

Đánh giá tình hình gây hại và nhận diện chủng nấm *Fusarium* gây bệnh Panama trên cây chuối lưu vực sông Srêpok, tỉnh Ratanakiri, Campuchia

Nguyễn Thị Nhã^{1*}, Hồ Thị Cẩm Nguyên¹, Nguyễn Thanh Diễm¹, Bùi Lê Trọng Nhân², Hoàng Xuân Hùng³

¹Khoa Khoa học Ứng dụng và Công nghệ, Trường Đại học Nguyễn Tất Thành

²Viện Khoa học liên ngành, Trường Đại học Nguyễn Tất Thành

³Công ty TNHH KTNH Thiên Nam

*ntnha@ntt.edu.vn

Tóm tắt

Hiện nay, chuối là một trong những nông sản xuất khẩu chủ lực của Campuchia. Tuy nhiên, bệnh héo vàng Panama đã và đang trở thành mối nguy lớn ảnh hưởng đến mật độ, năng suất cây chuối, gây tổn thất nặng cho các cánh đồng chuối lưu vực sông Srêpok, tỉnh Ratanakiri, Campuchia. Kết quả điều tra các ruộng chuối lưu vực sông Srêpok cho thấy, trong vòng 12 tháng năm 2024, khoảng 2 % cây chuối đã bị bệnh Panama và được hủy bỏ trong tổng số 430 980 cây chuối khảo sát. Trong đó, bệnh diễn biến phức tạp và lây lan nhanh hơn trong giai đoạn mùa mưa từ tháng 8 đến tháng 10, đạt tỷ lệ bệnh cao nhất vào tháng 10 với tổng hơn 200 cây chuối bị bệnh trong tháng. Tác nhân gây bệnh đã được xác định là *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* race 4 (*Foc* 4) thông qua đặc điểm hình thái, định danh phân tử với các cặp mồi đặc hiệu, và mùi thơm đặc trưng khi nuôi cấy trong môi trường cơm. Ngoài ra, sử dụng mồi nhận diện đặc hiệu cũng cho thấy các chủng *Foc* 4 trong nghiên cứu là *Foc* chủng 4 nhiệt đới (*Foc* TR4). Nghiên cứu cung cấp thông tin khoa học về bệnh Panama trên chuối, hỗ trợ phòng trừ bệnh trên chuối hiệu quả hơn.

Nhận 08/07/2025

Được duyệt 03/09/2025

Công bố 28/09/2025

Từ khóa

bệnh héo vàng lá chuối, chuối, *Foc* 4, *Fusarium oxysporum*, Panama

© 2025 Journal of Science and Technology - NTTU

1. Đặt vấn đề

Chuối Cavendish hay còn gọi là chuối tiêu, có tên khoa học là *Musa* spp., là cây ăn quả có nguồn gốc từ châu Á. Chuối tiêu thuộc nhóm chuối tam bội AAA, là kết quả của quá trình lai khác loài *Musa acuminata* và *M. balbisiana* [1]. Thành phần quả chuối rất giàu các loại vitamin A (carotene), B (thiamine, riboflavin, niacin), B6 (pyridoxine), C (acid ascorbic) và B12, cũng như các khoáng chất K, P và Mg [2]. Vừa mang đến hương vị thơm ngon, vừa giàu dinh dưỡng, mang lại nhiều lợi ích cho sức khỏe, quả chuối trở thành một loại trái cây rất được ưa chuộng trên khắp thế giới. Nhiều năm qua, chuối là một trong 10 mặt hàng nông sản hàng đầu thế giới, đồng thời là một trong những cây lương thực quan trọng ở các nước đang phát triển. Theo báo cáo của OECD/FAO năm 2023, Campuchia và Việt Nam nằm trong số 3 quốc gia có sản lượng xuất khẩu chuối lớn của châu Á.

Ratanakiri là một trong các tỉnh có diện tích trồng chuối đáng kể của Campuchia, tuy nhiên, những năm gần đây, bệnh Panama hay bệnh héo vàng lá chuối đã và đang trở thành mối nguy lớn ảnh hưởng đến mật độ, năng

suất cây chuối, gây tổn thất nặng cho các cánh đồng chuối lưu vực sông Srêpok. Năm 2023, khoảng 3,25 % cây chuối tương đương với diện tích khoảng 85 ha của Khu liên hợp nông nghiệp Snuol trồng chuối già Nam Mỹ tại Campuchia đã phải bị tiêu hủy vì bệnh Panama, bệnh lây lan nhanh chóng trên khắp cánh đồng [3].

Theo nhiều báo cáo, bệnh Panama do *Fusarium oxysporum* gây ra, cụ thể là *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*). Trong đó, *Foc* gây bệnh cho chuối ăn quả bao gồm 3 chủng chính là *Foc* race 1 (*Foc* 1) gây bệnh chủ yếu trên chuối giống Gros Michel; *Foc* race 2 (*Foc* 2) gây bệnh cho chuối nhóm Bluggoe; và *Foc* race 4 (*Foc* 4) là chủng được phát hiện sau cùng, gây bệnh cho chuối giống Cavendish. *Foc* 4 chia thành *Foc* subtropical Race 4 (*Foc* STR4) gây hại trong điều kiện nhiệt độ thấp, và *Foc* tropical race 4 (*Foc* TR4) đặc biệt nguy hiểm, gây bệnh nặng cả trên giống Cavendish và nhiều giống bản địa, hoang dại khác, là mối đe dọa toàn cầu [4].

Nhiều loài *Fusarium* tồn tại dưới dạng phức hợp loài, với đặc điểm hệ gene có nhiều điểm tương đồng, rất khó để định danh, do đó, cần sử dụng phối hợp nhiều

vùng trình tự để so sánh nhằm tăng sự tin cậy khi định danh bằng phương pháp sinh học phân tử. Một số vùng trình tự thường được sử dụng để định danh *Fusarium* gồm vùng đệm phiên mã ITS, một phần trình tự gen *rpb1* và *rpb2* mã hóa cho tiểu đơn vị lớn thứ nhất và thứ hai của RNA polymerase II, vùng trình tự mã hóa cho yếu tố kéo dài dịch mã 1 α , vùng trình tự mã hóa β -tubulin, vùng LSU mã hóa cho tiểu đơn vị lớn của ribosome. Bên cạnh đó, các chủng *Foc* cũng rất đa dạng, để phân biệt *Foc* 1, *Foc* 2, *Foc* TR4 và *Foc* STR4, các nhà khoa học đã thiết kế các mồi chuyên biệt dùng để nhận diện như cặp mồi W1805F/W1805R [5] nhận diện *Foc* 1; cặp mồi *Foc*-1/*Foc*-2 [6] hoặc W2987F/W2987R [5] nhận diện *Foc* 4; cặp mồi *Foc*TR-F/*Foc*TR-R [7] nhận diện *Foc* TR4.

Sự lan rộng nhanh chóng của *Foc* TR4 tại lưu vực sông Srêpok và nguy cơ xâm nhập vào các vùng trồng chuối trọng điểm đặt ra yêu cầu cấp bách về giám sát dịch bệnh và phát triển các biện pháp quản lý bệnh. Tuy nhiên, đối mặt với các tổn thất nghiêm trọng do bệnh héo vàng Panama gây ra, vẫn chưa có các nghiên cứu điều tra về bệnh Panama tại các khu vực trồng chuối lưu vực sông Srêpok, tỉnh Ratanakiri, Campuchia. Vì vậy, việc điều tra, tìm hiểu tình hình phân bố và đặc điểm của bệnh Panama tại khu vực này là cần thiết, nhằm xây dựng các biện pháp quản lý và phòng trừ hiệu quả, bảo vệ vùng nguyên liệu chuối quan trọng của Campuchia.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Phương pháp khảo sát tỷ lệ bệnh và chỉ số bệnh Panama trên cánh đồng chuối

Mỗi giống chuối, chọn lô đại diện, điều tra 5 điểm, mỗi điểm điều tra có diện tích 100 m². Điều tra định kỳ mỗi tháng một lần để xác định tỷ lệ bệnh và chỉ số bệnh. Tỷ lệ bệnh và chỉ số bệnh được tính dựa theo QCVN 01-168:2014/BNNT có điều chỉnh.

$$\text{Tỷ lệ bệnh (\%)} = \frac{\text{Tổng số cây bị bệnh}}{\text{Tổng số cây điều tra}} \times 100$$

Biểu hiện bệnh trên lá phân theo 5 cấp: 1 – không xuất hiện lá vàng; 2 – lá dưới chuyển vàng; 3 – lá dưới và một số lá non chuyển vàng; 4 – tất cả các lá chuyển vàng; 5 – cây chết.

Chỉ số bệnh (%)

$$= \frac{[(N1 \times 1) + (N2 \times 2) + (N3 \times 3) + (N4 \times 4) + (N5 \times 5)]}{N \times 5} \times 100$$

Trong đó, N1, N2, N3, N4, N5 là số cây bị bệnh ở cấp 1, 2, 3, 4, và 5 tương ứng; N là tổng số cây điều tra.

2.2. Phương pháp phân lập và làm thuần vi nấm gây bệnh

Các mẫu bệnh được rửa dưới vòi nước máy, rửa lại bằng nước cất vô trùng, sau đó được khử trùng bề mặt bằng cồn 70 %, để khô trên giấy thấm vô trùng. Trong tủ cấy,

những mẫu bó mạch của thân già (dài khoảng 0,5 cm) ở phần ranh giới giữa mô khỏe và mô bệnh được cắt lấy từ mẫu bệnh, sau đó đặt lên môi trường thạch nước 2 % agar (WA) và để ở nhiệt độ phòng (25 $\pm$ 2) °C. Khi tơ nấm đã xuất hiện từ mẫu cấy, tiến hành cấy chuyển tơ nấm lên môi trường thạch khoai tây (PDA – Himedia, Ấn Độ) nhiều lần để được mẫu nấm bệnh thuần.

2.3. Phương pháp lây nhiễm nhân tạo xác định tác nhân gây bệnh

Thí nghiệm lây nhiễm nhân tạo được thực hiện đảm bảo định đề Koch. Nguồn bệnh được chuẩn bị trong giá thể hạt thóc. Hạt thóc được rửa sạch, ngâm nước qua đêm, luộc trong nước sạch trong vòng 1 tiếng đến khi hạt thóc nở đều, để ráo nước. Mỗi bình tam giác dung tích 250 mL chứa khoảng 150 mL giá thể hạt thóc, đầy bằng nút bông gòn, bọc miệng bình bằng giấy bạc. Tất cả các bình hạt thóc được hấp khử trùng ở 121 °C trong 20 phút. Sau đó, miếng thạch (0,5 x 0,5 cm) có chứa sợi nấm được cấy vào bình giá thể, đặt ở nhiệt độ phòng trong 2 tuần. Sau 2-3 ngày cấy, lắc nhẹ bình tam giác để đảm bảo nguồn bệnh được phân bố đều trong giá thể. Thí nghiệm lây nhiễm nhân tạo được thực hiện trên cây chuối già nuôi cấy mô *ex vitro* có 4-5 lá, có nguồn gốc từ Viện Sinh học Nhiệt đới, chỉ chọn các bầu cây phát triển khỏe mạnh, tương đồng nhau để sử dụng lây nhiễm nguồn bệnh. Giá thể trồng cây có thành phần xơ dừa + đất sạch Tribat với tỷ lệ 3:1, được hấp khử trùng ở 121 °C trong 20 phút. 30 g hạt thóc chứa nguồn bệnh được trộn với giá thể xung quanh gốc cây chuối trong bầu, ở nghiệm thức đối chứng sử dụng giá thể hạt thóc không có nguồn bệnh. Mỗi nghiệm thức lây nhiễm 5 bầu cây, các bầu cây được đặt ở khu cách ly, theo dõi trong 40 ngày, đánh giá biểu hiện bệnh tương tự nội dung điều tra bệnh. Các mẫu xuất hiện triệu chứng bệnh được tái phân lập trên môi trường WA nhằm khẳng định tác nhân gây bệnh.

2.4 Phương pháp nhận diện vi nấm dựa trên đặc điểm hình thái

Đặc điểm hình thái và màu sắc của khuẩn lạc thuần trên môi trường thạch PDA được ghi nhận. Sợi khuẩn ty, túi bào tử và bào tử được nhuộm bằng thuốc nhuộm Lactophenol cotton blue, sau đó quan sát dưới kính hiển vi để ghi nhận đặc điểm hình thái của sợi khuẩn ty và bào tử. *Fusarium* được nhận diện thông qua đặc điểm hình thái.

2.5 Phương pháp nhận diện *Foc* 4 dựa trên môi trường đặc trưng

Môi trường com nuôi cấy *Fusarium* được chuẩn bị bằng cách cân 30 g gạo cho vào bình tam giác 250 mL + 90 mL H₂O, hấp khử trùng ở 121 °C trong 18 phút. Mẫu

thạch chứa sinh khối sợi nấm (0,5 x 0,5 cm) được cấy vào bình môi trường cơm, ủ ở nhiệt độ phòng trong 10 ngày. Chúng *Foc* 4 sẽ tạo ra mùi aldehyde đặc trưng, còn các chủng *Foc* 1 và *Foc* 2 không tạo mùi trên môi trường cơm.

2.6 Phương pháp xác định đặc điểm phân tử một số vùng trình tự của *Fusarium*

DNA tổng số của từng tác nhân gây bệnh được tách chiết và tinh sạch bằng TopPURE® Genomic DNA extraction kit của Công ty TNHH Giải pháp Y sinh ABT Việt Nam. Vi nấm được định danh dựa trên 5 vùng trình tự (Bảng 1) bao gồm, vùng ITS sử dụng cặp mồi ITS1/ITS4; một phần trình tự gen *rpb2* mã hóa cho tiểu đơn vị lớn thứ hai của RNA polymerase II, sử dụng cặp mồi RPB2-5f2/RPB2-7cr; vùng trình tự *tefl* mã hóa cho yếu tố kéo dài dịch mã 1 α , sử dụng cặp mồi EF1-728F/ EF1-986R; vùng trình tự mã hóa β -tubulin, sử dụng cặp mồi Bt2a/Bt2b; vùng large subunit of rDNA

(LSU) mã hóa tiểu đơn vị lớn của ribosome, sử dụng cặp mồi LROR/LR05.

Phản ứng PCR được thực hiện theo chu trình: biến tính ở 95 °C trong 3 phút, 30 chu kỳ (biến tính ở 95 °C trong 1 phút, gắn mồi ở 58 °C trong 35 giây, kéo dài ở 72 °C trong 1 phút), tổng hợp sợi ở 72 °C trong 10 phút, trữ ở 4 °C. Sản phẩm PCR sau đó được điện di trên gel agarose 1 % để xác định kích thước vùng trình tự khuếch đại được. Sản phẩm PCR sau đó được gửi giải trình tự bằng phương pháp Sanger sequencing tại công ty 1st Base, Malaysia. Kết quả giải trình tự được so sánh tương đồng với các trình tự đã công bố nhờ phần mềm tìm kiếm BLAST của NCBI để xác định tên tác nhân gây bệnh. Cây phát sinh loài được xây dựng bằng phần mềm MEGA X sử dụng thuật toán Maximum Likelihood với thông số được mặc định và Bootstrap resampling 1000 lần.

Bảng 1. Danh sách mồi định danh tác nhân gây bệnh Panama trên chuỗi

STT	Tên mồi	Trình tự (5'-3')	Sản phẩm PCR (bp)	Tham khảo
1	ITS1-F	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	500-800	White và cộng sự (1990) [8]
	ITS4-R	TCCTCCGCTTATTGATATGC		
2	RPB2-5f2	GGGGWGAYCAGAAGAAGGC	1 700-1 742	O'Donnell và cộng sự (2010) [9]
	RPB2-7cr	CCCATRGCTTGYTTRCCCAT		
3	EF1-728F	CATCGAGAAGTTCGAGAAGG	639-683	Glass và Donaldson, (1995) [10]
	EF1-986R	TACTTGAAGGAACCCTTACC		
4	Bt2a	GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC	400-600	Carbone và Kohn (1999) [11]
	Bt2b	CTCAGTGTAGTGACCCTTGGC		
5	LROR	GTACCCGCTGAACTTAAGC	920-980	Vilgalys & Hester, (1990) [12]
	LR5	TCCTGAGGGAACTTCG		

Ghi chú: D = A, G hoặc T; R = A hoặc G; S = C hoặc G; W = A hoặc T; Y = C hoặc T

2.7 Phương pháp xác định đặc điểm phân tử một số vùng trình tự của *Fusarium*

Ba cặp mồi nhận diện đặc hiệu được sử dụng để nhận diện các chủng *Foc* (Bảng 2). Phản ứng PCR được thực hiện theo chu trình nhiệt bắt đầu là giai đoạn biến tính DNA ở 95 °C trong 3 phút, tiếp theo là 30 chu kỳ (biến

tính ở 95 °C trong 30 giây, gắn mồi ở 62 °C trong 35 giây, kéo dài ở 72 °C trong 1 phút, tổng hợp sợi ở 72 °C trong 10 phút, bảo quản ở 4 °C. Sản phẩm PCR sau đó được điện di trên gel agarose 1 %. Sự xuất hiện band trên gel điện di thể hiện kết quả dương tính, nghĩa là DNA của *Foc* đã bắt cặp được với cặp mồi nhận diện.

Bảng 2. Danh sách mồi nhận diện các chủng *Foc* gây bệnh Panama trên chuỗi

STT	Cặp mồi	Trình tự (5'-3')	Sản phẩm PCR (bp)	Chủng	Tham khảo
1	W1805F	GTTGAGTCTCGATAAACAGCAAT	354	<i>Foc</i> 1	Li và cộng sự (2012) [5]
	W1805R	GACGAGGGGAGATATGGTC			

2	Foc-1	CAGGGGATGTATGAGGAGGCT	242	Foc 4	Lin và cs. (2009) [6]
	Foc-2	GTGACAGCGTCGTCTAGTTCC			
3	FocTRF	CACGTTTAAGGTGCCATGAGAG	463	Foc TR4	Dita và cộng sự (2010) [7]
	FocTRR	CGCACGCCAGGACTGCCTCGTGA			

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Kết quả điều tra diễn biến bệnh Panama trong năm 2024

Trong năm 2024, các cánh đồng chuối lưu vực sông Srêpok, tỉnh Ratanakiri, Campuchia liên tục bị bệnh Panama ảnh hưởng đến năng suất, chất lượng cây chuối già Nam Mỹ. Cuộc điều tra được thực hiện trong vòng 12 tháng của năm 2024 trên diện tích gần 200 ha diện tích chuối già Nam Mỹ, khảo sát trên 4 loại giống chuối già Nam Mỹ bao gồm giống VIP 26 (73 ha), giống William (51 ha), giống Đài Loan (50 ha) và giống kháng (22 ha), trong đó, giống được trồng nhiều nhất là giống VIP 26 (159 720 cây) và ít nhất là giống kháng (47 960 cây).

Bảng 3. Kết quả điều tra bệnh Panama trên 4 giống chuối trong cả năm 2024

Giống	Tổng số cây bị bệnh	Tỷ lệ bệnh (%)	Cấp độ bệnh trên lá	Chỉ số bệnh
VIP 26	3228	2,02	Cấp 3	0,01212
William	1795	1,59	Cấp 2	0,00636
Giống kháng	686	1,43	Cấp 2	0,00572
Đài Loan	1614	1,46	Cấp 4	0,01169
Tổng	7323	1,7		0,00979

Dù tất cả các cây chuối bị bệnh Panama đều được chặt bỏ và xử lý, kết quả khảo sát cho thấy, từ tháng 1 đến tháng 5, trung bình mỗi tháng đều có trên 150 cây chuối mới bị bệnh cho tất cả các giống chuối. Tỷ lệ bệnh bắt đầu tăng lên từ tháng 6 và tăng nhanh liên tục, đạt đỉnh điểm ở tháng 10 với tổng cộng khoảng 2100 cây chuối bị bệnh trong tháng. Sau đó, tỷ lệ bệnh giảm nhanh và ổn định lại ở tháng 11 và tháng 12 (Hình 1)



Hình 1. Diễn biến bệnh Panama trên cây chuối trồng tại cánh đồng chuối lưu vực sông Srêpok, tỉnh Ratanakiri, Campuchia năm 2024

Giống VIP 26 là giống bị bệnh nặng nhất toàn bộ năm với tỷ lệ bệnh và chỉ số bệnh, lần lượt là 2,02 % và 0,012, cao nhất trong 4 giống (Bảng 3). Giai đoạn tháng 6-10 là giai đoạn bùng phát bệnh mạnh của giống chuối này, mỗi tháng đều phải hủy trên 200 cây. Giống William cũng bị ảnh hưởng nghiêm trọng bởi bệnh Panama, đặc biệt từ tháng 8-10, với tỷ lệ bệnh cao thứ 2, tuy nhiên bệnh diễn biến chậm, đa số các cây chuối bị bệnh chỉ ở cấp 2. Đối với giống Đài Loan, bệnh xuất hiện hầu như quanh năm, nhưng bùng phát mạnh từ tháng 7-11, mặc dù tỷ lệ cây bị bệnh thấp hơn so với 2 giống VIP 26 và William, nhưng các cây chuối bị bệnh phần lớn có cấp độ bệnh trên lá ở cấp 4, hầu như tất cả lá chuối đều nhanh chóng héo vàng đến nâu, ảnh hưởng nghiêm trọng đến sức sống của cây (Hình 2). Giống kháng bị bệnh nhẹ nhất, đỉnh điểm chỉ 200 cây vào tháng 10, biểu hiện sự ổn định và khả năng chống chịu bệnh cao hơn hẳn so với 3 giống còn lại.

Thời điểm bùng phát bệnh Panama mạnh nhất là từ tháng 6 đến tháng 10, tương ứng với giai đoạn mùa mưa tại khu vực tỉnh Ratanakiri, độ ẩm và nước đọng trong đất cao, nhiệt độ thời gian này cũng mát mẻ, tạo điều kiện lý tưởng cho nấm bệnh phát triển mạnh trong đất và dễ xâm nhập vào rễ non.



Hình 2. Triệu chứng bệnh Panama trên 4 giống chuối già Nam Mỹ

Nhìn chung, giống VIP 26 và William có mức độ nhiễm bệnh cao, trong khi giống kháng là ứng viên tiềm năng để nhân rộng do tỷ lệ bệnh thấp hơn nhiều. Ngoài ra, cần chuẩn bị tốt các biện pháp quản lý bệnh Panama vào giai đoạn mùa mưa tháng 6-10.

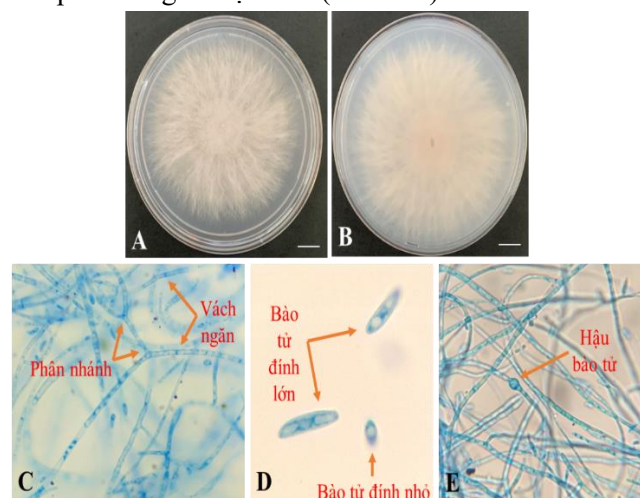
3.2 Kết quả phân lập, làm thuần vi nấm gây bệnh từ mẫu chuối bị bệnh Panama

Các mẫu thân và củ chuối bị bệnh Panama được chuyển về phòng thí nghiệm để phân lập tác nhân gây bệnh. Bên trong phần thân củ và thân giả, vi nấm phát triển tạo ra các vết bệnh màu nâu vàng, nâu đỏ đến nâu đen. Phân lập vi nấm từ 3 đợt thu mẫu thu được tổng cộng 21 dòng phân lập thuần có đặc điểm hình thái giống nhau hoàn toàn, và phù hợp với các đặc điểm của vi nấm thuộc chi *Fusarium*.

Khuẩn lạc vi nấm phân lập được có tốc độ phát triển chậm, đạt đường kính khoảng 4,5 cm sau 3 ngày và đường kính 7 cm sau 7 ngày. Khuẩn lạc ban đầu màu trắng, mặt sau hơi ngả vàng nhạt, sau 5-7 ngày, khuẩn lạc xuất hiện sắc tố màu tím nhạt hoặc tím đậm, màu sắc đậm hơn ở tâm khuẩn lạc (Hình 3A và 3B).

Dưới kính hiển vi vật kính 40x, hệ sợi nấm trong suốt, bắt màu xanh đặc trưng của thuốc nhuộm Lactophenol cotton blue. Sợi nấm có vách ngăn và phân nhánh (Hình 3C). Bào tử có 3 loại, đều trong suốt không màu. Bào tử đỉnh lớn có hình thoi dẹp dài, hơi cong, có 3-4 vách

ngăn ngang (Hình 3D). Bào tử đỉnh nhỏ thường không có vách ngăn, hình thoi ngắn hoặc hình trứng (Hình 3D). Hậu bào tử hay bào tử vách dày hình tròn, là cấu trúc phình to giữa sợi nấm (Hình 3E).



Hình 3. Đặc điểm hình thái vi nấm gây bệnh Panama trên chuối già Nam Mỹ

A, B – mặt trước và mặt sau khuẩn lạc vi nấm 7 ngày tuổi; C – hệ sợi nấm dưới kính hiển vi vật kính 40x; D – bào tử đỉnh lớn và bào tử đỉnh nhỏ; E – bào tử vách dày

3.3 Kết quả lây nhiễm nhân tạo xác định tác nhân gây bệnh

Các dòng vi nấm phân lập từ mẫu bệnh được lây nhiễm ngược lại các bầu cây chuối già Nam Mỹ *ex vitro* nhằm khẳng định khả năng gây bệnh. Các dòng phân lập của cả 3 đợt thu mẫu bệnh đều được thực hiện lây nhiễm nhân tạo trên cây chuối con khỏe mạnh. Kết quả lây nhiễm nhân tạo cho thấy tất cả các dòng phân lập đều có khả năng gây ra triệu chứng của bệnh Panama trên cây chuối con. Tỷ lệ bệnh chung ở mỗi đợt lây nhiễm đều trên 80 % (Bảng 4).

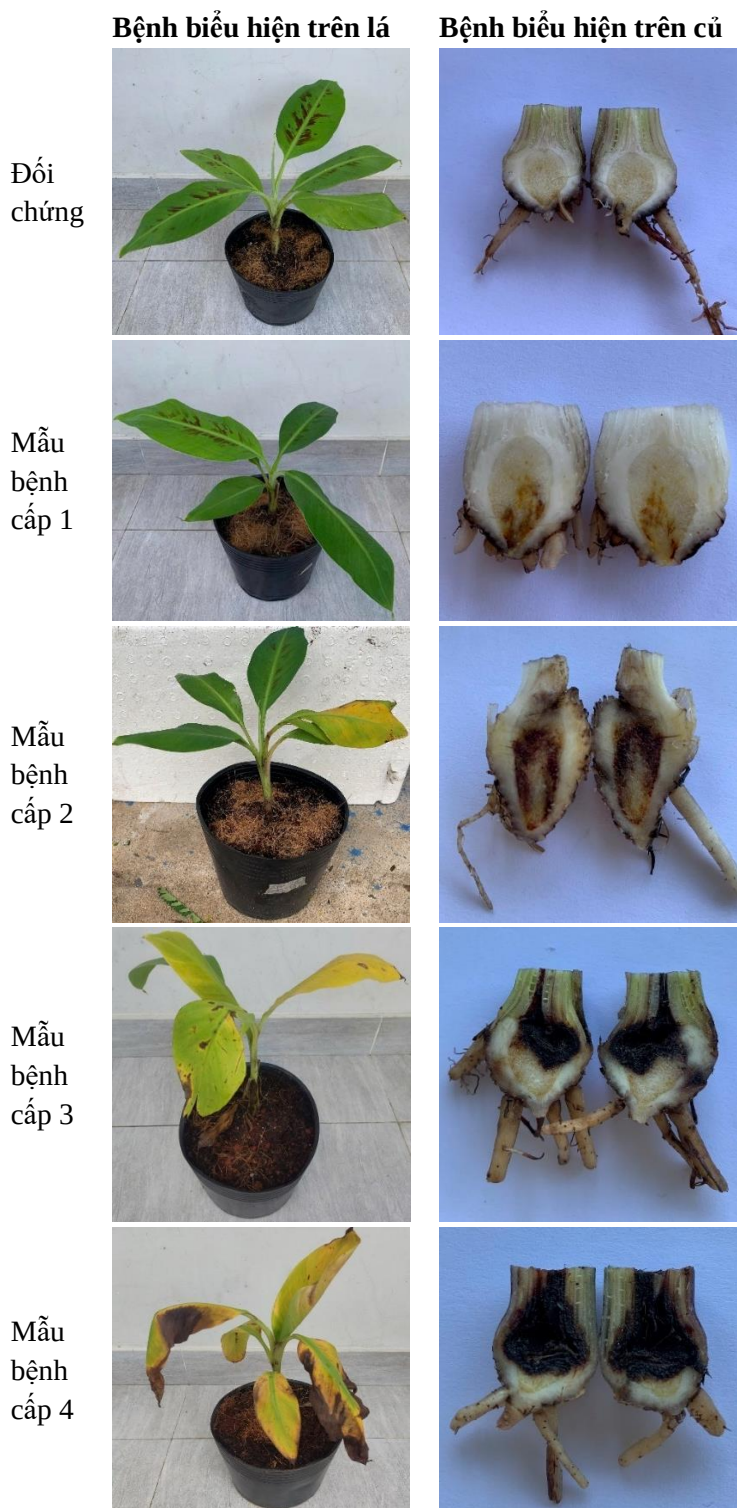
Bảng 4. Kết quả lây nhiễm nhân tạo 3 đợt phân lập mẫu bệnh

	Số cây bệnh	Tỷ lệ bệnh (%)	Chỉ số bệnh
Đối chứng	0	0	0
Đợt 1	31/35	88,57	0,46
Đợt 2	33/35	94,29	0,43
Đợt 3	30/35	85,71	0,4

Trong vòng 40 ngày theo dõi, không có nghiệm thức nào xuất hiện cây bị bệnh cấp 5 – cây bị chết hoàn toàn. Cây bị bệnh ở cấp 2 – lá dưới chuyển vàng, nấm bệnh xâm nhiễm khoảng 30-50 % phần thân củ chiếm phần lớn cây bị bệnh (khoảng 55-56 % cây bệnh). Ngoài ra, cây chuối con bị bệnh cấp 1 – không xuất hiện lá vàng, nấm bệnh bắt đầu xâm nhiễm vào rễ, chiếm khoảng 16-

27 %; cây chuối bị bệnh cấp 3 – lá dưới và một số lá non chuyển vàng, nấm bệnh từ thân củ bắt đầu xâm nhiễm lên phần thân giả, chiếm khoảng 7-19 %; cuối cùng cây bị bệnh cấp 4 – tất cả các lá chuyển vàng, nấm bệnh xâm nhập sâu phần thân củ và hệ thống mạch dẫn của phần thân giả, chiếm khoảng 3-10 % (Hình 4).

Tất cả các mẫu bệnh do lây nhiễm nhân tạo, khi tái phân lập trên môi trường WA, làm thuần trên môi trường PDA đều thu được các dòng vi nấm có đặc điểm hình thái giống với các dòng phân lập ban đầu. Do đó, các dòng phân lập là tác nhân gây ra bệnh Panama trên cây chuối già Nam Mỹ trồng tại lưu vực sông Srêpok.

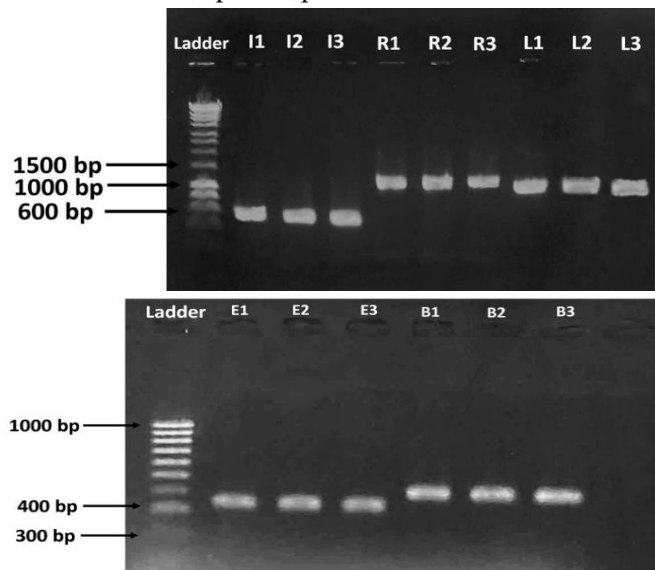


Hình 4. Triệu chứng bệnh Panama trên cây chuối con trong thí nghiệm lây nhiễm nhân tạo sau 40 ngày lây nhiễm

3.4 Kết quả định danh nấm bệnh bằng phương pháp sinh học phân tử

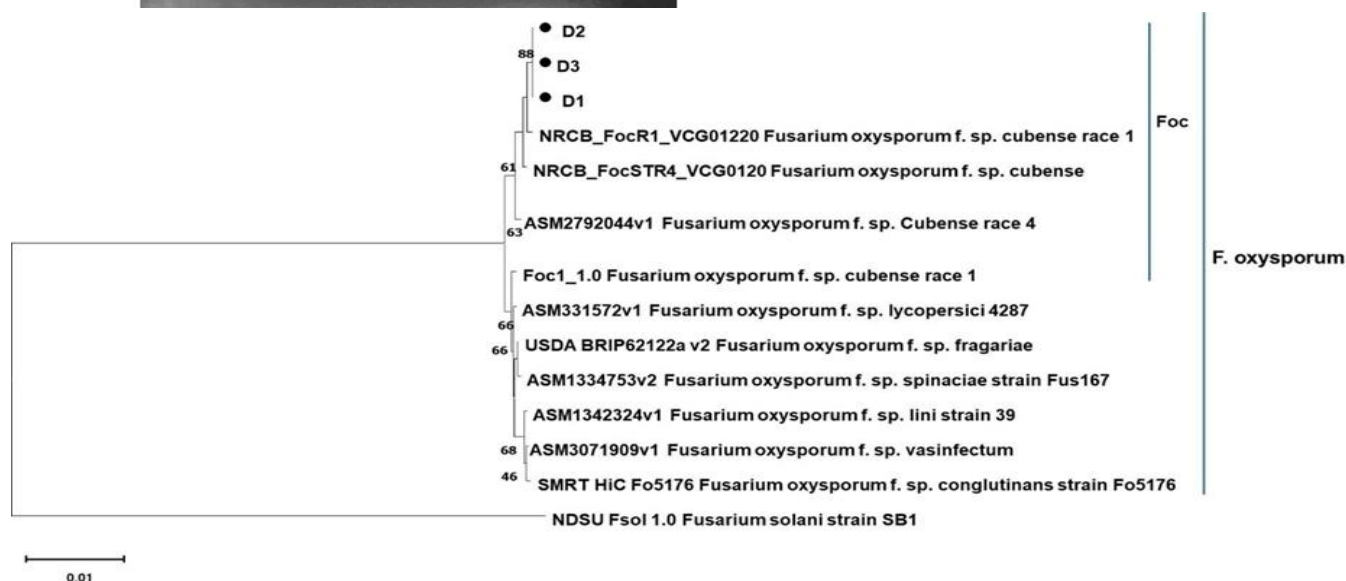
Nấm *Fusarium* thường tồn tại dưới dạng phức hợp loài, do đó, để phân biệt chính xác đến loài cần sử dụng nhiều chỉ thị phân tử khác nhau. Trong nghiên cứu này, các

vùng trình tự được sử dụng để nhận diện *Fusarium* bao gồm vùng ITS, vùng RPB2, vùng TEF1, vùng β -TUB và vùng LSU. Do tất cả các dòng phân lập có đặc điểm tương đồng nhau, nên mỗi đợt thu mẫu, 1 dòng phân lập đại diện được chọn để sử dụng cho nghiên cứu định danh và nhận diện, được ký hiệu là D1, D2 và D3 tương ứng với mẫu của 3 đợt phân lập.



Hình 5. Kết quả điện di trên gel agarose 1 % sản phẩm PCR khuếch đại các vùng trình tự I1, I2, I3 – vùng ITS; R1, R2, R3 – vùng RPB2; L1, L2, L3 – vùng LSU; E1, E2, E3 – vùng TEF1; B1, B2, B3 – vùng β -TUB; số thứ tự 1, 2, 3 tương ứng với vi nấm D1, D2, D3

Sản phẩm PCR được phát hiện trên gel agarose 1 % (Hình 5) cho thấy ở cả 3 mẫu, vùng trình tự ITS có kích thước khoảng 600 bp, vùng RPB2 khoảng 1200-1500 bp, vùng LSU khoảng 1000-1200 bp, vùng TEF1 khoảng 400 bp, và vùng β -TUB khoảng 450-500 bp. Kết quả giải trình tự sau khi hiệu chỉnh cho thấy, khi so sánh riêng từng vùng trình tự bằng phần mềm Seaview và Mega X giữa 3 mẫu D1, D2 và D3 thu được kết quả tương đồng 100 %, chứng tỏ các dòng phân lập từ cả 3 đợt thu mẫu đều thuộc về cùng 1 chủng. Kết quả giải trình tự của tất cả các vùng trình tự của 3 dòng phân lập khi BLAST với dữ liệu ngân hàng NCBI đều cho kết quả là *F. oxysporum*.



Hình 6. Cây phát sinh loài của 3 dòng phân lập dựa trên kết hợp 5 vùng trình tự ITS, TEF1, β -TUB, RPB2, LSU bằng phương pháp Maximum Likelihood (Bootstrap re – sampling 1000 lần)

Cây phát sinh loài được xây dựng dựa trên tổ hợp năm vùng trình tự ITS, TEF1, β -TUB, RPB2, LSU cho thấy mối quan hệ tiến hóa của 3 dòng *Fusarium* trong nghiên cứu này. Các dòng D1, D2 và D3 đều nằm chung một nhánh riêng biệt và nằm trong nhóm *F. oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) (Hình 6). Nhánh này tách biệt hoàn toàn với các chủng *F. oxysporum* khác, cho thấy mức độ phân hóa di truyền rõ rệt trong nội bộ loài *F. oxysporum*. *F. solani* được sử dụng làm nhóm out group cho cây phát

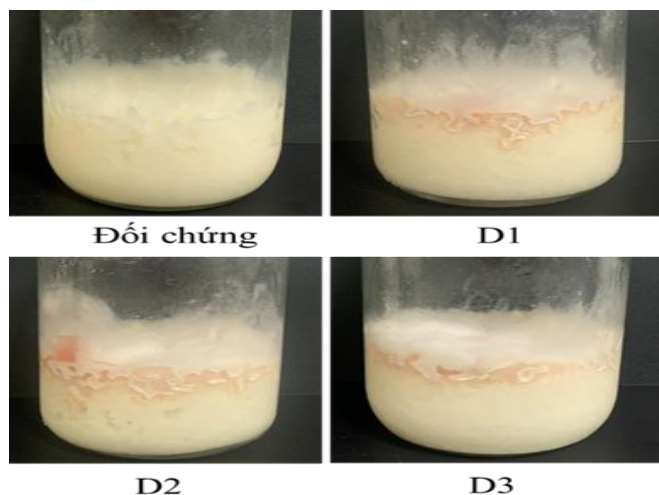
sinh, nằm ở 1 nhánh tách biệt hoàn toàn. Hai loài này vốn được xem là hai loài vi nấm phổ biến trong đất, và có đặc điểm hình thái dễ gây nhầm lẫn [13]. Việc kết hợp nhiều chỉ thị phân tử là cần thiết để xác định mối quan hệ phát sinh trong nhóm loài có tính đa hình cao như *F. oxysporum*.

Vùng ITS là một marker được sử dụng phổ biến trong phân loại nấm do có sự đa dạng cao giữa các loài, tuy nhiên, không đủ tin cậy để phân biệt các loài nấm có

quan hệ gần. Các chỉ thị phân tử như TEF1 α và β -tubulin có tốc độ tiến hóa cao, cho phép phân biệt giữa các loài có quan hệ gần, đã được sử dụng hiệu quả trong phân loại các loài cùng nhóm. Bên cạnh đó, vùng RPB2 mã hóa tiểu đơn vị lớn thứ hai của RNA polymerase II, là một chỉ thị phân tử có độ nhận diện cao. Do đó, việc kết hợp nhiều chỉ thị phân tử với mức độ bảo tồn và tốc độ tiến hóa khác nhau là cần thiết để tăng độ tin cậy trong việc nhận diện và phân định chính xác các chủng *Fusarium* cấp độ dưới loài.

3.5 Kết quả nhận diện *Foc* 4 bằng nuôi cấy trên môi trường cơm

Khi nuôi cấy trên môi trường cơm, các chủng *Foc* 4 sẽ tạo ra mùi aldehyde đặc trưng, còn các chủng *Foc* 1 và *Foc* 2 không tạo mùi. Trong cả 3 nghiệm thức tương ứng với 3 dòng phân lập của 3 đợt thu mẫu, vi nấm phát triển sợi nấm màu trắng bông xốp trên bề mặt cơm, sợi nấm phát triển xuống các khe hở tạo thành các rãnh nấm, ban đầu màu vàng nhạt, sau đó chuyển dần thành màu hồng cam.



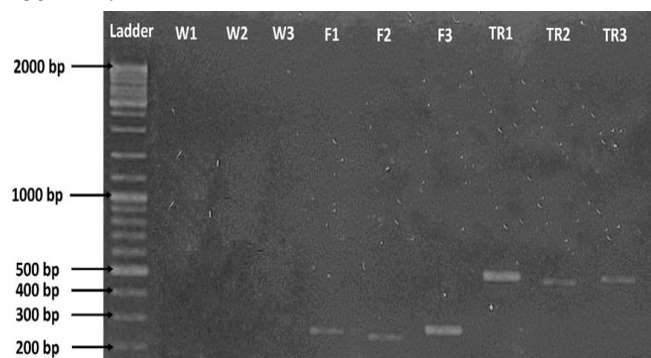
Hình 7. Ba dòng phân lập được nuôi cấy trong môi trường cơm

Sau 15 ngày nuôi cấy, ở nghiệm thức đối chứng chỉ ngửi thấy mùi thơm nhẹ của cơm, còn ở tất cả các nghiệm thức có nuôi cấy các dòng phân lập đều có mùi thơm aldehyde rất nồng, chứng tỏ các dòng *Foc* phân lập được là *Foc* 4. Đây là tác nhân gây bệnh Panama nghiêm trọng nhất hiện nay, đặc biệt tấn công giống chuối già Nam Mỹ Cavendish.

3.6 Kết quả PCR xác định sự hiện diện của các trình tự đặc hiệu với *Foc* 1, *Foc* 4 và *Foc* TR4

Kết quả điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 1 % cho thấy hiệu quả khuếch đại của ba cặp mồi đặc hiệu nhằm nhận diện các chủng khác nhau của *Foc*. Trong đó, cặp

mồi W1805F/W1805R được sử dụng để nhận diện *Foc* 1, *Foc*-1/*Foc*-2 nhận diện *Foc* 4 và *Foc*TR-F/*Foc*TR-R nhận diện *Foc* TR4. Cả 3 mẫu D1, D2 và D3 khuếch đại với mồi W1805F/W1805R đều không xuất hiện băng điện di (W1, W2, W3). Với nhóm F1, F2 và F3 là kết quả khuếch đại với mồi *Foc*1/*Foc*2 xuất hiện băng khuếch đại rõ ở vị trí khoảng 250 bp. Tương tự, nhóm TR1, TR2 và TR3 khuếch đại với cặp mồi *Foc*TR-F/*Foc*TR-R cũng có sự xuất hiện băng có kích thước khoảng 450 bp. Do đó, các chủng D1, D2 và D3 đều là *Foc* TR4.



Hình 8. Kết quả điện di sản phẩm PCR nhận diện các trình tự đặc hiệu với *Foc* 1, *Foc* 4 và *Foc* TR4

Cặp mồi W1805F/W1805R được phát triển dựa trên trình tự đặc trưng của *Foc* 1. *Foc* 1 hoặc *Foc* 2 đã từng được phát hiện gây bệnh Panama cho chuối tây ở Lai Châu vào năm 2021 [14]. Cặp mồi *Foc*-1/*Foc*-2 được báo cáo có độ đặc hiệu cao khi nhận diện *Foc* 4 [1]. Cuối cùng, cặp mồi *Foc*TR-F/*Foc*TR-R là công cụ quan trọng trong nhận diện *Foc* TR4 – chủng có khả năng lây lan, phá hủy ruộng chuối Cavendish trong thời gian ngắn, đang bùng phát mạnh tại Đông Nam Á và Nam Á [15].

4 Kết luận

Trong năm 2024, khoảng 2 % cây chuối già Nam Mỹ canh tác trên các cánh đồng chuối lưu vực sông Srêpok, tỉnh Ratanakiri, Campuchia bị bệnh Panama với nhiều mức độ khác nhau. Tác nhân gây bệnh được xác định là *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4. *Foc* TR4 mang các đặc điểm đặc trưng của các vùng trình tự ITS, TEF1 α , β -TUB, RPB2 và LSU, đồng thời lên men tạo mùi aldehyde nồng khi nuôi cấy trên môi trường cơm.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu được tài trợ bởi Trường Đại học Nguyễn Tất Thành, Thành phố Hồ Chí Minh trong khuôn khổ đề tài mã số 2024.01.162/HĐ-NCKH.

Tài liệu tham khảo

- [1] C. J. R. Cumagun, K. G. I. Aguilar-Hawod, and F. M. d. I. Cueva, "Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* causing Panama wilt of banana in the Philippines," *Pathogens*, vol. 9, no. 32, pp. 1-23, 2020.
- [2] K. H. Maseko, T. Regnier, B. Meiring, O. C. Wokadala, and T. A. Anyasi, "Musa species variation, production, and the application of its processed flour: A review," *Scientia Horticulturae*, vol. 325, p. 112688, 2024/02/01/ 2024.
- [3] Trần Thanh Dũng, "Đánh giá về tình hình bệnh Panama (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* - Foc) trên cây chuối già Nam Mỹ canh tác tại Khu liên hợp nông nghiệp Snuol (Campuchia) và biện pháp quản lý," *Tạp chí Khoa học Đại học Đông Á*, vol. 1, no. 5, pp. 50-61, 2023.
- [4] S. B. Ghag, U. K. Shekhawat, and T. R. Ganapathi, "Fusarium wilt of banana: Biology, epidemiology and management," *International Journal of Pest Management*, vol. 61, no. 3, pp. 250-263, 2015.
- [5] M. H. Li, X. Q. Yu, H. F. Wang, J. Zhou, P. G. Xi, and Z. D. Jiang, "Rapid detection and identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Race 1 and Race 4," *Scientia Agricultura Sinica*, vol. 45, pp. 3971-3979, 2012.
- [6] Y. H. Lin, J. Y. Chang, E. T. Liu, C. P. Chao, J. W. Huang, and P. F. L. Chang, "Development of a molecular marker for specific detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4," *European Journal of Plant Pathology*, vol. 123, pp. 353-365, 2009.
- [7] M. A. Dita, C. Waalwijk, I. W. Buddenhagen, M. T. Souza Jr, and G. H. J. Kema, "A molecular diagnostic for tropical race 4 of the banana fusarium wilt pathogen," *Plant Pathology*, vol. 59, no. 2, pp. 348-357, 2010.
- [8] T. J. White *et al.*, "Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics," in *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, vol. 31, M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White, Eds. San Diego, CA, USA: Academic Press, 1990, pp. 315-322.
- [9] K. O'Donnell, D. A. Sutton, and M. G. Rinaldi, "Internet-accessible DNA sequence database for identifying fusaria from human and animal infections," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 48, pp. 3708-3718, 2010.
- [10] N. L. Glass and G. C. Donaldson, "Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes," *Applied and environmental microbiology*, vol. 61, no. 4, pp. 1323-1330, 1995.
- [11] I. Carbone and L. M. Kohn, "A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes," *Mycologia*, vol. 91, no. 3, pp. 553-556, 1999.
- [12] R. Vilgalys and M. Hester, "Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species," *Journal of Bacteriology*, vol. 172, no. 8, pp. 4238-4246, 1990.
- [13] N. M. Shalapy and W. Kang, "Fusarium oxysporum & Fusarium solani: Identification, characterization, and differentiation the fungal phenolic profiles by HPLC and the fungal lipid profiles by GC-MS," *Journal of Food Quality*, vol. 2022, no. 1, p. 4141480, 2022/01/01 2022.
- [14] Vũ Thị Phương Bình *et al.*, "Một số kết quả nghiên cứu bệnh héo vàng hại cây chuối tây (bệnh Panama) tại huyện Phong Thổ, tỉnh Lai Châu," *Bảo vệ Thực vật*, vol. 2, pp. 3-9, 2021.
- [15] M. Dita, M. Barquero, D. Heck, E. S. Mizubuti, and C. P. Staver, "Fusarium wilt of banana: Current knowledge on epidemiology and research needs toward sustainable disease management," *Frontiers in Plant Science*, vol. 9, p. 398832, 2018.

Assessment of the damage situation and identification of *Fusarium* strains causing Panama disease on banana in the Srepok river basin, Ratanakiri province, Cambodia

Nguyen Thi Nha^{1*}, Ho Thi Cam Nguyen¹, Nguyen Thanh Diem¹, Bui Le Trong Nhan², Hoang Xuan Hung³

¹Faculty of Applied Science and Technology, Nguyen Tat Thanh University

²Institute of Interdisciplinary Sciences, Nguyen Tat Thanh University

³Thien Nam Agritech Company Limited

*ntnha@ntt.edu.vn



Abstract Bananas are one of Cambodia's main agricultural exports. However, Panama disease has become a major threat affecting the density and productivity of banana plants, causing heavy losses to banana fields in the Srepok River basin, Ratanakiri province, Cambodia. A field survey conducted in the Srepok river basin revealed that, during the 12 months of 2024, approximately 2 % of banana plants were infected with Panama disease and were destroyed out of a total of 430,980 surveyed banana plants. The disease showed more complex progression and faster spread during the rainy season from August to October, with the highest incidence in October, when a total of more than 2,000 banana plants were affected. The causal agent was identified as *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4 (*Foc* 4) based on morphological characteristics, molecular identification using specific primers, and its distinctive odor when cultured on rice medium. Furthermore, diagnostic primers confirmed that the strains isolated in this study belong to the tropical race 4 (*Foc* TR4). This research provides scientific insights into Panama disease in banana, contributing to more effective disease management strategies.

Keywords banana, *Foc* 4, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium* wilt, *Musa* spp., Panama disease