

XÁC ĐỊNH NGUYÊN NHÂN GÂY BỆNH HÉO VÀNG CHUỐI TẠI MỘT SỐ TỈNH TRUNG DU MIỀN NÚI PHÍA BẮC, VIỆT NAM

Lê Thị Loan^{1*}, Nguyễn Đức Huy², Vũ Đăng Toàn¹, Lưu Ngọc Sinh³

TÓM TẮT

Bệnh héo vàng chuối do nấm *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) còn gọi là bệnh Panama, gây hại rất nghiêm trọng cho các vùng trồng chuối trên cả nước. Bệnh đã được ghi nhận rất sớm tại Việt Nam. Các chủng nấm Foc được xác định dựa vào hình thái, đặc điểm phân tử và tính gây bệnh của chúng. Kết quả nghiên cứu cho thấy, chủng Foc 4 (Foc - TR4) được tìm thấy trên các mẫu chuối tiêu và chuối tây, trong khi đó chủng Foc 1 (Foc 1) chỉ gây bệnh trên chuối tây. Sử dụng cặp mồi đặc hiệu W1805F/W1805R và TR4-F/TR4-R giúp xác định nhanh, chính xác chủng nấm gây hại có ý nghĩa quan trọng trong việc đề xuất cơ cấu giống chuối tại các tỉnh trung du và miền núi phía Bắc, Việt Nam.

Từ khóa: Chuối, héo vàng *Fusarium*, trung du miền núi phía Bắc Việt Nam.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trên thế giới chuối được trồng ở 147 quốc gia với sản lượng xấp xỉ 125 triệu tấn [1]. Tại Việt Nam, diện tích trồng chuối là 130.000 ha, với sản lượng 2,1 triệu tấn/năm [2], chuối được trồng nhiều ở vùng đồng bằng sông Cửu Long chiếm 28,1% diện tích, 23,7% sản lượng, trung du và miền núi phía Bắc chiếm 18,3% diện tích, 15,9% sản lượng, đồng bằng sông Hồng chiếm 14,5% diện tích, 24,1% sản lượng. Năng suất chuối của các tỉnh thuộc đồng bằng sông Hồng cao nhất cả nước do đất đai màu mỡ, khí hậu thuận lợi và người dân có khả năng thâm canh cao [3].

Bệnh vàng lá chuối xuất hiện ở Việt Nam từ những năm 1967 - 1968. Trong đó, giống chuối tây và chuối tây tía là những giống mẫn cảm với chủng Foc 1 [3]. Bệnh héo vàng chuối là một trong những bệnh rất phổ biến và gây hại nghiêm trọng ảnh hưởng lớn đến năng suất và chất lượng chuối. Bệnh có thể xảy ra ở bất kỳ giai đoạn tăng trưởng nào của cây chuối, đây là một trong những vấn đề gây trở ngại trong sản xuất chuối của Việt Nam.

Sử dụng các cặp mồi đặc hiệu TR4-F/TR4-R, W1805F/W1805R để xác định nhanh và chính xác chủng nấm gây bệnh héo vàng trên chuối [4], [5]. Ở Việt Nam, Foc chủng 4 cũng đã được Trần Ngọc Hùng và cs (2020) [6] xác định trên chuối tiêu. Hiện nay, bệnh héo vàng chuối vẫn là bệnh nguy hiểm ở tất cả các vùng trồng chuối tại Việt Nam. Để cung cấp cơ sở khoa học và xác định nhanh nguyên nhân gây bệnh vàng lá chuối tại một số tỉnh phía Bắc, đã thực hiện xác định chủng nấm bằng cách sử dụng cặp mồi đặc hiệu.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

20 mẫu bệnh được thu thập trên giống chuối tiêu và chuối tây tại: Huyện Lâm Thao, tỉnh Phú Thọ; huyện Phù Ninh, tỉnh Phú Thọ; huyện Yên Lạc, tỉnh Vĩnh Phúc.

Môi trường phân lập: WA (Water Agar: agar 20 g, nước cất 1.000 ml), PDA (Potato Dextrose Agar: Khoai tây 200 g, Dextrose 20 g, agar 20 g, nước cất 1.000 ml). Các loại hóa chất phục vụ các phản ứng chiết suất ADN, cặp primer W1805F/W1805R, TR4-F2/F1.

¹ Trung tâm Tài nguyên Thực vật

² Học viện Nông nghiệp Việt Nam

³ Trường Đại học Thủ đô Hà Nội

* Email: ltloan27@gmail.com

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Thu thập và phân lập tác nhân gây bệnh héo vàng chuối: Thu thập và phân lập bệnh héo vàng chuối theo phương pháp điều tra phát hiện bệnh cây của Viện Bảo vệ Thực vật (1999) [7]. Triệu chứng thể hiện rõ nhất ở giai đoạn ra hoa: Lá chuyển sang màu vàng, thân giả phía ngoài bị nứt, các mạch có màu nâu đỏ và bốc mùi hôi. Trên cây bị bệnh, các lá giả bị khô héo, cuống lá gãy quanh thân giả, chỉ một số còn xanh và có xu hướng mọc thẳng. Tại phòng thí nghiệm, mẫu bệnh sẽ được phân lập, nuôi cấy, làm thuần phục vụ công tác giám định tác nhân gây bệnh. Sợi bó mạch trong thân giả màu nâu được khử trùng bề mặt bằng ethanol 70% trong 30 giây và rửa sạch 3 lần bằng nước cất vô trùng, để khô mẫu bệnh trong buồng cấy vô trùng, rồi cắt thành đoạn 5 mm đặt lên môi trường nuôi cấy. Sử dụng kính hiển vi để xác định hình thái bào tử nấm sau 5 - 7 ngày nuôi cấy. Nấm được phân lập thuần dựa trên kỹ thuật phân lập đơn bào tử.

Lây bệnh nhân tạo: Mẫu nấm được nhân lên trên môi trường PDA sau đó được lây cho chuối tiêu hồng và chuối tây giai đoạn cây con (4 - 5 lá) với 15 ml dung dịch bào tử nấm có nồng độ 10^6 bào tử/ml. Chuối được trồng trong giá thể đã được khử trùng. Đối chứng được lây bằng nước cất. Theo dõi khả năng biểu hiện của bệnh theo phương pháp của Moore và cs (1993) [8].

Tách chiết ADN và kỹ thuật PCR giám định mẫu nấm sau 10 ngày nuôi cấy ở 22 - 25°C, trên môi trường PDA, khoảng 100 mg sợi nấm sẽ được chuyển vào ống 2 ml để nghiền và tách chiết ADN theo phương pháp của Lin và cs (2008) [9]. Kiểm tra độ tinh sạch ADN tách chiết từ mẫu nấm thông qua điện di trên Agarose gel 1%. Mẫu ADN tinh sạch được lưu giữ ở - 20°C.

Phản ứng PCR được thực hiện với cặp mồi Foc-TR4 [4] (F: 5'-CAC GTT TAA GGT GCC ATG AGAG-3'; R: 5'-CGC ACG CCA GGA CTG CCT CGT GA-3') và W1805F/W1805R [5] GTTGAGTCTCGATAAACAGCAAT/GACGAGGG GAGATATGGTC theo chu trình nhiệt bắt đầu là biến tính ADN ở 95°C trong 2 phút, tiếp theo là 35 chu kỳ của 95°C 30 giây, 68°C 30 giây, 72°C 1 phút và 1 chu kỳ ở 72°C trong 10 phút, sau cùng ADN được bảo quản ở 4°C.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả thu thập mẫu bệnh héo vàng chuối

Mẫu bệnh được thu thập trên cả nhóm giống chuối tiêu hồng và chuối tây ở xã Bản Nguyên, huyện Lâm Thao, tỉnh Phú Thọ; xã An Đạo, huyện Phù Ninh, tỉnh Phú Thọ; xã Liên Châu, huyện Yên Lạc, tỉnh Vĩnh Phúc; xã Nhật Chiêu, huyện Yên Lạc, tỉnh Vĩnh Phúc; xã Hồng Châu, huyện Yên Lạc, tỉnh Vĩnh Phúc.

Bảng 1. Kết quả thu thập mẫu bệnh héo vàng chuối tại các tỉnh trung du miền núi phía Bắc năm 2021

STT	Ký hiệu mẫu	Giống chuối	Địa điểm thu thập	Giai đoạn sinh trưởng của cây	Triệu chứng bệnh
1	LT1	Chuối tây	Xã Bản Nguyên, huyện Lâm Thao, tỉnh Phú Thọ	Sau trồng 6 tháng	Lá vàng
2	LT2	Chuối tây	Xã Bản Nguyên, huyện Lâm Thao, tỉnh Phú Thọ	Có buồng	Lá vàng, nứt thân
3	LT3	Chuối tây	Xã Bản Nguyên, huyện Lâm Thao, tỉnh Phú Thọ	Có buồng	Lá vàng, nứt thân, củ nâu

KHOA HỌC CÔNG NGHỆ

4	LT4	Chuối tây	Xã Bản Nguyên, huyện Lâm Thao, tỉnh Phú Thọ	Sau trồng 8 tháng	Lá vàng
5	PN1	Chuối tiêu hồng	Xã An Đạo, huyện Phù Ninh, tỉnh Phú Thọ	Có buồng	Lá vàng
6	PN2	Chuối tiêu hồng	Xã An Đạo, huyện Phù Ninh, tỉnh Phú Thọ	Có buồng	Lá vàng, bó mạch hóa nâu
7	PN3	Chuối tiêu hồng	Xã An Đạo, huyện Phù Ninh, tỉnh Phú Thọ	Có buồng	Lá vàng, bó mạch hóa nâu
8	PN4	Chuối tiêu hồng	Xã An Đạo, huyện Phù Ninh, tỉnh Phú Thọ	Sau trồng 6 tháng	Lá vàng
9	LC1	Chuối tây	Xã Liên Châu, huyện Yên Lạc, tỉnh Vĩnh Phúc	Sau trồng 6 tháng	Lá vàng, bó mạch hóa nâu
10	LC2	Chuối tiêu hồng	Xã Liên Châu, huyện Yên Lạc, tỉnh Vĩnh Phúc	Sau trồng 8 tháng	Lá vàng
11	LC3	Chuối tây	Xã Liên Châu, huyện Yên Lạc, tỉnh Vĩnh Phúc	Sau trồng 8 tháng	Lá vàng
12	LC4	Chuối tây	Xã Liên Châu, huyện Yên Lạc, tỉnh Vĩnh Phúc	Sau trồng 6 tháng	Lá vàng, nứt thân
13	NC1	Chuối tây	Xã Nhật Chiêu, huyện Yên Lạc, tỉnh Vĩnh Phúc	Có buồng	Lá vàng, nứt thân
14	NC2	Chuối tây	Xã Nhật Chiêu, huyện Yên Lạc, tỉnh Vĩnh Phúc	Có buồng	Lá vàng, nứt thân

KHOA HỌC CÔNG NGHỆ

15	NC3	Chuối tiêu hồng	Xã Nhật Chiêu, huyện Yên Lạc, tỉnh Vĩnh Phúc	Có buồng	Lá vàng
16	NC4	Chuối tây	Xã Nhật Chiêu, huyện Yên Lạc, tỉnh Vĩnh Phúc	Có buồng	Lá vàng, nứt thân, mạch hóa nâu
17	HC1	Chuối tây	Xã Hồng Châu, huyện Yên Lạc, tỉnh Vĩnh Phúc	Sau trồng 8 tháng	Lá vàng
18	HC2	Chuối tây	Xã Hồng Châu, huyện Yên Lạc, tỉnh Vĩnh Phúc	Sau trồng 8 tháng	Lá vàng, nứt thân
19	HC3	Chuối tây	Xã Hồng Châu, huyện Yên Lạc, tỉnh Vĩnh Phúc	Sau trồng 8 tháng	Lá vàng, nứt thân
20	HC4	Chuối tây	Xã Hồng Châu, huyện Yên Lạc, tỉnh Vĩnh Phúc	Sau trồng 8 tháng	Lá vàng, mạch hóa nâu

20 mẫu chuối (chuối tây và chuối tiêu hồng) bị bệnh héo vàng được thu thập với các triệu chứng điển hình như lá vàng từ lá già sau đến các lá non, bẹ lá ngoài thân giả bị nứt dọc, cắt ngang thân (củ

chuối) có màu nâu đỏ, có mùi hôi (Hình 1). Cây có biểu hiện rõ lúc chuối chuẩn bị ra hoa và phát triển quả non.



Hình 1. Triệu chứng bệnh héo vàng chuối

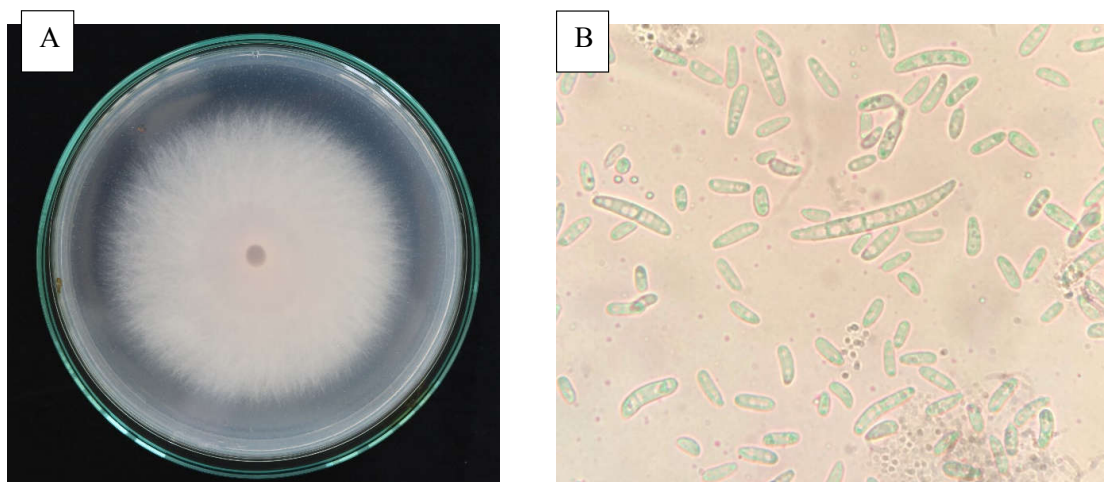
3.2. Kết quả phân lập các mẫu bệnh héo vàng chuối

Dựa vào đặc điểm nhận dạng triệu chứng khi thu thập mẫu ngoài thực địa, 20 mẫu có triệu chứng điển hình đã được phân lập tác nhân gây

bệnh. Các mẫu nấm được làm thuần bằng kỹ thuật cấy đơn bào tử và kiểm tra hình dạng bào tử, màu sắc tản nấm. Kết quả bước đầu xác định tác nhân gây bệnh là chủng nấm *Fusarium oxysporum*. Kết quả được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2. Phân lập nấm *Fusarium oxysporum* từ mẫu thu thập

Mẫu bệnh	Màu sắc tản nấm	Bào tử nhỏ	Bào tử lớn	Mẫu bệnh	Màu sắc tản nấm	Bào tử nhỏ	Bào tử lớn
LT1	Tía	+	+	LC3	Tía	+	+
LT2	Tía	+	+	LC4	Tía	+	+
LT3	Tía	+	+	NC1	Tía	+	+
LT4	Tía	+	+	NC2	Tía	+	+
PN1	Tía	+	+	NC3	Tía	+	+
PN2	Tía	+	+	NC4	Tía	+	+
PN3	Tía	+	+	HC1	Tía	+	+
PN4	Tía	+	+	HC2	Tía	+	+
LC1	Tía	+	+	HC3	Tía	+	+
LC2	Tía	+	+	HC4	Tía	+	+



Hình 2. Hình thái tản nấm trên môi trường PDA (A) và hình dạng bào tử (B)

3.3. Kết quả lây bệnh nhân tạo

Các chủng nấm sau khi phân lập trên môi trường PDA, được lây bệnh nhân tạo trên chuối tây

và chuối tiêu hồng trong điều kiện nhà lưới. Mỗi chủng lây nhiễm 30 cây với 3 lần lặp lại trên mỗi giống. Kết quả thí nghiệm được thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3. Kết quả lây bệnh nhân tạo của các mẫu nấm đối chuối tây và chuối tiêu hồng

Ký hiệu mẫu	Nguồn gốc phân lập	Cây trồng		Số cây biểu hiện triệu chứng sau lây bệnh	Tỉ lệ nhiễm (%)
LT1	Chuối tây	Chuối tây	30	30	100
NC3	Chuối tiêu hồng	Chuối tây	30	0	0
Đ/C	-	Chuối tây	30	0	0
LC2	Chuối tây	Chuối tiêu hồng	30	30	100
NC3	Chuối tiêu hồng	Chuối tiêu hồng	30	30	100
Đ/C	-	Chuối tiêu hồng	30	0	0



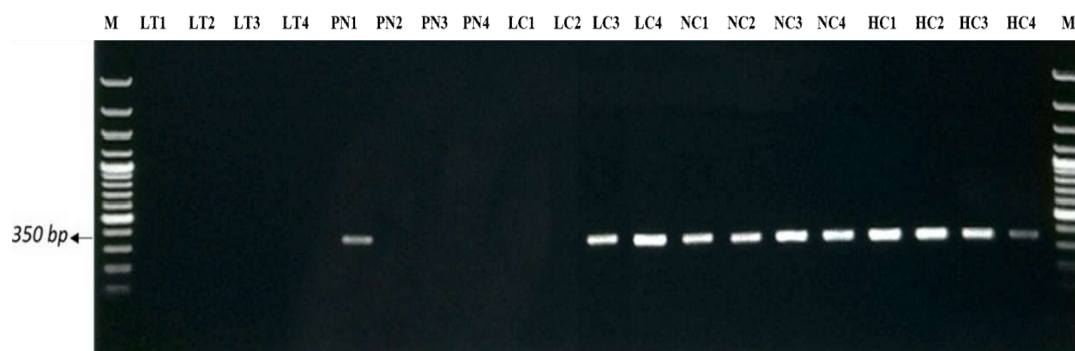
Hình 3. Triệu chứng lây bệnh nhân tạo trên chuối tiêu hồng và chuối tây

Mẫu nấm LT1 phân lập từ chuối tây gây bệnh cho cả chuối tiêu hồng và chuối tây được xác định là chủng Foc 4 nhiệt đới (Foc - TR4). Trái lại, mẫu nấm LC2 phân lập từ chuối tiêu hồng chỉ hại trên nhóm chuối đó không gây triệu chứng trên tây được xác định là chủng Foc 1. Kết quả nghiên cứu này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Nguyễn Đức Huy và Đỗ Thị Vinh Hằng (2018) [10]. Điều đó cho

thấy ở các vùng chuối tây bị bệnh héo vàng do chủng Foc 1 gây hại có thể thay thế bằng chuối tiêu.

3.4. Kết quả phân tích chủng nấm gây bệnh bằng cặp mồi đặc hiệu

Kết quả PCR nhân gen với 2 cặp mồi đặc hiệu cho chủng Foc 1 (W1805F/W1805R) và chủng Foc - TR4 (TR4-F2/F1), được kết quả như sau:

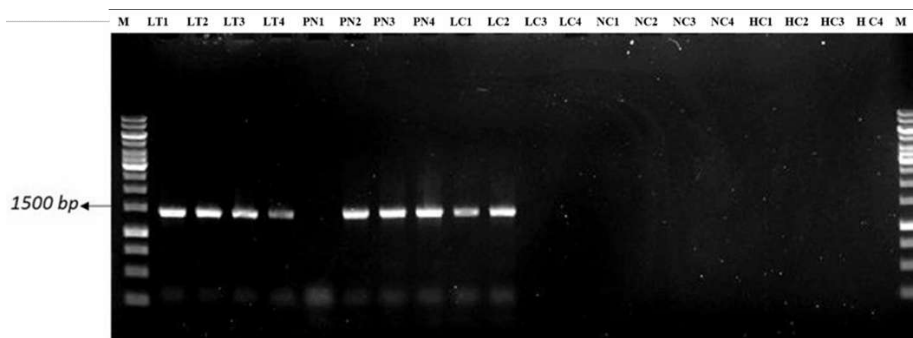


Hình 4a. Kết quả điện di sản phẩm PCR với cặp mồi W1805F/W1805R. Kích thước sản phẩm: 350 bp

Cặp mồi đặc hiệu cho chủng Foc 1 (W1805F/W1805R) có kích thước sản phẩm 350 bp. Trong đó 11 mẫu nằm ở các giếng tương ứng là LC1, LC3, LC4, NC1, NC2, NC3, NC4, HC1, HC2, HC3 và HC4 chỉ xuất hiện băng ADN có kích thước khoảng 350 bp phù hợp với kích thước lý thuyết cho băng đặc trưng của chủng Foc1. Điều này chứng tỏ 11 mẫu này thuộc chủng Foc 1

(Foc1) (Hình 4a) với cặp mồi Foc 1 (W1805F/W1805R) [5].

Kết quả cũng đã ghi nhận, 9 mẫu LT1, LT2, LT3, LT4, PN1, PN2, PN3, PN4 và LC2 chỉ xuất hiện băng có kích thước khoảng 1.400 bp, đây là băng đặc trưng cho chủng Foc TR4 (Hình 4b). Tính đặc hiệu của cặp mồi TR4-F2/F1 đã được chứng minh trong nghiên cứu về phân lập chủng Foc TR4 [4].



Hình 4b. Kết quả điện di sản phẩm PCR với cặp mồi TR4-F2/F1. Kích thước sản phẩm 1.400 bp

Phân tích chủng nấm bằng cặp mồi đặc hiệu cho thấy, trong 20 mẫu gây bệnh héo vàng chuối được phân lập có 11 mẫu có phản ứng dương tính chủng Foc 1, chiếm 55% số mẫu, 9 mẫu có phản ứng với chủng Foc - TR4, chiếm 45%. Chủng Foc 1

chỉ hại trên chuối tây, ngược lại chủng Foc - TR4 gây hại cả trên chuối tây và chuối tiêu. Kết quả nghiên cứu này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Nguyễn Đức Huy và Đỗ Thị Vĩnh Hằng (2018) [10].

Bảng 4. Kết quả xác định chủng nấm Foc phân lập từ chuối tây và chuối tiêu hồng

Mẫu nấm	PCR (350 bp)	PCR (1.400 bp)	Chủng nấm	Mẫu nấm	PCR (350 bp)	PCR (1.400 bp)	Chủng nấm
LT1	-	+	Foc - TR4	LC3	+		Foc 1
LT2	-	+	Foc - TR4	LC4	+		Foc 1

LT3	-	+	Foc - TR4	NC1	+		Foc 1
LT4	-	+	Foc - TR4	NC2	+		Foc 1
PN1	-	+	Foc - TR4	NC3	+		Foc 1
PN2	-	+	Foc - TR4	NC4	+		Foc 1
PN3	-	+	Foc - TR4	HC1	+		Foc 1
PN4	-	+	Foc - TR4	HC2	+		Foc 1
LC1	+	-	Foc 1	HC3	+		Foc 1
LC2	-	+	Foc - TR4	HC4	+		Foc 1

4. KẾT LUẬN

Chuối tiêu hồng và chuối tây trồng tại một số tỉnh phía Bắc đều bị nhiễm bệnh héo vàng do nấm *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* gây nên. Chủng Foc 1 chỉ gây bệnh trên chuối tây, nhưng chủng Foc - TR4 gây bệnh cả 2 nhóm chuối tiêu và chuối tây. Sử dụng công nghệ sinh học trong chuẩn đoán chủng nấm gây bệnh có thể biết nhanh và chính xác khu vực chuối đang bị bệnh để có thể bố trí cơ cấu giống để hạn chế thiệt hại do chủng nấm gây ra.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. FAO (2022). Banana Market Review 2021. Rome.
2. Chương Phương (2022). Sức bật cho xuất khẩu chuối, <https://vneconomy.vn/suc-bat-cho-xuat-khau-chuoi.htm>. (truy cập ngày 05/4/2023).
3. Nguyễn Văn Nghiêm (2008). Hiện trạng và giải pháp khoa học công nghệ chủ yếu phát triển sản xuất chuối ở Việt Nam. Hội thảo khoa học Chương trình KC.06/06-10 với sản xuất sản phẩm

nông nghiệp xuất khẩu, Hà Nội, tháng 12/2008, tr. 139 - 146.

4. Dita, M. A., Waalwijk, C., Buddenhagen, I. W., Souza Júnior, M. T. and Kema, G. H. J. (2010). A molecular diagnostic for tropical race 4 of the banana fusarium wilt pathogen. *Plant Pathol.* 59, 348 - 357. doi: 10.1111/j.1365-3059.
5. Dita, M., Barquero, M., Heck, D., Mizubuti, E. S. G., and Staver, C. P. (2018). Fusarium wilt of banana: current knowledge on epidemiology and research needs toward sustainable disease management. *Front Plant Sci.* 9: 1468. doi: 10.3389/fpls.2018.01468
6. Trần Ngọc Hùng, Đỗ Thị Vinh Hằng, Nguyễn Đức Huy (2020). Bệnh héo vàng (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*) hại chuối tiêu tại Việt Nam. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, Học viện Nông nghiệp Việt Nam, 18 (5), 315 - 322.
7. Viện Bảo vệ Thực vật (1999). *Phương pháp nghiên cứu bảo vệ thực vật*. Nxb Nông nghiệp Hà Nội.

8. Moore N. Y., Pegg K. G., Allen R. N. & Irwin J. A. G. (1993). Vegetative compatibility and distribution of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in Australia. *Australian Journal of experimental agriculture*, 33, 797 - 802.
9. Lin YH, Chang JY, Liu ET, Chao CP, Huang JW, Chang PFL. (2008). Development of a molecular marker for specific detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4. *European Journal of Plant Pathology*, 123, 353 - 365.
10. Nguyễn Đức Huy và Đỗ Thị Vinh Hằng (2018). Đánh giá khả năng ức chế của nấm *Trichoderma asperellum* đối với nấm *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* gây bệnh héo vàng chuối. *Tạp chí Bảo vệ Thực vật*, 1 (276), 25 - 31.

IDENTIFICATION OF CAUSITIVE AGENT FUSARIUM WILT OF BANANA IN NORTHERN MOUNTAINS AND MIDLANDS OF VIETNAM

Le Thi Loan, Nguyen Duc Huy, Vu Dang Toan, Luu Ngoc Sinh

Summary

Panama disease or Fusarium wilt, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc), is considered a serious disease for the production of bananas nationwide. It was identified so soon in Vietnam. We identified races of Foc based on morphology, molecular characterization, and pathogenicity. The research results showed that Foc tropical race 4 (Foc - TR4) was discovered to be on 'Cavendish' cultivar, while Foc race 1 (Foc 1) was determined to be on 'Pisang Awak' cultivar. Using 2 pair of specific primer W1805F/W1805R and TR4-F/TR4-R have helped how identified a quick, exact kind of race. It has important significance in proposing a structure of banana varieties in upper mountainous provinces in Northern mountains and midlands of Vietnam

Keywords: *Banana, Fusarium wilt, the Northern mountains and midlands of Vietnam.*

Người phản biện: GS.TS. Nguyễn Văn Tuất

Ngày nhận bài: 20/3/2023

Ngày thông qua phản biện: 19/4/2023

Ngày duyệt đăng: 27/4/2023