

TIÊU CHUẨN NGÀNH
10 TCN 530:2002
CÂY GIỐNG CHUỐI TIÊU NHÂN BẰNG PHƯƠNG PHÁP NUÔI CẤY MÔ
Standard of banana seedlings multiflied by tissue culture

Chương I:

PHẠM VI ÁP DỤNG

- Phạm vi áp dụng cho các vùng trồng chuối trên cả nước;
- Áp dụng cho cây chuối được nhân giống bằng phương pháp nuôi cấy mô.

Chương II:

TIÊU CHUẨN CÂY GIỐNG

1. Tiêu chuẩn mẫu giống thu thập làm nguồn vật liệu nhân giống

1.1. Nguyên tắc xác định giống trồng

Việc xác định giống trồng phải dựa trên cơ sở chính là:

- Khả năng thích ứng của giống với điều kiện tự nhiên tại vùng trồng chuối
- Yêu cầu của đối tượng tiêu thụ sản phẩm
- Giống chuối tiêu trung(*Musa sp.*) có đủ các tiêu chuẩn về năng suất, chất lượng mà Bộ Nông nghiệp và PTNT cho phép nhân giống.

1.2. Chất lượng cây mẹ (cây cho chồi dùng làm vật liệu nhân giống)

- Cây mẹ phải đúng giống được phép nhân
- Cây mẹ phải có các đặc tính sinh học cơ bản sau: chiều cao: 2,2–2,5m; đường kính thân giả: 22-25 cm (đo ở độ cao 80 cm kể từ chân bẹ ngoài); số lá khi trổ: 12-13 lá; số lá khi thu quả: 5-7 lá; trọng lượng buồng: 18-20 kg; buồng quả hình trụ, số nải trung bình: 8-12 nải; số quả/nải: 14-16 quả, quả đều, dạng hình đẹp không có biểu hiện dị dạng.

1.3. Kích cỡ và chất lượng chồi (mầm) tách từ cây mẹ dùng làm vật liệu nhân giống (xem mô tả ở phụ lục 1)

+ Kích cỡ:

- Cao từ mặt đất đến đỉnh (lá búp): 70-80 cm (đo từ chân của bẹ ngoài đến điểm giao nhau của hai cuống lá trên cùng)
- Đường kính gốc thân giả: 8-10 cm (đo cách mặt đất 30 cm)
- Thân giả có hình búp măng
- Có từ 3-4 lá hình lưỡi mác (xem phụ lục 1)

+ Chồi (mầm) tách từ cây mẹ đã được kiểm dịch cần tránh các bệnh chính nêu ở mục 1.4

+ Bệnh tuyến trùng của chồi mầm cũng cần kiểm tra để xác định mức độ sạch bệnh (xem phụ lục 6)

1.4. Kiểm tra dịch bệnh ở cây mẹ và chồi con

Cây mẹ và chồi con phải được đánh giá một số bệnh hại chính như: chùn ngọn (BBTV), héo rũ, đốm lá, tuyến trùng, thối vi khuẩn...

- Bệnh chùn ngọn cần được đánh giá ở cây mẹ và chồi con ngay trước khi lấy mẫu bằng phương pháp ELISA (xem phụ lục 2)

- Bệnh héo rũ do nấm *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* gây ra phải được đánh giá đối với cây mẹ hàng tháng, mỗi tháng một lần từ tháng thứ 3 sau khi trồng đến khi thu hoạch (theo hướng dẫn của INIBAP) (xem phụ lục 3)
- Bệnh Sigatoka cũng phải được đánh giá đối với cây mẹ mỗi tháng 1 lần, từ tháng thứ 3 sau khi trồng đến khi thu hoạch (theo hướng dẫn của INIBAP) (xem phụ lục 4).
- Bệnh thối thân do vi khuẩn *Pseudomonas solanacearum* gây ra phải được kiểm tra và xác định mức độ bệnh của cây mẹ mỗi tháng một lần, từ tháng thứ sáu sau khi trồng đến khi thu hoạch (theo hướng dẫn của INIBAP) (xem phụ lục 5).
- Bệnh tuyến trùng của chồi (cây con thế hệ thứ nhất) cũng phải được kiểm tra để xác định mức độ sạch bệnh (xem phụ lục 6)

2. Các chỉ tiêu mô tả tiêu chuẩn cây giống nuôi cấy mô

2.1. Độ đồng đều

- Đường kính thân giả (mm) được đo cách gốc 1 cm
- Chiều cao cây (cm) được đo từ gốc đến điểm giao nhau của hai cuống lá trên cùng)
- Số lá thật là số lá được tính với những lá đã phát triển đầy đủ

2.2. Tần số biến dị dòng soma

Được tính bằng tỷ số giữa số cây bị biến dị sinh lý, hình thái... xuất hiện trong một chu kỳ nhân giống trên tổng số mẫu thu được ở cuối chu kỳ

3. Tiêu chuẩn cây giống nuôi cấy mô

3.1. Tiêu chuẩn cây giống nuôi cấy mô trong ống nghiệm

- Đúng giống được phép nhân (đã nêu ở mục 1.1)
- Được tái sinh từ nguồn vật liệu vô trùng (theo quy trình nhân giống- phụ lục 7), không bị nhiễm một số bệnh hại chính (đã nêu ở mục 1.4).
- Cây chuối giống nhân trong ống nghiệm không được cấy chuyển quá nhiều lần (dưới 7 lần) để tránh hiện tượng biến dị dòng soma. Tần số biến dị về hình thái ở cây nuôi cấy mô không được vượt quá 3-5%.
- Cây giống không có biến dị diệp lục ở phiến lá.
- Cây ra rễ trong ống nghiệm phải có độ lớn đồng đều, thân giả to khỏe cao từ 5-8 cm, đường kính thân 5-7 mm, có từ 3 rễ trở lên, rễ trắng, dài từ 2-4 cm, có 3-4 lá thật

3.2. Tiêu chuẩn cây giống nuôi cấy mô trong giai đoạn vườn ươm và khi xuất vườn

- Cây giống nuôi cấy mô trong vườn ươm (10-15 ngày sau khi trồng): cao 7-10 cm, đường kính thân giả 5-7 mm, có 3-4 lá thật.
- Cây giống nuôi cấy mô trong bầu đất khi xuất vườn phải có độ lớn đồng đều, thân giả to khỏe cao từ 25-30 cm, đường kính thân 10-15 mm, có 5-7 lá thật.

4. Thành phần giá thể vườn ươm và túi bầu trồng cây

4.1. Giá thể nền vườn ươm

- Sử dụng hỗn hợp cát đen : đất phù sa theo tỷ lệ 1 : 1. Đất phù sa và cát đen phải sạch, đã qua xử lý nấm, khuẩn và các loại mầm bệnh khác, không được lấy từ các vùng có mầm bệnh nấm hay tuyến trùng.
- Độ dày giá thể của nền vườn ươm: 7-10 cm.
- Luống cao 0,2 m, rộng 0,8 - 1m, hai bên có lối đi (rộng 40cm), có rãnh thoát nước.
- Thường xuyên tiến hành phòng trừ sâu bệnh hại khác trong vườn ươm.

4.2. Thành phần và kích cỡ túi bầu trồng cây

- Thành phần đất để làm bầu gồm: đất, cát, pha trộn với các giá thể hữu cơ khác nhau
- Giá thể làm bầu phải đảm bảo độ tơi xốp, thoáng khí, có độ ẩm từ 60-70% và đủ dinh dưỡng cho bộ rễ và cây phát triển khoẻ.
- Túi bầu có màu đen, chắc chắn, có độ bền đảm bảo cho quá trình vận chuyển
- Kích thước túi bầu: rộng 15cm x cao 18cm

5. Các biện pháp kỹ thuật làm tăng độ đồng đều về di truyền của cây chuối nuôi cấy mô

- Mẫu giống ban đầu phải được lấy từ các cây mẹ đúng giống, có các đặc tính nông học tốt và bền vững về mặt di truyền trong quá trình vi nhân giống.
- Số lần nhân giống không vượt quá 7 lần, số cây chuối con tối đa tạo được từ một mẫu chồi ban đầu nên dừng ở mức dưới 2000 cây.
- Các chồi chuối phát triển không bình thường (nhỏ hoặc có biểu hiện sai khác so với giống gốc) xuất hiện trong mỗi lần cấy chuyển không sử dụng cho chu kỳ nhân giống tiếp theo
- Các dạng biến dị về hình thái cần phải loại bỏ ở tất cả các giai đoạn từ tái sinh cây đến giai đoạn cuối cùng đưa cây ra vườn ươm.

6. Kiểm tra bệnh ở vườn ươm dựa trên triệu chứng bệnh để tránh nhiễm bệnh trở lại

- Các bệnh do nấm
- Các bệnh do vi khuẩn, tuyến trùng
- Các loại sâu bệnh và côn trùng khác nếu có

7. Quy cách và nhãn cây giống nuôi cấy mô

- Chữ ghi rõ ràng lên giấy, ép plastic hoặc ghi trên nhãn nhựa bằng mực hoặc sơn chống ướt
- Nội dung ghi nhãn:

Gồm các nội dung được quy định tại thông tư số 75//2000/TT-BNN/KHCN ngày 7 tháng 7 năm 2000 của Bộ Nông nghiệp và PTNT về hướng dẫn thực hiện Quyết định số 178/1999/QĐ TTg ngày 30/8/1999 của Thủ tướng Chính phủ về quy chế ghi nhãn hàng hoá lưu thông trong nước và hàng hoá xuất nhập khẩu.

Tên giống chuối (tên khoa học)

Lô sản xuất ngày tháng năm

Cơ sở sản xuất: tên, địa chỉ

KCS: cơ quan kiểm tra chất lượng cây giống

- Thời hạn trồng từ ngày xuất giống đến ngày
- Thời gian sinh trưởng (từ trồng đến lúc quả bắt đầu chín): 12-14 tháng tùy thuộc vùng và thời vụ trồng

8. Bảo quản và vận chuyển

8.1. Bảo quản

- Cây nuôi cấy mô trong bầu có thể bảo quản ở điều kiện bình thường, song cần giữ đủ ẩm và tránh nắng nóng mùa hè chiếu trực tiếp
- Không để trơ rễ và gốc thân giả cây giống
- Nếu để lâu hơn 1 tháng cần tưới thêm hỗn hợp đạm ure (N) : lân (P_2O_5) : kali (K_2O) theo tỷ lệ 3:1:1, nồng độ tưới 2%.
- Phun thuốc phòng sâu ăn lá, sâu đục thân.

8.2. Vận chuyển

- Cây trong bầu phải được xếp thành lớp để tránh gãy lá búp.
- Trong khi vận chuyển cây giống phải được che nắng, gió
- Vận chuyển cự ly gần (thời gian vận chuyển 2-3 giờ bằng ô tô): trong thời gian vận chuyển không phải tưới nước bổ sung.
- Vận chuyển cự ly xa (trên 4 giờ vận chuyển bằng ô tô): sau 5 giờ phải tưới nước bổ sung, ngày tưới 2 lần.
- Tránh làm đổ vỡ bầu, gãy thân, lá
- Khi vận chuyển đến nơi cần để chỗ râm mát và tưới nước đủ ẩm cho cây
- Phải tạo sự thông thoáng trong quá trình vận chuyển

PHỤ LỤC THAM KHẢO

PHỤ LỤC 1. MÔ TẢ HÌNH DÁNG CHỒI (MẦM) CỦA CÂY MẸ

PHỤ LỤC 2. HƯỚNG DẪN XÁC ĐỊNH VÀ KIỂM TRA BỆNH CHÙN NGỌN (CHUỐI RỤT, ĐẦU GÀ)

Bệnh chùn ngọn do virus gây nên, vector truyền bệnh là loại rệp có tên là *Pentalonia nigronervosa*.

Để phát hiện bệnh này có thể xác định bằng mắt thường (nếu cây đã phát bệnh). Xác định bệnh bằng phương pháp ELISA (có thể phát hiện bệnh ngay khi còn đang ở giai đoạn ủ bệnh)

Hướng dẫn đánh giá bệnh chùn ngọn bằng phương pháp ELISA bao gồm các bước sau:

I- Chọn mẫu vật

1. Cây lấy mẫu có độ tuổi từ 3-6 tháng
2. Mẫu dùng để xét nghiệm có thể là lá, gân chính của lá (lá thứ 3 kể từ ngọn) hay các bộ phận khác của cây
3. Mẫu thu được có thể đựng trong túi nilon nhỏ có đánh số và ghi các thông số có liên quan đến cây lấy mẫu
4. Mỗi cây lấy 3 mẫu nhắc lại, có thể lấy ở các cây trong khóm để tăng tính đại diện của mẫu
5. Mẫu chưa làm đến có thể cất giữ trong tủ lạnh đến ngày hôm sau
6. Đĩa dùng để làm xét nghiệm ELISA có 2 loại
 - + Loại chưa bọc kháng thể các giếng
 - + Loại bọc sẵn kháng thể (ở đây dùng loại đĩa đã bọc sẵn của hãng sản xuất bán, việc tiến hành sẽ rất nhanh và tiện lợi)

II- Các bước tiến hành

1. Chiết dịch từ lá chuối

a. Chuẩn bị mẫu

- Dùng túi nghiền mẫu hoặc cối sứ để nghiền nhỏ mẫu
- Lá dùng làm mẫu có trọng lượng khoảng 1 g và được cắt từ nhiều cây trong 1 khóm để tăng tính đại diện của mẫu
- Mẫu có thể lấy từ hôm trước, cất vào túi chiết sau đó bảo quản trong tủ lạnh (7 – 13°C)

- Nên chọn 1 cây bị bệnh điển hình để làm đối chứng và so sánh với mẫu dương tính có bán kèm theo bộ kit

b. Chuẩn bị dung dịch chiết

- Lấy 16,5 g dung dịch chiết (trong bộ kit) hoà tan trong 500 ml nước cất 2 lần. Nhỏ thêm 15 ml Tween vào dung dịch (dung dịch này chỉ chuẩn bị trước khi dùng)

- Cho 10 ml dung dịch chiết vào mỗi mẫu nghiền theo tỷ lệ 1g/10 ml. Nghiền nát mẫu để lấy dịch lá

- Mỗi giếng cho 100 ml dịch lá vào để thử ELISA

2. Lập sơ đồ mẫu đo

Mỗi đĩa 96 giếng luôn bố trí 1 mẫu dương tính của hãng bán kèm theo bộ kit, 1 mẫu bệnh lấy từ cây bị nhiễm điển hình, 1 mẫu trắng chỉ có dung dịch chiết. các lỗ giếng còn lại bố trí mẫu dịch chiết từ lá chuối. Nhỏ 100 ml dịch chiết vào mỗi lỗ giếng, đánh dấu theo sơ đồ sau đó đặt đĩa vào hộp kín, ủ 2 giờ ở nhiệt độ phòng hay để qua đêm ở 4^oC.

3. Chuẩn bị dung dịch enzym

Dung dịch enzym chuẩn bị 10 phút ngay trước khi dùng, không nên để lâu vì sẽ làm giảm hoạt tính của enzym. Dung dịch này gồm hỗn hợp của 3 loại dung dịch: ECI, enzym liên kết A và B với tỷ lệ:

- 2 ml dung dịch ECI pha với 8 ml nước cất 2 lần được 10 ml dung dịch ECI (1X)

- 100 ml enzym A + 100 ml enzym B

Trộn lẫn tất cả các loại trên ta được dung dịch enzym cần dùng

4. Rửa đĩa

Sau khi cho dịch chiết vào các giếng và đem ủ 2 giờ, xong tiến hành rửa đĩa từ 4-8 lần bằng dung dịch 1X PBS -T (đã có sẵn kèm theo bộ kit)

5. Thêm 100 ml dung dịch enzym vào mỗi giếng

6. Ủ đĩa trong hộp kín giữ ấm trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng

7. Chuẩn bị dung dịch PNP (chuẩn bị trước khi dùng 15 phút) bằng cách lấy 12 viên PNP cho vào 60 ml PNP 1X (dung dịch này cần tránh ánh sáng mạnh và vi khuẩn vì các yếu tố này có thể gây đổi màu làm ảnh hưởng đến kết quả phép đo)

8. Rửa đĩa lần 2 bằng PBS-T từ 4-8 lần. Sau đó nhỏ 100 ml PNP vào mỗi giếng, tiếp đó ủ đĩa trong hộp kín từ 30-60 phút. Tiếp theo nhỏ 50 ml 3M NaOH vào mỗi giếng để dừng phản ứng

9. Cho điểm mức độ chuyển màu của mỗi lỗ giếng

- Bằng mắt thường

- Đo trên máy ELISA ở bước sóng 405 nm. Số liệu đo được in ra trên giấy theo như sơ đồ đã bố trí lúc ban đầu

- Tổng hợp kết quả đọc trên máy thành thang điểm từ 1-5 so sánh với mẫu dương tính hay mẫu bệnh tự chọn để đánh giá mức độ nhiễm bệnh của các mẫu và chọn ra cây không bị nhiễm bệnh.

III- Ghi chép số liệu

- Mô tả trạng thái cây khi lấy mẫu, đánh số cây lấy mẫu trên lô theo dõi, chụp ảnh tư liệu nếu cần

- Xác định mức độ bệnh của cây bằng mắt thường (nếu có thể)

- Phân tích số liệu đo được từ các mẫu thu thập

- So sánh kết quả đánh giá bằng mắt thường với kết quả đo được bằng máy phân tích ELISA

PHỤ LỤC 3. HƯỚNG DẪN ĐÁNH GIÁ BỆNH HÉO RŨ DO NẤM (*Fusarium oxysporum f. sp. cubense*) GÂY RA

- Vườn chuối chọn để đánh giá bệnh héo rũ nên xác định thêm một số yếu tố ảnh hưởng của môi trường như loại đất, chất đất và độ pH của đất, nhiệt độ, độ ẩm, lượng mưa ...

- Sau khi trồng số liệu về môi trường cần được thu thập cho đến khi thu hoạch, để bổ sung cho việc đánh giá bệnh chính xác hơn và loại trừ các yếu tố ngoại cảnh, sử dụng bảng:

Tuần	1	2	3	4	5
Lượng mưa					
nhiệt độ cao nhất					
nhiệt độ thấp nhất					
nhiệt độ trung bình					
Số ngày mưa					

- Mức độ nhiễm bệnh (triệu chứng bên ngoài) cần ghi lại cho mỗi cây, mỗi tháng 1 lần từ tháng thứ 3 sau khi trồng cho đến khi thu hoạch, bằng cách sử dụng bảng sau:

Bảng điểm đánh giá triệu chứng bệnh quan sát bằng mắt thường

Triệu chứng bệnh	Điểm	Mức độ bệnh
Vàng phiến lá	1	Không vàng
	2	Vàng nhạt
	3	Vàng rất nhiều
Nứt ở phần gốc thân giả	1	Không nứt
	2	Nứt vừa phải
	3	Nứt rất nhiều
Đổi màu bó mạch ở bẹ lá	1	Không đổi màu
	2	Đổi màu vừa phải
	3	Đổi màu rất mạnh
Thay đổi ở lá mới mọc ra	1	Không có triệu chứng
(Mép lá bạc không bình thường, hẹp, gân lá bị cháy và nhẵn, lá mọc đứng hơn bình thường)	2	Có triệu chứng
Các đốt lá dày hơn	1	Không dày
(Triệu chứng này khó phát hiện hơn đối với cây lùn và nửa lùn)	2	Hơi dày
	3	Dày
Rũ lá	1	Không rũ
	2	Hơi rũ
	3	Rũ nhiều
Gãy oằn, cong gập cuống lá	1	Gãy ít
	2	Gãy nhiều

- Triệu chứng bệnh bên ngoài có thể phát triển mạnh từ lúc ra hoa đến khi thu hoạch

- Các số liệu về nông học như chiều cao cây, trọng lượng buồng, số nải... cũng cần ghi nhận đối với những cây theo dõi

Bảng theo dõi các số liệu nông học

(Theo Drs D. Vuylsteke và R.Ortiz, IITA)

Ngày trồng
Ngày trổ hoa
Chiều cao cây khi trổ hoa (m)
Số ngày từ lúc trồng đến khi trổ
Ngày thu quả
Số ngày từ lúc trồng đến khi thu hoạch
Chiều cao của chồi kế tiếp lúc thu quả
Trọng lượng buồng (kg)
Số nải trong buồng
Số quả trong nải
Trọng lượng trung bình quả trong nải (g)

Số liệu về triệu chứng bệnh bên trong cây cũng cần thu thập ở các cây theo dõi khi thu hoạch. Triệu chứng bên trong sẽ được phát hiện bằng cách cắt phần dưới thân củ theo chiều ngang ở vị trí 1/4 của củ. Lát cắt dùng để đánh giá sự đổi màu gây bởi héo rũ *Fusarium*

1- Củ hoàn toàn sạch, sáng không có đổi màu bó mạch

2- Có các điểm riêng biệt đổi màu ở mô bó mạch

3- Đổi màu chiếm 1/3 phần mô bó mạch

4- Đổi màu chiếm 1/3 đến 2/3 mô bó mạch

5- Đổi màu chiếm nhiều hơn 2/3 mô bó mạch

6- Hầu hết đổi màu hoặc đổi màu ở bẹ lá ở thân giả

Mẫu bệnh ở thân giả hoặc ở củ của những cây bị bệnh cần thu thập theo cách sau (Phụ lục 3, hình 1) rồi gửi về cơ quan giám định để phân loại mầm bệnh

Hình 1: Các bước tách mẫu để kiểm tra bệnh héo rũ do *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* gây ra (Theo K. Pegg, QDPI)

PHỤ LỤC 4. HƯỚNG DẪN ĐÁNH GIÁ BỆNH ĐỐM LÁ SIGATOKA

Bảng 1: Các chỉ tiêu đánh giá bệnh Sigatoka ngoài đồng ruộng

A. Trồng	E. Thu hoạch
1- Ngày trồng	10- Mức độ nhiễm bệnh
B. Giai đoạn phát triển (từ tháng thứ 3 đến trổ hoa)	11- Thời gian từ trồng đến thu hoạch
2- Thời gian bệnh phát triển	12- Độ cao của chồi con kế tiếp lúc thu hoạch
3- Lá non nhất nhiễm bệnh	13- Trọng lượng buồng lúc thu hoạch
	14- Số nải trong buồng