

Nghiên cứu tác nhân *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* gây bệnh héo vàng hại cây chuối già tại huyện Trảng Bom, tỉnh Đồng Nai (cũ)

Trần Thị Vân^{1,2,3*}, Nguyễn Thị Ngọc An⁴, Văn Thị Thiên Thu⁴, Đinh Quốc Toàn⁴, Phan Thị Phương Trang^{1,2}, Lê Đình Đơn⁴

¹Trung tâm Khoa học và Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh,

227 Nguyễn Văn Cừ, phường Chợ Quán, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh, phường Linh Xuân, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

³Viện Nghiên cứu Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Nông Lâm TP Hồ Chí Minh, khu phố 33, phường Linh Xuân, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

⁴Khoa Khoa học Sinh học, Trường Đại học Nông Lâm TP Hồ Chí Minh, khu phố 33, phường Linh Xuân, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

Ngày nhận bài 25/4/2024; ngày chuyển phản biện 29/4/2024; ngày nhận phản biện 4/5/2024; ngày chấp nhận đăng 10/5/2024

Tóm tắt:

Chuối già (*Musa* spp.) là cây ăn trái mang lại giá trị kinh tế cao cho người nông dân trồng chuối ở huyện Trảng Bom, tỉnh Đồng Nai (cũ). Từ 2019 đến nay, diện tích trồng chuối già thâm canh ngày càng mở rộng, tiềm ẩn nguy cơ bùng phát dịch bệnh, làm giảm năng suất. Bệnh héo vàng hại cây chuối già đang được xem là bệnh gây hại nặng nhất. Nghiên cứu này đã thu thập mẫu bệnh, phân lập, xác định các đặc điểm hình thái, định danh phân tử vùng ITS và kết luận được tác nhân gây bệnh là *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (Foc). Khảo sát các đặc tính sinh học của Foc cho thấy, nấm phát triển tốt nhất trên môi trường PDA, ở nhiệt độ 25-30°C, pH 6-7, cho lượng bào tử (bào tử lớn và bào tử nhỏ) nhiều nhất (2,0x10⁸ bào tử/ml). Kết quả lây nhiễm bệnh trên cây chuối già trồng từ cây nuôi cấy mô cho thấy, phương pháp tưới tràn dịch bào tử (mật số bào tử 10⁸ bào tử/ml) với liều lượng 15 ml/1 kg giá thể trồng cho kết quả lây nhiễm bệnh nhanh với các triệu chứng bệnh đặc trưng nhất. Lá bị héo vàng đạt điểm từ 1 đến 3 với tỷ lệ 50-75% và sự đổi màu bên trong thân củ đạt điểm 4-5 với tỷ lệ 50-90% (sau 20-30 ngày chủng) thể hiện rõ ở cả bên ngoài cây và bên trong thân củ, rễ chuối.

Từ khóa: chuối già “Cavendish”, *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*, héo vàng, Trảng Bom - Đồng Nai.

Chỉ số phân loại: 4.1, 4.6

Studying *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* wilt disease on Cavendish banana in Trang Bom district, Dong Nai province

Thi Van Tran^{1,2,3*}, Thi Ngoc An Nguyen⁴, Thi Thien Thu Van⁴, Quoc Toan Dinh⁴, Thi Phuong Trang Phan^{1,2}, Dinh Don Le⁴

¹Center for Bioscience and Biotechnology, University of Science, Vietnam National University - Ho Chi Minh City,

227 Nguyen Van Cu Street, Cho Quan Ward, Ho Chi Minh City, Vietnam

²Vietnam National University - Ho Chi Minh City, Linh Xuan Ward, Ho Chi Minh City, Vietnam

³Research Institute for Biotechnology and Environment, Nong Lam University Ho Chi Minh City, Quarter 33, Linh Xuan Ward, Ho Chi Minh City, Vietnam

⁴Faculty of Biological Sciences, Nong Lam University, Ho Chi Minh City, Quarter 33, Linh Xuan Ward, Ho Chi Minh City, Vietnam

Received 25 April 2024; revised 4 May 2024; accepted 10 May 2024

Abstract:

Cavendish bananas (*Musa* spp.) are a high-value agricultural crop for people in the Trang Bom district of Dong Nai province (before). From 2019 to the present, the area of intensive banana cultivation has expanded, posing a potential risk of spreading the *Fusarium* wilt disease, decreasing productivity. Cavendish *Fusarium* wilt (yellow) was considered one of the most destructive diseases of bananas. By morphological and biological description combined with sequencing of the ITS gene region, the causative agent of Cavendish banana *Fusarium* wilt disease was identified as *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (Foc). A survey of the biological characteristics of Foc shows that the mushroom was grown optimally on a PDA medium at temperatures ranging from 25 to 30°C, pH 6 to 7, producing the highest spores (microspores and macrospores) with 2.0x10⁸ spores/ml. Disease infection on tissue-cultured Cavendish banana plants results show that inoculating spore suspension with 10⁸ spores/ml into tissue-cultured bananas at a dose of 15 ml/1 kg of substrate is the method of infection that produces a fast infection with recognisable symptoms. The yellow wilted leaves scored 1-3 with a rate of 50-75%, and discolouration inside the tuber scored 4-5 with a rate of 50-90% (after 20-30 days of inoculation) was shown on both the outside of the plant and inside the tuber and banana roots.

Keywords: Cavendish, *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*, *Fusarium* wilt, Trang Bom - Dong Nai.

Classification numbers: 4.1, 4.6

*Tác giả liên hệ: Email: van.tranthi@hcmuaf.edu.vn

1. Đặt vấn đề

Đồng Nai là địa phương đứng đầu cả nước về diện tích trồng chuối với 13.149 ha, chiếm 8,53% diện tích toàn quốc và 70% vùng Đông Nam Bộ. Cây chuối ở Đồng Nai được thu hoạch quanh năm, tập trung vụ chính từ tháng 9 đến tháng 5 năm sau, là một trong 24 cây trồng chủ lực của địa phương. Tổng sản lượng ước đạt khoảng 350 nghìn tấn, trong đó, tỷ lệ quả tươi tiêu thụ nội địa 15%, đưa vào chế biến 5%, xuất khẩu 80-85%. Trong 5 năm qua, diện tích trồng chuối ở tỉnh tăng từ hơn 7,3 nghìn ha vào năm 2016 lên hơn 13,1 nghìn ha vào năm 2021 [1]. Cây chuối ở Đồng Nai phân bố trên khắp các địa bàn trong tỉnh, với năng suất trung bình khoảng 40-45 tấn/ha và sản lượng ước tính 450.000 tấn/năm, trong đó có hơn 80% xuất khẩu với giống chuối được trồng phổ biến là giống chuối già Nam Mỹ. Huyện Trảng Bom hiện có diện tích trồng chuối hơn 3.000 ha, gần bằng 50% diện tích chuối tỉnh Đồng Nai, được trồng nhiều tại các xã Thanh Bình, Bàu Hàm, Sông Thao... Chuối được xuất khẩu sang Trung Quốc, Hàn Quốc, Nhật Bản, Malaysia, trong đó chủ yếu là thị trường Trung Quốc, mang lại giá trị kinh tế cao cho người trồng. Giai đoạn 2019-2022, giá chuối ở huyện Trảng Bom luôn ở mức cao. Vì lợi nhuận cao, người dân không luân canh chuyển đổi cây trồng nên nấm bệnh dễ lan truyền qua các vụ. Đặc biệt là nấm *Fusarium* spp. gây bệnh héo vàng chuối là một bệnh phổ biến trên cây chuối [1]. Tháng 8/2023, hơn 10 ha chuối ở Trảng Bom đã bị bệnh héo và chết do *Fusarium* spp., nhiều hộ trồng chuối đã phát hiện bệnh héo vàng rải rác, tuy nhiên chưa có thống kê cụ thể về tình hình thiệt hại do bệnh gây ra. Bệnh thường gây hại ở tất cả các giai đoạn sinh trưởng của cây nhưng nặng nhất là giai đoạn cây trưởng thành, ra hoa, tạo quả dẫn đến cây bị héo vàng và chết. Tác nhân gây bệnh héo vàng được cho là do *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* gây ra. Nấm này đã được phân loại dựa vào giống chuối ký chủ bao gồm *Foc* 1, *Foc* 2, *Foc* 3 và *Foc* TR4, trong đó *Foc* TR4 đang là tác nhân gây bệnh phổ biến ở nhiều vùng trồng chuối trên thế giới, có bào tử chống chịu có thể tồn tại đến 30 năm, có thể lan truyền nhiều vùng [2], với thiệt hại lên tới 94 tỷ USD trên toàn thế giới [3]. Nghiên cứu này xác định tác nhân gây bệnh héo vàng trên giống chuối già, các đặc điểm sinh học, sinh thái của tác nhân nấm, xác định phương pháp chủng nấm làm tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo về biện pháp phòng trừ bệnh tại huyện Trảng Bom, tỉnh Đồng Nai.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Mẫu cây chuối bệnh gồm thân già, củ chuối, rễ chuối bị bệnh héo vàng thu tại huyện Trảng Bom, tỉnh Đồng Nai. Mẫu lấy dựa trên triệu chứng bệnh của cây, bên trong thân cây bó mạch đổi màu, thay đổi từ màu vàng nhạt ở giai đoạn đầu đến màu đỏ sẫm hoặc gần như đen ở giai đoạn sau. Bên ngoài cây, lá già héo và vàng quanh mép. Lá vàng có thể vẫn đứng vững hoặc xẹp xuống ở cuống lá. Đôi khi lá vẫn xanh, trừ những đốm trên cuống lá nhưng vẫn gãy. Những chiếc lá rũ xuống thân già, cuối cùng, tất cả các lá đều khô và rụng [4]. Mẫu bệnh hại thu thập dựa theo phương pháp điều tra cơ bản (phương pháp nghiên cứu bảo vệ thực vật của Viện Bảo vệ Thực vật và QCVN 01-38:2010/BNNPTNT: Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về phương pháp điều tra phát hiện dịch hại cây trồng) [5, 6].

Môi trường nuôi cấy gồm: WA (20 g agar, 1000 ml nước), PDA (200 g khoai tây, 20 g agar, 20 g dextrose, 1000 ml nước), OMA (20 g yến mạch, 20 g agar, 1000 ml nước), CLA (5 g lá cẩm chướng, 20 g agar, 1000 ml nước), SNA (1 g KH_2PO_4 , 1 g KNO_3 , 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g KCl, 0,2 g D-glucose, 0,2 g D-sucrose, 20 g agar, 1000 ml nước), SM (0,2 g G-glucose, 10 g cao chiết nấm men, 10 g potassium acetate), được hấp tiệt trùng ở 121°C/1 atm/20 phút và phân phối vào đĩa petri đường kính 90 mm.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phân lập mẫu: Mẫu mô bệnh được cắt thành mẫu nhỏ 0,3-0,5 cm, khử trùng bề mặt bằng ethanol 70°, để khô trong buồng cấy vô trùng, cấy lên môi trường WA. Sau 3-5 ngày, cấy chuyển sang môi trường PDA, ủ ở 25°C. Dựa theo nghiên cứu của L.P. Vicente và cs (2014) [7] để tạo các mẫu nuôi cấy đơn bào tử thuần nhất, cắt miếng thạch ở rìa sợi nấm (kích thước 0,5x1 cm) sau 3-4 ngày nuôi, cho vào ống Falcon chứa 10 ml nước cất vô trùng, lắc trong vài phút. Sau đó, các đơn bào tử được tách ra dưới kính hiển vi soi nổi và cấy chuyển lên môi trường PDA, ủ 2-3 ngày, trừ mẫu trong ống nghiệm để phục vụ cho nghiên cứu.

Định danh bằng hình thái: Đặc điểm hình thái của mẫu nấm như sợi nấm, bào tử (tiểu bào tử, đại bào tử, bào tử chống chịu) được quan sát và đo kích thước trên kính hiển vi, mô tả hình thái, màu sắc tán nấm dựa theo công bố của Moore và cs (1995) [8]. Mùi đặc trưng tạo ra khi nuôi cấy nấm trên môi trường com là cơ sở xác định chủng nấm. Cây chuyển khối sợi nấm (~1 cm³) vào bình erlen chứa môi trường com 250 ml (hấp khử trùng, đặt ở 25-27°C). Sau 10 ngày nuôi cấy sẽ kiểm tra mùi đặc trưng. Mẫu nấm tạo ra mùi aldehyde thuộc chủng 4, nếu không có mùi aldehyde thuộc chủng 1 và 2 [9].

Định danh bằng sinh học phân tử: Dựa theo nghiên cứu của M.A. Dita và cs (2010) [10]. Chủng nấm *Foc* đã cắt đơn bào tử, được ly trích DNA, khuếch đại với cặp mồi ITS1 và ITS4, điện di trên gel agarose. Phản ứng PCR thực hiện với cặp mồi ITS1 (5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGC-3') và ITS4 (5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). Chu trình nhiệt biến tính DNA ở 95°C trong 2 phút, tiếp theo là 35 chu kỳ của 95°C 30 giây, 68°C trong 30 giây, 72°C 1 phút và 1 chu kỳ ở 72°C trong 10 phút, DNA thu được sẽ được bảo quản ở 4°C. Mẫu nấm được gửi giải trình tự trên vùng ITS tại Công ty TNHH Genlab.

Nghiên cứu ảnh hưởng của một số yếu tố đến sự sinh trưởng và phát triển của *Foc* gây bệnh vàng lá hại cây chuối già:

+ Thí nghiệm ảnh hưởng của các loại môi trường dinh dưỡng đến sự phát triển của nấm gồm PDA, OMA, CLA, SNA. Mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần.

+ Thí nghiệm ảnh hưởng của pH: 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0. Thí nghiệm được thực hiện trên đĩa petri chứa môi trường PDA với 3 lần lặp lại/nghiệm thức.

+ Thí nghiệm ảnh hưởng của nhiệt độ lên sự phát triển tán nấm: 15, 20, 25, 30, 35 và 40°C. Thí nghiệm thực hiện trên đĩa petri chứa môi trường PDA với 3 lần lặp lại/nghiệm thức.

Chỉ tiêu theo dõi: Theo dõi đường kính tán năm sau 2, 4, 6 ngày nuôi cấy, thời gian xuất hiện và đếm số lượng bào tử được hình thành.

Số lượng bào tử được đếm bằng buồng đếm hồng cầu Thomas (Đức) và tính theo công thức:

Số lượng bào tử/1 ml = số bào tử trung bình/ô x độ pha loãng x 10^4

trong đó: thể tích buồng đếm 10^4 cm^3 ($1 \text{ cm}^3=1 \text{ ml}$).

Đánh giá khả năng gây bệnh của chủng Foc đã phân lập lên cây chuối già nuôi cấy mô:

+ Môi trường SM sử dụng để tạo bào tử: Cây tán năm có đường kính 0,5 cm đã nuôi 5 ngày trên PDA vào bình erlen 250 ml, bổ sung 2 g dịch chiết đậu xanh. Ủ tối trên máy lắc, tốc độ 130 vòng/phút ở $25\pm 2^\circ\text{C}$ trong 6-10 ngày. Đếm và điều chỉnh đến mật số 10^8 bào tử/ml.

+ Chuẩn bị hạt bắp nhiễm nấm: Cây tán năm (1 cm^3) được nuôi cấy trên PDA 5 ngày vào bình erlen chứa 200 g hạt bắp đã hấp khử trùng, ủ ở 25°C , sau 7-10 ngày nấm xâm nhiễm vào hạt bắp. Điều chỉnh mật số bào tử đạt 10^8 bào tử/g và tiến hành chủng.

+ Cây giống chủng bệnh là giống chuối già nuôi cấy mô, cây từ bịch mô sẽ trồng lên giá thể đã khử trùng, cây có 3-5 lá, chiều cao đạt 8-12 cm sẽ bố trí thí nghiệm. Các nghiệm thức bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên đơn yếu tố. Cây sau chủng đặt trong buồng chủng ở $26\pm 2^\circ\text{C}$, độ ẩm tương đối 60-80% trong 24 giờ, duy trì tưới nước để cung cấp nước cho cây, đặt cây trong chậu để tránh rò rỉ dịch bào tử và tránh lây nhiễm chéo [11].

+ Nghiệm thức tạo vết thương, cây chuối được rửa sạch bằng nước, cắt tỉa các rễ thừa 1/3 khối lượng ban đầu (1-3 cm tính từ đầu rễ), ngâm 30 phút trong dung dịch bào tử tạo điều kiện cho mầm bệnh xâm nhập và giữ cho cây có đủ nước cho đến khi trồng. Sau khi lấy cây ra khỏi dung dịch bào tử để cây khô 10 phút và trồng [11].

+ Đất, cát vàng sử dụng trong các nghiệm thức được hấp thanh trùng 2 lần.

Bố trí thí nghiệm: Thí nghiệm gồm 6 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức lặp lại 10 cây.

NT1: Đối chứng không chủng nấm có tạo vết thương vào cây;

NT2: Đối chứng chủng nấm *Fusarium oxysporum* (mẫu được lưu trữ từ phòng thí nghiệm) có tạo vết thương vào cây;

NT3: Chủng chuối bằng dịch bào tử có tạo vết thương ở cây, cây được trồng vào đất;

NT4: Bổ sung hạt bắp đã nhiễm *Foc* vào giá thể đất, không tạo vết thương cho cây;

NT5: Chủng bào tử chống chịu (10^8 bào tử/ml) vào đất, không tạo vết thương cho cây;

NT6: Tưới trực tiếp dịch bào tử ($15 \text{ ml} - 10^8$ bào tử/ml) vào đất, không tạo vết thương.

Chỉ tiêu theo dõi: Theo dõi và ghi điểm các triệu chứng và tiến triển của bệnh hàng ngày sau 10, 20, 30 ngày chủng. Đánh giá mức độ nghiêm trọng của bệnh và tỷ lệ mắc bệnh dựa theo nghiên cứu của N.Y. Moore và cs (1993) [9].

Cây được kiểm tra bên ngoài và bên trong khi bị thổi rửa hoàn toàn hoặc khi 75% số lá chuyển sang màu vàng và kết thúc ở 1 tháng sau khi chủng.

Các triệu chứng bên ngoài bao gồm: Tỷ lệ lá vàng hay héo (được cho điểm theo thang điểm từ 1 đến 4), trong đó:

Cấp 1= $0<x\leq 25\%$ không, lá dưới xuất hiện lá vàng;

Cấp 2= $25<x\leq 50\%$ lá dưới và một số lá non chuyển vàng;

Cấp 3= $50<x\leq 75\%$ tất cả lá đều vàng;

Cấp 4= $75<x\leq 100\%$ cây chết.

Triệu chứng bên trong (cắt dọc ở thân rễ (củ) của từng cây). Dùng đánh giá mức độ nghiêm trọng của bệnh (được đánh giá trực quan theo thang điểm 1-6), trong đó: 1=Không đổi màu ở củ; 2= $x<5\%$, phần củ nhiễm là các điểm riêng biệt; 3= $5<x\leq 30\%$ phần củ màu nâu đỏ; 4= $30<x\leq 50\%$ phần củ màu nâu đỏ; 5= $50<x\leq 90\%$ phần củ màu nâu đỏ; 6=cây bị mục hoàn toàn $x<90\%$.

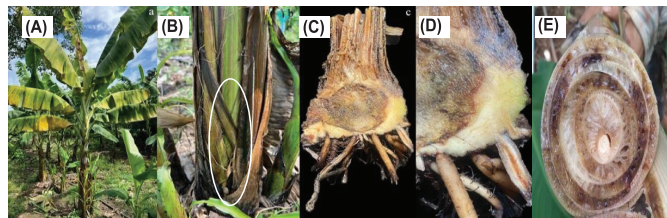
2.3. Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu thí nghiệm được xử lý bằng phần mềm Excel 2016 và đánh giá bằng các phương pháp thống kê phân tích biến lượng (ANOVA).

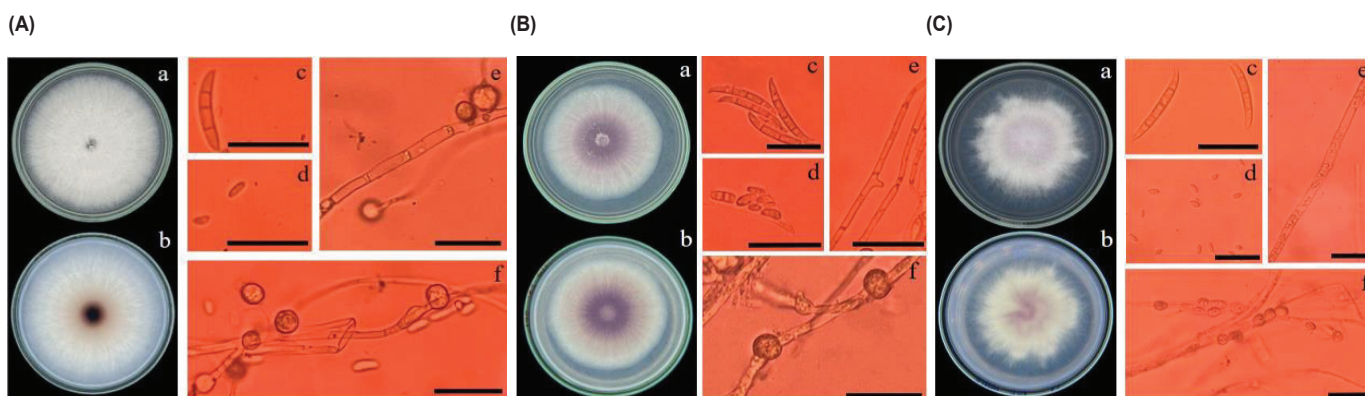
3. Kết quả và bàn luận

3.1. Kết quả phân lập tác nhân gây bệnh héo vàng hại chuối già tại huyện Trảng Bom, tỉnh Đồng Nai

Từ 6 mẫu cây chuối bệnh với triệu chứng lá héo vàng hoặc toàn bộ lá của cây bị héo vàng, khô được lấy ở giai đoạn cây có buồng và cây chưa có buồng, đã phân lập được 5 mẫu nấm có đặc điểm sơ bộ giống *Fusarium* spp. Trong đó, 2 mẫu nấm thuần đã phân lập từ vị trí củ chuối và 1 mẫu nấm phân lập được từ rễ chuối được tiến hành định danh. Kết quả quan sát mô bệnh nhận thấy, tất cả các cây bị bệnh có mạch dẫn bị chuyển màu nâu đỏ cho đến nâu đen ở thân củ, thân giả, rễ và bẹ lá (hình 1).



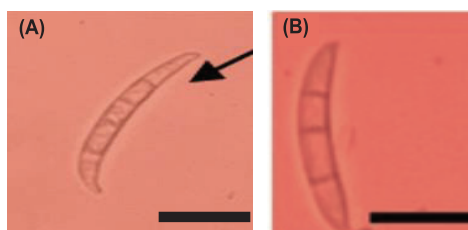
Hình 1. Triệu chứng chuối bị bệnh héo vàng tại huyện Trảng Bom, tỉnh Đồng Nai. (A) Triệu chứng trên cây, lá chuyển vàng; (B) Nứt thân giả ở gần gốc; (C) Triệu chứng trên củ; (D) Triệu chứng trên rễ; (E) Triệu chứng trong thân giả.



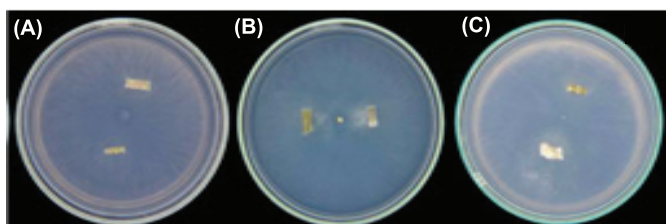
Hình 2. Đặc điểm hình thái mẫu nấm DN1.1 (A), DN1.2 (B), DN1.3 (C). (a) Mặt trên tán nấm; (b) Mặt dưới tán nấm, trên PGA sau 7 ngày nuôi cấy; (c) Bào tử lớn; (d) Bào tử nhỏ, (e) Sợi nấm, (f) Bào tử vách dày. Thanh tỷ lệ=25 µm.

3.2. Xác định tên loài *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* gây bệnh héo vàng chuối già bằng mô tả hình thái

Ba mẫu nấm đã phân lập được quan sát và mô tả đặc điểm hình thái (hình 2). Tán nấm có tốc độ sinh trưởng khá nhanh, đường kính đạt 85 mm sau 7 ngày nuôi cấy trên môi trường PGA ở 25°C. Tán nấm có hình tròn, có vòng tròn đồng tâm, mặt trên tán nấm có màu trắng bông, mặt dưới có màu trắng, gần tâm có màu tím đen (mẫu DN1.1), màu tím hoa cà (mẫu DN1.2), màu tím nhạt (mẫu DN1.3). Bào tử lớn (macroconidia) có dạng từ thẳng đến hơi cong hình lưỡi liềm 3-5 vách ngăn (đa số 3 vách ngăn) (hình 3), kích thước 24,6-40,2x2,2-4,3 µm (trung bình 28,2±3,6x3,28±0,45 µm, n=30), bào tử nhỏ (microconidia) đơn nhân hình oval, một số kéo dài hình trụ không có vách ngăn, có kích thước từ 6-8,5x2,4-5 µm (trung bình 7,03±0,96x 3,33±0,66 µm, n=30), bào tử vách dày có vách dày hình tròn đến oval, kích thước 4,2-9x4,1-9,2 µm (trung bình 7,18±0,62x6,9±1,75 µm, n=30).



Hình 3. Bào tử lớn 5 vách ngăn (A) và 4 vách ngăn (B). Thanh tỷ lệ=25 µm.

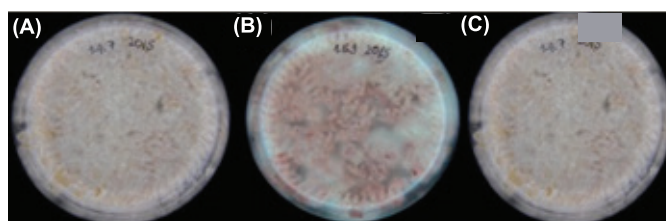


Hình 4. Tán nấm mẫu DN1.1 (A), DN1.2 (B), DN1.3 (C) trên môi trường CLA.

Trên môi trường CLA (hình 4) sợi nấm mọc dày trên lá cảm chương, bào tử nhỏ không có vách ngăn, kích thước đồng đều, bào tử vách dày có hình tròn hoặc hình oval, có vách ngăn dày, hình

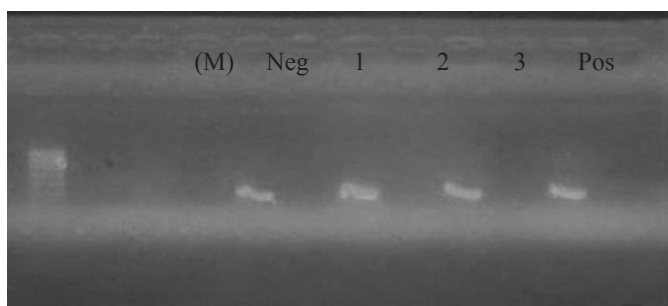
thành dạng đơn lẻ, theo cặp hoặc có thể được tìm thấy trong cụm, chuỗi ngắn, xuất hiện ở đầu sợi nấm hoặc mọc xen kẽ trong sợi nấm, hình thành nhiều sau 2-4 tuần, kích thước 4,1-16,2x3,7-13,0 µm (trung bình 7,9±2,3x7,1±1,9 µm, n=30).

Theo N.Y. Moore và cs (1993) [9], K.G. Pegg và cs (1996) [12], các tác giả đã nuôi nấm gây bệnh héo vàng chuối trên môi trường com. Sau nuôi cấy 10-15 ngày, nếu nấm có thể hiện màu sắc từ hồng nhạt tới tím và tạo chất thơm aldehyde sẽ thuộc chủng *Foc* TR4, nếu không tạo chất thơm aldehyde sẽ thuộc chủng *Foc* 1 hoặc *Foc* 2. Trong nghiên cứu này, 3 mẫu *F. oxysporum* được nuôi cấy trên môi trường com, sau 10 ngày, nấm phát triển và làm cho môi trường com chuyển sang màu tím nhạt và có mùi thơm aldehyde bay ra khi cảm quan bằng khứu giác (hình 5).



Hình 5. Ba mẫu nấm DN1.1 (A), DN1.2 (B), DN1.3 (C) được nuôi cấy trên môi trường com.

Mặc dù phương pháp định danh dựa trên hình thái vẫn đóng vai trò quan trọng trong chẩn đoán bệnh thực vật của các loài *Fusarium*, nhưng phương pháp chẩn đoán sinh học phân tử tiên tiến có thể giúp phân loại ở cấp độ dưới loài. Trong thực tế, dễ dàng phân lập được nhiều loài nấm *Fusarium* khác nhau từ mẫu cây bị nhiễm bệnh. Do đó, chẩn đoán dựa trên phản ứng chuỗi polymerase (Polymerase Chain Reaction - PCR) có độ nhạy phân tích cao trong việc phân biệt các chủng *F. oxysporum* [13, 14]. Vùng ITS được khuếch đại và giải trình tự bằng cặp mồi ITS1 (5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGC-3') và ITS4 (5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). So sánh trình tự vùng ITS với các mẫu nấm *Foc* trên GenBank của NCBI cho thấy, vùng ITS của 3 mẫu nấm *Fusarium* spp. đã phân lập có sự tương đồng 100% với loài *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (mã số truy cập GenBank MN830364) (hình 6).



Hình 6. Gel điện di sản phẩm phản ứng chuỗi polymerase của các mẫu nấm. (M) là thang chuẩn; giếng 1, 2, 3 là mẫu nấm phân lập được, giếng Neg là đối chứng âm, Pos là đối chứng dương.

Như vậy, kết hợp giữa mô tả hình thái, sự tạo mùi aldehyde trên môi trường cơm và kết quả trình tự vùng ITS của 3 mẫu *Fusarium* spp. đã phân lập trên cây chuối bị bệnh héo vàng tại huyện Trảng Bom, tỉnh Đồng Nai là loài *Foc* dựa theo nghiên cứu của N.Y. Moore và cs (1993) [9] và Z. Lin và cs (2008) [14]. Khi nghiên cứu về bệnh héo vàng trên cây chuối tiêu ở một số tỉnh phía Bắc như Vĩnh Phúc, Phú Thọ, Hưng Yên, Lào Cai, Hà Nội. Nghiên cứu của T.N. Hung và cs (2020) [15] cũng đã kết luận, tác nhân gây bệnh héo vàng trên cây chuối tiêu là do *Foc* TR4.

3.3. Một số đặc điểm sinh học của *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* gây bệnh héo vàng chuối già tại huyện Trảng Bom, tỉnh Đồng Nai

Sự phát triển của *Foc* trên môi trường dinh dưỡng: Vì các mẫu phân lập đều là *Foc* nên chủng DN1.1 được chọn đại diện cho nghiên cứu tiếp theo. Đặc điểm hình thái của nấm *Foc* trên các môi trường khác nhau có sự khác biệt (bảng 1). Sợi nấm mọc nhô cao trên môi trường PGA, tiểu bào tử hình bầu dục hoặc hình oval, không có hoặc có một vách ngăn, kích thước đồng đều, số lượng nhiều. Trên môi trường OMA và SNA, sợi nấm màu trắng, mọc mỏng, bào tử nhỏ không có vách ngăn, kích thước đồng đều. Trên môi trường CLA, sợi nấm mọc dày trên lá cảm chướng, bào tử nhỏ không có vách ngăn, kích thước đồng đều, hình thành bọc giả thuận lợi cho việc giám định. Trên môi trường PGA, OMA, SNA, bào tử lớn có 3-4 vách ngăn, số lượng bào tử lớn ít nhưng hình dạng và kích thước không đồng đều. Trên môi trường CLA, bào tử lớn có 3-4 vách ngăn, số lượng nhiều, hình dạng và kích thước đồng nhất. Môi trường PGA, OMA, SNA có số lượng bào tử vách dày ít, hình cầu, kích thước không đồng đều. Môi trường CLA có số lượng bào tử vách dày nhiều, bào tử thường hình thành đơn lẻ hoặc theo cặp, kích thước không đồng đều.

Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sự phát triển của *Foc*: Các mẫu *Foc* trong nghiên cứu này có thể phát triển ở nhiệt độ từ 15°C đến 35°C, tuy nhiên ở mức nhiệt độ 15°C và 35°C nấm phát triển rất yếu. Nhiệt độ tốt nhất cho nấm *Foc* phát triển là 25-30°C đạt 82,5-83,3 mm sau 6 ngày nuôi cấy. Ở mức 40°C nấm không phát triển (bảng 2). Kết quả nghiên cứu của S. Groenewald và cs (2006) [16] về sinh thái học của nấm gây bệnh héo vàng

Bảng 1. Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng lên sự phát triển của *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*.

Môi trường	Đường kính tán nấm sau 6 ngày nuôi cấy (mm)	Tốc độ tăng trưởng trung bình 24 giờ (mm)	Ngày xuất hiện bào tử (ngày)	Mật số bào tử sau 10 ngày (bào tử/ml)	Đặc điểm tán nấm
PDA	84,3 ^a ±0,58	14,1±0,04	3	2,0x10 ⁸	Mặt trên tán nấm màu trắng, sợi nấm bung lên rất dày, mặt dưới ở tâm có màu tím đậm
OMA	82,3 ^a ±0,58	13,7±0,04	4	2,0x10 ⁷	Mặt trên tán nấm có màu trắng, sợi nấm thưa, xốp, mặt dưới ở tâm màu trắng
SNA	75,7 ^a ±0,58	12,6±0,04	4	1,5x10 ⁸	Tán nấm màu trắng nhạt, mọc thưa, sợi nấm bám chặt, mọc chìm vào bề mặt môi trường, mặt dưới màu trắng, tâm hơi hồng nhạt
CLA	76,3 ^a ±0,58	12,7±0,04	4	1,0x10 ⁸	Tán nấm màu trắng nhạt, sợi nấm mảnh thưa ở rìa, tán nấm màu trắng mạnh, sợi mọc bông dày ở tâm
CV (%)	1,8				

chuối cho thấy, tốc độ tăng trưởng của các chủng *Foc* trong ống nghiệm khác nhau, sự tăng trưởng bị giới hạn ở 10 và 35°C, không quan sát thấy sự tăng trưởng ở 40°C, tối ưu nhất ở 25°C. Trong khi đó, L.T. Loan và cs (2023) [17] công bố, nhiệt độ tối ưu cho *Foc* TR4 phát triển là 20-30°C, nhiệt độ tối thích là 25°C. Ở nhiệt độ 40°C, không quan sát thấy sự phát triển của *Foc* TR4.

Bảng 2. Ảnh hưởng của nhiệt độ tới sự phát triển của *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*.

Nhiệt độ (°C)	Đường kính tán nấm sau các ngày nuôi cấy (mm)		
	2 ngày	4 ngày	6 ngày
15	10,5 ^{bc}	18,2 ^c	27,0 ^c
20	13,0 ^c	29,0 ^d	45,5 ^d
25	24,2 ^d	48,5 ^e	82,5 ^e
30	30,2 ^e	58,0 ^f	83,3 ^e
35	8,50 ^b	9,0 ^b	11,0 ^b
40	0 ^a	0 ^a	0 ^a
CV (%)	2,8	2,0	1,8

Trong cùng một cột các giá trị trung bình có ký tự theo sau khác nhau thì có sự khác biệt có ý nghĩa ($p < 0,05$).

Ảnh hưởng của pH đến sự phát triển của *Foc*: Kết quả bảng 3 cho thấy, *Foc* có khả năng phát triển trong phạm vi pH rộng từ 4 đến 9. Tuy nhiên, nấm sinh trưởng và phát triển mạnh nhất ở mức pH 6-7 với tán nấm mọc dày, sợi nấm phát triển mạnh, bông lên khỏi mặt thạch, sau 6 ngày nuôi cấy đường kính tán nấm đạt từ 83,5-86,3 mm. Ở pH 8,0 tán nấm phát triển mạnh, dày có sự xuất hiện cả tiểu bào tử và đại bào tử, mật số bào tử đạt 1,0x10⁶ bào tử/ml. Ở pH 4-5 tán nấm vẫn phát triển, sợi nấm mọc áp sát vào mặt thạch, tuy nhiên chỉ có tiểu bào tử xuất hiện với mật số thấp (1,0x10² bào tử/ml, pH 4,0) và mật số 2 loại bào tử thấp (2,0x10⁴ bào tử/ml, ở pH 5,0). Theo Z. Li và cs (2017) [18], *Foc* có thể phát triển trên môi trường nhân tạo ở phạm vi rộng, với pH tối ưu là 7,5.

Bảng 3. Ảnh hưởng của pH tới sự phát triển của *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*.

Độ pH	Đường kính tán nấm sau các ngày nuôi cấy (mm)			Bào tử (quan sát sau 10 ngày nuôi cấy)
	2 ngày	4 ngày	6 ngày	
4	20,5 ^a	42,5 ^a	67,0 ^a	Chỉ có tiểu bào tử xuất hiện, mật số $1,0 \times 10^2$ bào tử/ml
5	24,0 ^a	44,8 ^b	70,2 ^b	Xuất hiện tiểu bào tử và đại bào tử, mật số $2,0 \times 10^4$ bào tử/ml
6	30,7 ^b	60,5 ^c	83,5 ^d	Có sự xuất hiện của tiểu bào tử và đại bào tử, mật số $5,0 \times 10^7$ bào tử/ml
7	33,2 ^b	58,3 ^c	86,3 ^c	Tiểu bào tử và đại bào tử, mật số cao $2,0 \times 10^8$ bào tử/ml
8	30,5 ^b	56,0 ^d	84,0 ^d	Xuất hiện tiểu bào tử và đại bào tử, mật số $1,0 \times 10^8$ bào tử/ml
9	25,4 ^a	54,5 ^c	80,7 ^c	Chủ yếu tiểu bào tử xuất hiện, mật số thấp $1,0 \times 10^3$ bào tử/ml
CV (%)	2,9	2,5	3,0	

Trong cùng một cột, các giá trị trung bình có ký tự theo sau khác nhau thì có sự khác biệt có ý nghĩa ($p < 0,05$).

Trong khi đó, nghiên cứu của K.G. Pegg và cs (1996) [12] về một số tính chất hoá học của đất như độ pH, hàm lượng chất hữu cơ, kali, photpho, nitơ, magiê là những yếu tố chính góp phần vào tính miễn dịch của cây chuối với bệnh héo vàng chuối. Tuy nhiên, trong nghiên cứu của J.F. Djeugap và cs (2023) [19], nhiệt độ tăng trưởng và pH tối ưu cho tất cả *F. oxysporum* f.sp. *cubense* phân lập ở phía tây Cameroon là 25°C và pH 6.

3.4. Đánh giá khả năng gây bệnh của *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* lên cây chuối già cấy mô trong nhà lưới bằng các phương pháp chủng bệnh

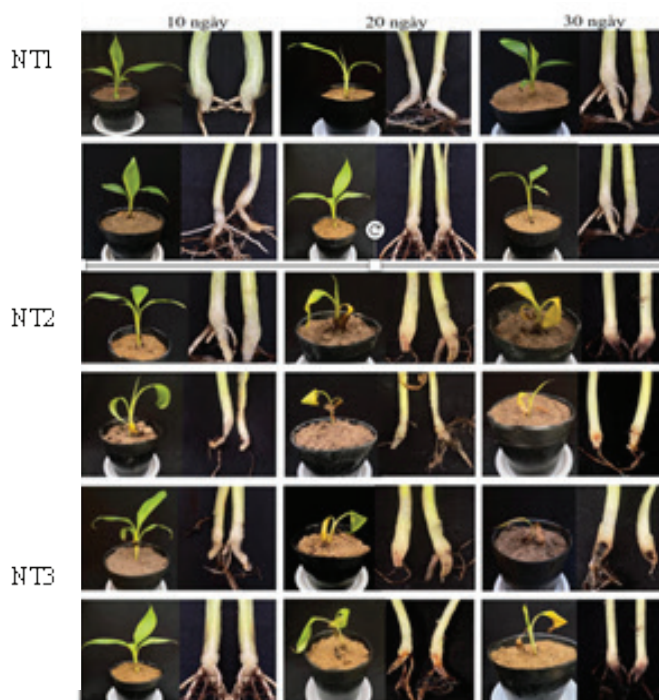
Ngoại trừ NT1 và NT2, không gây bệnh cho cây chuối mô, tất cả 5 nghiệm thức khác đều gây đổi màu bên trong thân củ và thể hiện triệu chứng bên ngoài, nhưng kết quả lây nhiễm rất khác nhau giữa các phương pháp được áp dụng. NT3 nhiều cây phục hồi sau 2 tuần, có thể thấy biểu hiện bên ngoài như

Bảng 4. Tỷ lệ bệnh sau khi chủng ở các ngày theo dõi dựa theo thang điểm.

Nghiệm thức	Ngày sau chủng (ngày)								
	10			20			30		
	Thang điểm (lá héo vàng - củ nâu đen)	Tỷ lệ lá héo vàng (%)	Tỷ lệ thân rễ (củ) nhiễm bệnh (%)	Thang điểm (lá héo vàng - củ nâu đen)	Tỷ lệ lá héo vàng (%)	Tỷ lệ thân rễ (củ) nhiễm bệnh (%)	Thang điểm (lá héo vàng - củ nâu đen)	Tỷ lệ lá héo vàng (%)	Tỷ lệ thân rễ (củ) nhiễm bệnh (%)
NT1 (Đ/C nước)	0-0	0	0	0-0	0	0	0-0	0	0
NT2 (Đ/C <i>F. oxysporum</i>)	0-0	0	0	0-0	0	0	0-0	0	0
NT3	0-0	0	0	1-2	<25	<5	3-5	50-75	50-90
NT4	0-0	0	0	3-4	25-75	<50	3-4	50-75	30-50
NT5	0-2	0	<5	3-4	25-75	<50	3-6	50-75	<90 (cây mục)
NT6	1-2	<25	<5	3-5	25-75	50-90	4-6	75-100	<90 (cây mục)

héo, vàng lá ở cây do tác động cắt tia rễ, các triệu chứng bên ngoài ở những ngày đầu cho kết quả không đáng tin cậy, mặc dù tạo vết thương được xem là dấu hiệu trực tiếp cho sự dễ nhiễm mầm bệnh [20]. Trong khi, ở NT4 cho kết quả thu được không nhất quán giữa các cây. NT6 tưới dịch bào tử lên đất trồng chuối, thể hiện các triệu chứng bệnh điển hình bao gồm héo, vàng lá cũng như sự đổi màu của thân rễ với tỷ lệ cao sau khi chủng bệnh và trong trường hợp nghiêm trọng là cây chết (bảng 4).

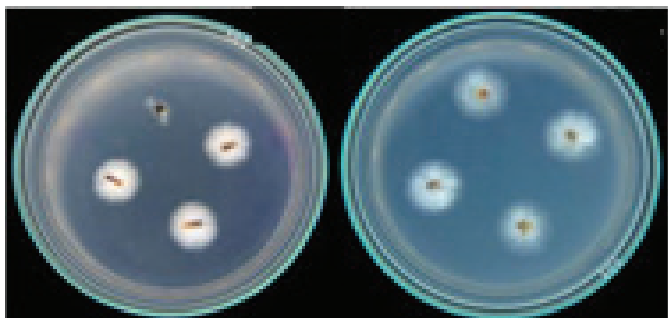
Kết quả thu được trong nghiên cứu này khá tương đồng với kết quả chủng bệnh trong nghiên cứu của G.B. Fernando (2020) [21]. Trong quá trình lây nhiễm, 10 cây được lập lại cho 1 NT, tuy nhiên có những cây triệu chứng bên ngoài thể hiện tất cả các lá còn xanh, bẹ lá ngoài không xuất hiện mạch nâu đỏ, tuy nhiên, khi cắt thân củ thấy mạch nâu đỏ xuất hiện. Điều này cho thấy, nếu chỉ dựa vào triệu chứng thể hiện bên ngoài cây để điều tra, vẫn có thể bỏ sót những cây đang mang mầm bệnh. Trong quá trình quản lý vườn chuối, rất khó để xác định vườn cây nhiễm bệnh nếu cây chưa thể hiện triệu chứng bên ngoài (hình 7).



Hình 7. Diễn biến bệnh biểu hiện trên lá và thân củ cây chuối già cấy mô sau 10, 20, 30 ngày chủng *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*.

Như vậy, trong các phương pháp chủng bệnh áp dụng, phương pháp tưới tràn dịch bào tử (NT6) với lượng 15 ml/1 kg giá thể (mật số 10^8 bào tử/ml) cho kết quả lây nhiễm bệnh nhanh với các triệu chứng bệnh đặc trưng nhất thể hiện ở cả bên ngoài cây và bên trong thân củ, rễ chuối.

Sau khi chủng bệnh, để khẳng định tác nhân gây bệnh là *Foc* đã chủng, tiến hành tái phân lập tác nhân từ các cây bị bệnh. Kết quả cho thấy, tác nhân nấm phân lập sau khi chủng có đặc điểm hình thái giống như mẫu nấm chủng ban đầu (hình 8).



Hình 8. Mẫu cây bệnh sau khi chủng được tái phân lập kiểm tra mầm bệnh.

4. Kết luận

Bằng mô tả hình thái và sinh học kết hợp giải trình tự vùng gen ITS, đã xác định tác nhân gây bệnh héo vàng chuối già (*Musa* spp.) tại huyện Trảng Bom, tỉnh Đồng Nai là *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. Nấm phát triển tốt nhất trên môi trường PDA, ở nhiệt độ 25-30°C, pH 6-7, sinh ra lượng bào tử (bào tử nhỏ và bào tử lớn) nhiều nhất ($2,0 \times 10^8$ bào tử/ml).

Trong các phương pháp lây nhiễm bệnh trên cây chuối già cấy mô, phương pháp tưới tràn dịch bào tử (mật số bào tử 10^8 bào tử/ml) với liều lượng 15 ml/1 kg giá thể trồng cho kết quả lây nhiễm bệnh nhanh với các triệu chứng bệnh đặc trưng nhất (lá bị héo vàng đạt điểm từ 1 đến 3 với tỷ lệ 50-75% và sự đổi màu bên trong thân củ đạt điểm 4-5 với tỷ lệ 50-90% (sau 20-30 ngày chủng) thể hiện ở cả bên ngoài cây và bên trong thân củ, rễ chuối).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] P. Anh (2023), “Dong Nai is the capital of exported bananas”, <https://dongnai.gov.vn/en/pages/newsdetail.aspx?NewsId=5682&CatId=220>, accessed 26 March 2024.

[2] R.C. Ploetz (2015), “Fusarium wilt of banana”, *American Phytopathological Society (APS)*, **105**(12), pp.1512-1521, DOI: 10.1094/PHYTO-04-15-0101-RVW.

[3] G. Martinez, B.O. Olivares, J.C. Rey, et al. (2023), “The advance of Fusarium wilt TR4 in Musaceae of Latin America and the Caribbean: Current situation”, *Pathogens*, **12**(2), DOI: 10.3390/pathogens12020277.

[4] R. Ploetz, S. Freeman, J. Konkol, et al. (2015), “TR4 of Panama disease in the Middle East”, *Phytoparasitica*, **43**(3), pp.283-293, DOI: 10.1007/s12600-015-0470-5.

[5] N.N. Thin (2007), *Methods of Plant Research*, Vietnam National University Press, 166pp (in Vietnamese).

[6] Ministry of Agriculture and Rural Development (2012), *National Technical Regulations on Plant Protection - QCVN 01-38: 2010/BNNPTNT* (in Vietnamese).

[7] L.P. Vicente, M.A. Dita, E. Martinez (2014), “Prevention and diagnostic of Fusarium wilt (Panama disease) of banana caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* tropical race 4 (TR4)”, *Technical Manual*, 74pp.

[8] N.Y. Moore, K.G. Pegg, P.W. Landson, et al. (1995), “Current research Fusarium wilt of banana in Australia”, *Symposium on Recent Development in Banana Cultivation Technology*, **14**, pp.270-284.

[9] N.Y. Moore, K.G. Pegg, R.N. Allen, et al. (1993), “Vegetative compatibility and distribution of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* in Australian”, *Australian Journal of Experimental Agriculture*, **33**(6), pp.797-802, DOI: 10.1071/EA9930797.

[10] M.A. Dita, C. Waalwijk, I.W. Buddenhagen, et al. (2010), “A molecular diagnostic for tropical race 4 of the banana fusarium wilt pathogen”, *Plant Pathology*, **59**(2), pp.348-357, DOI: 10.1111/j.1365-3059.2009.02221.x

[11] A.A. Mohamed, C. Mak, K.W. Liew, et al. (2001), “Early evaluation of banana plants at nursery stage for Fusarium wilt tolerance”, *Agricultural and Food Sciences*, **11**, pp.174-185.

[12] K.G. Pegg, N.Y. Moore, S. Bentley (1996), “Fusarium wilt of banana in Australia: A review”, *Australian Journal of Agricultural Research*, **47**(5), pp.637-650, DOI: 10.1071/AR9960637.

[13] S. Bentley, K.G. Peggand, J.L. Dale (1995), “Genetic variation among a worldwide collection of isolates of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* analysed by RAPD-PCR fingerprinting”, *Mycological Research*, **99**(11), pp.1378-1384, DOI: 10.1016/S0953-7562(09)81225-2.

[14] Y.H. Lin, J.Y. Chang, E.T. Liu, et al. (2008), “Development of a molecular marker for specific detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4”, *Eur. J. Plant Pathol.*, **123**, pp.353-365, DOI: 10.1007/s10658-008-9372-4.

[15] T.N. Hung, D.T.V. Hang, N.D. Huy (2020), “Fusarium wilt (*Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*) on Cavendish banana in Vietnam”, *Vietnam J. Agri. Sci.*, **18**(5), pp.315-322 (in Vietnamese).

[16] S. Groenewald, N.V.D. Berg, W.F.O. Marasas, et al. (2006), “Biological, physiological and pathogenic variation in a genetically homogenous population of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*”, *Australasian Plant Pathology*, **35**, pp.401-409, DOI: 10.1071/AP06041.

[17] L.T. Loan, N.T. Vu, V.D. Toan, et al. (2023), “Biological characteristics and biocontrol of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* causing Panama disease on banana”, *Vietnam J. Agri. Sci.*, **21**(6), pp.821-833 (in Vietnamese).

[18] Z. Li, Z. Deng, S. Chen, et al. (2017), “Contrasting physical and biochemical properties of orchard soils suppressive and conducive to fusarium wilt of banana”, *Soil Use and Manag.*, **34**(1), pp.154-162, DOI: 10.1111/sum.12390.

[19] J.F. Djeugap, H.U. Abireche, C.P.Z. Donfack, et al. (2023), “Cultural characterization of five isolates of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (banana fusarium wilt) and antifungal activity of plant extract”, *Pak. J. Phytopathol.*, **35**(1), pp.43-53, DOI: 10.33866/phytopathol.035.01.0844.

[20] L.J. Smith, M.K. Smith, D. Tree, et al. (2008), “Development of a small-plant bioassay to assess banana grown from tissue culture for consistent infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*”, *Australasian Plant Pathology*, **37**, pp.171-179, DOI: 10.1071/AP08006.

[21] G.B. Fernando (2020), “*Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* tropical race 4 (Foc TR4)”, *CABI Compendium*, DOI: 10.1079/cabicompendium.59074053.