyễn Thanh Phương & Trần Ngọc Tuấn (2010). Bào tử chủng vi nấm thí nghiệm VL1.23 được nuôi cấy ở 28°C trong 5 ngày trên môi trường GYA. Sau khi vi nấm đã phát triển trên đĩa môi trường cấy, bào tử vi nấm được thu bằng cách cho trực tiếp 20mL nước muối sinh lý (0,85% NaCl) vô trùng vào các đĩa cấy, sau đó trải đều bằng que cấy vô trùng và lấy phần dung dịch lỏng, tiến hành lọc với giấy lọc vô trùng

và thu bào tử nấm. Mật độ bào tử được xác định bằng cách dùng buồng đếm hồng cầu và phương pháp pha loãng theo hệ số 10. Cách tính bào tử vi nấm được thực hiện theo Duc (2009): M (bào tử/mL) = $B \times 10^4 \times P$ (trong đó, M là mật độ bào tử, B là tổng số bào tử trong 25 ô đếm và P là độ pha loãng). Mật độ bào tử vi nấm sử dụng cho thí nghiệm này là 2×10^6 bào tử/mL.

Cá dùng cho thí nghiệm: Cá lóc sử dụng cho thí nghiệm cảm nhiễm được mua từ ao nuôi tại Cần Thơ, cá có khối lượng trung bình là 4,8 g và không có dấu hiệu bệnh lý. Trước khi tiến hành thí nghiệm cảm nhiễm, cá được thuần hóa trong bể composite với sục khí và được cho ăn 2 lần/ngày (sáng và chiều) bằng thức ăn viên công nghiệp (40% đạm) trong thời gian 4 tuần. Cá được quan sát không nhiễm kí sinh trùng và vi nấm trước khi tiến hành thí nghiệm cảm nhiễm.

Thí nghiệm cảm nhiễm và quan sát: Tiêm 0,1 mL dung dịch chứa bào tử vi nấm (mật độ 2×10^6 bào tử/mL) vào vây lưng cá thí nghiệm và tiêm cùng thể tích nước muối sinh lý (0,85% NaCl) vô trùng vào cá dùng cho nghiệm thức đối chứng. Thí nghiệm được bố trí trong bể nhựa (thể tích 50L) có sục khí với mật độ 15 con/bể. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần cho mỗi nghiệm thức (đối chứng và thí nghiệm). Trong quá trình thí nghiệm, cá được cho ăn 2 lần/ngày với thức ăn viên công nghiệp. Trong thời gian bố trí thí nghiệm, nước trong bể được thay định kỳ 3 ngày/lần, mỗi lần thay từ 20 - 30% thể tích nước. Biểu hiện của cá được quan sát và ghi nhận hằng ngày trong 14 ngày. Những cá có dấu hiệu bệnh lý (hoặc chết) được thu mẫu và tiến hành tái phân lập và định danh vi nấm.

2.1.4. Đặc điểm mô bệnh học

Mẫu mang, cơ và gan của cá nhiễm bệnh tự nhiên trong ao nuôi được thu và cố định trực tiếp trong dung dịch neutral buffer formalin (NBF) và chuyển sang cồn 70% để bảo quản và chuẩn bị dùng cho các thao tác

tiếp theo. Mẫu được xử lý qua các giai đoạn loại nước, làm trong mẫu, tẩm paraffin, đúc khối (trong paraffin), cắt mẫu (4-6 μ m) và nhuộm với dung dịch heamatoclyline và eosin (H&E). Tiêu bản được quan sát dưới kính hiển vi lần lượt ở độ phóng đại 100X và 400X. Tiến hành chụp hình các tiêu bản đặc trưng và ghi nhận sự biến đổi cấu trúc mô cũng như quan sát sự hiện diện của sợi nấm và bào tử vi nấm trên tiêu bản mô.

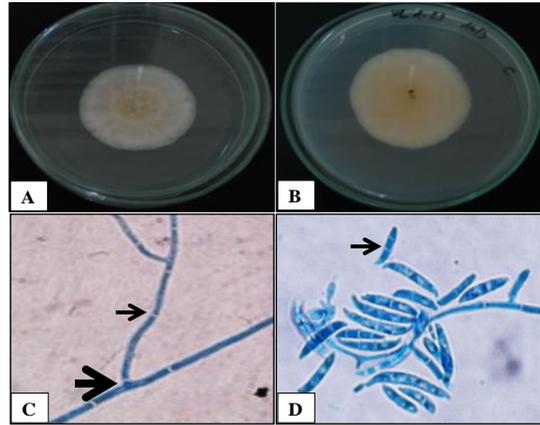
2.2. Kết quả và thảo luận

2.2.1. Phân lập và định danh vi nấm

Phân lập vi nấm: Tổng số 49 chủng vi nấm thuần được phân lập từ cá lóc có dấu hiệu bệnh lý được quan sát (với sự xuất hiện của các sợi nấm có vách ngăn phát triển bên trong mẫu mô quan sát tiêu bản tươi). Kết quả ghi nhận khuẩn lạc vi nấm phát triển trên môi trường GYA sau 1 - 4 ngày nuôi cấy. Trong đó, chủng vi nấm VL1.23 được chọn lọc từ những chủng có hình thái khuẩn lạc giống nhau (chiếm tần suất xuất hiện cao - 38,8% so với các chủng còn lại) dùng cho những nghiên cứu tiếp theo.

Đặc điểm hình thái và định danh: Chủng vi nấm VL1.23 có khuẩn lạc phát triển nhanh trên môi trường GYA ở 28°C, đạt đường kính 48mm sau 5 ngày nuôi cấy. Khuẩn lạc có màu vàng trắng nhạt khi quan sát ở mặt trên của khuẩn lạc (Hình 3.1A) và màu hồng nhạt ở mặt dưới khuẩn lạc (Hình 3.1B). Sợi nấm màu trắng mọc nhô cao khỏi bề mặt môi trường nuôi cấy và đan xen vào nhau. Sợi nấm có vách ngăn ngang và phân nhánh, đường kính sợi nấm khoảng từ 4-8 μ m (Hình 3.1C). Cuống bào tử được hình thành sau 4 ngày nuôi cấy trên lame kính ở 28°C. Cuống bào tử mọc trực tiếp từ sợi nấm, có dạng búp măng và nhỏ dần về đỉnh, có vách ngăn ở phần gốc (Hình 3.1C). Các đại bào tử được hình thành từ cuống sinh bào tử, đại bào tử có hình thuyền, thuôn dài, hơi cong và nhỏ về hai đầu, kích thước trung bình $21,4 \pm 4,5 \times 2,8 \pm 0,6 \mu$ m và có 1 - 4 vách ngăn (Hình 3.1D). Theo khóa phân loại của De Hoog,

Guarro, Gené & Figueras (2000) có mô tả vi nấm *Fusarium* có khuẩn lạc màu hồng, vàng, đỏ hoặc tím nhạt; cuống bào tử được hình thành từ sợi nấm, phân nhánh nhiều, thường mọc thành cụm với hình trụ hoặc có hình búp măng; bào tử thường có đại bào tử (hình lưới liềm hoặc hình thuyền với nhiều vách ngăn) và tiểu bào tử (hình elip, hình trứng và hình cầu). Căn cứ theo khóa phân loại trên thì chủng vi nấm VL1.23 được định danh sơ bộ thuộc giống vi nấm *Fusarium*. Trình tự đoạn gen ITS có chiều dài 898 nucleotide của chủng vi nấm VL1.23 được dùng để tra cứu trên Blast search (dựa trên dữ liệu của NCBI) (Hình 3.2A). Kết quả cho thấy chủng vi nấm VL1.23 có trình tự gen tương đồng 97% với trình tự gen của loài *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* race 4 strain B2 (Mã số: LT571434.1) (Hình 3.2B). Kết quả này có thể khẳng định chủng vi nấm VL1.23 thuộc loài *Fusarium oxysporum* VL1.23.



Hình 3.1. Đặc điểm hình thái vi nấm *Fusarium oxysporum* VL1.23. (A) Khuẩn lạc mặt trên đĩa Petri; (B) Khuẩn lạc mặt dưới đĩa Petri; (C) Sợi nấm có vách ngăn (mũi tên ngắn) và vách ngăn ở gốc cuống sinh bào tử (mũi tên dài) (400X); (D) Đại bào tử có hình thuyền tập trung ở đầu mút của cuống sinh bào tử (400X).

A

ctcgactcgtcgaaggagctttacagagatttggcatccaaccagacggggctctcacctctatggcgtcccgtccagg
 gaactcggaaagcaccgcatcaaaagcatctctacaattacaactcgggccgagagccagattfcaaaattgagctgtt
 cccgcttactcggcttactagggcaatccctgttggttctttctccgcttattgatatgcttaagtctcagcgggtattccta
 cctgatccgaggtcaacattcagaagttggggttttacggcgtggccgacgattaccagtaacagaggtgatgattacta
 cgctatggaagctcagcgtgaccgccaatcgatttggggaacgcgggttaccgcgagtcaccaacccaagctgagcttga
 ggggtgaaatgacgctcgaacagggcatgcccgcagaatactggcggggcgaatgtgcttcaaaagattcgatgattcact
 gaattctgcaattcacttacttctcattttgctgcttctcctcctgatccagaaccaagagatccgttggtaagattttgat
 ttattttgttttactcagaagttccactaaaacagagtttgggggtctcggggcggccgctccggtttacggggcgcgg
 gctgatccggcaggaacgtataggtatgttcacaggggttgggagttgaaactggtaatgatccctccgctggttcac
 caacggagacctgttacgacttttactctcctaataatgaccgagtttggagagctttccggccctgagtgtagtggccacc
 tctctggggcagctccggacgcctcactgagccattcaatcggtatgacgacgggcgggtgtgtacaa

B

TPA_inf: *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* race 4 strain B2 rDNA repeat region
 Sequence ID: LT571434.1 Length: 7872 Number of Matches: 1

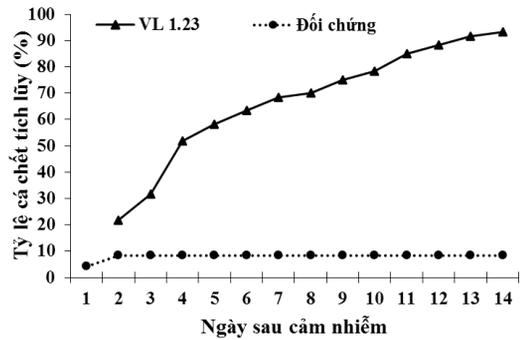
Range 1: 1623 to 2518		GenBank	Graphics		
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
1502 bits(813)	0.0	872/900(97%)	6/900(0%)	Plus/Minus	
Query 1	CTCGACTCGTCAAGGAGCTTACAGAGATTTGGCATCCAACCAGACGGGGCTCTCACCC	60	Query 481	TGATGATCACTGAATTCGCAATTCATTACTTATGCCAATTTGCTGGCTTCTCAT	540
Sbjct 2518	CTCGACTCGTTCGAAGGAACTTACAGAGATTTGGCATCCAACCAGACGGGGCTCTCACCC	2459	Sbjct 2039	TGATGATCACTGAATTCGCAATTCATTACTTATGCCAATTTGCTGGCTTCTCAT	1980
Query 61	TCTATGGGCTCCGCTCCAGGGAAGCTCGAAGGACCCGCAATCAAAAGCATCTCTACAAA	120	Query 541	CGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTGAAGTTGATTTATTTGTGTGTTACTCA	600
Sbjct 2458	TCTATGGGCTCCGCTTCGAGGAACTCGAAGGACCCGCAATCAAAAGCATCTCTACAAA	2399	Sbjct 1979	CGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTGAAGTTGATTTATTTGTGTTACTCA	1921
Query 121	TTACAACCTGGGCCGAGAGCCAGATTTCAAATTTGAGCTGTTGCCGCTTCACTCGCCGT	180	Query 601	GAAGTTCACATA-A-AAACAGAGTTTGAAGGCTCTGGGGCCGCTCCGCTTTACGGG	658
Sbjct 2398	TTACAACCTGGGCCGAGAGCCAGATTTCAAATTTGAGCTGTTGCCGCTTCACTCGCCGT	2339	Sbjct 1920	GAAGTTCACA-TATAGAAACAGAGTTTGAAGGCTCTGGGGCCGCTCCGCTTTACGGG	1862
Query 181	TACTAGGGCAATCCCTGTGTGTTCTTCTCCGCTTATGATATGCTTAAGTTACAGCG	240	Query 659	GCGGGGCTGATCCCGGAGGCAAGCTATAGGTATGTTCCACAGGGTTTGGAGTTGTAA	718
Sbjct 2338	TACTAGGGCAATCCCTGTGTGTTCTTCTCCGCTTATGATATGCTTAAGTTACAGCG	2279	Sbjct 1861	GAGCGGGCTGATCCCGGAGGCAAC-AAAGTGTATGTTACAGGGTTTGGAGTTGTAA	1803
Query 241	GGTATTCCTACTGATCCAGAGTCAACATTCAGAAAGTTGGGTTTACCGCTGGCCCGG	300	Query 719	ACTCGGTAATGATCCCTCCGCTGGTTCAACAACGGAGACTTGTACAGCTTTACTTCC	778
Sbjct 2278	GGTATTCCTACTGATCCAGAGTCAACATTCAGAAAGTTGGGTTTACCGCTGGCCCGG	2219	Sbjct 1802	ACTCGGTAATGATCCCTCCGCTGGTTCAACAACGGAGACTTGTACAGCTTTACTTCC	1743
Query 301	ACGATTACCACTAAGGAGGTATGATTAACCTACGCTATGGAAGCTCGAGCTACCCGCAA	360	Query 779	TCTAATGACCGAGTTTGGAGACTTTCCGGCCCTGAGTGTAGTTCGCCACTCTCTGG	838
Sbjct 2218	ACGATTACCACTAAGGAGG-GTTTACTACTACGCTATGGAAGCTCGAGCTACCCGCAA	2160	Sbjct 1742	TCTAATGACCGAGTTTGGAGACTTTCCGGCCCTGAGTGTAGTTCGCCACTCTCTGG	1683
Query 361	TGATTTGGGAAAGCGGGTTACCGGAGTCCCAACACCAAGCTGAGCTGAGGGTTGAA	420	Query 839	GGCAGCTCCGAGGCTCTACTGAGCCATCAATCGGTATGACGACGGGGCTGTGTACAA	898
Sbjct 2159	TCAATTTGGGAAAGCGGAATTAACCGGGTCCCAACACCAAGCTGAGCTGAGGGTTGAA	2100	Sbjct 1682	GGCAGCTCCGAGGCTCTACTGAGCCATCAATCGGTATGACGACGGGGCTGTGTACAA	1623
Query 421	ATGACCGTGGAAACAGGATGCCCCCAGAAATCTGGGGGGCCAAATCTCGTTCAAAGAT	480			
Sbjct 2099	ATGACCGTGGAAACAGGATGCCCCCAGAAATCTGGGGGGCCAAATCTCGTTCAAAGAT	2040			

Hình 3.2. Kết quả giải trình tự đoạn gene ITS. (A) Trình tự đoạn gene và (B) Kết quả tra cứu trên Blast search (dựa trên dữ liệu của NCBI)

Trong nghiên cứu này, các dấu hiệu bệnh lý như lở loét và mòn vây trên cá lóc giống với những mô tả trong các nghiên cứu trước đây trên cá lóc (*Channa striata*) (Phạm Minh Đức, Trần Ngọc Tuấn & Trần Thị Thanh Hiền, 2012) và cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) (Phạm Minh Đức & Đặng Thụy Mai Thy, 2013). Trước đây, vi nấm *Fusarium* được ghi nhận là tác nhân gây bệnh trên nhiều loài cá như trên cá mập *Sphyrna lewini* với các vết phù và nhót màu trắng đục trên vùng đầu (Crow, Brock & Kaiser, 1995) và cá tra (*P. hypophthalmus*) gây trương bóng hơi (Duc, Thy, Hatai & Muraosa, 2015). Từ kết quả nghiên cứu này có thể kết luận lần đầu tiên định danh được loài vi nấm *F. oxysporum* VL1.23 phân lập từ cá lóc nuôi thâm canh ở Đồng bằng Sông Cửu Long có dấu hiệu lở loét và mòn vây.

2.2.2. Thí nghiệm cảm nhiễm

Thí nghiệm cảm nhiễm tiêm ở vây lưng cá với chủng vi nấm *F. oxysporum* VL1.23 với mật độ bào tử 2×10^5 bào tử/cá. Hình 3.3 biểu thị kết quả thí nghiệm. Cá bắt đầu chết sau 48 giờ tiêm, cá chết không có dấu hiệu bệnh lý rõ rệt, nhưng có ghi nhận được kết quả tái phân lập vi nấm ở mẫu cơ, mang và gan của cá cảm nhiễm. Tỷ lệ cá chết tích lũy tăng dần ở nghiệm thức tiêm vi nấm *F. oxysporum* VL1.23 và sau 14 ngày thí nghiệm, tỷ lệ này đạt 93,3%. Cá có biểu hiện bệnh lý chủ yếu lở loét trên thân, mang nhạt có đốm trắng và đen thân. Những dấu hiệu này tương đối giống với cá nhiễm bệnh tự nhiên trong ao nuôi. Tiến hành tái phân lập vi nấm trên cá cảm nhiễm và định danh (dựa vào đặc điểm hình thái) giống với chủng vi nấm ban đầu dùng cho thí nghiệm. Ngược lại, ở nghiệm thức đối chứng tỷ lệ chết là 8,34% sau 14 ngày và không có dấu hiệu cảm nhiễm vi nấm khi tái phân lập.



Hình 3.3. Tỷ lệ cá lóc chết tích lũy (%) theo ngày sau khi cảm nhiễm với chủng vi nấm *Fusarium oxysporum* VL1.23 với mật độ bào tử 2×10^5 bào tử/cá

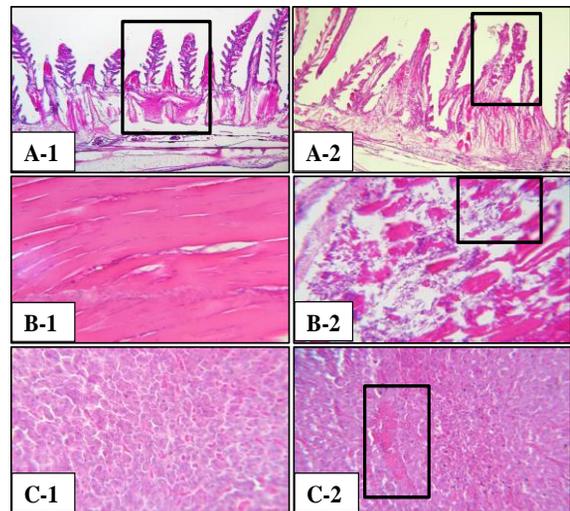
Thí nghiệm gây cảm nhiễm nhân tạo trên cá lóc với vi nấm *F. oxysporum* VL1.23 cho thấy dấu hiệu bệnh lý giống như cá cảm nhiễm ngoài tự nhiên và kết quả tái phân lập được chủng vi nấm ban đầu dùng cho thí nghiệm. Ở thí nghiệm này ghi nhận cá chết sau 48 giờ tiêm. Cá chết ở nghiệm thức này có thể do hai nguyên nhân: (1) Thao tác trong quá trình bố trí thí nghiệm làm cho cá xây xác, stress, suy yếu và chết hoặc (2) cảm nhiễm từ bào tử vi nấm và nguyên nhân này được chứng minh thông qua kết quả tái phân lập cho thấy có hiện diện của bào tử nấm trên các cơ quan như cơ, mang và gan. Như vậy, sau khi tiêm bào tử nấm vào bên trong cơ cá, các bào tử này đã được vận chuyển theo đường máu đến các cơ quan khác chuẩn bị cho quá trình nảy mầm và phát triển của bào tử; mặc dù chưa có dấu hiệu bệnh lý rõ rệt nhưng các bào tử đã hiện diện tại các cơ quan này để có thể nảy mầm, phát triển thành sợi nấm mới và tiết độc tố gây bệnh. Sau 14 ngày thí nghiệm tỷ lệ chết tích lũy tăng cao, kết quả nghiên cứu này giống với kết quả của những nghiên cứu trước đây (Ke, Wang, Yuan & Gong, 2010; Phạm Minh Trúc, 2012; Nguyễn Trúc Phương, 2015; Ngô Thị Mộng Trinh, 2016). Khi cảm nhiễm loài vi nấm này (*F. oxysporum*) (nồng độ $4,4 \times 10^8$ bào tử/mL) trên cá vàng (*Carassius auratus*), Ke, Wang, Yuan & Gong (2010) đã ghi nhận tỷ lệ cá chết tích lũy là 93 - 100% sau 15 ngày tiêm với các dấu hiệu bệnh lý như phần đầu cá, vây lưng, phần lưng và đuôi xuất huyết và viêm, phần bụng có vết loét, cơ quan nội tạng như gan, thận và ruột sung huyết, sung to và phù thũng. Vi nấm *F.*

oxysporum VL1.23 dùng trong nghiên cứu này gây ra tỷ lệ chết của cá lóc (93,3%) cao hơn tỷ lệ chết của cá tra (46,15% và 3,33%) trong nghiên cứu trước đây khi cảm nhiễm với *F. oxysporum* (được phân lập từ cá tra bệnh) ở mật độ bào tử lần lượt là 8×10^6 và 8×10^3 bào tử/mL (Phạm Minh Trúc, 2012). Ngoài ra, khi tiêm vi nấm *Fusarium* sp. (mật độ 2×10^5 bào tử/mL) trên cá điêu hồng (*Oreochromis* sp.) và cá rô phi (*Oreochromis niloticus*), kết quả ghi nhận tỷ lệ chết tích lũy của cá điêu hồng và cá rô phi lần lượt là 86,67% và 50% sau 14 ngày thí nghiệm (Ngô Thị Mộng Trinh, 2016). Sự khác nhau về tỷ lệ chết trong những nghiên cứu này được lý giải cho sự khác biệt ở loài cá thí nghiệm, độc lực của chủng vi nấm thí nghiệm và điều kiện bố trí thí nghiệm. Ngược lại ở nghiệm thức đối chứng, cá được ghi nhận chết sau hai ngày thí nghiệm, tỷ lệ chết là 8,34% và được duy trì sau 14 ngày thí nghiệm và tái phân lập không có cảm nhiễm vi nấm. Kết quả này cho thấy cá chết ở nghiệm thức đối chứng khả năng là do ảnh hưởng của quá trình thao tác khi chuẩn bị bố trí thí nghiệm và không liên quan đến khả năng cảm nhiễm vi nấm. Nhìn chung, kết quả thí nghiệm này minh chứng cho tác nhân gây bệnh lở loét và mòn vây trên cá lóc là do vi nấm *F. oxysporum* VL1.23.

2.2.3. Mô bệnh học

Biểu hiện mô bệnh học trên mang, cơ và gan cá lóc bị tổn thương và lở loét được thu khi cá nhiễm bệnh tự nhiên trong ao nuôi được minh họa qua Hình 3.4. Kết quả quan sát ghi nhận mang cá có nhiều biến đổi cấu trúc như: Sưng huyết động mạch mang, sợi mang thứ cấp dính lại với nhau và biến đổi cấu trúc cơ bản (Hình 3.4A và 3.4B). Mô cơ cá lóc bệnh với dấu hiệu thay đổi cấu trúc, hoại tử và có sợi nấm phát triển, các tế bào đơn nhân gây sưng viêm cũng gia tăng và xen kẽ trong các bó cơ (Hình 3.4C và 3.4D). Gan cá bệnh có hiện tượng sung huyết, biến đổi cấu trúc và có nhiều không bào (Hình 3.4E và 3.4F). Kết quả quan sát mô bệnh học ghi nhận ngoài mẫu mô cơ thì các mẫu mang và gan chưa ghi nhận được sự hiện diện của các sợi nấm hay bào tử vi nấm, đây có thể do quá trình thao tác mẫu đã không tiến hành được ở những vị trí mẫu có sự hiện diện của vi nấm. Những dấu hiệu bệnh lý ở mức độ mô học này

phù hợp với kết quả nghiên cứu trước đây của Phạm Minh Trúc (2012), Nguyễn Trúc Phương (2015) và Ngô Thị Mộng Trinh (2016). Các tác giả đã mô tả hiện tượng phình và dính lại của sợi mang thứ cấp, hoại tử sợi mang sơ cấp và xung huyết (Phạm Minh Trúc, 2012), cấu trúc mô cơ rời rạc và hoại tử (Ngô Thị Mộng Trinh, 2016) hay ở mô gan thì liên kết cấu trúc tế bào bị phá hủy, động mạch xung huyết, đảo tụy xung huyết và hoại tử mất cấu trúc (tạo khoảng không bào lớn) tại nhiều vùng trên gan (Nguyễn Trúc Phương, 2015). Ngoài ra, theo mô tả mô bệnh học của cá lóc cảm nhiễm vi nấm của Đặng Thụy Mai Thy, Trần Thị Tuyết Hoa & Phạm Minh Đức (2016): Các bó cơ có hiện tượng mất cấu trúc, thoái hóa và hoại tử cũng như có sự hiện diện của các sợi nấm bên trong và các tế bào đơn nhân gây sưng viêm cũng gia tăng và xen kẽ trong lớp biểu bì và bó cơ cá. Như vậy, có thể khẳng định rằng bào tử vi nấm có khả năng nảy mầm và phát triển thành các sợi nấm bên trong cơ thể cá từ nơi xâm nhiễm đến các cơ quan khác.



Hình 3.4. Biến đổi mô học ở mang (A), cơ (B) và gan (C) cá lóc nhiễm vi nấm (nhuộm H&E, 400X). (A-1) Mang cá bị sung huyết (hình vuông nhỏ); (A-2) Các sợi mang thứ cấp dính lại với nhau (hình vuông nhỏ); (B-1) Mô cơ cá khỏe; (B-2) Mô cơ cá bệnh bị hoại tử và có sợi nấm (không bắt màu) bên trong (hình vuông nhỏ); (C-1) Mô gan cá khỏe; (C-2) Mô gan cá bệnh bị sung huyết và biến đổi cấu trúc (hình vuông nhỏ).

3. Kết luận

Trong nghiên cứu này, mẫu cá lóc giai đoạn nuôi thương phẩm (ở An Giang, Đồng Tháp, Vĩnh Long, Hậu Giang và Cần Thơ) có dấu hiệu bơi lờ đờ trên mặt nước, thân cá có dấu hiệu lở loét và mòn vẩy được thu, tiến hành phân lập và định danh vi nấm. Kết quả ghi nhận *F. oxysporum* VL1.23 lần đầu tiên được phân lập từ cá lóc và định danh thông qua phương pháp nuôi cấy truyền thống và sinh học phân tử (giải trình tự đoạn gene ITS). Kết quả thí nghiệm cảm nhiễm đã khẳng định

F. oxysporum VL1.23 là tác nhân gây ra dấu hiệu bệnh lý ở cá nuôi trong điều kiện tự nhiên và điều kiện thí nghiệm. Trong tương lai cần thực hiện những nghiên cứu chuyên sâu hơn về khả năng phát hiện bệnh sớm do tác nhân vi nấm này gây ra bằng các phương pháp nuôi cấy vi sinh truyền thống cũng như phương pháp sinh học phân tử hiện đại. Ngoài ra, phát triển phương pháp phòng và trị bệnh (mức độ *in vitro* và *in vivo*) trong trường hợp cá nhiễm bệnh do tác nhân *F. oxysporum* gây ra cũng đóng vai trò quan trọng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Abdel-Latif, H.M.R., R.H. Khalil, H.R. El-hofi, T.T. Saad & S.M.A. Zaied. (2015). Epidemiological investigations of mycotic infections of cultured gilthead seabream, *Sparus aurata* at Marriott Lake, Egypt. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 2(3), 05-13.
2. Crow, G.L., J.A. Brock & S. Kaiser. (1995). *Fusarium solani* fungal infection of the lateral line canal system in captive scalloped hammerhead sharks (*Sphyma lewin*) in Hawaii. *Journal of Wildlife Diseases*, 31, 562-565.
3. Cutuli, M.T., A. Gibello, A. Rodriguez-Bertos, M.M. Blanco, M. Villarroel, A. Giraldo & J. Guarro. (2015). Skin and subcutaneous mycoses in tilapia (*Oreochromis niloticus*) caused by *Fusarium oxysporum* in coinfection with *Aeromonas hydrophila*. *Medical Mycology Case Report*, 9, 7-11.
4. De Hoog, G.S., J. Guarro, J. Gené & M.J. Figueras. (2000). *Atlas of clinical fungi. 2nd edition*. Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences: Centraalbureau voor schimmelculture.
5. Deepa, B., G.S. Bisht, R.D. Khulbe & D. Bisht. (2000). *Fusarium*- a new threat to fish population in reservoirs of Kumaun, India. *Current Science*, 78(10), 1241-1245.
6. Duc, P.M, D.T.M. Thy, K. Hatai & Y. Muraosa. (2015). Infection of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) in Vietnam caused by the fungus *Fusarium incarnatum-equiseti*. *Bull.Eur.Ass.Fish Pathol.*, 35(6), 208-216.
7. Duc, P.M., 2009. Studies on fungal infection in Japan mantis shrimp, *Oratosquilla orathria* caused by two anamorphic fungi. *Doctor of Philosophy*, Nippon Veterinary & Life Science University, Tokyo.
8. Duc, P.M., D.T.M. Thy & T.N. Tuan. (2015). Fungal species isolated from water and striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) farmed in earthen ponds in the Mekong Delta of Viet Nam. *International Journal of Science, Engineering and Technology*, 3(5), 1164-1171.
9. Phạm Minh Đức & Đặng Thụy Mai Thy. (2013). Nghiên cứu vi nấm bậc cao (*Fusarium* sp.) nhiễm trên cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, 15, 74-79.
10. Phạm Minh Đức & Nguyễn Thị Thúy Hằng. (2011). Bước đầu nghiên cứu bệnh nấm thủy mi trên cá lóc (*Channa striata*) giống ở tỉnh Đồng Tháp. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, 12, 35-43.
11. Phạm Minh Đức, Nguyễn Thanh Phương & Trần Ngọc Tuấn. (2010). Tổng quan

bệnh nấm ở động vật thủy sản. *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ*, 16b, 88-97.

12. Phạm Minh Đức, Trần Ngọc Tuấn & Trần Thị Thanh Hiền. (2012). Khảo sát mầm bệnh trên cá lóc (*Channa striata*) nuôi ao thâm canh ở An Giang và Đồng Tháp. *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ*, 21b, 124-132.

13. Hatai K., S. Kubota, N. Kida & S. Udagawa. (1986). *Fusarium oxysporum* in red sea beam, *Pagrus* sp. *Journal Wildlife Diseases*, 22, 570-571.

14. Hatai, K. & S. Egusa, 1979. Studies on the pathogenic fungus of mycotic granulomatosis-III. Development of the medium for MG-fungus. *Fish Pathology*, 13, 147-152.

15. Ke, X.-L., J.-G. Wang, J. Yuan & X.-N. Gong. (2010). Studies on the pathogenicity and histopathology of *Fusarium* in fish. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 34(5), 943-948.

16. Kulatunga, D.C., S.H. Dananjaya, B.K. Park, C.H. Kim, J. Lee & M. De Zoysa. (2016). First report of *Fusarium oxysporum* species complex infection in zebrafish culturing system. *Journal of Fish Diseases*, doi:10.1111/jfd.12529.

17. Khoa, L.V. & K. Hatai. (2005). First case of *Fusarium oxysporum* infection in culture Kuruma Prawn *Penaeus japonicus* in Japan. *Fish Pathology*, 40, 195-196.

18. Khoa, L.V., K. Hatai & T. Aoki. (2004). *Fusarium incarnatum* isolated from black tiger shrimp *Penaeus monodon* Fabricius, with black gill disease cultured in Vietnam. *Journal of Fish Diseases*, 27, 507-515.

19. Khoa, L.V., K. Hatai, A. Yuasa & K. Sawada. (2005). Morphology and molecular phylogeny of *Fusarium solani* isolated from Kuruma prawn *Penaeus japonicus* with black gills. *Fish Pathology*, 40, 103-109.

20. Lightner, D.V. & C.T. Fontaine. (1975). A mycosis of the American lobster *Homarus americanus* caused by *Fusarium* sp. *Journal of Invertebrate*, 25, 239-245.

21. Nelson, P.E., M.C. Dignani & E.J. Anaissie. (1994). Taxonomy, biology, and

clinical aspects of *Fusarium* species. *Clin.Microbiol.Rev.*, 7(4), 479-504.

22. Lê Xuân Sinh & Đỗ Minh Chung, 2009. Hiện trạng và những thách thức cho nghề nuôi cá lóc ở Đồng Bằng Sông Cửu Long. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, 2, 56-63.

23. Nguyễn Trúc Phương. (2015). Nghiên cứu đặc điểm mô bệnh học cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) nhiễm vi nấm. *Luận văn tốt nghiệp cao học, Nuôi trồng Thủy sản*. Trường Đại học Cần Thơ, Thành phố Cần Thơ.

24. Phạm Đăng Phương. (2010). Khảo sát tình hình quản lý môi trường và sức khỏe cá lóc nuôi ở Đồng Bằng Sông Cửu Long. *Luận văn tốt nghiệp cao học, Nuôi trồng Thủy sản*. Trường Đại học Cần Thơ, Thành phố Cần Thơ.

25. Đặng Thụy Mai Thy, Trần Thị Tuyết Hoa & Phạm Minh Đức. (2016). Khả năng gây bệnh của vi nấm trên cá lóc (*Channa striata*) nuôi thâm canh. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, 22, 105-113.

26. Nguyễn Thị Diệp Thuý. (2010). Phân tích một số chỉ tiêu kinh tế- kỹ thuật của các mô hình nuôi cá lóc ở Đồng Bằng Sông Cửu Long. *Luận văn tốt nghiệp cao học, Nuôi trồng Thủy sản*. Trường Đại học Cần Thơ, Thành phố Cần Thơ.

27. Ngô Thị Mộng Trinh. (2016). Nghiên cứu mầm bệnh vi nấm nhiễm trên cá điêu hồng (*Oreochromis* sp.). *Luận văn tốt nghiệp cao học, Nuôi trồng Thủy sản*. Trường Đại học Cần Thơ, Thành phố Cần Thơ.

28. Phạm Minh Trúc. (2012). Xác định đặc điểm trưng bóng hơi trên cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) nuôi thâm canh. *Luận văn tốt nghiệp cao học, Nuôi trồng Thủy sản*. Trường Đại học Cần Thơ, Thành phố Cần Thơ.

29. Trần Ngọc Tuấn & Phạm Minh Đức. (2010). Đặc điểm hình thái và sinh học của một số giống nấm gây bệnh "nấm nhớt" trên cá rô đồng (*Anabas testudineus*). *Tạp chí khoa học, Trường Đại học Cần Thơ*, 14b, 188-199.

30. Yanong, R.P.E. (2003). Fungal diseases of fish. *Vet Clin Exot Anim.*, 6, 377-400.