Australian Government
Australian Centre for
International Agricultural Research

Cẩm nang chẩn đoán bệnh cây ở Việt Nam

Cẩm nang chẩn đoán bệnh cây ở Việt Nam

Lester W. Burgess
Timothy E. Knight
Len Tesoriero
Phan Thúy Hiền

ACIAR
Research that works for developing countries and Australia
www.aciar.gov.au

2009

Trung tâm Nghiên cứu Nông nghiệp Quốc tế Australia (ACIAR) được thành lập vào tháng 6 năm 1982 qua một Đạo luật của Quốc hội Australia. Nhiệm vụ chính của Trung tâm là giúp xác định những vấn đề nông nghiệp cần giải quyết ở các nước đang phát triển và giúp hợp tác nghiên cứu giữa các nhà khoa học của Australia và của các nước đang phát triển trong những lãnh vực mà Australia có thế mạnh đặc biệt.

Khi các tên thương mại được dùng, điều này không có nghĩa là Trung tâm ủng hộ hay phân biệt đối với bất cứ sản phẩm nào.

LOẠT TÀI LIỆU CHUYÊN KHẢO CỦA ACIAR

Loạt tài liệu này gồm các kết quả nghiên cứu ban đầu do ACIAR hỗ trợ, hoặc các tài liệu được xem là có liên quan đến các mục tiêu nghiên cứu và phát triển của ACIAR. Loạt tài liệu này được phân phối trên khắp thế giới, chủ yếu là các nước đang phát triển.

© Liên bang Australia 2009
Công trình này có bản quyền. Ngoài những sử dụng được phép theo Luật Bản quyền 1968, không một phần nào được phép sao chép lại bằng bất cứ tiến trình nào mà không có văn bản cho phép trước của Chính quyền Liên bang Australia. Các yêu cầu liên quan đến việc sao chép lại và bản quyền cần được gửi đến Ban Quản trị Bản quyền Liên bang Úc, Bộ Tổng Chưởng lý, Văn phòng Robert Garran, National Circuit, Barton, ACT, 2006 hoặc gửi đến http://www.ag.gov.au/cca.

Xuất bản bởi Trung tâm Nghiên cứu Nông nghiệp Quốc tế Australia (ACIAR)
GPO Box 1571, Canberra ACT 2601, Australia
Điện thoại: 61 2 6217 0500
aciar@aciar.gov.au

Burgess L.W., Knight T.E., Tesoriero L. và Phan H.T. 2009. Cẩm nang chẩn đoán bệnh cây ở Việt Nam. Chuyên khảo ACIAR số 129a, 210 pp. ACIAR: Canberra.

ISBN 978 1 921434 79 2 (bản in)
ISBN 978 1 921434 80 8 (trực tuyến)

Biên tập kỹ thuật bởi Biotext Pty Ltd
Thiết kế bởi Clarus Design Pty Ltd
In bởi Goanna Print Pty Ltd

Dịch: All Language Typesetters & Printers Pty Ltd
Hiệu đính bản dịch: Phan Thúy Hiền

Lời nói đầu

Bệnh hại cây trồng tiếp tục gây thiệt hại mùa màng đáng kể ở Việt Nam và các khu vực khác có khí hậu nhiệt đới ở Đông Nam Á. Bệnh dịch vàng lùn và lùn xoắn lá trên lúa ở miền Nam Việt Nam gần đây đánh dấu những tác động đáng kể của bệnh cây đối với kinh tế xã hội ở cấp quốc gia.

Sự bùng phát dịch bệnh trên các cây trồng có giá trị kinh tế có thể tác động lớn đến từng hộ nông dân tại những địa phương có ít cây trồng thay thế phù hợp – phức hợp bệnh héo trên gừng ở Quảng Nam là một ví dụ.

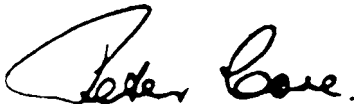
Việc chẩn đoán chính xác tác nhân gây bệnh là yếu tố quan trọng quyết định sự thành công của các biện pháp phòng trừ. Tuy nhiên, nhiều bệnh hại có các triệu chứng giống nhau, khiến cho việc chẩn đoán tại chỗ gặp nhiều khó khăn, đôi khi không thể thực hiện được. Vì vậy, các phòng thí nghiệm chẩn đoán là một thành phần không thể thiếu trong mạng lưới bảo vệ thực vật. Cán bộ nhận trách nhiệm làm công việc chẩn đoán bệnh cây cần phải trải qua quá trình đào tạo bài bản ở trình độ đại học và sau đại học về kỹ năng nghiên cứu trong phòng thí nghiệm và ngoài đồng ruộng, ngoài ra còn phải nắm vững những khái niệm cơ bản về bệnh cây và quản lý bệnh hại tổng hợp.

Việc chẩn đoán chính xác tác nhân gây bệnh cũng vô cùng cần thiết cho việc xây dựng và phát triển một cơ sở dữ liệu bệnh cây quốc gia một cách khoa học. Cơ sở dữ liệu về bệnh cây ở Việt Nam sẽ là một phần then chốt cho sự thành công của công tác kiểm dịch thực vật. Hơn nữa, cơ sở dữ liệu quốc gia là một phần quan trọng của các biện pháp an ninh sinh học liên quan tới vấn đề trao đổi thương mại hàng nông sản, đặc biệt đối với những quốc gia thành viên của Tổ chức Thương mại Thế giới.

Cuốn cẩm nang này được biên soạn nhằm giúp các nhà nghiên cứu bệnh cây phát triển những kỹ năng cơ bản trong việc chẩn đoán tác nhân gây bệnh, chủ yếu là các bệnh do nấm ở rễ và thân cây. Những bệnh này thường ẩn, không biểu hiện triệu chứng ngay nhưng gây ra những tổn thất đáng kể về mặt kinh tế xã hội ở Việt Nam.

Nội dung của cuốn sách này dựa trên kinh nghiệm của các tác giả cùng nhiều đồng nghiệp ở Australia và Việt Nam qua các chương trình tập huấn liên quan đến các dự án khác nhau được tài trợ bởi Trung tâm Nghiên cứu Nông nghiệp Quốc tế Australia (ACIAR), chương trình nâng cao năng lực cho Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn của AusAID, và Quỹ tài trợ Crawford của Viện Khoa học Kỹ thuật và Công nghệ.

Cuốn cẩm nang này bổ sung cho các ấn phẩm khác của ACIAR và nhiều đồng nghiệp khác tại Việt Nam.



Peter Core
Tổng Giám Đốc
Trung tâm Nghiên cứu Nông nghiệp Quốc tế Australia

Nội dung

Lời nói đầu 3

Lời tựa 17

Lời cảm ơn 19

1 Giới thiệu 21

1.1 Tài liệu tham khảo 23

2 Tổng quan về sức khỏe thực vật 24

2.1 Cỏ dại 25

2.2 Sâu hại 26

2.3 Thuốc bảo vệ thực vật 26

2.4 Dinh dưỡng 26

2.5 Tình trạng đất 28

2.6 Môi trường 29

2.7 Lịch sử cây trồng 30

3 Quy trình chẩn đoán 32

3.1 Nghiên cứu cụ thể 32

4 Triệu chứng bệnh 43

4.1 Các triệu chứng thường gặp 43

4.2 Các bệnh trên lá, hoa hoặc quả 45

4.2.1 Sự sản sinh bào tử trên lá bệnh 46

4.2.2 Nấm và các tác nhân giống nấm ký sinh chuyên tính trên lá 47

4.2.3 Nấm bệnh sản sinh ra hạch nấm trên mô bệnh 48

4.3 Các bệnh ở rễ, gốc và thân cây 49
4.4 Tài liệu tham khảo 49

5 Trên đồng ruộng 51
5.1 Dụng cụ cần thiết cho công tác chẩn đoán trên đồng ruộng 54
5.2 Tiến hành điều tra đồng ruộng 56

6 Trong phòng thí nghiệm 59
6.1 Kiểm tra mẫu bệnh trong phòng thí nghiệm 59
6.1.1 Héo và còi cọc 60
6.1.2 Các bệnh ở lá 60
6.2 Kính lúp soi nổi và kính hiển vi 61
6.2.1 Sử dụng kính lúp soi nổi 61
6.2.2 Sử dụng kính hiển vi 62
6.2.3 Chuẩn bị mẫu lam kính 63
6.3 Phân lập nấm gây bệnh 65
6.3.1 Phân lập từ lá và thân 66
6.3.2 Phân lập từ rễ mảnh, nhỏ 68
6.3.3 Phân lập từ rễ và thân gỗ 69
6.3.4 Bẫy đất 69
6.3.5 Phương pháp pha loãng dung dịch đất 71
6.4 Cấy truyền từ các đĩa phân lập 74
6.5 Làm thuần mẫu nấm 76
6.5.1 Cấy đơn bào tử 76
6.5.2 Cấy đỉnh sinh trưởng sợi nấm 78
6.6 Nhận biết các mẫu nấm thuần 79
6.7 Giám định nấm gây bệnh 81
6.8 Tài liệu tham khảo 82

7 Phân loại nấm và tác nhân gây bệnh 83
7.1 Các đặc tính chủ yếu của nấm và vi sinh vật giống nấm 83
7.2 Phân loại nấm gây bệnh thực vật 84
7.3 Tài liệu tham khảo 87

8 Lây bệnh nhân tạo 88
8.1 Các phương pháp lây bệnh nhân tạo 89
8.1.1 Lây bệnh lên lá và thân 90

8.1.2 Lây bệnh vào đất 91
8.2 Chuẩn bị nguồn bệnh cho quá trình lây bệnh nhân tạo 92
8.2.1 Dịch bào tử 92
8.2.2 Môi trường hạt kê/vỏ trấu (thể tích 50:50) 92

9 Quản lý bệnh hại tổng hợp 95
9.1 Luân canh 96
9.2 Quản lý cây trồng 97
9.2.1 Thoát nước tốt 97
9.2.2 Làm ngập ruộng 100
9.3 Cây giống, hạt giống và các nguồn giống sạch bệnh khác 100
9.4 Kiểm dịch 101
9.5 Dùng giống kháng bệnh hoặc chống chịu bệnh 101
9.6 Dùng gốc ghép kháng bệnh 101
9.7 Thuốc trừ nấm 102
9.8 Vệ sinh 103
9.9 Tài liệu tham khảo 104

10 Các bệnh thối rễ và thân có nguồn gốc từ đất 105
10.1 *Sclerotinia sclerotiorum* 109
10.2 *Sclerotium rolfsii* 112
10.3 Các loài *Rhizoctonia* 113
10.4 *Phytophthora* và *Pythium* 116
10.4.1 Sinh sản vô tính 116
10.4.2 Sinh sản hữu tính 117
10.4.3 Xác định và phân biệt giữa *Phytophthora* và *Pythium* . . . 117
10.4.4 Chu kỳ bệnh của nấm Oomycete - *Phytophthora* và *Pythium* 119
10.4.5 Các loài *Pythium* 119
10.4.6 Các loài *Phytophthora* 123
10.5 *Fusarium* 126
10.5.1 Giới thiệu 126
10.5.2 Nấm *Fusarium* gây bệnh ở Việt Nam 126
10.5.3 Phân lập nấm *Fusarium* gây héo 131
10.5.4 *Fusarium oxysporum* và *Fusarium solani*—các đặc điểm hình thái chính giúp cho việc giám định 132

10.6 *Verticillium albo-atrum* và *V. dahliae*—nấm gây bệnh héo ngoại lai 134
10.7 Tuyến trùng ký sinh thực vật 137
10.7.1 Tách tuyến trùng ra khỏi đất và rễ nhỏ 139
10.8 Bệnh do vi khuẩn gây ra 142
10.8.1 Héo vi khuẩn 142
10.8.2 Phân lập vi khuẩn gây bệnh cây 144
10.9 Bệnh do vi rút gây ra 148
10.10 Tài liệu tham khảo 150

11 Các bệnh phổ biến trên một số cây trồng quan trọng 151
11.1 Các bệnh phổ biến trên ớt 151
11.2 Các bệnh phổ biến trên cà chua 154
11.3 Các bệnh phổ biến trên lạc 156
11.4 Các bệnh nấm phổ biến trên hành 158
11.5 Các bệnh nấm phổ biến ở ngô 160

12 Nấm, người và động vật: các vấn đề về sức khỏe 162
12.1 Các nấm có độc tính chủ yếu ở Việt Nam 164
12.2 Các loài *Aspergillus* có độc tính 165
12.2.1 *Aspergillus flavus* 165
12.2.2 *Aspergillus niger* 166
12.2.3 *Aspergillus ochraceus* 167
12.3 Các loài *Fusarium* có độc tính 168
12.3.1 *Fusarium verticillioides* 168
12.3.2 *Fusarium graminearum* 169

13 Phòng thí nghiệm chẩn đoán và nhà lưới 171
13.1 Phòng thí nghiệm chẩn đoán 171
13.1.1 Vị trí phòng thí nghiệm 171
13.1.2 Phòng chuẩn bị 172
13.1.3 Phòng sạch 172
13.2 Bố trí phòng thí nghiệm 173
13.3 Thiết bị phòng thí nghiệm 174
13.3.1 Thiết bị cho phòng sạch 174
13.3.2 Thiết bị cho phòng chuẩn bị 176

13.4 Nhà lưới cho việc nghiên cứu bệnh cây 177
13.4.1 Khu chuẩn bị 179
13.4.2 Hỗn hợp giá thể 179
13.4.3 Vệ sinh nhà lưới 180
13.4.4 Quản lý và dinh dưỡng cây 181

Phụ lục 1 Cách làm một que cấy dẹp 183

Phụ lục 2 Sức khỏe và an toàn 185

Phụ lục 3 Môi trường, khử trùng và bảo quản mẫu vi sinh vật 186

Các chữ viết tắt 204

Chú giải thuật ngữ 205

Tủ sách 208

Bảng

Bảng 8.1 Các phương pháp lây bệnh nhân tạo 89
Bảng 10.1 Các đặc tính của các tác nhân gây bệnh phổ biến tồn tại trong đất ở Việt Nam 106
Bảng 10.2 Đặc tính của *Sclerotinia sclerotiorum* 109
Bảng 10.3 Đặc tính của *Sclerotium rolfsii* 112
Bảng 10.4 Đặc tính của các loài *Rhizoctonia* 115
Bảng 10.5 Đặc tính của các loài *Pythium* 122
Bảng 10.6 Đặc tính của các loài *Phytophthora* 123
Bảng 10.7 *Fusarium oxysporum* (héo do tắc bó mạch) 128
Bảng 10.8 Đặc điểm của bệnh héo Fusarium 130
Bảng 10.9 Các đặc điểm để phân biệt *Fusarium oxysporum* và *Fusarium solani* 134
Bảng 10.10 Đặc điểm của *Verticillium albo-atrum* và *V. dahliae* 136
Bảng 11.1 Các bệnh phổ biến trên ớt 152
Bảng 11.2 Các bệnh phổ biến ở cà chua 154
Bảng 11.3 Các bệnh phổ biến trên lạc 156
Bảng 11.4 Các bệnh nấm phổ biến trên hành 158
Bảng 11.5 Các bệnh nấm phổ biến trên ngô 160
Bảng 12.1 Các nấm có độc tính chủ yếu ở Việt Nam 164
Bảng A3.1 Các chất kháng sinh thông dụng 188

Bảng A3.2 Thời gian cần cho việc khử trùng nóng ẩm và nóng khô ở các mức nhiệt độ khác nhau 197

Bảng A3.3 Thời gian khuyến cáo để khử trùng các lượng dung dịch khác nhau 199

Hình

Hình 2.1 Những nhân tố chủ yếu trong việc duy trì sức khỏe thực vật 25

Hình 2.2 Hư hại do sâu gây ra: (a) sùng trắng (hình trong) làm hư hại rễ ngô, (b) cây ngô bị héo do sùng trắng, (c) rệp gây hại, (d) lá có màu đồng thau điển hình do nhện chích hút ở mặt dưới của lá (hình trong) 27

Hình 2.3 Thiếu dinh dưỡng gây ra các triệu chứng giống bệnh: (a) thối cuống quả do thiếu canxi ở cây cà chua, (b) thiếu kali ở câyhọ thập tự, (c) thiếu boron ở cây súp lơ xanh 28

Hình 2.4 Rễ cây mọc ngang do chạm phải lớp đất cứng trong cấu trúc đất (tầng đế cày) 29

Hình 2.5 Cỏ cứt lợn *(Ageratum conyzoides):* (a) loại hoa màu tím, (b) loại hoa màu trắng, (c) rễ cỏ *Ageratum conyzoides* bị tuyến trùng *Meloidigyne* gây hại gây ra các nốt sưng, (d) cỏ *Ageratum conyzoides* héo rũ do vi khuẩn *Ralstonia solanacearum*, (e) triệu chứng vàng lá hoa lá trên cỏ *Ageratum conyzoides* giống như ở cúc tây (hình trong: triệu chứng vàng lá hoa lá cúc tây *Callistephus chinensis*) 31

Hình 3.1 Sơ đồ quy trình chẩn đoán 33

Hình 3.2 Các bước phân lập, làm thuần và lây bệnh nhân tạo nấm gây thối nõn dứa, *Phytophthora nicotianae* 34

Hình 3.3 Thảo luận với nông gia về bệnh héo trên gừng 36

Hình 3.4 Điều tra bệnh héo gừng ở Quảng Nam vào tháng 1 năm 2007: (a) gừng với triệu chứng héo nhanh, (b) cây gừng bị vàng, dấu hiệu của héo chậm, (c) các ruộng gần nhau, một ruộng bị héo nhanh, một ruộng không có triệu chứng héo, (d) và (e) các mẫu cây được đào lên một cách cẩn thận bằng dao rựa, giữ cho hệ thống rễ còn nguyên, (f) túi mẫu với nhãn đánh số điểm lấy mẫu, tên nông dân và ngày lấy mẫu 37

Hình 3.5 Chuẩn bị và kiểm tra các mẫu cây bị bệnh héo gừng để chọn lọc mẫu cho phòng thí nghiệm 38

Hình 3.6 Quy trình phân lập các vi sinh vật có khả năng gây bệnh từ củ gừng 39

Hình 3.7 Phân lập *Fusarium oxysporum* từ miếng cấy gừng trên môi trường chọn lọc (aga peptone pentachloronitrobenzene) cho *Fusarium* 40

Hình 3.8 Thí nghiệm chỉ thị sinh học để phân lập *Ralstonia solanacearum* từ củ gừng bị bệnh: (a) ngọn cây chỉ thị ở công thức đối chứng (trái) ngọn cây chỉ thị héo trong nước chiết từ các miếng gừng (phải), (b) ngọn ớt bị héo có triệu chứng hóa nâu ở mạch dẫn, (c) phân lập *R. solanacearum* từ ngọn ớt, (d) và (e) lây bệnh nhân tạo trên mướp đắng với vi khuẩn đã được phân lập từ cây chỉ thị 41

Hình 4.1 Sự hình thành bào tử trên lá của nhiều nấm bệnh khác nhau . . . 46

Hình 4.2 Nấm bệnh và các tác nhân giống nấm gây bệnh trên lá: (a) phấn trắng trên bầu bí, (b) gỉ trắng trên cải bắp, (c) đốm lá Cercospora và gỉ sắt trên lạc, (d) sương mai trên cải bắp 47

Hình 4.3 Hình thành hạch nấm bởi (a) *Rhizoctonia solani*, (b) *Sclerotium rolfsii và* (c) *Sclerotinia sclerotiorum* 48

Hình 4.4 Những bệnh ở gốc, rễ và thân: (a) sưng rễ họ thập tự, (b) héo trên họ thập tự (khỏe [trái] và bệnh [phải]) gây ra do sưng rễ (*Plasmodiophora brassicae*), (c) héo Fusarium trên cây cúc tây (chú ý đến sự hình thành khối bào tử trên thân), (d) teo thắt do *Rhizoctonia* sp., (e) thối rễ ớt do *Phytophthora* gây héo trầm trọng, (g) thối rễ và quả lạc do *Pythium*, (h) quả thể của *Gibberella zeae* gây ra thối thân ngô . . . 50

Hình 5.1 Trao đổi với nông dân trên đồng ruộng 51

Hình 5.2 Dụng cụ cần thiết khi điều tra đồng ruộng 55

Hình 6.1 Kiểm tra các tản nấm dưới kính lúp soi nổi 62

Hình 6.2 Quan sát bào tử nấm dưới kính hiển vi 63

Hình 6.3 Các bộ phận của kính hiển vi 64

Hình 6.4 Kỹ thuật phân lập tác nhân gây bệnh từ các mô hóa gỗ: (a) cắt rời rễ phụ, (b) rửa mẫu, (c) cắt bỏ phần dưới thân ở chỗ tiếp giáp với mặt đất, (d) phun xịt mẫu với cồn 70%, (e) để cồn bay hơi, (f) cắt mô thân cây bệnh thành từng miếng cấy nhỏ 70

Hình 6.5 Bẫy *Phytophthora* từ đất bằng cánh hoa và lá. 71

Hình 6.6 Sơ đồ các nồng độ sử dụng trong phương pháp pha loãng dung dịch đất 72

Hình 6.7 Đĩa phân lập từ dung dịch đất pha loãng chứa *Fusarium spp.* trên môi trường thạch peptôn PCNB (lý tưởng là số tản nấm khoảng từ 10 đến 30) 73

Hình 6.8 Sơ đồ một đĩa phân lập từ rễ cho thấy (hình trong) nhiều loại nấm mọc ra từ cùng một đoạn rễ 75

Hình 6.9 Những nấm tạp thường thấy trên các đĩa cấy: (a) *Penicillium sp.* (gây tạp từ không khí), (b) *Cladosporium sp.* (trong mẫu cấy sạch), (c) *Trichoderma sp.* (mọc từ một mẩu rễ bị bệnh) 75

Hình 6.10 Các bước cấy đơn bào tử 77

Hình 6.11 Quy trình cấy đơn bào tử, thao tác chọn lựa một bào tử đúng cách 78

Hình 6.12 Cấy đỉnh sinh trưởng sợi nấm, ví dụ đầu của một sợi nấm *Rhizoctonia* sp. được lấy từ đĩa môi trường thạch nghiêng. 79

Hình 6.13 Tản nấm của một số nấm bệnh thông thường trên môi trường thạch đường khoai tây 80

Hình 8.1 Lây bệnh nhân tạo bằng phương pháp lây bệnh lên thân: (a) gây vết thương vào thân dưới của cây, (b) cấy nguồn bệnh vào vị trí vết thương, (c) bọc vị trí vết thương bằng ny lông, (d) sợi nấm phát triển trên mặt đất từ thân bị bệnh, (e) cây được lây bệnh (trái) và cây đối chứng (phải). 91

Hình 8.2 Các phương pháp lây bệnh nhân tạo bằng cách đưa vi sinh vật vào đất 92

Hình 8.3 Một bình tam giác chứa nguồn bệnh 93

Hình 8.4 Chuẩn bị giá thể hạt kê/vỏ trấu trong bình tam giác 94

Hình 8.5 Chuẩn bị giá thể hạt kê/vỏ trấu cho quá trình lây bệnh nhân tạo: (a) hạt kê và vỏ trấu đã được ngâm trong nước cất 24 giờ, (b) trộn đều các thành phần của giá thể, (c và d) đưa giá thể vào bình tam giác dùng một phễu tự chế, (e) bình tam giác được nút kín bằng bông gòn gói trong vải màn, (f) cổ bình được phủ bằng giấy nhôm sẵn sàng cho vào nồi hấp 94

Hình 9.1 Minh họa bằng sơ đồ các biện pháp phòng trừ thích hợp đối với các nhóm bệnh thông thường 99

Hình 9.2 Cuốc cỏ rãnh làm tăng khả năng thoát nước trong một vườn hồ tiêu bị bệnh thối rễ Phytophthora 100

Hình 9.3 Các biện pháp ngăn ngừa mang nguồn bệnh qua giày dép: bao bọc ngoài giày dép bằng nhựa (trái) và khử trùng giày sau khi kiểm tra một ruộng trồng bị bệnh có nguồn gốc từ đất (phải) 103

Hình 10.1 Chu kỳ bệnh *Sclerotinia sclerotiorum* 110

Hình 10.2 *Sclerotinia sclerotiorum* gây hại: (a) đậu cô ve leo, (b) xà lách, (c) cải bắp (thối ướt), (d) cải bắp, (e) quả thể đĩa từ hạch nấm ở tàn dư cây đậu tương; (f) quả thể đĩa cạnh cây đậu cô ve lùn; (g) đậu cô ve leo (hạch nấm hình thành trên quả đậu); (h) hạch nấm nảy mầm tạo ra quả thể đĩa 111

Hình 10.3 *Sclerotium rolfsii:* (a) trong thí nghiệm lây bệnh nhân tạo (chú ý các sợi nấm lan ra), (b) trên dưa hấu đã bị thối, (c) thối gốc với sự hình thành các hạch nấm hình cầu màu nâu 113

Hình 10.4 Các ví dụ về bệnh *Rhizoctonia*: (a) triệu chứng nhọn như đầu mác ở rễ bệnh, (b) bệnh khô vằn trên lúa do *Rhizoctonia*, (c) hạch nấm của *Rhizoctonia* trên cải bắp bị bệnh, (d) bệnh do *Rhizoctonia* trên vỏ ngô 114

Hình 10.5 Du động bào tử *Pythium* được giải phóng qua bọc giả (trái), và du động bào tử *Phytophthora* được giải phóng trực tiếp từ cành mang bọc bào tử (phải) 116

Hình 10.6 Sơ đồ minh họa quá trình sinh sản hữu tính ở *Pythium*, liên quan đến sự tiếp xúc giữa túi đực và túi noãn để tạo ra bào tử trứng 117

Hình 10.7 *Pythium sp*. (trái) và *Phytophthora sp.* (phải), cho thấy đặc tính mọc nhanh và tạo thành các sợi nấm khí sinh trên đĩa *Pythium* 118

Hình 10.8 Chu kỳ bệnh đã được đơn giản hoá của tác nhân gây bệnh thuộc lớp nấm trứng 120

Hình 10.9 (a) Thể trứng của *Pythium spinosum* với thùy thể đực bám vào, (b) bào tử trứng trưởng thành của *P. mamillatum*, (c) bọc bào tử *P. mamillatum* với ống tháo và bọc giả chứa các du động bào tử đang phát triển, (d) bọc bào tử của P. irregulare với các du động bào tử trưởng thành trong bọc giả có vách mỏng trước khi được giải phóng ra ngoài, (e) Các bọc bào tử hình ngón ở *P. myriotilum*, (f) cành mang bọc bào tử và bọc bào tử đặc trưng của *Phytophthora sp.* 121

Hình 10.10 Các bệnh do *Pythium* trên lạc: (a) thối rễ con và thối thân cây con do *Pythium* trong điều kiện rất ẩm ướt, (b) so sánh hai cây trưởng thành, cây khỏe (trái), cây còi cọc do thối rễ nặng (phải), (c) thối rễ cái và quả lạc trầm trọng do *Pythium*. . . . 123

Hình 10.11 Bệnh do *Phytophthora palmivora* ở sầu riêng: (a) cây vàng lá, (b) thối mục thân, (c) thối quả. Bệnh do *P. palmivora* ở cacao: (d) tàn lụi cây con, (e) quả bị đen. Thối rễ (héo nhanh) hồ tiêu do *P. capsici*: (f) rụng lá, (g) héo. Bệnh do *P. infestans:* (h) mốc sương khoai tây. 125

Hình 10.12 Bệnh do các loài *Fusarium* gây ra: (a) *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* gây héo đậu Hà Lan, (b) khối bào tử phân sinh *Fusarium oxysporum* f. sp. *zingiberi* trên củ gừng, (c) thân cây bị hóa nâu do *F. oxysporum*, (d) quả thể của *F. graminearum* trên thân ngô. 127

Hình 10.13 Héo *Fusarium* trên chuối do *F. oxysporum* f. sp. *cubense*: (a) các triệu chứng héo trầm trọng, (b) triệu chứng nứt thân, (c) hóa nâu mạch dẫn. Héo Fusarium trên cẩm chướng do *F. oxysporum* f. sp. *callistephi*: (d) héo trầm trọng gây chết cây, (e) thân cây héo với nhiều khối bào tử phân sinh màu trắng trên bề mặt. Héo Fusarium ở đậu Hà Lan do *F. oxysporum* f. sp. *pisi*: (f) các triệu chứng héo trên đồng ruộng (chú ý các đám cây chết), (g) hóa nâu mạch dẫn ở cành bị héo. 129

Hình 10.14 Mẫu cấy *Fusarium oxysporum* (trái) và *F. solani* (phải) nuôi cấy được bốn ngày, trong đĩa Petri 60mm trên môi trường thạch đường khoai tây 132

Hình 10.15 Phân biệt giữa *Fusarium oxysporum* (trái) và *F. solani* (phải): (a) và (b) bào tử lớn, (c) và (d) bào tử nhỏ và một số bào tử lớn, (e) và (f) bào tử nhỏ trong bọc giả trên tế bào sinh bào tử (lưu ý *F. oxysporum* có tế bào sinh bào tử ngắn và *F. solani* có tế bào sinh bào tử dài) 133

Hình 10.16 Bào tử hậu của *Fusarium solani* hình thành trên môi trường thạch lá cẩm chướng (CLA) (Bào tử hậu *F. oxysporum* trông tương tự) 134

Hình 10.17 *Verticillium dahliae*: (a) Mẫu nấm trên môi trường thạch đường khoai tây (nấm mọc chậm), (b) hạch nấm nhỏ trên thân cây bông già, (c) sợi nấm trong mạch xylem bị bệnh, (d) cây hồ trăn héo do *V. dahliae*, (e) và (f) lá cà tím héo do *V. dahliae* 135

Hình 10.18 Tuyến trùng: (a) ký sinh thực vật với kim chích, (b) không ký sinh thực vật, không có kim chích.. 137

Hình 10.19 Hệ thống rễ cây bị phá hủy do: (a) tuyến trùng nốt sưng, (b) tuyến trùng gây loét rễ, cả hai bệnh đều làm cây còi cọc và vàng lá 138

Hình 10.20 Các triệu chứng của tuyến trùng nốt sưng: (a) triệu chứng sưng rễ, (b) tuyến trùng cái ký sinh trong các nốt sưng 138

Hình 10.21 Sơ đồ minh họa quy trình tách tuyến trùng từ rễ hoặc đất 139

Hình 10.22 Bộ dụng cụ phễu Baerman để tách tuyến trùng 140

Hình 10.23 Bộ dụng cụ khay Whitehead để tách tuyến trùng 141

Hình 10.24 Bệnh do vi khuẩn gây ra: (a-c) mướp đắng bị héo do vi khuẩn, (d) cháy lá do vi khuẩn, (e) *Ralstonia solanacearum* gây héo nhanh trên gừng, (f) thối nhũn cải thảo do *Erwinia aroideae*, (g) *Pseudomonas syringae* trên lá bầu bí. 143

Hình 10.25 Phương pháp phân lập *Ralstonia solanacearum* từ thân bị bệnh 145

Hình 10.26 Sơ đồ minh họa đĩa cấy vi khuẩn, cho thấy thứ tự các vạch cấy và hơ lửa khử trùng que cấy giữa các bước 146

Hình 10.27 Đĩa cấy vi khuẩn phát triển sau 2 ngày ở nhiệt độ 25°C 146

Hình 10.28 Chà xát rễ hoặc thân rễ để chuẩn bị dịch vi khuẩn trước khi cấy 147

Hình 10.29 Các bệnh do vi rút: (a) vi rút héo đốm cà chua ở ớt, (b) vi rút biến vàng củ cải đường ở dưa chuột, (c) vi rút vàng lá xoăn lá ở cà chua, (d) vi rút khảm củ cải ở cây ăn lá họ cải bắp (phải), cây khỏe (trái), (e) vi rút ở dưa chuột, (f) quăn lá do vi rút ở mãn đình hồng (*Althaea rosea*). 149

Hình 11.1 Các bệnh trên ớt: (a) cây ớt khỏe (trái) và bị héo (phải) có thể do một số bệnh gây ra, (b) thân biến màu nâu, triệu chứng điển hình của bệnh héo xanh do vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* gây ra, (c) thối gốc mốc trắng do *Sclerotium rolfsii* gây ra, (d) thối rễ *Phytophthora* do nấm *Phytophthora capsici* gây ra, (e) ớt bị nhiễm vi rút héo đốm cà chua, (f) quả ớt bị bệnh thán thư do nấm *Colletotrichum* sp. gây ra. . . .153

Hình 11.2 Các bệnh ở cà chua: (a) triệu chứng lá quăn, vàng do vi rút gây ra trên những chồi mới mọc. (b) vết loét do vi khuẩn *Pseudomonas syringae* gây ra trên quả cà chua, (c) Sưng rễ tuyến trùng do *Meloidogyne* sp. gây ra, (d) đốm mốc lá do *Cladosporium fulvum*, (e) đốm vòng trên lá do *Alternaria solani*. 155

Hình 11.3 Các bệnh ở lạc: (a) gỉ sắt lạc do nấm *Puccinia arachidis* gây ra, (b) đốm lá Cercospora (*Cercospora arachidicola*) và gỉ sắt, (c) lạc bị thối rễ gây triệu chứng biến vàng và còi cọc, (d) thối rễ con và thối quả do *Pythium* sp., (e) vết bệnh trên lá mầm lạc với rất nhiều bào tử của nấm *Aspergillus niger*, (f) thối rễ Pythium ở cây con, (g) cây khỏe (trái) và cây bị thối rễ gây còi cọc (phải). 157

Hình 11.4 Các bệnh ở hành: (a) đốm lá Stemphylium, (b) sương mai do nấm *Peronospora* sp., (c) Các triệu chứng thối rễ màu hồng do nấm *Phoma terrestris* 159

Hình 11.5 Các bệnh ở ngô: (a) ung thư ngô do *Ustilago maydis*, (b) khô vằn do *Rhizoctonia solani*, (c) sợi nấm trắng mọc trên bắp ngô bị nhiễm bệnh do *Fusarium verticillioides*. 161

Hình 12.1 Hạt ngô nhiễm *Fusarium graminearum* và sơ đồ minh họa quá trình độc tố nấm từ sợi nấm thấm vào mô hạt. 163

Hình 12.2 *Aspergillus flavus* hình thành bào tử trên hạt lạc bị nhiễm bệnh trên môi trường phân lập 163

Hình 12.3 *Aspergillus flavus*, ba tản nấm trên môi trường Czapek yeast autolysate agar (trái), bào tử vô tính mọc đầy trên đầu cành bào tử phân sinh (giữa), bào tử vô tính (phải) 165

Hình 12.4 *Aspergillus niger*, ba tản nấm trên môi trường Czapek yeast autolysate agar (trái), bào tử vô tính mọc đầy trên đầu cành bào tử phân sinh dài (giữa), bào tử vô tính (phải) 166

Hình 12.5 *Aspergillus ochraceus*, ba tản nấm trên môi trường Czapek yeast autolysate agar (trái), bào tử vô tính mọc đầy trên đầu cành bào tử phân sinh (giữa), bào tử vô tính (phải) 168

Hình 12.6 Thối Fusarium ở ngô do *Fusarium verticillioides* (trái), và mẫu nuôi cấy thuần trên môi trường PDA (phải) 169

Hình 12.7 Thối Fusarium ở ngô do *F. graminearum* (trái), và mẫu nuôi cấy thuần trên môi trường PDA (phải) 170

Hình 13.1 Sắp xếp thiết bị trong một phòng thí nghiệm chẩn đoán (phòng thí nghiệm tại Chi cục BVTV Nghệ An): (a) và (b) hai vị trí trong phòng sạch, (c) và (d) hai vị trí trong phòng chuẩn bị. 172

Hình 13.2 Sơ đồ phòng thí nghiệm chẩn đoán, biểu thị sơ đồ bố trí thiết bị và bàn. 173

Hình 13.3 Dụng cụ cần thiết cho việc phân lập, cấy truyền, làm thuần và giám định các tác nhân nấm và vi khuẩn gây bệnh 176

Hình 13.4 Sơ đồ minh họa thiết kế một nhà lưới thích hợp cho việc lây bệnh nhân tạo và các công việc thí nghiệm với tác nhân gây bệnh thực vật. 178

Hình 13.5 Nhà lưới dùng cho nghiên cứu bệnh cây tại Chi cục BVTV Quảng Nam: (a) hình ảnh tổng quát của nhà lưới với lưới chống côn trùng, (b) lưới che nắng và mái tôn nhựa polycarbonate phẳng với các bộ quạt cầu thông gió 178

Hình 13.6 Chuẩn bị phân bón thương phẩm để dùng trong nhà lưới 181

Hình A1.1 Hướng dẫn từng bước làm que cấy dẹp 184

Lời tựa

Cuốn cẩm nang này được biên soạn nhằm giới thiệu những kỹ năng cơ bản trong việc chẩn đoán các bệnh nấm hại cây trồng tại Việt Nam. Nội dung của sách chủ yếu dựa vào kinh nghiệm đạt được qua hai dự án của Trung tâm Nghiên cứu Nông nghiệp Quốc tế Australia (ACIAR) ở miền Bắc và miền Trung Việt Nam.1 Sách cũng tham khảo các cẩm nang khác đã hoặc sắp được xuất bản.

Bốn phòng thí nghiệm chẩn đoán với chi phí thấp đã được xây dựng tại các tỉnh miền Trung Việt Nam trong dự án ACIAR hiện tại.2 Những phòng thí nghiệm này được đặt tại các Chi cục Bảo vệ thực vật (PPSD) tại các tỉnh Quảng Nam, Thừa Thiên Huế, Nghệ An, và tại trường Đại học Nông Lâm Huế. Họ được tài trợ các trang thiết bị cần thiết để phân lập và giám định các chi nấm và vi khuẩn gây bệnh phổ biến tồn tại trong đất và một số nấm và vi khuẩn gây bệnh phổ biến trên lá. Các phòng thí nghiệm này cũng có cũng có cơ sở vật chất để thực hiện quá trình lây bệnh nhân tạo đối với các bệnh mới được tìm ra ở Việt Nam. Cán bộ kỹ thuật các phòng thí nghiệm này đã được tập huấn kỹ năng cơ bản trong phòng thí nghiệm thông qua các lớp tập huấn tại trường Đại học Nông nghiệp I Hà Nội và tại Chi cục Bảo vệ thực vật Quảng Nam, nơi có một phòng thí nghiệm giảng dạy đã được xây dựng. Các cán bộ này cũng đã thường xuyên tham gia việc điều tra bệnh hại định kỳ trên đồng ruộng và đã chẩn đoán các mẫu bệnh cây do nông dân thu thập.

Mỗi phòng thí nghiệm có một thư viện nhỏ và một máy vi tính để truy cập thông tin từ mạng internet, một nguồn thông tin thiết yếu cho những người làm công tác chẩn đoán bệnh cây.

---

1 CS2/1994/965 Chẩn đoán và phòng trừ bệnh hại cây trồng tại miền Bắc Việt Nam (1998–2001) và CP/2002/115 Chẩn đoán, khuyến nông và phòng trừ bệnh hại cây trồng tại các tỉnh miền Trung Việt Nam (2005–2008).

2 CP/2002/115 Chẩn đoán, khuyến nông và phòng trừ bệnh hại cây trồng tại các tỉnh miền Trung Việt Nam (2005-2008)

Mỗi tỉnh đã được xây dựng một nhà lưới nhỏ phục vụ cho lây bệnh nhân tạo và đánh giá hiệu quả của thuốc trừ nấm và việc thay đổi thành phần giá thể đất trong việc hạn chế bệnh hại. Việc thiết kế và điều hành các nhà lưới cho công việc thí nghiệm và sản xuất cây con sạch bệnh là chủ đề cho các hoạt động tập huấn ở Việt Nam và Australia. Tiến sĩ Ngô Vĩnh Viễn, Viện trưởng Viện Bảo vệ thực vật, đã đề nghị rằng tất cả cán bộ dự án nên được tập huấn và phát triển chuyên môn trong các lĩnh vực này. Nhóm dự án ACIAR hiện tại đã tham quan các vườn ươm cây tại Đà Lạt, một phần trong chương trình tập huấn.

Sự phối hợp giảng dạy tiếng Anh với tập huấn về bệnh cây là một khía cạnh quan trọng trong việc phát triển năng lực của cán bộ trong dự án hiện tại. Nhiều đồng nghiệp của chúng tôi trong dự án này giờ đây có thể tìm kiếm tư vấn qua thư điện tử (với sự trợ giúp của các hình ảnh kỹ thuật số) về các vấn đề nảy sinh trên các bệnh mới.

Các đồng nghiệp từ Việt Nam và Australia đã đóng góp các hình ảnh và đoạn viết cho cuốn cẩm nang này - những đóng góp này đã được đề cập đến đối với từng cá nhân.

Công việc chẩn đoán bệnh cây là nền tảng cơ bản cho việc thiết kế các thí nghiệm phòng trừ bệnh hại, và xây dựng các biện pháp phòng trừ cho mục đích khuyến nông. Việc chẩn đoán chính xác một số lượng lớn bệnh hại và giám định các tác nhân gây bệnh tới loài dựa vào kinh nghiệm có được qua nhiều năm. Chúng tôi hy vọng cuốn sách này sẽ trợ giúp các đồng nghiệp Việt Nam mới vào nghề trong những nghiên cứu khởi đầu của họ về chẩn đoán bệnh cây tại phòng thí nghiệm và trên đồng ruộng.

Lời cảm ơn

Nhóm tác giả thành thực cảm ơn Tiến sĩ T.K. Lim trong việc gợi ý sự ra đời của cuốn cẩm nang chẩn đoán bệnh cây ở Việt Nam và Trung tâm Nghiên cứu Nông nghiệp Quốc tế Australia đã trợ giúp tài chính cho việc hình thành cuốn sách. Tác giả chính cũng cảm ơn sự hỗ trợ và khuyến khích vô giá của ACIAR trong những hoạt động chẩn đoán, nghiên cứu, nâng cao năng lực tại Việt Nam hơn 12 năm qua.

Nhóm tác giả cũng chân thành cảm ơn các hiệu trưởng qua nhiều nhiệm kỳ các đồng nghiệp của chúng tôi trong ngành bệnh cây và các cán bộ Phòng Hợp tác Quốc tế, Đại học Nông nghiệp I Hà Nội vì sự ủng hộ của họ từ năm 1992. Nhóm tác giả cũng bày tỏ lòng biết ơn tới cán bộ Viện Bảo vệ Thực vật vì sự chỉ dẫn và hỗ trợ, đặc biệt là Tiến sĩ Ngô Vĩnh Viễn, Viện trưởng.

Chúng tôi cũng cảm ơn sự giúp đỡ của các cán bộ Trường Đại học Sydney, Vườn Thực vật Hoàng gia Sydney và Domain Trust, và Bộ Nông nghiệp Bang New South Wales trong các hoạt động nghiên cứu và giảng dạy tại Việt Nam.

Chúng tôi cũng cảm ơn sự quảng đại, lòng hiếu khách và hỗ trợ của các đồng nghiệp tại các Chi cục Bảo vệ Thực vật ở Quảng Nam, Thừa Thiên Huế, Nghệ An, Quảng Trị và Lâm Đồng, trường Đại học Nông Lâm Huế, Trung tâm Bảo vệ Thực vật Vùng 4, và các nông dân hợp tác tại các tỉnh trên và một số tỉnh khác. Dự án hiện tại của chúng tôi đặc biệt là sự đền đáp lại công lao đóng góp của tất cả những người liên quan.

Những đồng nghiệp sau đây ở Việt Nam và Australia đã đóng góp cho sách chỉ dẫn này qua các hình ảnh về bệnh cây, các nhận xét liên quan và tư vấn về mặt biên tập. Tuy nhiên, nhóm tác giả là những người chịu trách nhiệm về nội dung và hình ảnh minh họa.

Australia — Barry Blaney, Julian Burgess, Eric Cother, Norma Cother, Nerida Donovan, Phillip Davies, Mark Fegan, Col Fuller, David Guest, Ailsa Hocking, Greg Johnson, Edward Liew, Suneetha Medis, Dorothy Noble, Tony Pattison, Brett Summerell và Ameera Yousiph.

Việt Nam— Đặng Lưu Hoa, Đậu Thị Vinh, Hồ Đắc Thọ, Phạm Thị Hòa, Hoàng Thị Minh Hương, Huỳnh Thị Minh Loan, Lương Minh Tâm, Ngô Vĩnh Viễn, Nguyễn Kim Vân, Nguyễn Thị Nguyệt, Trần Nguyễn Hà, Nguyễn Vĩnh Trường, Phạm Thanh Long, Trần Kim Loang, Trần Thị Nga và Trần Út.

1 Giới thiệu

Bệnh hại cây trồng gây ra những thiệt hại nghiêm trọng cho thu nhập của nhiều nông dân Việt Nam qua việc làm giảm năng suất và chất lượng nông sản. Chi phí cho các biện pháp phòng trừ như thuốc trừ nấm càng làm giảm hơn nữa thu nhập của người dân.

Một số bệnh do nấm gây ra có thể sản sinh độc tố nấm, như aflatoxin, nhiễm vào các sản phẩm thức ăn (như ngô và lạc). Sự lẫn tạp độc tố nấm có thể gây ảnh hưởng xấu đến sức khỏe con người và động vật.

Đôi khi bệnh bùng phát thành dịch tàn phá các cây trồng chính. Những dịch bệnh như vậy có thể tác động nghiêm trọng đến kinh tế và xã hội của toàn thể một vùng hoặc quốc gia. Chẳng hạn như trong năm 2006, dịch vàng lùn và lùn xoắn lá đã gây thiệt hại lớn trên lúa ở vùng đồng bằng sông Cửu Long, ảnh hưởng đến một triệu hecta lúa thuộc 22 tỉnh thành. Bệnh dịch này trực tiếp ảnh hưởng đến hàng triệu gia đình nông dân.

Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn Việt Nam từ lâu đã nhận ra tầm quan trọng của bệnh cây trong nông nghiệp. Bộ có một mạng lưới rộng lớn các trung tâm nghiên cứu và một mạng lưới cán bộ bảo vệ thực vật tại các cấp tỉnh và huyện trên khắp Việt Nam. Những thành viên trong mạng lưới này hỗ trợ công tác chẩn đoán bệnh cây và cung cấp thông tin về các biện pháp phòng trừ bệnh. Nhiệm vụ này là một thử thách lớn, do sự phong phú của cây trồng, bệnh hại, và sự đa dạng của các vùng khí hậu ở Việt Nam.

Việc phòng trừ bệnh hại thành công phụ thuộc vào việc xác định chính xác bệnh và tác nhân gây bệnh. Một số bệnh thông thường có thể được chẩn đoán chính xác trên đồng ruộng thông qua các triệu chứng điển hình. Chẳng hạn như bệnh ung thư ngô, thối thân do *Sclerotinia*, tuyến trùng nốt sưng, sưng rễ và gỉ sắt lạc đều có những triệu chứng điển hình và hiển nhiên khi nhìn bằng mắt thường. Tuy nhiên, có nhiều bệnh có các triệu chứng không điển hình tương tự nhau (như héo rũ, còi cọc, vàng lá). Một số bệnh này có thể được chẩn đoán một cách chính xác tại phòng thí nghiệm khi quan sát dưới kính hiển vi. Nhiều nấm bệnh và tuyến trùng ký sinh có thể được giám định bằng cách này.

Tuy nhiên, một số nấm và vi khuẩn gây bệnh chỉ có thể được xác định bằng cách phân lập trên môi trường nhân tạo. Một khi đã được phân lập, các mẫu vi sinh vật sạch có thể được giám định bằng kính hiển vi và, nếu cần, có thể khẳng định lại kết quả bằng kỹ thuật phân tử hoặc các phương pháp khác tốn kém hơn. Hầu hết các nấm bệnh gây thối rễ và thân cây chỉ có thể chẩn đoán bằng cách phân lập trên môi trường nhân tạo. Hầu hết các bệnh virút chỉ có thể được xác định chính xác trong phòng thí nghiệm virút. Các bộ kit chẩn đoán sẵn có hiện nay có thể chẩn đoán nhanh và chính xác một số bệnh do vi rút và vi khuẩn ngay trên đồng ruộng; tuy nhiên, những bộ kit này có giá tương đối đắt.

Cuốn cẩm nang này được biên soạn nhằm trợ giúp trong việc xây dựng và vận hành các phòng thí nghiệm nhỏ để chẩn đoán các bệnh nấm thông thường ở cấp tỉnh tại Việt Nam. Cuốn sách đặc biệt quan tâm, đề cập đến các bệnh nấm gây thối thân và rễ, gây thiệt hại đáng kể cho nhiều nông dân Việt Nam hàng năm. Nhiều bệnh trong số này vẫn chưa được giám định chính xác.

Trong cuốn sách này, các thuật ngữ về nấm được dùng với nghĩa truyền thống như vẫn thường dùng ở Việt Nam hiện nay. Vì vậy những thuật ngữ này được dùng để đề cập đến nhóm nấm thực cũng như các loài dạng sợi giống nấm trong lớp nấm trứng, và nấm mốc nhờn nội ký sinh. Tuy nhiên, tầm quan trọng trong việc hiểu rõ những tiếp cận mới về phân loại nấm hiện đại đã được nhấn mạnh trong cuốn sách. Một trong những hệ thống phân loại hiện đại các sinh vật này cũng được khái quát lại trong cuốn sách.

Các bệnh nấm là đối tượng hữu ích cho việc tập huấn về chẩn đoán. Trung tâm Nghiên cứu Nông nghiệp Quốc tế Australia (ACIAR) đã hỗ trợ việc xây dựng bốn phòng thí nghiệm chẩn đoán ở cấp tỉnh, bao gồm việc cả việc tập huấn cho cán bộ về kỹ năng trong phòng thí nghiệm và ngoài đồng ruộng. Đã có tiến triển đáng khích lệ, mặc dù phải cần nhiều năm kinh nghiệm và thực hành để quen với việc chẩn đoán các bệnh do nhiều tác nhân gây ra - nấm, vi khuẩn, virút, phytoplasma và tuyến trùng.

Cán bộ phòng thí nghiệm chẩn đoán phải ghi chép lại tất cả các thông tin liên quan đến việc chẩn đoán trong một cuốn sổ có mã số lưu trữ và tất cả các mẫu bệnh đều phải được ghi chép lại. Thông tin về sự xuất hiện bệnh có thể được nhập vào cơ sở dữ liệu bệnh hại cây trồng quốc gia, đây là một phần quan trọng trong các tiến trình an ninh sinh học hỗ trợ cho việc xuất khẩu sản phẩm nông nghiệp. Giờ đây khi Việt Nam đã gia nhập Tổ chức Thương mại Thế giới thì vai trò của cơ sở dữ liệu quốc gia lại càng trở nên quan trọng. Một cơ sở dữ liệu quốc gia về bệnh cây và một mạng lưới các phòng thí nghiệm chẩn đoán sẽ giúp Việt Nam đáp ứng được những thử thách trong việc thiết lập và duy trì an ninh sinh học. Một cách lý tưởng, các phòng thí nghiệm cần phải duy trì một bộ sưu tập các mẫu vi sinh vật hại và tiêu bản bệnh (xem Shivas and Beasley 2005).

Bệnh chỉ là một trong những yếu tố tác động đến sức khỏe thực vật và do đó tác động đến năng suất cây trồng. Điều quan trọng là những người làm công tác chẩn đoán bệnh cây phải nắm được tất cả các yếu tố ảnh hưởng đến sức khỏe cây trồng và có tác động qua lại với bệnh - sâu hại, cỏ dại, dùng thuốc trừ sâu, tính chất đất, khí hậu địa phương và các yếu tố môi sinh khác.

Sự cộng tác chặt chẽ giữa nông dân và cán bộ bảo vệ thực vật sẽ giúp cho việc chẩn đoán và phòng trừ bệnh thành công. Nông dân có thể rất giỏi quan sát và cung cấp thông tin quan trọng để trợ giúp cho việc chẩn đoán từ những quan sát và kinh nghiệm của chính họ.

Cuốn cẩm nang này được sắp xếp thành các phần sau:

- tổng quát về sức khỏe thực vật và các yếu tố ảnh hưởng
- quy trình chẩn đoán tác nhân gây bệnh trong phòng thí nghiệm và ngoài đồng ruộng
- các triệu chứng bệnh cây
- quy trình và thiết bị làm việc trên đồng ruộng
- quy trình và thiết bị làm việc trong phòng thí nghiệm
- giới thiệu sơ lược về phân loại nấm
- các phương pháp lây bệnh nhân tạo
- quản lý bệnh hại tổng hợp
- các bệnh do nấm có nguồn gốc từ đất
- các bệnh thường gặp trên một số cây trồng có ý nghĩa kinh tế
- ảnh hưởng sức khỏe từ nấm gây bệnh
- thiết kế, xây dựng và vận hành các phòng thí nghiệm và nhà lưới dùng cho chẩn đoán
- phụ lục về cách làm que cấy dẹp, sức khỏe an toàn trong công việc, cũng như các công thức nấu môi trường, các phương pháp khử trùng, và các phương pháp lưu giữ mẫu nấm
- Gợi ý một thư viện tham khảo cho các phòng thí nghiệm chẩn đoán.

1.1 Tài liệu tham khảo

Shivas R. and Beasley D. 2005. Management of plant pathogen collections. Australian Government Department of Agriculture, Fisheries and Forestry. At: <http://www.daff.gov.au/planthealth>.

2 Tổng quan về sức khỏe thực vật

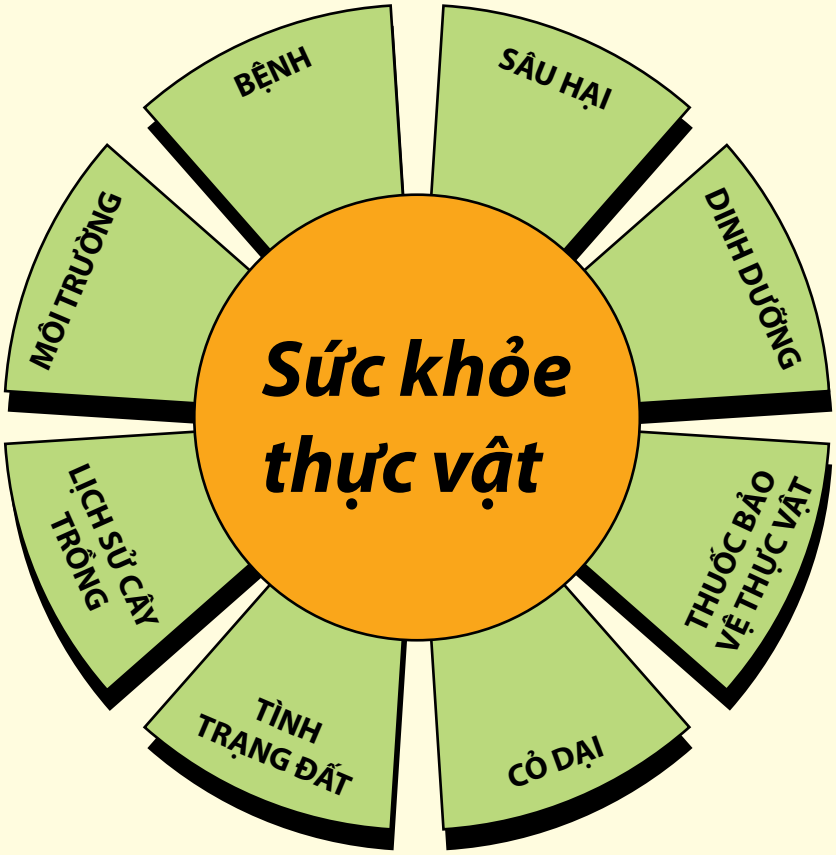
Sức khỏe thực vật là một nhân tố quyết định đối với năng suất cây trồng và do vậy cũng là nhân tố quyết định tới thu nhập của nông dân. Vì vậy, vấn đề quản lý sức khỏe cây trồng là vô cùng quan trọng để tối đa hóa lợi nhuận.

Cải thiện SỨC KHỎE THỰC VẬT → tăng NĂNG SUẤT → tăng THU NHẬP CỦA NGƯỜI DÂN

Bệnh chỉ là một trong những nhân tố ảnh hưởng đến sức khỏe cây trồng. Các nhân tố khác bao gồm sâu hại, cỏ dại, dinh dưỡng, thuốc bảo vệ thực vật, tình trạng đất và môi sinh (Hình 2.1). Tất cả các nhân tố này phải được xem xét đến trong quá trình chẩn đoán bởi vì mỗi nhân tố có thể tác động đến cây và gây ra các triệu chứng tương tự như các triệu chứng bệnh. Mỗi nhân tố cũng có thể có tiềm năng ảnh hưởng đến sự phát triển của bệnh trong cây.

Các nhà nghiên cứu bệnh cây làm công tác chẩn đoán cần phải hiểu rõ về tất cả các nhân tố tác động đến sức khỏe và bệnh của cây. Trên đồng ruộng, cán bộ bệnh cây cần phải ghi chép lại thông tin về tất cả các yếu tố liên quan (xem phiếu điều tra đồng ruộng ở Phần 5), và thảo luận lịch sử ruộng và việc quản lý cây trồng với nông dân.

Việt Nam có phạm vi rộng lớn các vùng khí hậu nông nghiệp khác nhau. Chẳng hạn như các tỉnh miền trung và bắc có mùa đông từ mát tới lạnh thích hợp cho các tác nhân gây bệnh có nguồn gốc ôn đới. Nhiệt độ thấp hạn chế sự phát triển của một số cây trồng khiến cho chúng dễ bị các bệnh thường gặp ở cây con và một số bệnh khác. Hơn nữa, chu kỳ khí hậu hàng năm bao gồm những giai đoạn rất ẩm ướt và những giai đoạn quá khô. Khí hậu như vậy có thể gây stress cho cây trồng và tạo điều kiện thuận lợi cho một số bệnh, nhất là bệnh trên rễ và thân cây gây ra bởi các tác nhân tồn tại trong đất. Thực tế thì sự ngập nước và thoát nước kém là những yếu tố chính tạo điều kiện cho sự gây hại của những bệnh này ở Việt



Hình 2.1 Những nhân tố chủ yếu trong việc duy trì sức khỏe thực vật

Nam. Vì vậy, lên luống cao và thoát nước tốt là các biện pháp canh tác then chốt trong việc quản lý bệnh hại tổng hợp. Một người làm công tác chẩn đoán phải hiểu rõ các ảnh hưởng này.

2.1 Cỏ dại

Nhiều sâu hại và tác nhân gây bệnh tồn tại trên ký chủ phụ là cỏ dại khi không có mặt cây trồng là ký chủ chính. Vì vậy, phòng trừ cỏ dại một cách hữu hiệu là một biện pháp phòng trừ quan trọng và cũng là một phần không thể thiếu trong quản lý bệnh hại tổng hợp (integrated disease management - IDM). Hơn nữa, cỏ dại mọc chung với cây trồng sẽ cạnh tranh nước, dinh dưỡng và ánh sáng, vì vậy sẽ gây stress cho cây trồng và tăng tác hại của bệnh.

2.2 Sâu hại

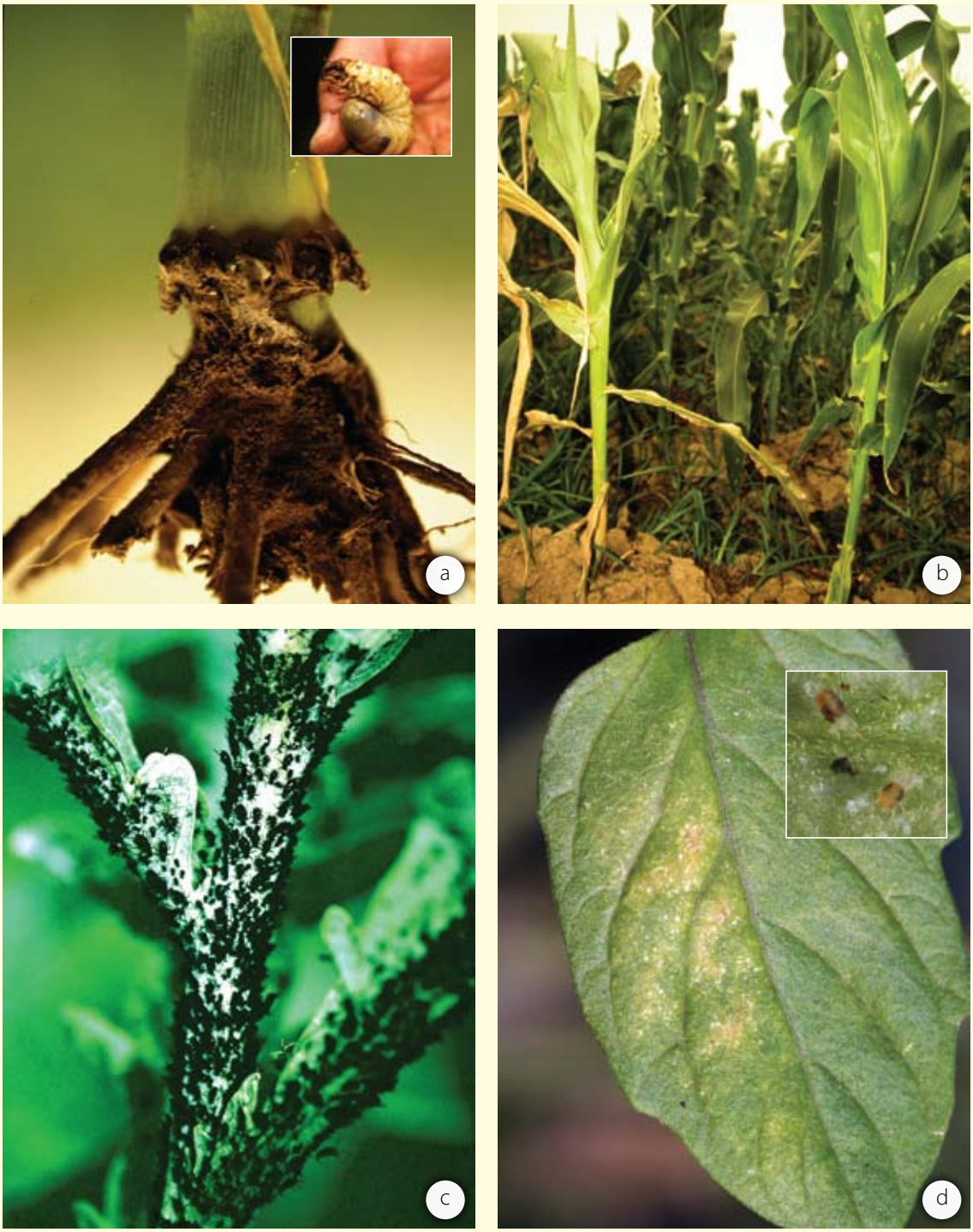
Trong quá trình tìm kiếm và lấy thức ăn sâu hại có thể gây hại đến cây tương tự như các triệu chứng bệnh (Hình 2.2). Chẳng hạn như rệp, bọ nhảy trên lá, bọ trĩ, nhện và ruồi trắng có thể gây tổn thương cho lá cây tương tự như các triệu chứng của một số bệnh trên lá. Những sâu hại này cũng có thể đóng vai trò như vectơ truyền virút và vi khuẩn. Sâu đục thân, sùng ăn rễ cây làm ảnh hưởng đến quá trình hút nước của cây và có thể gây héo tương tự như triệu chứng héo do các bệnh thối rễ và tắc bó mạch gây ra.

2.3 Thuốc bảo vệ thực vật

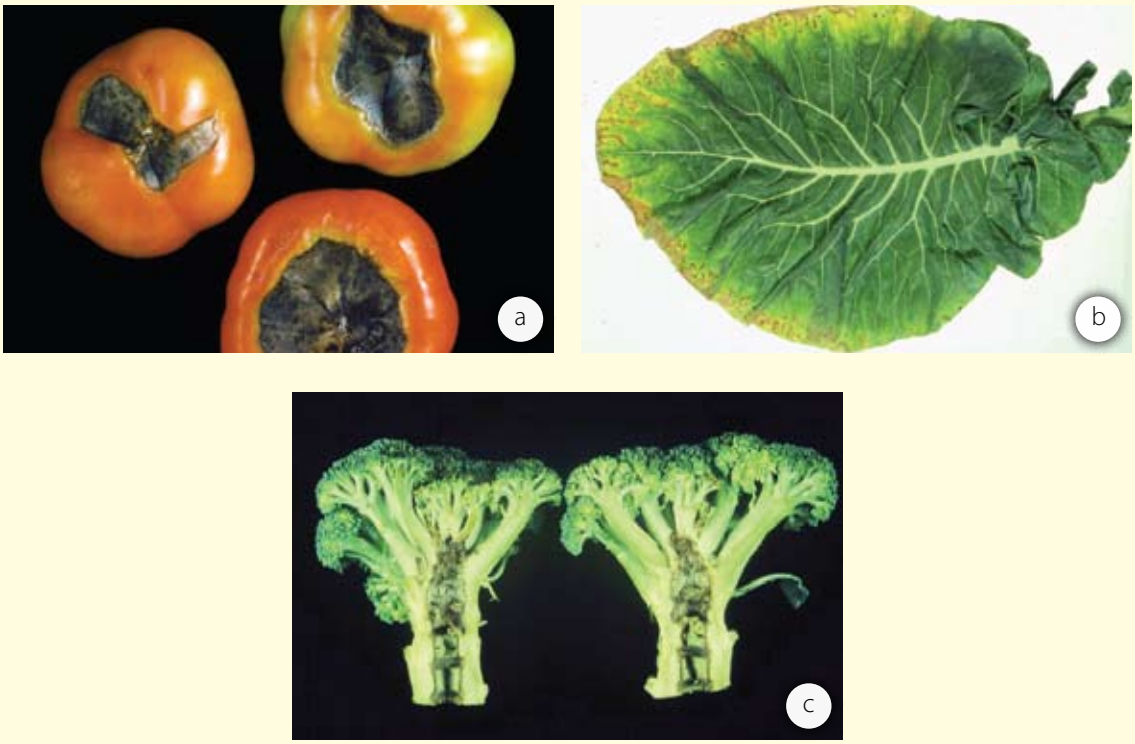
Việc sử dụng thuốc bảo vệ thực vật có thể khiến cho lá bị hư hại, gây ra các triệu chứng như cháy lá hoặc đốm lá. Những triệu chứng này có thể bị nhầm lẫn với những triệu chứng cháy lá và đốm lá do nhiều tác nhân gây bệnh là nấm và vi khuẩn gây ra. Thuốc trừ cỏ có thể gây stress cho cây, làm chúng dễ mẫn cảm hơn với tác nhân gây bệnh.

2.4 Dinh dưỡng

Dinh dưỡng không đầy đủ thường làm cho cây còi cọc và rễ tăng trưởng kém (Hình 2.3). Những triệu chứng này cũng có thể có nguyên nhân từ các tác nhân gây bệnh thối rễ. Các dấu hiệu khác của việc thiếu khoáng chất và có độc tố cũng có thể tương tự như những triệu chứng do một số bệnh gây ra. Chẳng hạn như thiếu đạm gây ra vàng lá, đặc biệt là các lá ở phía dưới. Vàng lá cũng là triệu chứng của bệnh ở phần rễ, do phá hủy quá trình vận chuyển đạm lên cây. Thiếu chất khoáng hoặc có độc tố có thể làm cho cây dễ mẫn cảm với một số bệnh hại.



Hình 2.2 Hư hại do sâu gây ra: (a) sùng trắng (hình trong) làm hư hại rễ ngô, (b) cây ngô bị héo do sùng trắng, (c) rệp gây hại, (d) lá có màu đồng thau điển hình do nhện chích hút ở mặt dưới của lá (hình trong)



Hình 2.3 Thiếu dinh dưỡng gây ra các triệu chứng giống bệnh: (a) thối cuống quả do thiếu canxi ở cây cà chua, (b) thiếu kali ở cây họ thập tự, (c) thiếu boron ở cây súp lơ xanh

2.5 Tình trạng đất

Sự ngập nước (thoát nước kém), cấu trúc đất nghèo nàn, đất có tầng sét cứng và 'tầng đế cày' (lớp đất cứng trong cấu trúc đất) có thể cản trở sự phát triển của rễ. Rễ bị còi cọc sẽ làm giảm lượng nước và dinh dưỡng lên cây, gây stress cho cây. Rễ còi cọc cũng có thể gây héo và vàng lá, tương tự như các triệu chứng của nhiều loại bệnh cây. Tầng đế cày có thể làm cho rễ mọc ngang (Hình 2.4), làm giảm chức năng và sự phát triển của rễ; gây stress cho cây, tạo điều kiện thuận lợi cho sự phát triển của một số bệnh hại.

Hình 2.4 Rễ cây mọc ngang do chạm phải lớp đất cứng trong cấu trúc đất (tầng đế cày)

2.6 Môi trường

Những điều kiện khí hậu khác nhau có thể gây hư hại và gây stress cho cây, và vì vậy có hại cho sức khỏe của cây. Những điều kiện này, bao gồm nhiệt độ quá thấp hoặc quá cao, ẩm ướt và mưa, cùng với mưa đá, lũ lụt, hạn hán và bão tố dẫn đến việc tăng tỷ lệ và mức độ gây hại của bệnh. Nhiệt độ cao, độ ẩm thấp và hạn hán có thể làm cây héo trầm trọng và chết. Điều kiện gió kết hợp với mưa tạo cơ hội cho sự xâm nhiễm và lan truyền của nhiều loại nấm và vi khuẩn gây bệnh trên lá. Đất ẩm ướt là điều kiện thuận lợi cho các bệnh thối rễ do *Phytophthora* và *Pythium*. Cây bị stress do hạn hán có thể là điều kiện thuận lợi cho sự xâm nhập của các bệnh trên rễ, và thối thân. Sự có mặt của bệnh thối rễ trong điều kiện đất khô có thể gây chết cây.

Bão tố hoặc gió lớn làm lắc lư cây có thể làm hư hại đến hệ thống rễ của cây. Hư hại như vậy có thể tạo điều kiện cho sự xâm nhập của các tác nhân gây thối rễ dẫn đến hiện tượng cây suy thoái dần và chết. Ví dụ như, bão tố và gió lớn là một nguyên nhân đáng ngờ trong việc gây tàn lụi cây cà phê và cây vải ở Việt Nam.

2.7 Lịch sử cây trồng

Hiểu biết về lịch sử cây trồng có thể giúp chẩn đoán bệnh. Chẳng hạn như, thông tin về nguồn gốc của hạt và hạt có được xử lý thuốc trừ nấm hay không có thể giúp suy luận xem bệnh hạt giống có phải là nguyên nhân ảnh hưởng đến cây trồng không. Như đã thảo luận ở trên, việc tìm hiểu diễn biến thời tiết trước khi dịch bệnh bùng phát là vô cùng quan trọng. Điều kiện ẩm ướt và lạnh có lợi cho nhiều tác nhân gây bệnh thối rễ nhưng cây có thể tồn tại mặc dù có tổn thương rễ bởi vì trong điều kiện này cây thoát nước chậm. Tuy nhiên, nếu thời tiết trở nên nóng bức và mức độ thoát nước nhanh, cây bị bệnh có thể héo rất nhanh và chết.

Sự xuất hiện của vectơ môi giới truyền virút trên một cây trồng trước đó có thể chỉ ra rằng virút do vectơ đem đến đã xâm nhiễm vào cây trồng và gây ra các triệu chứng như đã quan sát được.

Hiểu biết về các cây trồng trước và bệnh của chúng cũng có thể là một gợi ý trong việc xác định bệnh tiềm tàng trên cây trồng hiện tại. Chẳng hạn như, một số công thức luân canh sẽ gia tăng mức độ hại của một số bệnh do tác nhân gây bệnh có nguồn gốc từ đất. Ví dụ, luân canh liên tục cây trồng trong họ Solanaceae có thể làm tăng bệnh héo xanh do vi khuẩn *Ralstonia solanacearum*.

Nghiên cứu cụ thể

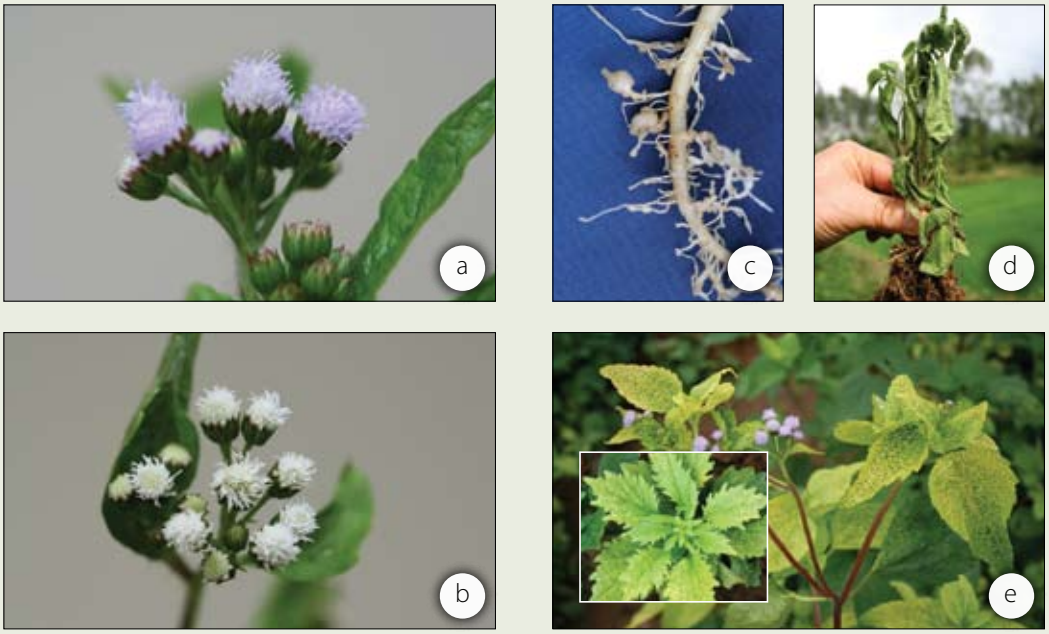
Cỏ dại với vai trò là ký chủ phụ - Cỏ cứt lợn (*Ageratum conyzoides*)

Cỏ dại có thể đóng vai trò như ký chủ phụ cho nhiều tác nhân quan trọng gây bệnh trên cây trồng.

Cỏ cứt lợn (*Ageratum conyzoides*) là một cỏ dại thường thấy ở Việt Nam (Hình 2.5), mọc lẫn với cây trồng, mọc trên ruộng giữa các vụ trồng và dọc theo đường đi. Loài cỏ này là ký chủ phụ của một số tác nhân gây bệnh quan trọng và là nơi bảo tồn nguồn bệnh hại cho cây trồng vụ sau. Sự có mặt của loài cỏ này sẽ làm mất đi lợi ích của việc luân canh mà nông dân thực hiện để hạn chế nguồn bệnh trong đất.

Cỏ cứt lợn là ký chủ phụ của *Ralstonia solanacearum* (gây héo xanh vi khuẩn), tuyến trùng nốt sưng và có khả năng gây cả bệnh vàng lá hoa lá cúc tây, một bệnh do phytoplasma và có môi giới truyền bệnh là bọ nhảy trên lá, vectơ này thường truyền bệnh cho những cây mẫn cảm với bệnh như như cúc tây, khoai tây, cà rốt và dâu tây.

Việc phòng trừ cỏ dại ký chủ phụ là vô cùng quan trọng.



Hình 2.5 Cỏ cứt lợn (*Ageratum conyzoides*): (a) loại hoa màu tím, (b) loại hoa màu trắng, (c) rễ cỏ *Ageratum conyzoides* bị tuyến trùng Meloidigyne gây hại gây ra các nốt sưng, (d) cỏ *Ageratum conyzoides* héo rũ do vi khuẩn *Ralstonia solanacearum*, (e) triệu chứng vàng lá hoa lá trên cỏ *Ageratum conyzoides* giống như ở cúc tây (hình trong: triệu chứng vàng lá hoa lá cúc tây *Callistephus chinensis*)

3 Quy trình chẩn đoán

Các bước chính trong quy trình chẩn đoán là:

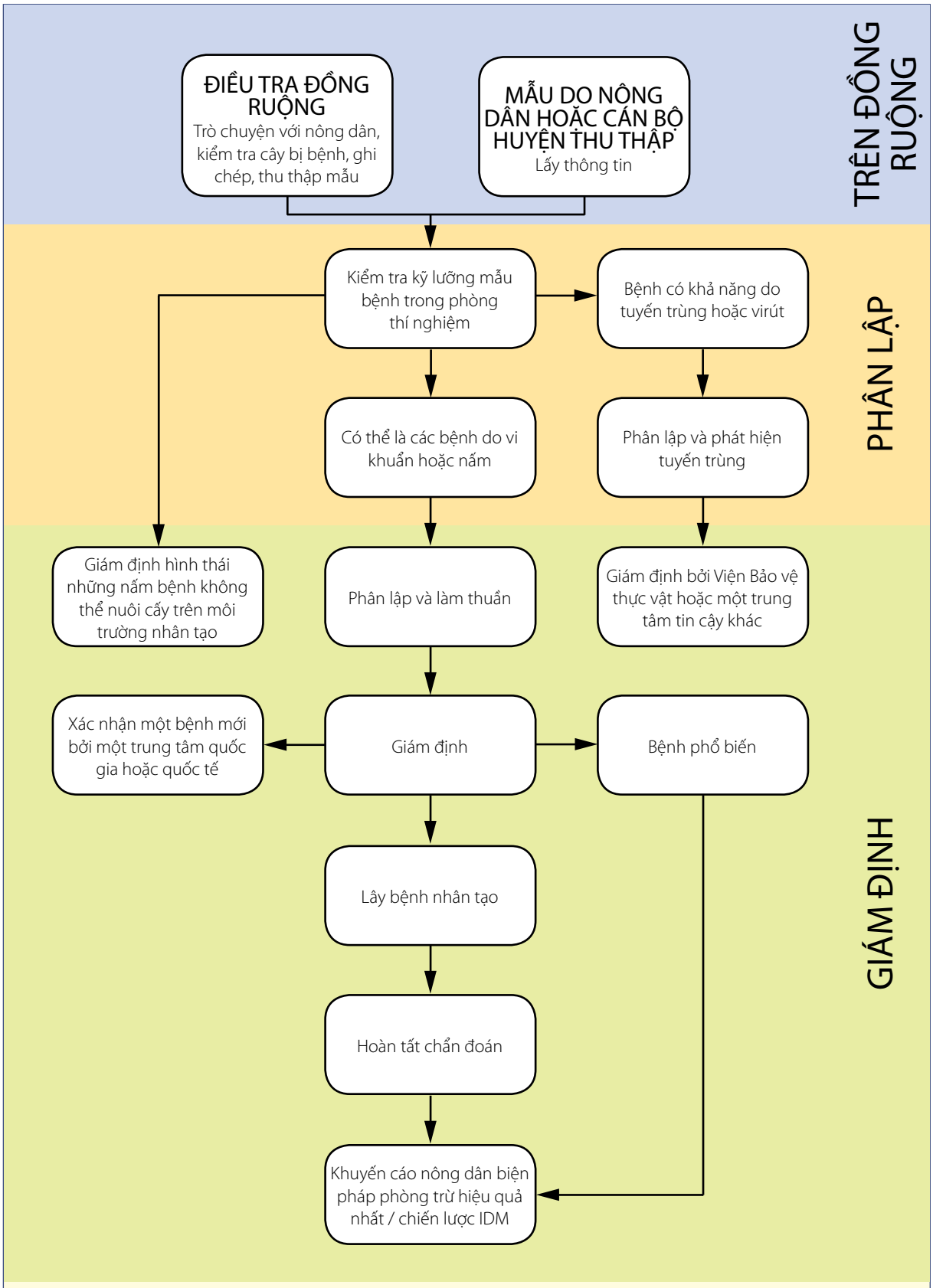
- thu thập mẫu bệnh ngoài đồng ruộng
- kiểm tra các mẫu bệnh thu thập được trong phòng thí nghiệm
- lây bệnh nhân tạo
- chẩn đoán bệnh.

Các bước này được minh họa trong Hình 3.1.

3.1 Nghiên cứu cụ thể

Trong phần này, hai nghiên cứu cụ thể được trình bày để minh họa cho quy trình chẩn đoán:

- chẩn đoán nguyên nhân gây bệnh thối nõn dứa - *Phytophthora nicotianae*
- điều tra một phức hợp bệnh – héo trên gừng do vi khuẩn và nấm *Fusarium*.

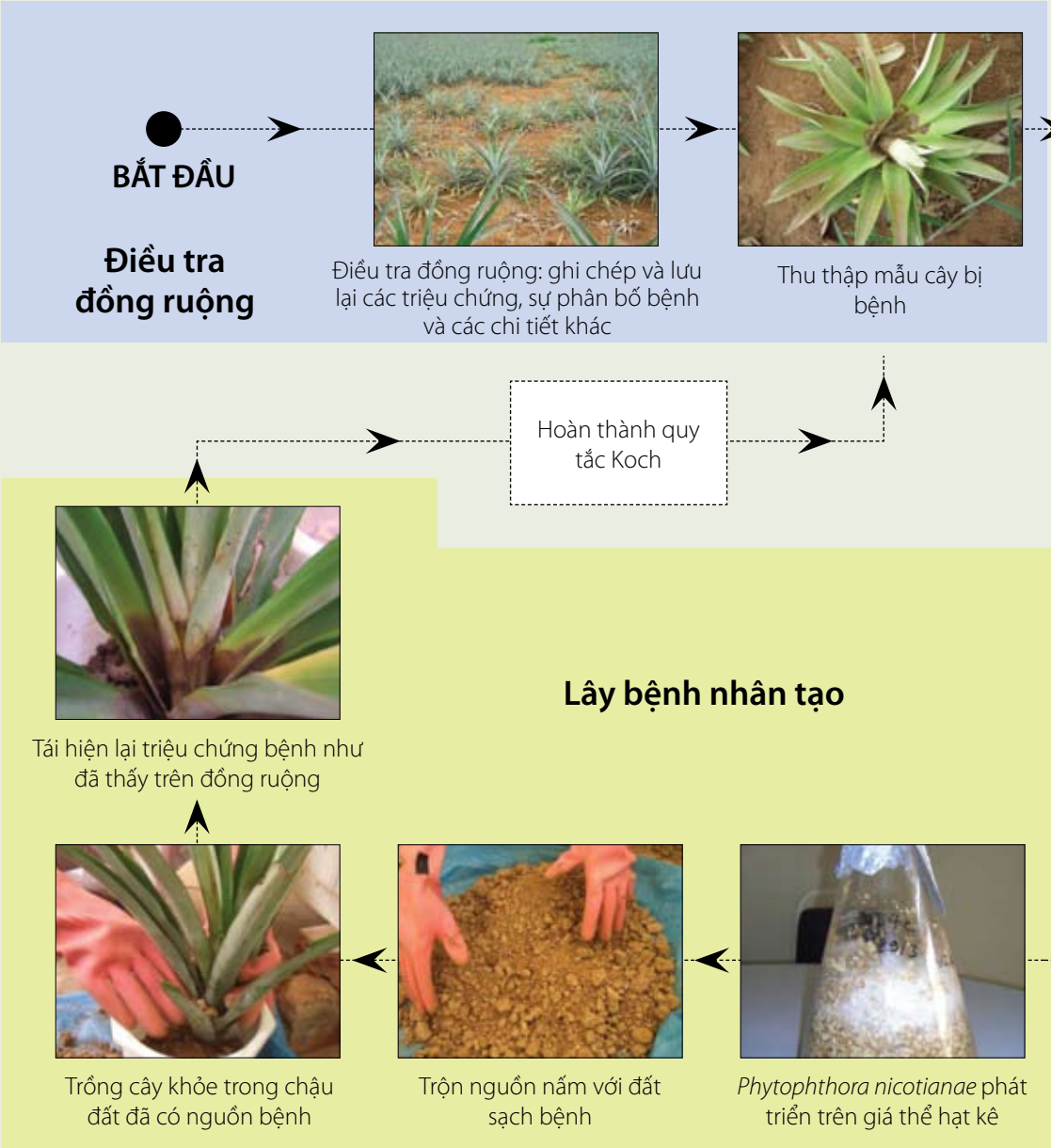


Hình 3.1 Sơ đồ quy trình chẩn đoán

Nghiên cứu cụ thể chẩn đoán 1

Chẩn đoán nguyên nhân gây bệnh thối nõn dứa - *Phytophthora nicotianae*

Hình 3.2 minh họa một ví dụ về các bước trong quy trình chẩn đoán.



Hình 3.2 Các bước phân lập, làm thuần và lây bệnh nhân tạo nấm gây thối nõn dứa, *Phytophthora nicotianae* (Ảnh do Đặng Lưu Hoa cung cấp)

Chọn lựa mẫu cấy từ phần ranh giới giữa mô khỏe và mô bệnh

Rửa và khử trùng bề mặt mẫu cấy

Cắt từng miếng cấy nhỏ và chuyển vào đĩa cấy, các dụng cụ đều phải được khử trùng.

Đặt các miếng cấy lên môi trường chọn lọc

Phòng thí nghiệm

Phân lập và làm thuần

Đặt các đĩa cấy vào tủ

Các tản nấm mọc từ các miếng cấy

Cấy truyền tản nấm và đỉnh sinh trưởng lên môi trường thạch nước cất

Giám định mẫu cấy đã được làm thuần bằng phương pháp cấy đỉnh sinh trưởng của sợi nấm (*P. nicotianae*)

Nghiên cứu cụ thể chẩn đoán 2

Điều tra một phức hợp bệnh - héo trên gừng do vi khuẩn và nấm *Fusarium*

Giới thiệu

Bệnh héo trên gừng được ghi nhận lần đầu tiên tại Quảng Nam vào năm 2000. Bệnh gây ra thiệt hại nghiêm trọng, nhiều nông dân thất thu 100%. Một nghiên cứu sơ bộ năm 2006 cho thấy bệnh héo có nguyên nhân do cả vi khuẩn và nấm *Fusarium*. Một cuộc điều tra hệ thống về phức hợp bệnh này đã được tiến hành vào tháng 1 năm 2007, một phần trong dự án CP/2002/115 "Chẩn đoán, khuyến nông và phòng trừ bệnh hại cây trồng tại các tỉnh miền Trung Việt Nam" (2005-2008) của Trung tâm Nghiên cứu Nông nghiệp Quốc tế Australia.

Mục tiêu của nghiên cứu là phân lập, tìm ra các tác nhân có liên quan đến bệnh và xác định tầm quan trọng của chúng đối với bệnh. Mười cây bị bệnh đã được thu thập từ 10 ruộng khác nhau thuộc hai huyện Phú Ninh và Tiên Phước, hai khu vực trồng gừng chính tại Quảng Nam. Các ruộng được lựa chọn ngẫu nhiên để lấy mẫu trước khi mẫu được kiểm tra chi tiết.

Trên ruộng

Thông tin được thu thập từ nông dân tại mỗi ruộng trồng (Hình 3.3). Các nông dân xác nhận là có hai loại héo: héo nhanh và héo chậm. Lá cây bị héo nhanh có triệu chứng giống như 'luộc trong nước sôi'. Ngược lại, lá những cây bị héo chậm có hiện tượng biến vàng (Hình 3.4). Những nhận xét này cho thấy rằng có hai bệnh liên quan và các triệu chứng héo đã mô tả được giả thiết là héo vi khuẩn (héo nhanh) và héo Fusarium (héo chậm).

Hình 3.3 Thảo luận với nông dân về bệnh héo trên gừng

Hình 3.4 Điều tra bệnh héo gừng ở Quảng Nam vào tháng 1 năm 2007: (a) gừng với triệu chứng héo nhanh, (b) cây gừng bị vàng, dấu hiệu của héo chậm, (c) các ruộng gần nhau, một ruộng bị héo nhanh, một ruộng không có triệu chứng héo, (d) và (e) các mẫu cây được đào lên một cách cẩn thận bằng dao rựa, giữ cho hệ thống rễ còn nguyên, (f) túi mẫu với nhãn đánh số điểm lấy mẫu, tên nông dân và ngày lấy mẫu

Nghiên cứu cụ thể chẩn đoán 2 (tiếp theo)

Trong phòng thí nghiệm

Chuẩn bị mẫu cây

Rễ cây được rửa cẩn thận để loại bỏ đất bẩn. Sau đó kiểm tra mẫu cây và lấy các mẫu nhỏ lấy từ những phần bị bệnh trên cây đem vào phòng thí nghiệm để kiểm tra dưới kính hiển vi và phân lập tác nhân gây bệnh (Hình 3.5).

Nhẹ nhàng rửa đất khỏi rễ

Kiểm tra cây (lá, mầm, củ, rễ) và ghi lại triệu chứng

Tuyến trùng nốt sưng (*Meloidogyne* sp.) có trong một số mẫu rễ

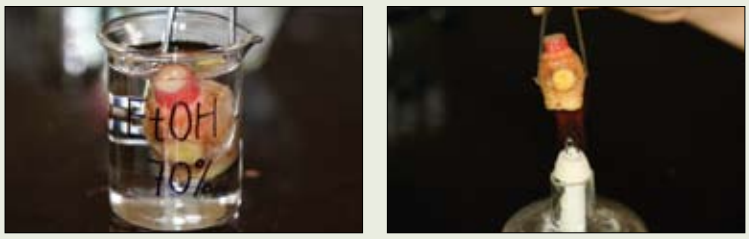
Cắt củ ra khỏi rễ và thân

Hình 3.5 Chuẩn bị và kiểm tra các mẫu cây bị bệnh héo gừng để chọn lọc mẫu cho phòng thí nghiệm

Phân lập các vi sinh vật có khả năng gây bệnh từ mô bệnh

Các củ gừng được khử trùng bề mặt, gọt vỏ và khử trùng bề mặt lần nữa. Từ mỗi củ cắt ra một lát, sau đó các miếng cấy nhỏ lại được cắt ra từ lát cắt trên và cấy lên môi trường peptone PCNB (pentachloronitrobenzene) và môi trường chọn lọc cho *Phytophthora*. Lấy một miếng cấy nhỏ, dằm nát và dùng que cấy khuẩn cấy lên môi trường King's B để phân lập vi khuẩn (Hình 3.6).

Củ được khử trùng bề mặt trong cồn êtylic 70% trong 5 giây và hơ qua lửa đèn cồn

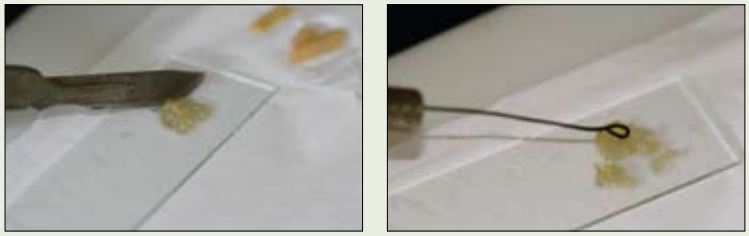


Củ được gọt vỏ (bỏ lớp ngoài) sau đó khử trùng bề mặt lần nữa trong cồn êtylic 70%

Củ đã gọt vỏ được hơ qua lửa đèn cồn và một lát cắt được cắt ra ở phần củ giáp với thân lá, tất cả dụng cụ đều được khử trùng

Năm miếng cấy nhỏ được cắt ra từ lát cắt, cấy hai miếng lên môi trường PPA và hai miếng lên môi trường PSM

Miếng cấy còn lại được dằm nát trong nước vô trùng trên một lam kính và dùng que cấy khuẩn cấy lên môi trường King's B để phân lập vi khuẩn



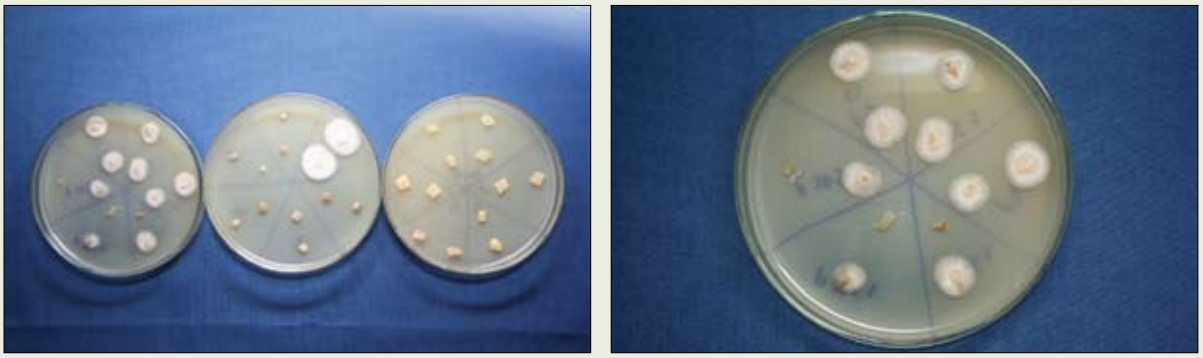
Hình 3.6 Quy trình phân lập các vi sinh vật có khả năng gây bệnh từ củ gừng

Nghiên cứu cụ thể chẩn đoán 2 (tiếp theo)

Kết quả phân lập các tác nhân có khả năng gây bệnh

Fusarium spp. đã được phân lập từ củ (Hình 3.7) của những cây có triệu chứng héo chậm - vàng lá và có tuyến trùng nốt sưng - ở một số điểm điều tra. Những mẫu nấm phân lập được làm thuần bằng cách cấy đơn bào tử và được giám định là *Fusarium oxysporum*.

Các mẫu nấm *F. oxysporum* có hình thái giống hệt nhau trên môi trường thạch lá cẩm chướng và môi trường thạch đường dextrose khoai tây, chỉ ra rằng chúng có thể là nấm gây bệnh. (Các mẫu cấy của *F. oxysporum* hoại sinh thường có hình thái không đồng nhất.)



Hình 3.7 Phân lập *Fusarium oxysporum* từ miếng cấy gừng trên môi trường chọn lọc (aga peptone pentachloronitrobenzene) cho *Fusarium*

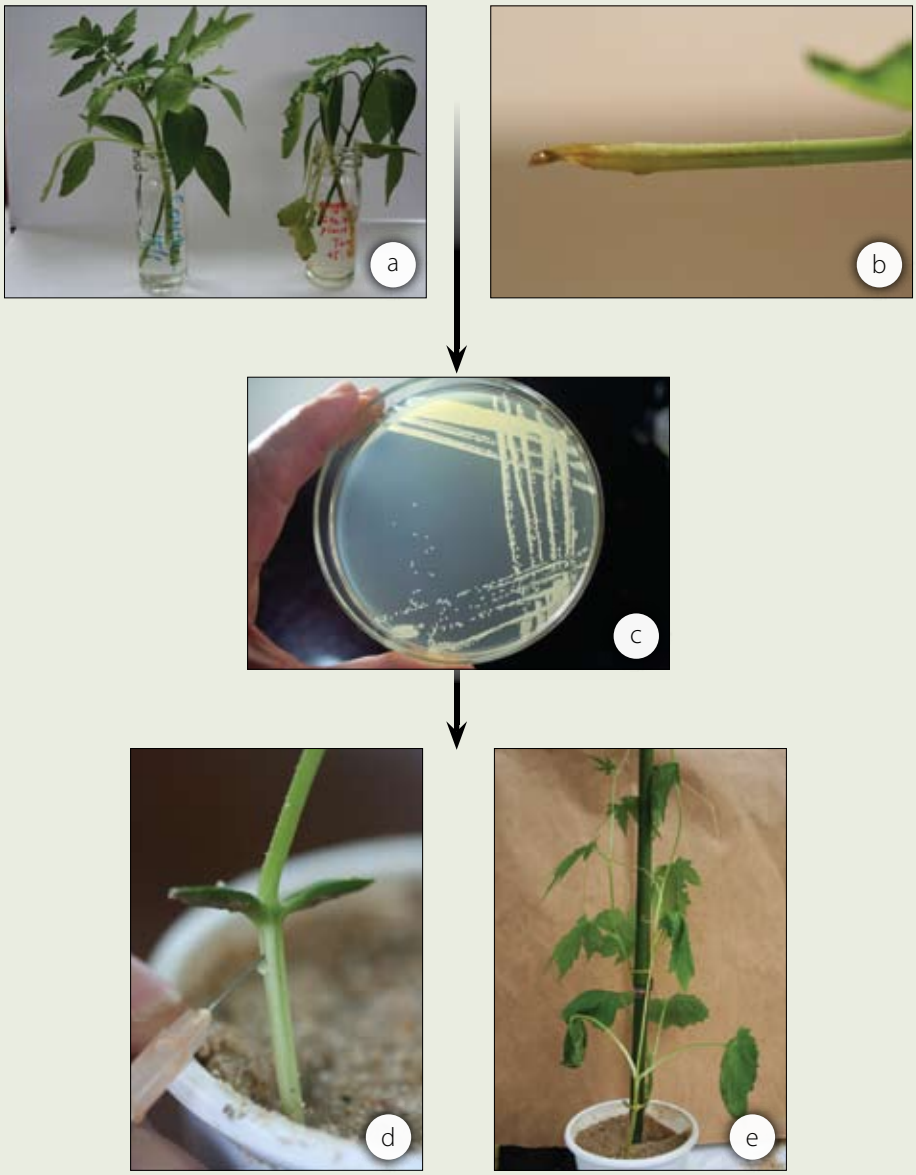
Không phân lập được *Phytophthora* từ củ gừng.

Chẩn đoán nhanh *Ralstonia solanacearum* dùng Bộ Kít Pocket Diagnostic® cho kết quả dương tính đối với củ lấy từ ba cây có triệu chứng héo nhanh, chứng tỏ là vi khuẩn này có trong mô củ. Dùng Kít thử tương tự cho kết quả âm tính đối với củ từ một cây có triệu chứng héo chậm (héo vàng) - *F. oxysporum* đã được phân lập từ củ này.

Nhiều khuẩn lạc khác nhau đã được phân lập từ môi trường King's B và không thể xác định một cách chính xác khuẩn lạc thuần *R. solanacearum*. Bởi vì các cây được lấy làm mẫu có những triệu chứng từ hiển nhiên đến rất nặng và đã phải chịu tình trạng đất rất ướt trước khi lấy mẫu, đây là điều kiện thuận lợi cho sự xâm nhập của các vi khuẩn không gây bệnh vào mô cây đã bị bệnh.

Vì lý do trên, một thí nghiệm chỉ thị sinh học đã được tiến hành để tìm cách phân lập được vi khuẩn *R. solanacearum* (Hình 3.8). Mô bên trong của các củ lấy thêm từ những mẫu cây thu thập tại sáu ruộng trước đó đã được cắt thành từng miếng nhỏ và lắc kỹ với 30 mL nước vô trùng. Sau đó dung dịch này được đổ vào những lọ nhỏ và cắm vào đó các cây con

cà chua và ớt vừa được cắt bỏ phần rễ và gốc thân (ớt và cà chua được dùng như cây chỉ thị để bẫy vi khuẩn). Các lọ nhỏ này được đặt trong nhà kính ở 25-30°C. Trong vòng 4-8 ngày, một số ngọn ớt và cà chua biểu hiện triệu chứng héo đi và thử thấy dịch khuẩn ứa ra. Những cây con đối chứng được cắm vào nước vô trùng vẫn khỏe bình thường.



Hình 3.8 Thí nghiệm chỉ thị sinh học để phân lập *Ralstonia solanacearum* từ củ gừng bị bệnh: (a) ngọn cây chỉ thị ở công thức đối chứng (trái) ngọn cây chỉ thị héo trong nước chiết từ các miếng gừng (phải), (b) ngọn ớt bị héo có triệu chứng hóa nâu ở mạch dẫn, (c) phân lập *R. solanacearum* từ ngọn ớt, (d) và (e) lây bệnh nhân tạo trên mướp đắng với vi khuẩn đã được phân lập từ cây chỉ thị.

Nghiên cứu cụ thể chẩn đoán 2 (tiếp theo)

Một đoạn thân của mỗi cây chỉ thị bị héo được dầm nát trong nước vô trùng và dùng que cấy khuẩn cấy lên môi trường King's B. Sau đó, một khuẩn lạc từ môi trường này được cấy truyền để làm thuần và tiêm vào thân cây mướp đắng 6-tuần tuổi để đánh giá khả năng gây bệnh. Một số cây mướp đắng biểu hiện triệu chứng héo rũ và quá trình phân lập được lặp lại với những cây này để lấy mẫu vi khuẩn *R. solanacearum* thuần gửi đi giám định tại một trung tâm tiêu chuẩn quốc tế.

Lây bệnh nhân tạo để xác định nguyên nhân chính gây bệnh

Fusarium oxysporum f. sp. *zingiberi* đã được ghi nhận rộng rãi tại nhiều nước là nguyên gây bệnh héo Fusarium ở gừng. Tuy nhiên, những mẫu nấm *F. oxysporum* phân lập được từ gừng ở Quảng Nam cần được lây bệnh nhân tạo trên các giống gừng ở địa phương để chứng minh rằng đó là nấm gây bệnh chứ không phải nấm hoại sinh. Vì vậy, những mẫu *Fusarium* đại diện được cấy lên giá thể hạt kê/trấu để dùng cho việc lây bệnh nhân tạo.

Bởi vì *R. solanacearum* cũng được biết đến là nguyên nhân gây ra bệnh héo vi khuẩn trên gừng, các mẫu *R. solanacearum* cũng được dùng lây bệnh nhân tạo trên các giống gừng địa phương để hoàn tất quy tắc Koch (tiêu chí dùng để thiết lập mối liên hệ nhân quả giữa tác nhân gây bệnh và bệnh).

Để giám định chính xác tác nhân gây bệnh, các mẫu vi khuẩn *R. solanacearum* thuần cũng được gửi đi giám định tại một phòng thí nghiệm tiêu chuẩn quốc tế. Loài vi khuẩn này rất đa dạng, bao gồm nhiều chủng khác nhau gây hại trên các ký chủ khác nhau và đòi hỏi áp dụng các biện pháp luân canh cây trồng khác nhau để phòng trừ bệnh.

Các mẫu tuyến trùng nốt sưng *Meloidogyne* cũng được gửi tới một phòng thí nghiệm tiêu chuẩn để giám định loài một cách chính xác.

Sau khi lây bệnh nhân tạo thành công

Khi đã khẳng định được các vi sinh vật gây héo là nguyên nhân gây bệnh trên gừng, các cán bộ đã tìm kiếm nguồn gừng sạch bệnh trồng trên những ô trình diễn nhỏ nơi đất không có nguồn bệnh. Đất được coi là không có nguồn bệnh nếu các vụ cây trồng trước đó không có héo vi khuẩn (và tuyến trùng nốt sưng). Lưu ý rằng *R. solanacearum* có phổ ký chủ rất rộng.

Mặc dù *F. oxysporum* f. sp. *zingiberi* chỉ gây ra bệnh trên gừng, nó có thể tồn tại ở rễ của những cây không phải là ký chủ và không biểu hiện triệu chứng. Vệ sinh tốt cho cây trồng là vô cùng cần thiết sao cho đất từ những ruộng có bệnh không được đưa vào ruộng sạch bệnh qua giầy dép và các dụng cụ làm ruộng.

4 Triệu chứng bệnh

Việc chẩn đoán bắt đầu bằng việc quan sát cẩn thận tất cả các bộ phận của cây bị bệnh - lá, hoa, quả, thân và rễ. Việc xác định tác nhân chính gây bệnh có thể sẽ rất khó khăn vì nhiều tác nhân gây bệnh không thể được nhận ra bằng mắt thường. Những tác động của tác nhân gây bệnh lên cây - triệu chứng - có thể giúp trong việc xác định sự có mặt của một hay nhiều tác nhân gây bệnh. Các triệu chứng của bệnh có thể gây ra bởi:

- các mô của cây bị tổn thương
- rối loạn các chức năng sinh lý của cây:
  - hấp thụ nước và dinh dưỡng
  - quang hợp
  - phát triển.

Cần ghi chép cẩn thận các triệu chứng của bệnh trong một cuốn sổ nhật ký đồng ruộng và chụp lại triệu chứng bệnh bằng máy ảnh kỹ thuật số (nếu có thể).

4.1 Các triệu chứng thường gặp

Các triệu chứng không điển hình thường gặp có thể có nguyên nhân từ nhiều loại tác nhân gây bệnh khác nhau. Héo, ngả vàng và còi cọc là những triệu chứng không điển hình thông thường (xem những phần về tác nhân gây héo). Héo thường do các tác nhân gây héo mạch dẫn, thối rễ, sưng rễ, thối cổ rễ, thối thân cây và do đất quá khô. Những bệnh này và nhiều bệnh khác cũng có thể gây ra triệu chứng còi cọc và biến vàng. Vì vậy, cần thiết phải kiểm tra tất cả các bộ phận của cây - quan trọng nhất là rễ.

Các tác nhân làm tổn thương rễ hoặc các mô thân – điển hình là nấm và tuyến trùng - làm rối loạn quá trình hấp thụ nước và dinh dưỡng gây hiện tượng héo, biến vàng và còi cọc, bắt đầu bằng việc cây sinh trưởng kém và khi bệnh phát triển, toàn cây héo, biến vàng và chết. Các bệnh héo vi khuẩn gây triệu chứng héo, chết cây và một số bệnh do virút cũng gây hiện tượng héo, còi cọc và cây chết.

Các triệu chứng bệnh trên lá có thể do nấm (đốm và rụi lá), do vi khuẩn (đốm và rụi lá), và do virút ký sinh thực vật (khảm hoặc hoa lá, lá còi và lá bị cuốn lại). Virút cũng có thể gây ra các triệu chứng không điển hình (vàng lá, héo và còi cọc).

Tuyến trùng ký sinh thực vật chủ yếu tác động đến hệ thống rễ, gây ra các vết thương trên rễ, sưng rễ, và rễ phân ly nhanh kèm theo các u sưng làm cho cây còi cọc, biến vàng, héo và đôi khi có thể chết cây.

Một số triệu chứng có thể giúp xác định nguyên nhân gây bệnh bởi vì chúng là triệu chứng điển hình đối với một số tác nhân gây bệnh nhất định. Chẳng hạn như, triệu chứng nốt sưng trên rễ do *Meloidogyne* spp. (tuyến trùng nốt sưng) hoặc sưng rễ do *Plasmodiophora brassicae*, có thể dễ dàng chẩn đoán chính xác ngay trên ruộng.

Cây họ đậu như lạc và đậu tương có các nốt sần ở rễ - những chỗ sưng nhỏ ở rễ gây ra do sự cộng sinh của vi khuẩn cố định đạm như *Rhizobium* spp. Những nốt sần này có lợi cho cây và quan trọng đối với sức khỏe của cây. Các nốt sần khỏe khi cắt ra thường có màu hồng.

Do có rất nhiều các triệu chứng khác nhau có thể quan sát thấy trên đồng ruộng, các nhà bệnh cây cần kiểm tra các cây bị bệnh hết sức cẩn thận và ghi chép rõ ràng nhằm giúp cho việc chẩn đoán được chính xác. Hơn nữa, các nhà nghiên cứu bệnh cây cần đặt câu hỏi cho nông dân để lấy thông tin về lịch sử cây trồng và sự phát triển của bệnh.

Một cây có thể bị vài tác nhân khác nhau gây hại, gây ra một loạt các triệu chứng bệnh.

Các bệnh được nghi là do vi rút gây ra cần được chuyển đến một phòng thí nghiệm và kiểm tra bởi các chuyên gia về virút có kinh nghiệm trong việc giám định virút. Việc xác định chính xác tuyến trùng ký sinh thực vật, vi khuẩn gây bệnh và các tác nhân liên quan cũng đòi hỏi có sự kiểm tra của các chuyên gia.

Ngược lại, nhiều nấm bệnh có thể được chẩn đoán một cách thành công trên đồng ruộng hoặc trong một phòng thí nghiệm cơ bản, miễn là có đầy đủ tài liệu tham khảo.

Tìm trợ giúp nếu bạn không tự tin trong việc xác định nguyên nhân của bệnh. Đừng phỏng đoán - lợi nhuận của nông dân sẽ phụ thuộc vào kết quả chẩn đoán và lời khuyên của bạn.

Chỉ khoảng một nửa số mẫu gửi đến phòng thí nghiệm chẩn đoán là thực sự do các tác nhân gây bệnh gây ra. Cây có thể bị ảnh hưởng bởi các nhân tố khác như thuốc trừ sâu hoặc stress do môi trường.

4.2 Các bệnh trên lá, hoa hoặc quả

Nhiều nấm gây các bệnh trên lá (lá, cuống lá và thân), hoa hoặc quả, và thường sản sinh ra các bào tử từ những cấu trúc tạo-bào-tử trên mô bệnh. Bào tử nhờ gió hoặc mưa phát tán đến các cây khác, khiến bệnh lan truyền. Nấm bệnh có thể tích lũy số lượng rất nhanh chóng và gây ra bùng phát dịch trong những điều kiện thời tiết thuận lợi .

Sự có mặt của những cấu trúc tạo-bào-tử như quả cành hoặc quả thể, cành bào tử phân sinh hoặc cành mang bọc bào tử động là đặc điểm quan trọng cho việc giám định hình thái nấm bệnh và việc chẩn đoán bệnh do nấm gây ra.

Dùng một kính lúp để giúp cho việc nhận dạng cấu trúc của nấm trên đồng ruộng. Tuy nhiên, để có thể xác định chính xác bào tử và các cấu trúc tạo thành bào tử phải dùng kính hiển vi trong phòng thí nghiệm.

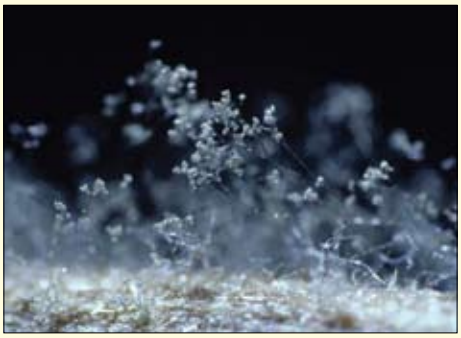
Nhiều nấm bệnh gây đốm (vết thương) trên lá, hoa hoặc quả. Đốm vàng là các vết bệnh do mất màu và đốm nâu là các vết bệnh chết hoại. Các đốm nâu được gọi là 'hoại tử' bởi vì nấm bệnh khi xâm nhập đã làm cho các mô bị chết. Các nấm bệnh gây vết thương trên lá, hoa và quả thường có thể phân lập được và phát triển được trong môi trường nhân tạo.

Nấm hoại sinh cũng có thể mọc được trên các mô cây bị bệnh như là những nấm ký sinh bậc hai. Thí dụ như, các loài nấm hoại sinh của chi *Alternaria* và *Pestalotia* thường mọc trên mô lá bị bệnh và sản sinh bào tử trên mô. Những loài hoại sinh này có thể làm cho việc chẩn đoán bị sai lệch bởi vì chúng thường được nhìn thấy rõ dưới kính hiển vi và mọc rất nhanh trên môi trường phân lập.

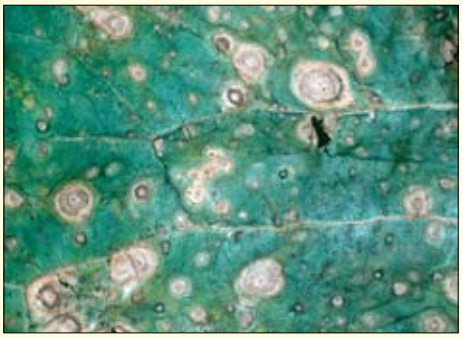
4.2.1 Sự sản sinh bào tử trên lá bệnh

Nấm có thể tạo thành các bào tử vô tính từ các sợi nấm chuyên hóa gọi là cành bào tử phân sinh. Trong các loài của *Stemphylium, Botrytis, Aspergillus, Penicillium, Bipolaris, Alternaria* và *Cercospora*, các cành bào tử phân sinh phát triển trên mô bệnh từ sợi nấm (Hình 4.1). Một số loài (như *Septoria, Diaporthe, Didymella, Ascochyta* và *Phoma*) sản sinh bào tử vô tính trong những cấu trúc đặc biệt gọi là quả cành, những loài khác (như *Colletotrichum, Cylindrosporium*) bào tử được sản sinh trong các cấu trúc gọi là đĩa cành.

Bào tử sản sinh ra từ cành bào tử phân sinh trên bề mặt mô bệnh



Stemphyllium
Botrytis
Aspergillus
Penicillium
Bipolaris
Alternaria
Cercospora



Bào tử sản sinh ra từ đĩa cành

Colletotrichum
Cylindrosporium

Bào tử sản sinh ra trong quả cành trên mô bệnh

Septoria
Diaporthe
Didymella
Ascochyta
Phoma

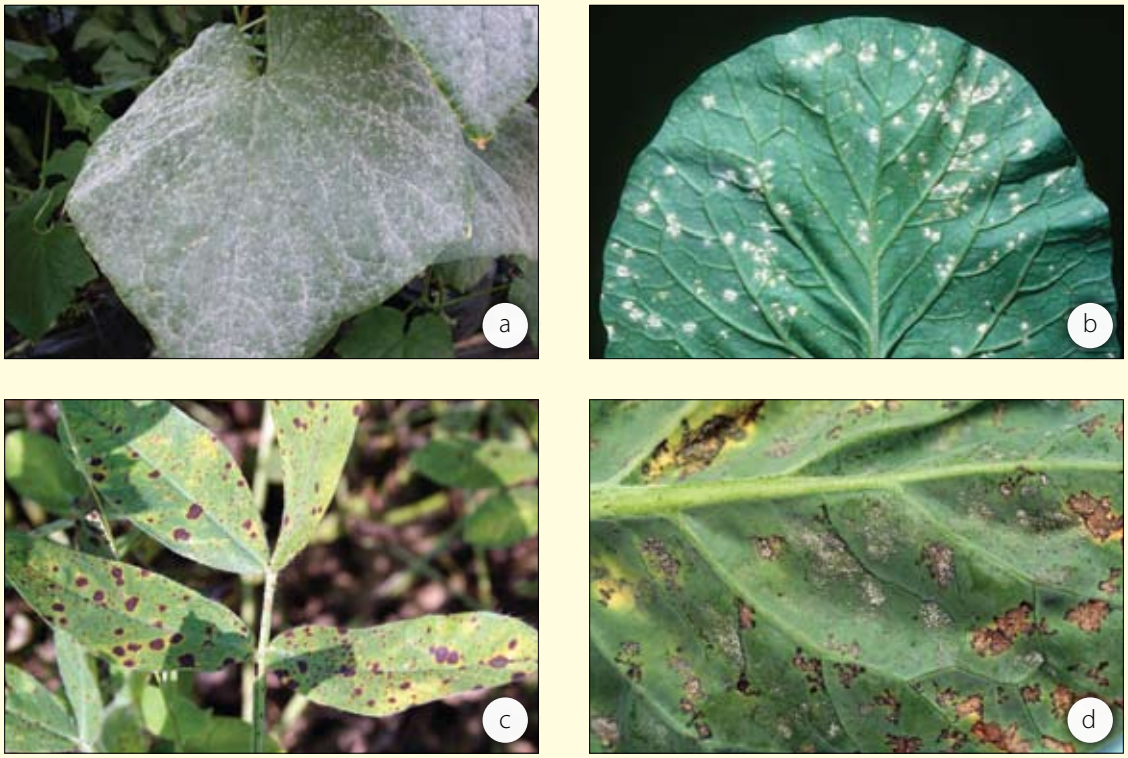
Hình 4.1 Sự hình thành bào tử trên lá của nhiều nấm bệnh khác nhau

Một số nấm bệnh cũng sản sinh ra bào tử từ những cấu trúc sinh sản hữu tính trên lá, thân hoặc quả. Thí dụ, *Fusarium graminearum (Gibberella zeae)* sản sinh ra bào tử túi trong một túi bào tử nằm bên trong quả thể trên thân và bắp ngô trưởng thành bị bệnh. Nấm này gây bệnh thối thân và bắp ngô.

Quả thể có hình dạng tương tự quả cành, nhưng quả cành sinh ra bào tử vô tính và không có túi bào tử.

4.2.2 Nấm và các tác nhân giống nấm ký sinh chuyên tính trên lá

Bệnh sương mai, phấn trắng và gỉ sắt do các loài nấm ký sinh chuyên tính gây ra. Những nấm bệnh này chỉ có thể xâm nhiễm, mọc và sản sinh bào tử trong mô ký chủ còn sống - chúng không thể phân lập được và không mọc trong môi trường nhân tạo - và thường chỉ có thể gây hại cho một hoặc hai loài hoặc giống ký chủ. Ví dụ, gỉ sắt lạc chỉ có thể gây hại cho lạc.



Hình 4.2 Nấm bệnh và các tác nhân giống nấm gây bệnh trên lá: (a) phấn trắng trên bầu bí, (b) gỉ trắng trên cải bắp, (c) đốm lá Cercospora và gỉ sắt trên lạc, (d) sương mai trên cải bắp

Những triệu chứng của bệnh sương mai, phấn trắng và gỉ sắt thường rất hiển nhiên (Hình 4.2). Chúng hấp thụ chất dinh dưỡng từ các tế bào cây sống, làm cho các mô bị vàng. Sự quang hợp trong mô lá bị giảm, dẫn đến hiện tượng cây kém phát triển.

4.2.3 Nấm bệnh sản sinh ra hạch nấm trên mô bệnh

Trong điều kiện ẩm thấp, một số nấm bệnh sản sinh ra sợi nấm và/hoặc hạch nấm trên bề mặt cây bị bệnh. Sợi nấm của một số loài *Rhizoctonia* mọc ở gốc thân và lá bị bệnh. Ở Việt Nam, một số loài *Rhizoctonia* sản sinh ra hạch màu nâu có hình dạng bất định trên mô lá ngô và cải bắp bị bệnh (Hình 4.3a).

Sclerotium rolfsii gây thối gốc thân trên nhiều rau màu hàng năm trong điều kiện thời tiết nóng ẩm ở Việt Nam. *S. rolfsii* sản sinh ra những sợi nấm màu trắng trên gốc thân bị bệnh và các hạch tròn nhỏ màu nâu (Hình 4.3b) hình thành từ những sợi nấm này.

Sclerotinia sclerotiorum sản sinh ra các sợi nấm màu trắng và hạch to màu đen trên thân và lá của nhiều cây trồng lá rộng, như đậu cô ve lùn và cô ve leo, cà chua, cải bắp, khoai tây và xà lách (Hình 4.3c).

Hình 4.3 Hình thành hạch nấm bởi (a) *Rhizoctonia solani*, (b) *Sclerotium rolfsii* và (c) *Sclerotinia sclerotiorum*

4.3 Các bệnh ở rễ, gốc và thân cây

Nấm bệnh có thể gây bệnh nghiêm trọng cho rễ, cổ rễ (gốc thân) hoặc thân cây. Một số nấm bệnh chỉ gây hại cho cây con, làm cây con chết trước hoặc sau khi nảy mầm; một số loại khác chỉ gây hại ở rễ con, và một số loài chỉ gây hại trên thân (như *Sclerotinia sclerotiorum* và *Sclerotium rolfsii*).

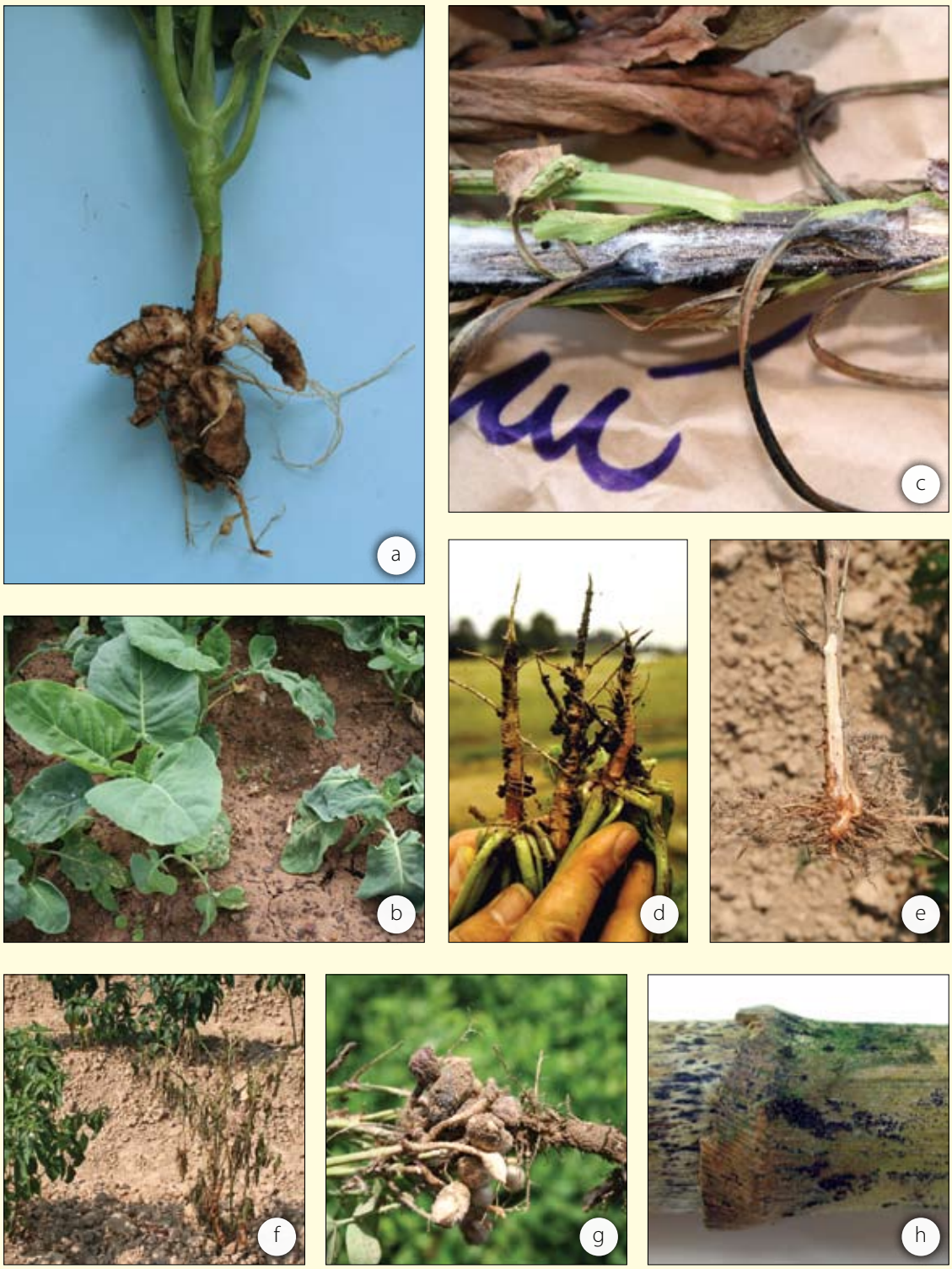
Các triệu chứng trên rễ có thể không điển hình. Thối rễ con, rễ chính, gốc hoặc thân phá hủy quá trình dẫn nước và dinh dưỡng, làm cho cây còi cọc, lá biến vàng, héo và đôi khi làm chết cây.

Các chi nấm thường gây những bệnh này ở Việt Nam là *Phytophthora, Pythium, Fusarium, Sclerotinia, Sclerotium, Rhizoctonia* và *Phoma* (Hình 4.4). Một tác nhân ký sinh rễ, *Plasmodiophora brassicae*, gây ra sưng rễ họ thập tự, là loài ký sinh chuyên tính và không thể mọc trên môi trường nhân tạo. Nhóm nấm đảm Basidiomycota gây hại ở gốc và rễ những cây lưu niên (Shivas and Beasley 2005), nhìn chung khó phân lập trong môi trường nhân tạo.

Nấm bệnh thối rễ có thể khó phân lập bởi vì có thể có nhiều nấm và vi khuẩn hoại sinh trong các mô rễ bị bệnh, các vi sinh vật hoại sinh này cũng có thể mọc trên môi trường phân lập - thường mọc lấn át các nấm bệnh.

4.4 Tài liệu tham khảo

Shivas R. và Beasley D. 2005. Quản lý mẫu bệnh thực vật, Bộ Nông nghiệp, Thủy sản và Lâm nghiệp Australia. Tại: <http://www.daff.gov.au/planthealth>.



Hình 4.4 Những bệnh ở gốc, rễ và thân: (a) sưng rễ họ thập tự, (b) héo trên họ thập tự (khỏe [trái] và bệnh [phải]) gây ra do sưng rễ (*Plasmodiophora brassicae*), (c) héo Fusarium trên cây cúc tây (chú ý đến sự hình thành khối bào tử trên thân), (d) teo thắt do *Rhizoctonia* sp., (e) thối rễ ớt do *Phytophthora* gây héo trầm trọng, (g) thối rễ và quả lạc do *Pythium*, (h) quả thể của *Gibberella zeae* gây ra thối thân ngô

5 Trên đồng ruộng

Nông dân và cán bộ bảo vệ thực vật huyện thường là những người đầu tiên phát hiện ra bệnh trên cây trồng. Sau đó họ có thể yêu cầu các cán bộ nghiên cứu bệnh cây xác định bệnh và tác nhân gây bệnh.

Nếu mẫu bệnh được gửi tới phòng thí nghiệm chẩn đoán, nông dân hoặc cán bộ huyện cần lưu ý thu thập tất cả những thông tin liên quan và gửi kèm cùng với mẫu bệnh (Hình 5.1). Các cán bộ huyện có thể cung cấp thông tin về bệnh theo phiếu điều tra bệnh trên đồng ruộng (Phần 5).

Tuy nhiên, tốt hơn hết là các cán bộ nghiên cứu bệnh cây cùng với cán bộ huyện đến tận nơi gặp gỡ nông dân và kiểm tra cây bệnh trên đồng ruộng. Các cán bộ bệnh cây có thể thu thập mẫu bệnh còn mới để giám định trong phòng thí nghiệm đồng thời thu thập thông tin về giống cây trồng, biện pháp canh tác, cây trồng vụ trước và dữ liệu khí hậu. Những thông tin này đặc biệt quan trọng trong việc chẩn đoán bệnh cây. Một danh sách những dụng cụ cần thiết cho việc điều tra đồng ruộng của các cán bộ nghiên cứu bệnh cây được đưa ra ở Phần 5.1. Mẫu bệnh cần được bảo quản trong điều kiện mát và chuyển đến phòng thí nghiệm càng sớm càng tốt để được kiểm tra chi tiết.

Hình 5.1 Trao đổi với nông dân trên đồng ruộng

Disease Surveying: Field Notes

Collector's name: ..... Collection date: .....

Farmer's details:

Name: ..... Phone: .....

Address: .....

Diseased sample:

Type of sample collected: .....

Crop species: ..... Variety/rootstock: .....

Source of seeds/plants: ..... Plant maturity: .....

Symptoms (compare with healthy specimens): .....

.....

.....

Signs (evidence of the pathogen): .....

.....

.....

Field observations:

Percentage affected: ..... Distribution/patterning: .....

Paddock history: .....

Other plant species present: .....

Rainfall, irrigation events: ..... Soil type: .....

Association with terrian (slope of land): .....

Where was the problem first observed: .....

Chemical use (herbicides, insecticides, fungicides): .....

.....

Additional information (insect damage, other diseases): .....

.....

.....

.....

Phiếu điều tra bệnh trên đồng ruộng

Tên người lấy mẫu ..... Ngày lấy mẫu: .....

Thông tin về chủ ruộng:

Tên: ..... Điện thoại: .....

Địa chỉ: .....

Thông tin về mẫu bệnh:

Phân loại mẫu: ví dụ mẫu thân, lá, rễ hay đất: .....

Tên cây trồng:..... Tên giống: .....

Nguồn gốc hạt giống: ..... Tuổi cây: .....

Mô tả triệu chứng bệnh (so sánh với mẫu khỏe): .....

.....

.....

Những dấu hiệu điển hình chứng tỏ cây bị bệnh: .....

.....

.....

Thông tin quan sát được trên ruộng:

% số cây bị bệnh: ..... sự phân bố của bệnh: .....

Tên các cây trồng trên ruộng trước đó: .....

Có trồng chung với các loài cây khác không? .....

lượng mưa và hệ thống tưới tiêu: ..... Loại đất: .....

đất bằng phẳng hay đồi dốc: .....

vị trí phát sinh bệnh đầu tiên: .....

những loại thuốc trừ cỏ, trừ sâu và trừ nấm đã sử dụng: .....

.....

Sơ qua về tình hình các loại sâu bệnh khác đang tồn tại trên ruộng: .....

.....

.....

.....

5.1 Dụng cụ cần thiết cho công tác chẩn đoán trên đồng ruộng

Cần chuẩn bị các dụng cụ cần thiết một cách cẩn thận trước mỗi đợt điều tra. Những dụng cụ sau đây rất cần cho việc lấy mẫu bệnh cây và ghi lại những thông tin liên quan. Nhiều dụng cụ trong danh mục này có thể được mua từ các chợ địa phương ở Việt Nam. Khung 5.1 là bản kiểm kê dụng cụ điều tra đồng ruộng (Hình 5.2).

Cần có một sổ tay để ghi chép lại triệu chứng bệnh và những thông tin về cây trồng và lịch sử ruộng trồng. Một kính lúp cầm tay được sử dụng để kiểm tra các cấu trúc của nấm, như hạch nấm và quả cành. Một máy ảnh kỹ thuật số, nếu có, có thể dùng để ghi lại hình ảnh các triệu chứng của bệnh trên đồng ruộng.

Nên có một số phong bì, túi giấy và bao ny lông các cỡ để đựng mẫu cây. Dùng bút dạ loại không xóa được ghi lại các thông tin quan trọng như tên và địa chỉ nông dân, địa điểm lấy mẫu và đánh số mẫu lên mặt ngoài của túi đựng mẫu.

Các dụng cụ cắt khác nhau được dùng để lấy mẫu:

- một dao rựa lớn để chặt các thân cây lớn (như chuối) hoặc thân gỗ (như cây bông), và để đào toàn bộ phần rễ cây cũng như thu thập những mẫu đất nhỏ
- một dao rựa nhỏ để chặt các thân cành cứng nhỏ (như cây ớt)
- hai hoặc ba dao nhỏ sắc dùng cắt thân mềm (như dưa hấu, cà chua) để kiểm tra bó mạch hóa nâu và dịch vi khuẩn, hoặc lấy mẫu dùng trong phòng thí nghiệm
- kéo cắt cành để thu thập số lượng mẫu lớn.

Khung 5.1 Bản kiểm kê dụng cụ điều tra đồng ruộng

- Sổ ghi chép và bút
- Máy ảnh kỹ thuật số
- Kính lúp cầm tay
- Túi giấy, túi ny lông và phong bì
- Bút dạ không xóa được
- Dao rựa nhỏ và lớn
- Dao và kéo cắt cành
- Lọ thủy tinh nhỏ
- Chai nước sạch
- Lọ rửa chứa cồn êthanol
- Thùng đựng đá và chai nước đá (dự trữ một số trong ngăn đá tủ lạnh)
- Nước uống và mũ nón

Các dụng cụ này có thể dễ dàng được vận chuyển bằng xe máy. Các dụng cụ đào xới thường có thể mượn từ nông dân vì vận chuyển bằng xe máy thì cồng kềnh và nguy hiểm.

Cần đem theo một lọ thủy tinh nhỏ để kiểm tra dịch khuẩn từ thân cành của mẫu bệnh được nghi là héo vi khuẩn. Phải dùng nước sạch để rửa dụng cụ cắt và để dùng kiểm tra dịch khuẩn. Nên khử trùng bề mặt dụng cụ cắt bằng cồn êthanol 70% trước khi chuyển qua khu vực khác trên ruộng hoặc lấy mẫu cây khỏe.

Cần có một thùng đựng nước đá bằng nhựa chắc để giữ cho mẫu bệnh được mát trong lúc di chuyển từ ruộng đến phòng thí nghiệm. Dùng các chai nước đá để giữ cho thùng mát và nên dự trữ sẵn các chai nước trong ngăn đá cho mục đích này.

Mang nước uống và mũ nón khi đi điều tra cũng rất quan trọng, để tránh nắng và khát.

Không được di chuyển từ ruộng này sang ruộng khác với giày dép, quần áo hoặc dụng cụ đã dính bùn. Bùn có thể chứa các tác nhân gây bệnh và đem theo chúng từ ruộng cây bị bệnh sang ruộng cây khỏe.

Hình 5.2 Dụng cụ cần thiết khi điều tra đồng ruộng

5.2 Tiến hành điều tra đồng ruộng

Bước 1

Chuẩn bị dụng cụ điều tra (Phần 5.1) và liên hệ phương tiện đi lại.

Bước 2

Thảo luận về bệnh với nông dân và cán bộ bảo vệ thực vật huyện.

Bước 3

Bước chậm qua ruộng cây trồng và ghi nhận những loại triệu chứng bệnh hiện có trên ruộng, phân bố của bệnh và bất cứ yếu tố đất đai nào hoặc các yếu tố khác liên quan đến bệnh (xem các triệu chứng bệnh ở Phần 4).

Khi bước qua ruộng cần quan sát cẩn thận các dấu hiệu tổn thương do côn trùng, sự hiện diện của các vectơ truyền virut, cỏ dại và tổn thương do thuốc bảo vệ thực vật. Trò truyện với nông dân về những quan sát của họ.

Bước 4

Cẩn thận đào những cây bị bệnh ra khỏi đất và kiểm tra tất cả các bộ phận của cây để tìm các triệu chứng. So sánh cây bị bệnh với cây khỏe.

Héo, còi cọc và lá chuyển vàng thường là dấu hiệu của bệnh gây hại ở rễ hoặc thân cây (xem Khung 5.2). Kiểm tra cẩn thận xem rễ có bị thối, có các vết loét, u sưng hay có sự hình thành nhiều rễ con ở một phần nào đó của bộ rễ không.

Quan sát tìm cấu trúc nấm ở phần gốc thân, chẳng hạn như hạch nấm của *Sclerotium rolfsii* hoặc *Sclerotinia sclerotiorum*.

Lá có dạng khảm hoặc đốm, ngả vàng, lá quăn, lá cuốn, cây còi cọc hoặc thấp lùn có thể là dấu hiệu của bệnh gây do virút gây ra. Một số virút cũng gây các triệu chứng giống như héo.

Sử dụng kính lúp cầm tay kiểm tra các vết đốm trên lá để tìm các cấu trúc nấm như quả cành hoặc đĩa cành. Nấm phấn trắng, sương mai, và gỉ sắt cũng sinh sản trên bề mặt lá và tạo thành các khối bào tử nhìn rất rõ. Nấm sương mai thường phát triển ở mặt dưới lá. Ngược lại, nấm phấn trắng thường được thấy rõ hơn ở mặt trên lá.

Đốm lá với hình thái mọng nước, xanh trong giọt dầu thường là dấu hiệu của bệnh do vi khuẩn gây ra (xem Khung 5.3).

Cắt ngang thân để kiểm tra sự hóa nâu của mạch dẫn, dấu hiệu của bệnh héo do nấm hoặc vi khuẩn. Kiểm tra thân cắt xem có dịch khuẩn không bằng cách nhúng phần thân cắt vào nước sạch (xem Khung 5.3).

Nhiều bệnh có thể cùng gây hại ở các bộ phận khác nhau của cây cùng một thời điểm.

Bước 5

Vẽ và ghi chép lại các triệu chứng bệnh bằng sơ đồ minh họa. Dùng kính lúp cầm tay quan sát cẩn thận để tìm các cấu trúc nấm và chụp ảnh.

Khung 5.2 Phát hiện tuyến trùng

Tuyến trùng có thể gây ra các triệu chứng không điển hình (còi cọc, biến vàng và héo) trên nhiều loại cây trồng. Những triệu chứng này xuất hiện do tuyến trùng làm giảm khả năng hấp thụ nước và chất dinh dưỡng từ rễ cây.

Có thể nhận ra các dấu hiệu tổn thương do tuyến trùng gây ra bằng cách kiểm tra kỹ phần rễ cây (xem phần tuyến trùng).

Mật độ tuyến trùng trong đất có thể được xác định bằng các phương pháp dựa vào sự di chuyển của tuyến trùng để tách rời chúng ra khỏi đất (ví dụ phương pháp dùng khay Whitehead hoặc phễu Baermann), hoặc các kỹ thuật thụ động (như sàng).

Có thể nhận dạng tuyến trùng ký sinh qua sự có mặt của kim chích hút. Cấu trúc này có thể được quan sát dưới kính hiển vi hoặc kính lúp soi nổi loại tốt.

Có một số các chi tuyến trùng khác nhau có thể gây bệnh cho cây trồng. Các tuyến trùng bệnh cây thông thường gồm có *Meloidogyne* spp. và *Pratylenchus* spp.

Bước 6

Thu thập mẫu bệnh để kiểm tra và phân lập tác nhân gây bệnh trong phòng thí nghiệm. Hầu hết các mẫu cây và đất, kể cả các mẫu gồm cả rễ và đất, cần được thu thập và bảo quản trong túi giấy. Mẫu đựng trong bao ny lông thường bị hấp hơi, kích thích sự phát triển của vi khuẩn hoại sinh, làm cản trở việc phân lập tác nhân gây bệnh.

Các mẫu lá nhỏ tốt nhất nên được bảo quản trong một hộp nhựa nhỏ có lót giấy thấm.

Ghi nhãn các mẫu cẩn thận và bảo quản chúng trong thùng nước đá khi vận chuyển.

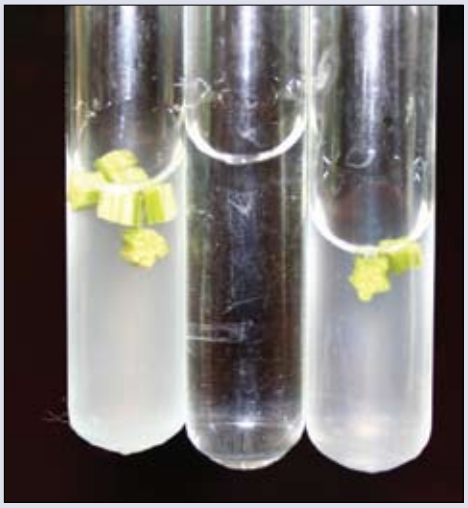
Bước 7

Phân tích thông tin đã thu thập từ nông dân, các ghi chép về triệu chứng bệnh và phân bố của bệnh để xác định tác nhân nào có khả năng gây bệnh nhất. Dùng kết quả phân tích này để định hướng cho công việc tiếp theo tại phòng thí nghiệm. Nếu có thể nên kiểm tra kỹ các mẫu bệnh trong phòng thí nghiệm trong vòng vài giờ sau khi lấy mẫu.

Bước 8

Không bước vào phòng thí nghiệm khi vẫn mang quần áo hoặc giày dép vừa đi điều tra đồng ruộng về. Tắm và thay quần áo sạch trước khi vào phòng thí nghiệm.

Khung 5.3 Phát hiện vi khuẩn gây bệnh



Vi khuẩn gây bệnh cây chỉ có thể xâm nhiễm vào cây qua các lỗ hở tự nhiên, như các lỗ hổng ở mép lá và đầu rễ, hoặc qua các vết thương gây ra do côn trùng hoặc trong quá trình phát triển rễ phụ.

Một khi đã vào trong cây, một số vi khuẩn gây bệnh có thể lan nhanh theo hệ thống mạch dẫn.

Phương pháp kiểm tra dịch khuẩn là cách chẩn đoán nhanh xem cây có bị nhiễm vi khuẩn gây héo hay không. Phương pháp này giúp phân biệt nhanh giữa các bệnh héo do vi khuẩn và do nấm gây ra. Cắt một đoạn ngắn thân cây bệnh và nhúng vết cắt vào một lọ thủy tinh nhỏ đựng nước sạch. Nếu dịch khuẩn chảy ra từ vết cắt và nước trở nên vẩn đục sau vài phút thì khả năng cây đã bị vi khuẩn gây hại. Để kết quả kiểm tra có độ tin cậy cao hơn, nên lập lại thao tác tương tự dùng một đoạn thân từ cây khỏe làm đối chứng.

6 Trong phòng thí nghiệm

Trong phần này, các hướng dẫn được đưa ra nhằm trợ giúp các cán bộ mới vào nghề, giúp họ phát triển những kỹ năng cần thiết cho một cán bộ chẩn đoán bệnh cây, bao gồm các cách:

- dùng kính hiển vi
- phân lập
- cấy truyền
- làm thuần
- giám định
- lây bệnh nhân tạo.

Với kinh nghiệm của mình, cán bộ chẩn đoán bệnh cây có thể thay đổi các quy trình sao cho có hiệu quả cao nhất. Các phương pháp bảo quản mẫu nấm sống, các công thức nấu môi trường nuôi cấy và quy tắc cũng như phương pháp khử trùng được trình bày ở Phụ lục 3.

6.1 Kiểm tra mẫu bệnh trong phòng thí nghiệm

Những quy trình sau đây được áp dụng để kiểm tra những cây có triệu chứng héo, còi cọc và bệnh trên lá. Bước đầu tiên là xem xét cẩn thận toàn bộ cây và so sánh những quan sát này với những quan sát trên đồng ruộng.

6.1.1 Héo và còi cọc

Nếu cây bị héo và còi cọc, khả năng có nguyên nhân từ bệnh héo do tắc bó mạch hoặc thối thân hoặc rễ.

1. Kiểm tra sự hóa nâu của mạch dẫn

(a) Nếu mạch dẫn hóa nâu, có thể là bệnh héo do nấm hoặc vi khuẩn. Kiểm tra dịch khuẩn.

- Nếu có dịch khuẩn, chuẩn bị đĩa cấy khuẩn.
- Nếu không có dịch khuẩn, có thể là bệnh héo Fusarium hoặc Verticillium. Cấy phần thân hóa nâu ra đĩa để phân lập nấm.

(b) Nếu mạch dẫn không hóa nâu, có thể là bệnh thối rễ hoặc thân do nấm thực hoặc một loài giống nấm hoặc tuyến trùng gây ra. (Ghi chú: nên kiểm tra thêm các triệu chứng do virút bởi vì một số virút gây bệnh cũng gây triệu chứng héo và còi cọc.)

2. Kiểm tra tìm hạch và sợi nấm

(a) Nếu có hạch, tìm cách phân lập *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. rolfsii* hoặc *Rhizoctonia* spp. dựa vào hình thái loại hạch quan sát được.

(b) Nếu không có hạch, có thể là bệnh thối rễ, tuyến trùng hoặc sưng rễ ở cây họ thập tự.

3. Kiểm tra tìm bằng chứng bệnh tuyến trùng (nốt sưng rễ hoặc vết loét rễ).

(a) Nếu có, tách tuyến trùng ra để xác định tác nhân gây bệnh và gửi đến một phòng thí nghiệm tuyến trùng để giám định loài.

(b) Nếu không có, và có thối rễ (màu nâu), tìm cách phân lập nấm hoặc tác nhân giống nấm gây bệnh

6.1.2 Các bệnh ở lá

Nếu lá có các dấu hiệu bệnh, kiểm tra vết bệnh dưới một kính lúp soi nổi.

1. Kiểm tra tìm triệu chứng khảm, vằn, lá cuốn hoặc lá còi.

(a) Nếu có, có thể là bệnh do virút. Gửi mẫu bệnh đến một phòng thí nghiệm chẩn đoán virút thực vật. (Ghi chú: biến vàng và đốm cũng có thể do virút gây ra, chẳng hạn như virút đốm vòng đu đủ và virút đốm héo cà chua.)

(b) Nếu không có, có thể tác nhân gây bệnh là nấm hoặc vi khuẩn.

2. Kiểm tra tìm đốm lá xanh trong dạng giọt dầu, cháy lá hoặc dịch khuẩn.

(a) Nếu có, có thể tác nhân gây bệnh là vi khuẩn. Phân lập bằng cách cấy dịch khuẩn từ nhựa cây lên môi trường King's B.

(b) Nếu không có, có thể tác nhân gây bệnh là nấm.

3. Kiểm tra tìm các cấu trúc nấm dưới kính lúp soi nổi.

Nếu được thực hành nhiều, nấm sương mai, gỉ trắng (*Albugo candida*), phấn trắng và gỉ sắt có thể được xác định bằng cách quan sát mẫu bệnh dưới kính lúp soi nổi và kính hiển vi. Do những nấm này đều ký sinh chuyên tính, chúng không thể phát triển trên môi trường nhân tạo.

Nếu có các dấu hiệu của các nấm bệnh khác (sợi nấm, bào tử hoặc các cấu trúc sinh sản), cần chuẩn bị mẫu lam kính để quan sát dưới kính hiển vi. Các chi gây bệnh đốm lá thông thường có thể xác định được bao gồm *Alternaria, Cercospora, Stemphylium, Septoria* và *Phomopsis*. Có thể kích thích sự hình thành bào tử bằng cách để ẩm lá bị bệnh trong điều kiện có ánh sáng. Kiểm tra lá bệnh hàng ngày để tìm dấu hiệu của nấm bệnh. (Ghi chú: nấm và vi khuẩn hoại sinh mọc nhanh trong môi trường ẩm nên có thể dẫn đến việc chẩn đoán sai.)

Cũng nên cấy mô bệnh ở mép ngoài của vết đốm lá lấy từ mẫu bệnh mới thu thập lên một môi trường nghèo dinh dưỡng để phân lập tác nhân gây bệnh (xem Phần 6.3).

6.2 Kính lúp soi nổi và kính hiển vi

Kính lúp soi nổi và kính hiển vi là những thiết bị không thể thiếu được trong một phòng thí nghiệm chẩn đoán và cán bộ chẩn đoán bệnh cây cần phải làm quen với việc điều chỉnh, bảo dưỡng và sử dụng kính.

6.2.1 Sử dụng kính lúp soi nổi

Kính lúp soi nổi được dùng để kiểm tra mẫu bệnh nhằm tìm ra các cấu trúc nấm nhỏ, như quả cành, đĩa cành, khối bào tử và quả thể với độ phóng đại thấp (tới khoảng ×100). Với kính lúp soi nổi, có thể dễ dàng lấy và chuyển những cấu trúc nấm trên sang lam kính để chuẩn bị cho việc quan sát dưới kính hiển vi với độ phóng đại cao hơn (tới ×400).

Một kính lúp soi nổi cũng được sử dụng cho các công việc tỉ mỉ như cấy đơn bào tử nảy mầm hoặc cấy đỉnh sinh trưởng của sợi nấm trong quá trình làm thuần mẫu nấm, để kiểm tra tuyến trùng và chuyển chúng sang một lam kính để quan sát dưới kính hiển vi. Bằng cách này có thể xác định xem tuyến trùng có phải là ký sinh thực vật hay không. Kính lúp soi nổi cũng rất hữu ích trong việc kiểm tra các tản nấm đang phát triển (Hình 6.1).

Mỗi kính lúp soi nổi cần có một gương gắn vào có thể điều chỉnh độ nghiêng để cung cấp ánh sáng thẳng và chéo góc cho các mẫu có độ tương phản ánh sáng thấp. Lý tưởng nhất là kính có gắn nguồn ánh sáng dùng để rọi sáng phía trên bề mặt mẫu, tuy nhiên nếu không có cũng có thể khắc phục bằng cách dùng một nguồn sáng riêng rẽ bên ngoài.

Hình 6.1 Kiểm tra các tản nấm dưới kính lúp soi nổi

6.2.2 Sử dụng kính hiển vi

Cần tuân thủ cẩn thận các chỉ dẫn đi kèm theo kính hiển vi để đảm bảo kính được dùng đúng cách và tránh hư hại.

Điều quan trọng là không được để vật kính bị xước hoặc chạm vào mặt thạch, nấm hoặc các mẫu nhuộm. Các miếng lamen thường rất mỏng và, nếu vỡ, có thể làm đứt tay.

Điều chỉnh kính hiển vi

1. Đặt một lam kính chứa mẫu trên bàn giữ của kính hiển vi.
2. Bật đèn và điều chỉnh ánh sáng đến khoảng 50% độ sáng.
3. Chỉnh mẫu thật nét với vật kính ×10.
4. Đóng màng ngăn quang trường của kính cho nhỏ lại.
5. Chỉnh độ nét màng ngăn quang trường bằng cách thay đổi độ cao của tụ kính.
6. Xoay hai nút chỉnh trung tâm tụ sáng cho đến khi ảnh của màng ngăn quang trường ở trung tâm - chi tiết này rất quan trọng!
7. Mở màng ngăn quang trường cho đến khi vừa ra khỏi tầm nhìn (nghĩa là cho đến khi vừa lớn hơn khung nhìn một chút).
8. Chỉnh màng chỉnh độ mở để nhìn rõ mẫu. Số chỉnh (số độ mở) trên màng chỉnh độ mở nên vào khoảng 75% của số độ mở vật kính đang sử dụng.
9. Quan sát mẫu (Hình 6.2 và 6.3).

6.2.3 Chuẩn bị mẫu lam kính

Các mẫu bào tử nấm hoặc cấu trúc tạo bào tử như túi quả cành, quả thể bầu hoặc quả thể kín có thể được cố định trên lam kính trong nước.

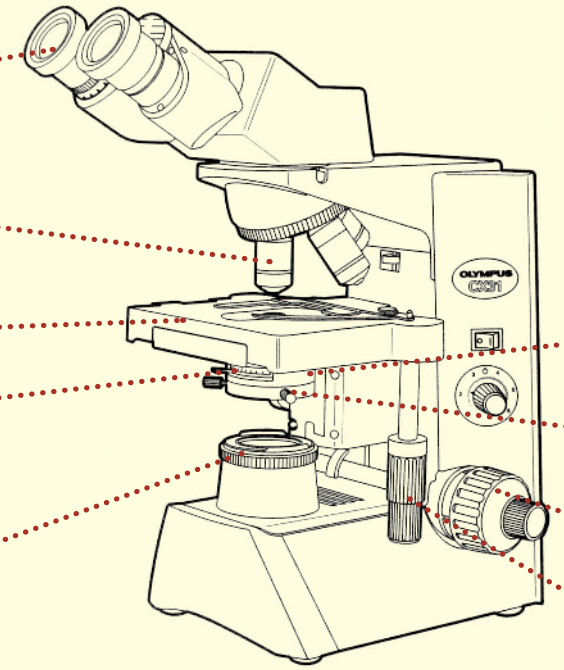
Cố định mẫu trong nước

1. Nhỏ một giọt nước cất nhỏ lên lam kính.
2. Đặt mẫu vào vị trí giọt nước, dưới một kính lúp soi nổi.
3. Đặt lamen sao cho một cạnh chạm lam kính gần mép giọt nước.
4. Từ từ hạ cạnh bên kia của lamen xuống sao cho lamen trùm lên trên giọt nước - phương pháp này giúp đẩy các bọt khí ra khỏi mẫu lam.
5. Dùng một miếng giấy thấm hoặc giấy lọc để thấm đi phần nước thừa phía ngoài lamen.

Các bào tử từ cây bị bệnh hoặc mẫu nấm được nuôi cấy nhân tạo có thể được lấy ra dùng một que cấy và đặt vào vị trí giọt nước.

Các cấu trúc tạo bào tử lớn hơn cần được kiểm tra dưới kính lúp soi nổi, sau đó được đặt vào một giọt nước và làm dẹp bằng cách dùng một dụng cụ có bề mặt phẳng ép nhẹ lên lamen. Khi kiểm tra lại bằng mẫu lam, có thể phân biệt được quả cành và quả thể: quả cành chỉ chứa bào tử phân sinh trong khi cả quả thể kín và quả thể bầu chứa cả túi bào tử và bào tử túi.

Hình 6.2 Quan sát bào tử nấm dưới kính hiển vi



Hình 6.3 Các bộ phận của kính hiển vi

Các cấu trúc với mô mềm, như quả thể đĩa của *Sclerotinia sclerotiorum*, cần dùng lưỡi dao cạo ướt hoặc dao mổ cắt thành những lát mỏng rồi đặt vào vị trí giọt nước để làm mẫu lam.

6.3 Phân lập nấm gây bệnh

Không cần phải tuân thủ một cách chính xác những kỹ thuật phân lập nấm gây thối rễ, thân và lá sau đây, mà có thể sử dụng những kỹ thuật này làm định hướng và thay đổi chúng tùy theo từng tác nhân gây bệnh và cây trồng cụ thể sao cho có kết quả tốt nhất. Điều quan trọng là học hỏi và tích lũy kinh nghiệm bằng cách thử nghiệm các phương pháp khác nhau.

Cán bộ làm công tác chẩn đoán bệnh cây nên tham dự các khóa tập huấn về các kỹ năng trong phòng thí nghiệm nếu họ chưa từng được tập huấn về các kỹ năng này trước đây. Điều quan trọng là học cách phân biệt giữa các loài gây bệnh và với các loài hoại sinh thông thường.

Thực hành quy trình phân lập và cấy truyền với một loạt các nấm bệnh khác nhau.

Các kỹ thuật phân lập có thể được cải thiện bằng cách:

- thay đổi thời gian khử trùng bề mặt mẫu bệnh
- gọt bỏ lớp ngoài mẫu bệnh
- điều chỉnh thành phần môi trường nuôi cấy (chẳng hạn như pH, dinh dưỡng và nồng độ aga)
- thêm kháng sinh vào môi trường.

Cồn êtyl (70%) là chất khử trùng bề mặt chuẩn cho các dụng cụ phòng thí nghiệm và các mẫu bệnh. Dung dịch Javen cũng có thể được dùng làm chất khử trùng bề mặt, nhưng thường mất tác dụng nếu để lâu và tiếp xúc trực tiếp với ánh sáng.

Luôn luôn thấm khô mô bệnh trên giấy thấm đã được khử trùng trước khi phân lập.

Chọn mô mới bị bệnh để phân lập. Không nên sử dụng các mô đã bị bệnh lâu bởi vì trên bề mặt các mô bệnh này thường có rất nhiều nấm và vi khuẩn hoại sinh phát triển.

Bề mặt của mô cây thường có nhiều nấm và vi khuẩn hoại sinh, chúng cần phải được tiêu diệt trước khi có thể phân lập tác nhân gây bệnh. Nhiều loại nấm và vi khuẩn hoại sinh mọc rất nhanh trên môi trường phân lập, vì thế rất khó để phân lập tác nhân gây bệnh.

Không dùng môi trường thạch đường khoai tây (PDA) hoặc môi trường giàu hydrat cacbon để phân lập nấm từ các mô cây bị bệnh, nhất là nếu phân lập từ rễ. Nấm và vi khuẩn hoại sinh mọc rất nhanh trên các môi trường giàu hydrat cacbon và ức chế sự phát triển của nấm bệnh mọc chậm hơn.

Sự thành công trong việc phân lập nấm từ mô cây bị bệnh phụ thuộc vào một số yếu tố:

- loại mô bị bệnh (lá, thân, rễ)
- phương pháp khử trùng bề mặt
- thao tác cấy
- môi trường phân lập
- các điều kiện nuôi các đĩa phân lập.

Kinh nghiệm quá khứ là một công cụ vô giá trong việc lựa chọn quy trình phân lập phù hợp. Kinh nghiệm thường giúp phán đoán loại nấm gây bệnh nào có khả năng gây ra các triệu chứng đặc biệt nào đó. Khi còn nghi ngờ, nên lấy thông tin từ các cơ sở dữ liệu bằng hình ảnh, sổ lưu thông tin mẫu bệnh và các tài liệu đã phát hành.

6.3.1 Phân lập từ lá và thân

Việc phân lập từ thân thường được cải thiện bằng cách gọt bỏ phần vỏ hoặc các mô thân bên ngoài trước khi khử trùng bề mặt.

Các bước cơ bản phân lập từ lá hoặc thân

1. Lau sạch bàn làm việc bằng cồn êtyl 70%
2. Nhúng dụng cụ (kẹp và dao hoặc dao mổ) trong cồn êtyl 70% và hơ khô trên ngọn lửa. (Cồn mêtyl có thể được dùng thay cho cồn êtyl.)
3. Rửa mẫu lá hoặc thân trong nước để loại bỏ đất bụi và các tạp chất khác.

4. Khử trùng bề mặt mô lá hoặc thân bằng cách dùng giấy mềm (giấy ăn) đã nhúng cồn êtyl 70% lau mặt lá hoặc bằng cách nhúng nhanh lá dày vào cồn êtyl 70% trong 5 giây, rửa lại trong nước vô trùng và để khô trên giấy thấm vô trùng.
5. Dùng dụng cụ đã khử trùng cắt những miếng cấy nhỏ (khoảng 2 × 2 mm) từ phần ranh giới giữa mô khỏe và mô bệnh, sau đó cấy lên môi trường nghèo dinh dưỡng (như thạch nước cất [WA]) hoặc môi trường chọn lọc, đặt những miếng cấy gần mép đĩa.
6. Đặt đĩa cấy ở nhiệt độ khoảng 25°C, lý tưởng là trong điều kiện ánh sáng.
7. Kiểm tra đĩa cấy hàng ngày, khi các tản nấm phát triển từ những miếng cây, cấy truyền chúng (chú ý cắt ở mép ngoài tản nấm) sang môi trường như PDA hoặc WA có chứa các miếng mô cây đã khử trùng, chẳng hạn như cọng lúa còn xanh, lá cẩm chướng hoặc quả đậu. (Các miếng mô cây đã được khử trùng kích thích sự hình thành bào tử, giúp cho việc giám định tác nhân gây bệnh.)
8. Giám định lần cuối dùng mẫu cấy đã được làm thuần từ một bào tử nảy mầm hoặc đỉnh sinh trưởng của sợi nấm. (Các thao tác này được mô tả trong Phần 6.5.1 và 6.5.2.)

Môi trường dùng để phân lập tùy thuộc vào loại nấm được nghi là tác nhân gây bệnh. Môi trường thạch nước cất hoặc PDA một phần tư độ mạnh, chứa kháng sinh nếu cần, là những môi trường phân lập phổ biến nhất. Có thể sử dụng môi trường phân lập chọn lọc như peptone pentachloronitrobenzene agar (PPA) cho *Fusarium* spp. và môi trường chọn lọc *Phytophthora* (PSM) cho *Phytophthora* spp.

Các nấm hoại sinh, như *Alternaria, Pestalotia* và *Cladosporium*, thường phát triển trên các mô lá chết. Sự có mặt của những nấm này có thể gây khó khăn cho việc phân lập các loài *Alternaria* hoặc nấm lá khác gây bệnh, như *Stemphylium* và *Bipolaris*.

Phương pháp khác để phân lập nấm gây bệnh đốm lá

1. Đặt cả lá hoặc một mảnh lá trên giấy ẩm trong đĩa Petri ở môi trường để ẩm.
2. Đặt mẫu lá ở nhiệt độ khoảng 25°C dưới ánh sáng để thúc đẩy việc tạo bào tử.
3. Kiểm tra sau 1-2 ngày dưới kính lúp soi nổi để tìm bào tử hoặc các cấu trúc tạo bào tử như quả cành, đĩa cành hoặc khối bào tử.
4. Thêm vào môi trường phân lập chứa WA một giọt axít lactic (làm giảm pH và hạn chế sự phát triển của vi khuẩn) hoặc kháng sinh (như trong môi trường PPA).
5. Dùng một que cấy vô trùng cấy chuyển bào tử vào đĩa.

6.3.2 Phân lập từ rễ mảnh, nhỏ

Các rễ con mảnh, nhỏ, và các rễ phụ làm nhiệm vụ hấp thụ dinh dưỡng cho sự phát triển của cây và quan trọng cho sức khỏe của cây. Các tác nhân gây bệnh như *Rhizoctonia, Pythium, Phytophthora* và *Phoma* thường gây bệnh ở những bộ phận này.

Nhiều nấm (như một số *Fusarium* spp. và *Trichoderma* spp.) và vi khuẩn hoại sinh thường xâm nhập vào các tế bào ngoài của vỏ rễ. Vì vậy, việc phân lập tác nhân gây bệnh từ rễ con có thể gặp khó khăn.

Không khử trùng bề mặt các rễ con quá mức bởi vì chất khử trùng có thể tiêu diệt tất cả các nấm ký sinh trong rễ con, bao gồm cả nấm gây bệnh.

Phân lập từ rễ mảnh, nhỏ

1. Chọn những rễ con có cả phần khỏe (không triệu chứng) và phần bị bệnh, rửa chúng bằng nước vô trùng đựng trong lọ nhỏ, thay nước 3 lần. Thêm một giọt thuốc tẩy vào lọ trong lần rửa đầu tiên.
2. Lau chùi bàn làm việc bằng cồn êtyl 70%.
3. Nhúng dụng cụ (kẹp và dao hoặc dao mổ) trong cồn êtyl 70% và hơ khô trên ngọn lửa. (Cồn mêtyl có thể thay thế cho cồn êtyl)
4. Nhúng qua các rễ con trong cồn êtyl 70%, rửa nhanh trong nước vô trùng và để khô trên giấy thấm đã khử trùng. Cách khác, khử trùng bề mặt rễ con bằng dung dịch Javen 1% trong cồn êtyl 10% chỉ trong khoảng 10-15 giây, sau đó rửa bằng nước vô trùng ngay lập tức và để khô trên giấy thấm vô trùng trong tủ cấy vô trùng.
5. Dùng dụng cụ đã khử trùng cắt rễ thành từng miếng dài 1-2 mm ở phần ranh giới giữa mô khỏe và mô bệnh sau đó cấy lên WA hoặc môi trường chọn lọc.
6. Ấn nhẹ các miếng cấy lên mặt thạch sao cho chúng tiếp xúc tốt với kháng sinh trong môi trường phân lập.
7. Đặt đĩa cấy ở nhiệt độ khoảng 25°C và quan sát hàng ngày dưới kính lúp soi nổi để kiểm tra nấm mọc từ các miếng rễ cấy.
8. Cấy truyền từng tản nấm lên môi trường PDA hoặc WA có chứa các miếng mô cây đã khử trùng, như các mẩu thân lúa còn xanh.
9. Làm thuần nấm bằng cách cấy đỉnh sinh trưởng của sợi nấm (xem Phần 6.5.1) hoặc cấy đơn bào tử nảy mầm (xem Phần 6.5.2) trước khi giám định lần cuối cùng.

Cần chú ý là việc phân lập một số nấm hoại sinh cùng một lúc với nấm bệnh từ mô rễ bị bệnh là thường xảy ra. Với kinh nghiệm, chỉ bằng quan sát có thể nhận ra một số nấm bệnh trên môi trường PDA. Phải tiến hành lây bệnh nhân tạo trước khi khẳng định nguyên nhân gây bệnh.

6.3.3 Phân lập từ rễ và thân gỗ

Nấm gây bệnh ở rễ thường phải được phân lập từ rễ chính hoặc gốc thân của cây thân gỗ. Nhìn chung phân lập từ mô thân dễ thành công hơn. Thông thường có ít vi sinh vật hoại sinh ở phần gốc thân hơn là phần rễ đã hóa gỗ.

Việc chọn lựa phương pháp khử trùng tùy thuộc vào mức độ hóa gỗ của mô. Khử trùng bề mặt các phần thân mềm hơn có thể chỉ đơn giản bằng cách lau hoặc xịt cồn êthanol 70% trước khi cấy lên môi trường nhân tạo.

Phân lập từ rễ và thân gỗ

1. Cắt bỏ các rễ phụ (Hình 6.4).
2. Rửa mẫu trong nước với một chút nước tẩy rửa để loại bỏ đất và các tạp chất khác.
3. Gọt bỏ lớp ngoài của thân hoặc rễ vì đây thường là nơi chứa các vi sinh vật hoại sinh.
4. Bỏ đi phần dưới của thân nơi tiếp giáp với mặt đất. Việc lựa chọn mô để phân lập phụ thuộc vào mức độ bệnh hại. Không cố phân lập từ các mô bệnh đã cũ. Lý tưởng nhất là dùng các mẩu mô cấy lấy từ ranh giới giữa mô khỏe và mô bệnh.
5. Phun xịt mẫu bằng cồn 70%.
6. Hơ qua lửa để đốt bớt lượng cồn thừa, hoặc nếu thân mềm thì để cho cồn tự bay hơi.
7. Cắt những miếng mô thân mỏng và cấy lên môi trường nghèo dinh dưỡng hoặc môi trường chọn lọc.

6.3.4 Bẫy đất

Bẫy đất là một phương pháp gián tiếp để phân lập các loài *Phytophthora* và *Pythium* từ đất hoặc rễ.

Bẫy nấm từ đất bằng táo hoặc các quả khác

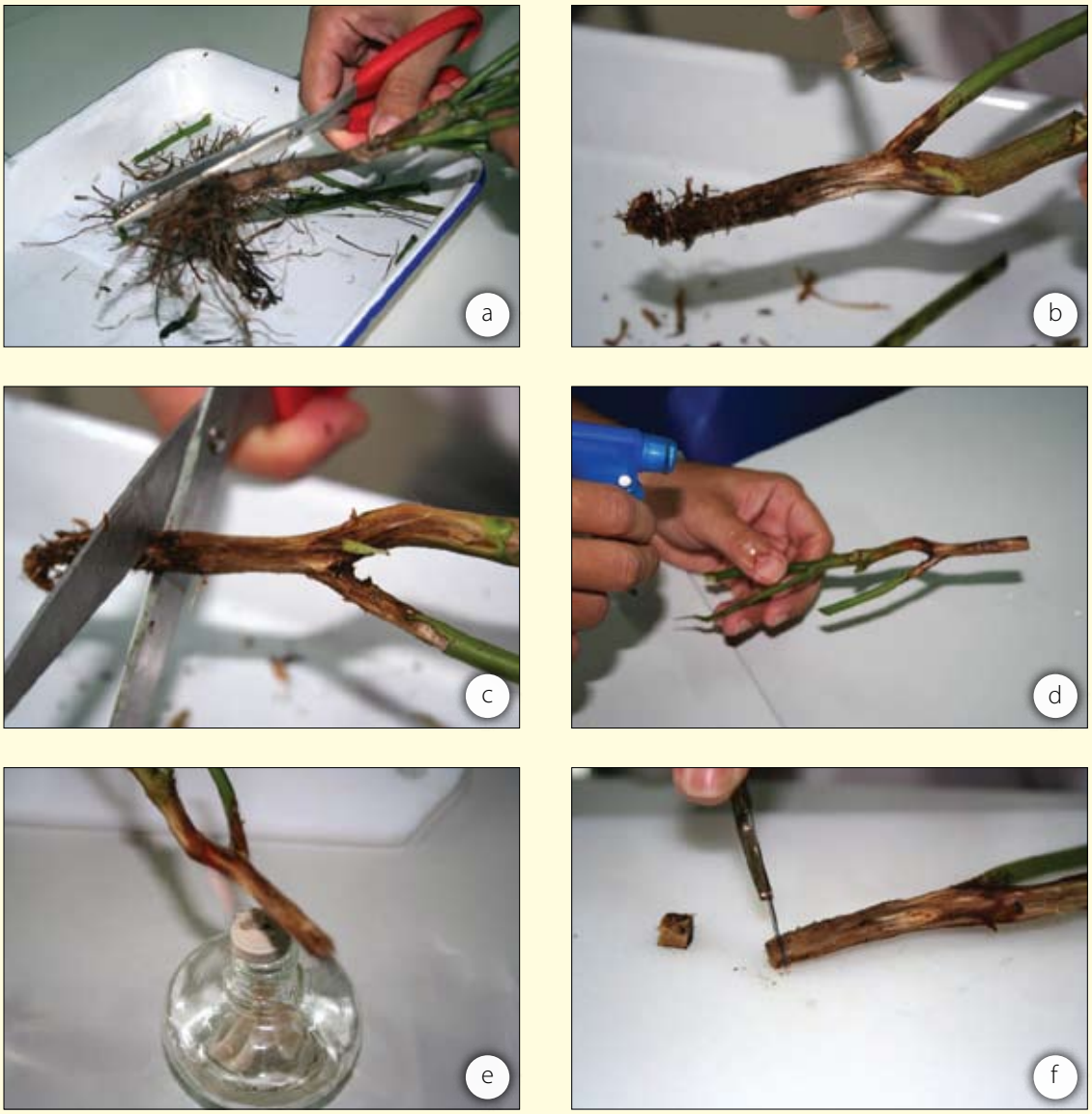
1. Lau táo với cồn.
2. Dùng một cái khoan nút chai sạch cắt một lỗ có đường kính khoảng 10 mm từ một bên tới lõi.
3. Bỏ đất đầy lỗ và dán lỗ bằng một miếng băng dính để đất khỏi rơi ra ngoài.
4. Đặt táo ở nhiệt độ phòng có ánh sáng.
5. Phân lập nấm sau 1-3 ngày từ phần ranh giới giữa mô khỏe và mô bệnh màu nâu lan ra từ phần đất bẫy.

Phương pháp này không phải là hoàn toàn chọn lọc bởi vì nhóm nấm tiếp hợp mọc nhanh cũng có thể gây các vết thương tương tự.

Bẫy từ dung dịch đất bằng lá và cánh hoa

Các loài *Phytophthora* và *Pythium* có thể được phân lập từ đất bằng cách thả nổi lá hoặc cánh hoa hồng sạch trên dung dịch đất bẫy. Nếu có các loài này trong đất, du động bào tử được hình thành di chuyển lên phía trên và xâm nhiễm vào lá hoặc cánh hoa. Đây là phương pháp chọn lọc bởi vì nó thích hợp cho việc phân lập các loài sản sinh ra du động bào tử.

1. Cho khoảng 100g đất vào một cốc nhựa.
2. Đổ nước vô trùng hoặc nước cất vào cốc sao cho ngập đất khoảng 5-10cm.



Hình 6.4 Kỹ thuật phân lập tác nhân gây bệnh từ các mô hóa gỗ: (a) cắt rời rễ phụ, (b) rửa mẫu, (c) cắt bỏ phần dưới thân ở chỗ tiếp giáp với mặt đất, (d) phun xịt mẫu với cồn 70%, (e) để cồn bay hơi, (f) cắt mô thân cây bệnh thành từng miếng cấy nhỏ

3. Thả vào cốc những mẩu bộ phận tươi của cây trồng mẫn cảm với bệnh, các vật liệu bẫy này sẽ nổi trên mặt nước.
4. Đặt cốc nguyên vị trí trong vòng 2-4 ngày.
5. Phân lập nấm sau 2-3 ngày từ mép vết bệnh đã phát triển trên vật liệu bẫy sau khi rửa trong nước vô trùng và khử trùng bề mặt, dùng môi trường chọn lọc (như PSM).

Vật liệu bẫy cũng có thể là các loại cây trồng ký chủ của *Phytophthora* hoặc *Pythium*. Vật liệu có thể dùng để bẫy bao gồm lá ớt, cánh hoa hồng, lá cây có múi, cây con ớt, đậu lupin và đậu tương. Nếu bẫy không tự nổi được, có thể treo bẫy lên nắp cốc sao cho bẫy lơ lửng ở mặt nước hoặc gắn vào một miếng xốp hay một vật liệu nổi thích hợp.

Phân lập từ rễ con dùng cây ký chủ làm bẫy

1. Rửa rễ con bị bệnh (Hình 6.5).
2. Đặt rễ con vào một cốc nhựa và đổ nước vô trùng hoặc nước cất vào cốc.
3. Thả nổi một lá cây ký chủ vào cốc.
4. Để cốc nguyên vị trí trong 2-4 ngày.
5. Phân lập nấm sau 2-3 ngày từ mép ngoài của vết bệnh đã phát triển trên lá bẫy sau khi rửa bằng nước vô trùng và khử trùng bề mặt, dùng môi trường chọn lọc (như PSM).

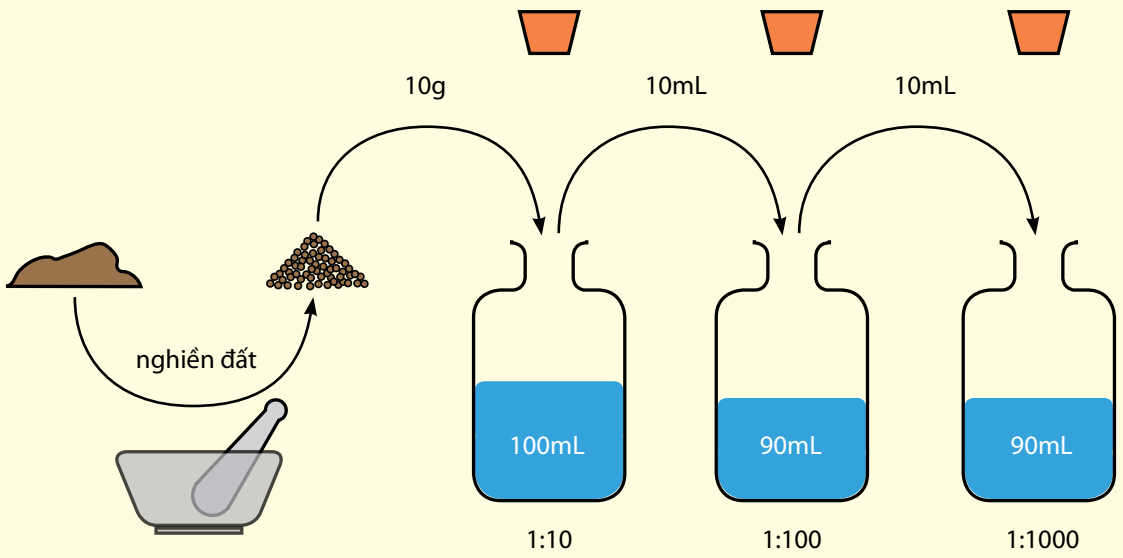
6.3.5 Phương pháp pha loãng dung dịch đất

Phương pháp pha loãng dung dịch đất được sử dụng để phân lập các loài *Fusarium* từ đất khô bằng môi trường chọn lọc PPA. Phương pháp này có thể được áp dụng để phân lập một số loài nấm khác sử dụng các môi trường chọn lọc thích hợp.

Hình 6.5 Bẫy *Phytophthora* từ đất bằng cánh hoa và lá

Phân lập từ đất khô bằng phương pháp pha loãng dung dịch đất

1. Phơi mẫu đất cho khô, dùng cối chày nghiền sơ đất (loại cối chày làm bằng đá dùng trong nấu bếp) và trộn đều.
2. Cho 10g mẫu đất vào một lọ có chứa 100mL WA 0.01% đã hấp tiệt trùng, tạo dung dịch 1:10.
3. Đổ 10mL dung dịch sang lọ thứ hai chứa 90mL WA 0.01% tạo dung dịch 1:100 và lắc đều để đảm bảo đất được phân tán đều trong dung dịch. Lặp lại bước này để có dung dịch với nồng độ 1:1000, thường thì độ loãng này là phù hợp cho việc phân lập *Fusarium* từ đất trồng rau màu (Hình 6.6).
4. Phân tán đều 1mL dung dịch đất trên bề mặt môi trường phân lập trong một đĩa Petri đường kính 90mm:
   - chuẩn bị các đĩa môi trường phân lập và để khô trong vài ngày để loại bỏ hơi nước đọng trên bề mặt đĩa
   - dùng pipette cẩn thận hút 1mL dung dịch đất cho vào một phía ở rìa của đĩa môi trường
   - cầm đĩa hơi nghiêng từ mép có dung dịch và lắc nhẹ vuông góc với chiều dốc để dung dịch ướt đều trên bề mặt đĩa.
5. Đặt các đĩa phân lập này dưới ánh sáng trong 5-7 ngày cho đến khi các tản nấm phát triển.
6. Cấy truyền các tản nấm và làm thuần chúng bằng phương pháp cấy đơn bào tử lên môi trường PDA, thạch lá cẩm chướng (CLA), hoặc thạch nước cất có chứa một mẩu mô cây đã khử trùng.



Hình 6.6 Sơ đồ các nồng độ sử dụng trong phương pháp pha loãng dung dịch đất

Mặc dù nồng độ pha loãng 1:1000 thường được sử dụng, độ loãng thích hợp nên sử dụng khi cho kết quả 10-30 tản nấm trên mỗi đĩa (Hình 6.7). Vì mật độ *Fusarium* trong đất tùy thuộc vào lịch sử ruộng trồng và loại đất, có thể cần phải điều chỉnh nồng độ pha loãng để có được một kết quả mong muốn.

Hình 6.7 Đĩa phân lập từ dung dịch đất pha loãng chứa *Fusarium* spp. trên môi trường thạch peptôn PCNB (lý tưởng là số tản nấm khoảng từ 10 đến 30)

Nếu quy trình phân lập được thiết kế để cung cấp số liệu định lượng, dùng 3-5 đĩa nhắc lại cho mỗi nồng độ và sử dụng vài mẫu đất. Có thể có sự khác nhau đáng kể giữa các đĩa nhắc lại và giữa các mẫu đất.

Phương pháp này không xác định được số lượng bào tử trong đất, mà là lượng 'mầm bệnh' của một loài trong đất. Các mầm bệnh có thể gồm bào tử phân sinh, bào tử hậu và các mảnh sợi nấm trong tàn dư thực vật bị bệnh. Số lượng những đơn vị tạo tản nấm (colony-forming units - CFU) này trong mỗi gram đất có thể được tính cho mỗi loài dùng công thức sau:

Độ loãng × số tản nấm trung bình của loài nấm trên các đĩa phân lập = CFU/g đất

6.4 Cấy truyền từ các đĩa phân lập

Cấy truyền là bước trung gian giữa phân lập từ mẫu bệnh và làm thuần vi sinh vật gây bệnh. Giai đoạn này giúp xác định vi sinh vật nào đã được phân lập.

Quy trình cấy truyền

1. Kiểm tra các đĩa cấy hàng ngày dưới kính lúp soi nổi và đánh giá sự phát triển của sợi nấm từ các miếng cấy.
2. Xác định xem có nhiều hơn một loài nấm mọc lên hay không.
3. Cấy truyền khi sợi nấm mọc được khoảng 5mm từ miếng cấy.
4. Cắt một miếng thạch nhỏ (2 × 2 mm) từ rìa mỗi tản nấm và cấy sang môi trường PDA hoặc một môi trường có chứa giá thể tự nhiên (như môi trường CLA hoặc môi trường thạch thân lúa còn xanh).

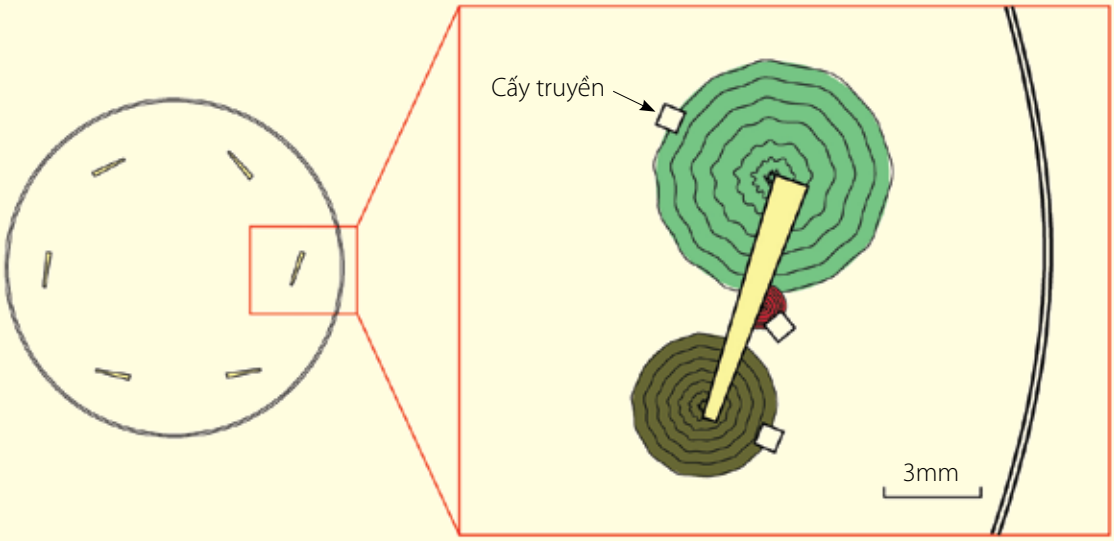
Có một số bệnh nấm mà tác nhân gây bệnh được phân lập một cách dễ dàng và các vi sinh vật hoại sinh hiếm khi cản trở việc phân lập. Chẳng hạn như *Sclerotinia sclerotiorum* và *Sclerotium rolfsii* có thể được phân lập dễ dàng từ ranh giới giữa mô khỏe và mô bệnh ở thân bệnh còn xanh.

Việc phân lập từ các bộ phận khác của cây có thể khó khăn hơn. Khi phân lập từ rễ bị bệnh, thường có khoảng hai loại nấm hoặc nhiều hơn mọc từ rễ, thậm chí ngay cả trên môi trường chọn lọc (Hình 6.8). Vấn đề tương tự có thể xảy ra khi tìm cách phân lập nấm bệnh từ vết đốm lá, bởi vì nấm hoại sinh mọc nhanh trên các mô lá bị bệnh. Cần chú ý cấy truyền khi các tản nấm còn nhỏ vì cấy truyền được thực hiện dễ dàng hơn trước khi các loài mọc nhanh mọc lấn át các loài mọc chậm.

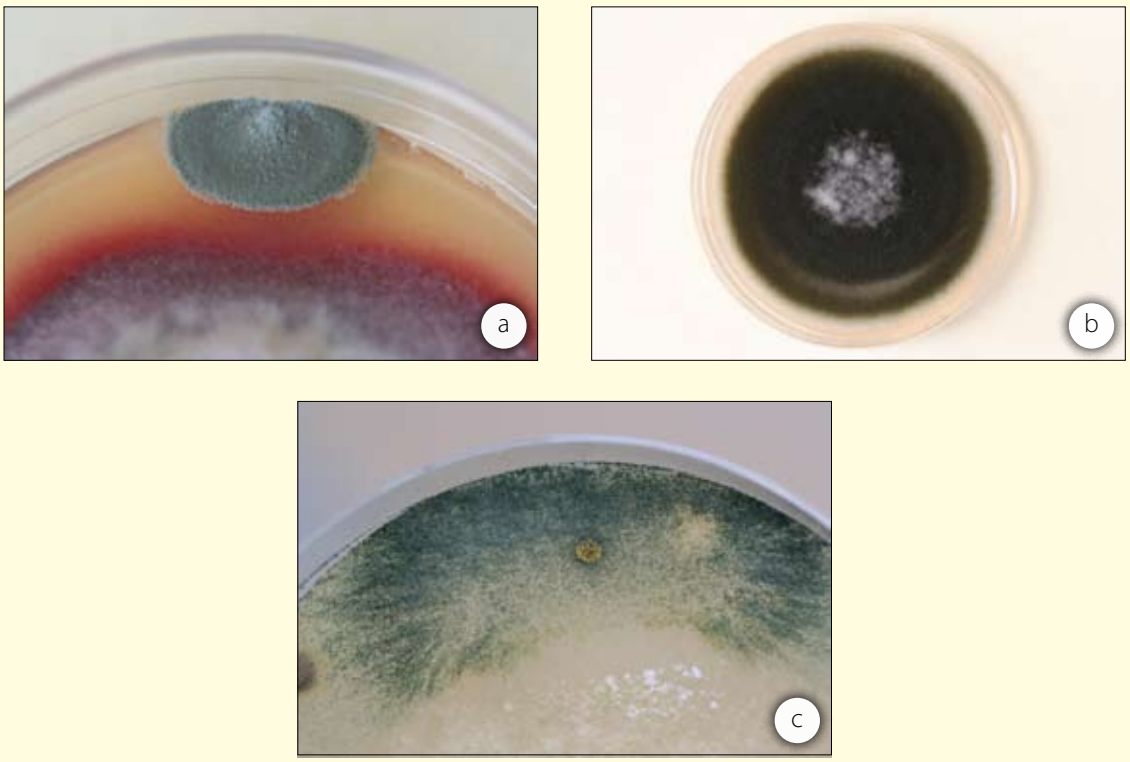
Vì vậy, cần kiểm tra các đĩa phân lập hàng ngày để tìm nấm mọc. Quan sát các miếng cấy xem có hiện tượng hình thành bào tử không, đây có thể là dấu hiệu nhận ra tác nhân gây bệnh. Tuy nhiên, nên lưu ý rằng bào tử hình thành có thể từ nấm hoại sinh.

Thực hành nhiều sẽ dẫn đến sự thành công! Thực hành phân lập trên nhiều loại nấm bệnh khác nhau để lấy kinh nghiệm và để học cách nhận biết sự phát triển của các nấm gây bệnh thông thường trên các đĩa phân lập.

Các nấm hoại sinh thường xuất hiện trong mô bệnh và thường phát triển trên đĩa cấy phân lập (Hình 6.9). Một số, như *Trichoderma*, cản trở quá trình phân lập. Các nấm hoại sinh lan truyền qua không khí, như *Penicillium* và *Cladosporium* cũng có thể gây nhiễm các đĩa cấy.



Hình 6.8 Sơ đồ một đĩa phân lập từ rễ cho thấy (hình trong) nhiều loại nấm mọc ra từ cùng một đoạn rễ



Hình 6.9 Những nấm tạp thường thấy trên các đĩa cấy: (a) *Penicillium* sp. (gây tạp từ không khí), (b) *Cladosporium* sp. (trong mẫu cấy sạch), (c) *Trichoderma* sp. (mọc từ một mẩu rễ bị bệnh)

Một khi các mẫu cấy truyền phát triển thành các tản nấm, chúng có thể được nhóm lại theo hình thái tản nấm và các đặc tính hình thái khác cho việc giám định ban đầu. Các nấm hoại sinh phổ biến có thể được xác định, loại bỏ và các nấm có thể là tác nhân gây bệnh có thể được làm thuần bằng phương pháp cấy đỉnh sinh trưởng sợi nấm hoặc cấy đơn bào tử sang một môi trường thích hợp để giám định sau này.

6.5 Làm thuần mẫu nấm

Giai đoạn cuối cùng trong việc giám định nấm gây bệnh là việc làm thuần mẫu nấm. Chỉ một bào tử hoặc một đỉnh sinh trưởng của sợi nấm được cấy sang môi trường sạch để đảm bảo nấm được cấy là hoàn toàn thuần.

6.5.1 Cấy đơn bào tử

Cấy đơn bào tử là quá trình cấy truyền một bào tử đã nảy mầm để tạo một mẫu nấm thuần (Hình 6.10). Phương pháp này thích hợp cho việc làm thuần những chi nấm tạo bào tử trên môi trường nhân tạo, như *Fusarium, Colletotrichum, Alternaria, Stemphylium, Bipolaris, Verticillium* và *Phoma*.

Cấy đơn bào tử

1. Khử trùng que cấy.

2 & 3. Tạo dung dịch bào tử bằng cách dùng que cấy lấy một lượng nhỏ sợi nấm trên mặt thạch có lẫn bào tử hoặc lấy một chút bào từ từ khối bào tử lớn của *Fusarium* spp. rồi cho vào ống nghiệm chứa 10mL nước vô trùng.

4. Lắc ống nghiệm để phân tán các bào tử và kiểm tra mật độ bào tử bằng cách quan sát ống nghiệm trước ánh sáng hoặc kiểm tra một giọt dịch bào tử dưới kính lúp soi nổi. Tránh tạo dịch bào tử với mật độ bào tử quá cao. Bằng kinh nghiệm, mật độ bào tử có thể được đánh giá bằng mắt thường khi nhìn ống nghiệm.

5. Làm loãng với nước vô trùng nếu cần.

6. Đổ dịch bào tử vào một đĩa Petri có chứa một lớp mỏng môi trường thạch nước cất.

7. Đổ dịch bào tử thừa từ đĩa Petri đi. Một số bào tử sẽ nằm lại trên mặt thạch.

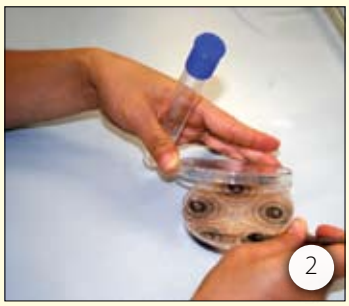
8. Để dựng đĩa Petri trong khoảng 18 giờ cho đến khi bào tử nảy mầm.

9. Kiểm tra đĩa Petri dưới kính lúp soi nổi với nguồn sáng phía dưới. (Điều chỉnh gương trên nguồn sáng cẩn thận để có sự tương phản tốt giữa thạch, bào tử, và các ống mầm.)

10. Dùng một que cấy dẹp cắt lấy ra một bào tử nảy mầm (Hình 6.11) và chuyển sang một đĩa môi trường mới (Phụ lục 1 mô tả cách làm một que cấy dẹp).

Khử trùng que cấy

Cạo các bào tử từ rìa tản nấm



Cho bào tử vào nước vô trùng

Kiểm tra mật độ bào tử

Làm loãng nếu cần

Đổ dịch bào tử vào một đĩa môi trường thạch nước cất mỏng

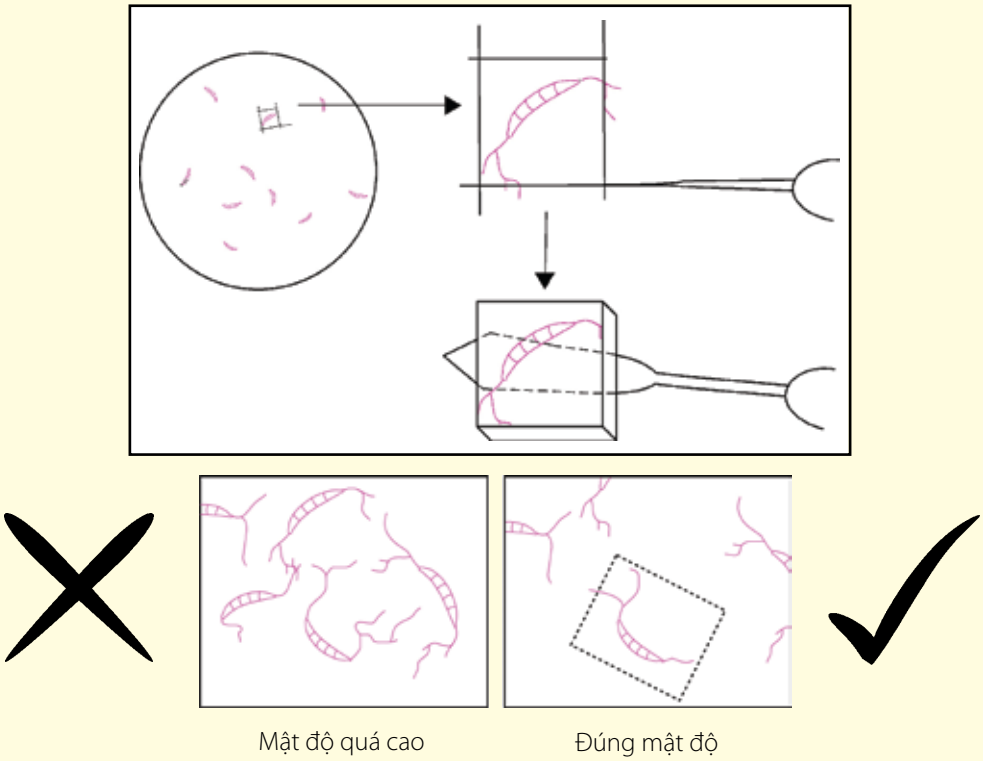
Đổ bỏ dịch bào tử thừa

Để dựng đĩa lên trong 18 giờ

Dùng que cấy đã khử trùng cắt một bào tử đã nảy mầm

Chuyển sang một môi trường mới

Hình 6.10 Các bước cấy đơn bào tử



Hình 6.11 Quy trình cấy đơn bào tử, thao tác chọn lựa một bào tử đúng cách

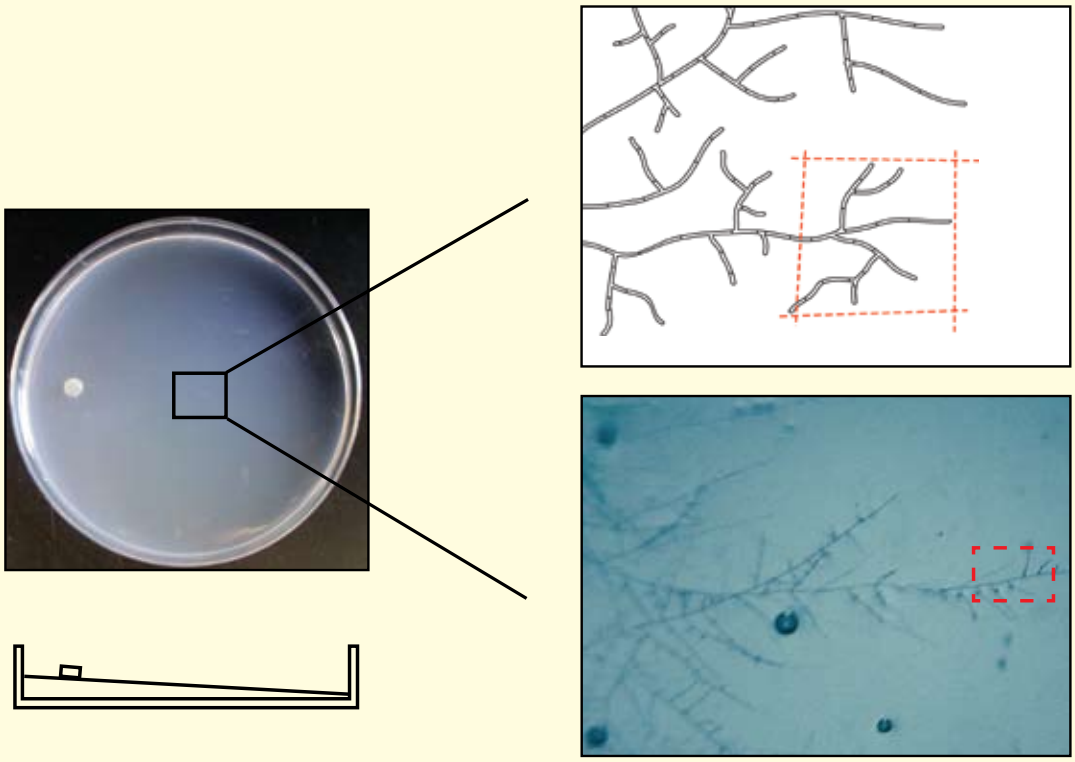
6.5.2 Cấy đỉnh sinh trưởng sợi nấm

Cấy đỉnh sinh trưởng sợi nấm là quá trình cấy truyền đỉnh sinh trưởng của một sợi nấm để tạo một mẫu nấm thuần. Phương pháp này thích hợp cho việc làm thuần các chi nấm như *Phytophthora, Pythium, Rhizoctonia, Sclerotium* và *Sclerotinia*.

Cấy đỉnh sinh trưởng sợi nấm

1. Đổ môi trường thạch nước cất vào đĩa Petri để nghiêng sao cho phần thạch ở một phía của đĩa nông (Hình 6.12).
2. Cấy truyền một miếng nhỏ nấm từ đĩa phân lập vào một bên đĩa nơi thạch sâu hơn.
3. Đặt đĩa dưới kính lúp soi nổi và điều chỉnh tiêu điểm sợi nấm ở rìa tản nấm. (Các sợi nấm sẽ mọc rất thưa ở phần nông của thạch)
4. Điều chỉnh nguồn sáng (gương) nhằm đạt độ tương phản tốt giữa môi trường và sợi nấm.
5. Dùng que cấy dẹp đã khử trùng cấy một miếng thạch nhỏ chứa đỉnh sinh trưởng của một sợi nấm sang một đĩa môi trường thích hợp.

Chỉ cấy phần đỉnh của một sợi nấm duy nhất để đảm bảo mẫu nấm được làm thuần hoàn toàn.



Hình 6.12 Cấy đỉnh sinh trưởng sợi nấm, ví dụ đầu của một sợi nấm *Rhizoctonia* sp. được lấy từ đĩa môi trường thạch nghiêng.

6.6 Nhận biết các mẫu nấm thuần

Có thể có sự khác nhau đáng kể trong hình thái và màu sắc các tản nấm của cùng một loài. Việc chẩn đoán trở nên dễ dàng hơn khi các cán bộ chẩn đoán học cách nhận biết tản nấm của các loài nấm thông thường trên môi trường nhân tạo (Hình 6.13). Các mẫu nấm sau đó có thể được phân loại dễ dàng thành nhóm các loài nấm bệnh và các loài nấm hoại sinh bằng mắt thường. Thao tác này có thể làm giảm bớt số lượng mẫu nấm cần làm thuần, tiết kiệm chi phí và thời gian.

Pythium aphanidermatum

Pythium irregulare

Phytophthora nicotianae

Fusarium oxysporum

Fusarium solani

Aspergillus niger

Rhizoctonia sp.

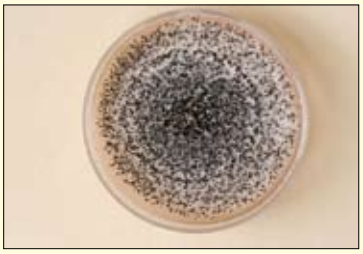
Rhizoctonia sp.

Rhizoctonia sp.

Sclerotium rolfsii

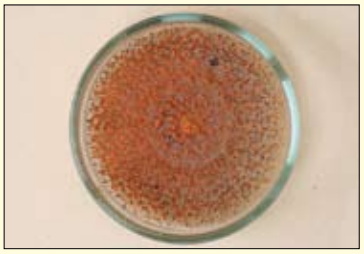
S. rolfsii (trái) và *S. sclerotiorum* (phải) nhìn gần

Sclerotinia sclerotiorum



Pestalotia sp.

Phoma terrestris



Colletotrichum sp.

Hình 6.13 Tản nấm của một số nấm bệnh thông thường trên môi trường thạch đường khoai tây

Việc giám định cuối cùng các mẫu sạch cần dựa vào:

- các đặc tính vi hình thái (như quả thể vô tính và hữu tính)
- hình thái bào tử hoặc hình thái hạch nấm
- hình thức tạo bào tử (như bản chất của tế bào sinh bào tử và sự tạo thành hay không tạo thành chuỗi bào tử).

Một số nấm gây bệnh quan trọng không tạo bào tử và chỉ có thể nhận biết qua sự có mặt và hình thái của hạch nấm (như *Sclerotinia* spp., *Sclerotium* spp. và một số loài *Rhizoctonia*). Nếu không có sự hình thành các quả thể vô tính hoặc hữu tính, hay các bào tử hoặc hạch nấm thì việc giám định đến loài có thể gặp khó khăn.

6.7 Giám định nấm gây bệnh

Có hơn 10.000 loài nấm và các loài giống nấm gây bệnh cây. Những vi sinh vật này là tác nhân gây ra rất nhiều các bệnh, bao gồm đốm và cháy lá, thối thân, loét, thối rễ, héo và chết mòn, các bệnh ở cây con, quả, thối nõn và hạt, u sưng, gỉ sắt, than đen và sương mai.

Việc giám định chính xác một tác nhân gây bệnh là bước đầu then chốt trong việc xây dựng các biện pháp phòng trừ và quản lý bệnh hại tổng hợp. Nếu xác định được tên tác nhân gây bệnh, thì có thể tìm thông tin về đặc tính sinh học, dịch tễ học và các biện pháp phòng trừ qua các tài liệu đã xuất bản hoặc qua mạng internet.

Việc giám định chính xác tác nhân gây bệnh là vô cùng cần thiết cho việc lựa chọn đúng thuốc trừ nấm trong trường hợp phòng trừ bằng biện pháp hóa học. Ví dụ, một số thuốc trừ nấm có thể phòng trừ bệnh sương mai thì không có hiệu quả đối với bệnh phấn trắng.

Việc giám định tác nhân nấm gây bệnh bắt đầu bằng việc dựa vào các đặc tính hình thái, như bào tử và các cấu trúc tạo bào tử. Nhìn chung, cần quan sát dưới kính hiển vi (xem Phần 6.2) để có thể nhận ra tác nhân gây bệnh và chẩn đoán bệnh. Việc giám định hình thái được trợ giúp nhờ các khóa phân loại, tài liệu hướng dẫn, và cũng có nhiều hình ảnh minh họa rất hữu ích cho nhiều loại nấm bệnh thông thường trong Agrios (2005). Nên lưu giữ một số sách và cẩm nang khác làm tài liệu tham khảo trong các phòng thí nghiệm chẩn đoán, và may mắn là nhiều tạp chí khoa học về phân loại và giám định có thể được tiếp cận qua mạng internet.

Các nấm ký sinh chuyên tính chỉ có thể mọc trên mô ký chủ còn sống (như sương mai, phấn trắng và gỉ sắt) và không thể phân lập được trên môi trường nhân tạo. Vì vậy, việc giám định hình thái tùy thuộc vào việc kiểm tra cẩn thận các bào tử và các cấu trúc tạo bào tử trên mô bệnh.

Nhiều nấm gây bệnh khác có thể được phân lập và nuôi cấy trong môi trường nhân tạo trong các điều kiện tiêu chuẩn. Các cấu trúc tạo bào tử và bào tử của những nấm bệnh này có thể được quan sát trong môi trường nuôi cấy cho các mục đích giám định. Ví dụ như hầu hết các tác nhân nấm gây bệnh ở lá đều tạo ra các cấu trúc tạo bào tử - quả thể, quả cành, đĩa cành, bọc bào tử hoặc cành bào tử phân sinh - và những cấu trúc này đều có thể quan sát được dưới kính hiển vi.

Kiểm tra sự hòa hợp sinh dưỡng là một phương pháp khác có thể được dùng để xác định dòng. Nghiên cứu khả năng kết hợp trong sinh sản hữu tính cũng giúp tìm hiểu về sự đa dạng di truyền và có thể được sử dụng để phân biệt các loài khác nhau nhưng có hình thái tương tự. Tuy nhiên, những kỹ thuật này đòi hỏi nhiều kinh nghiệm và trang thiết bị hơn là những gì có sẵn trong những phòng thí nghiệm chẩn đoán nhỏ.

6.8 Tài liệu tham khảo

Agrios G.N. 2005. Plant pathology, 5th edition. Elsevier Academic Press: San Diego, California.

7 Phân loại nấm và tác nhân gây bệnh

Phần sau đây giới thiệu sơ lược về các đặc tính chủ yếu của nấm và phân loại nấm. Hệ thống phân loại là nền tảng cho việc học cách giám định nấm gây bệnh và tìm hiểu về đặc tính sinh học của chúng.

Xây dựng một sơ đồ treo tường tóm tắt những nhóm nấm chính theo phân loại với các ví dụ về các nấm thông thường đã được phân lập trong phòng thí nghiệm của bạn.

7.1 Các đặc tính chủ yếu của nấm và vi sinh vật giống nấm

Nấm và các vi sinh vật giống nấm gây bệnh là các vi sinh vật dị dưỡng - chúng cần một nguồn dinh dưỡng bên ngoài để phát triển và sinh sản. Hiểu biết về các đặc tính chủ yếu khác của những vi sinh vật này có thể giúp ích cho việc giám định chúng:

- Sợi nấm – cấu tạo dạng sợi giống như sợi chỉ với đặc tính phát triển phân nhánh – là một đặc tính phổ biến ở hầu hết các nấm. Sợi nấm phát triển trên giá thể để vi sinh vật có thể hấp thu dinh dưỡng từ đó. Các loài gây bệnh cây phát triển xuyên qua bề mặt ký chủ, đôi khi thông qua việc xâm nhiễm trực tiếp xuyên qua các bề mặt cây ký chủ còn nguyên vẹn. Các nấm hoại sinh có khuynh hướng xâm nhiễm và phát triển trên các mô cây bị bệnh, cây già yếu đang chết dần và các tàn dư thực vật. Những nấm này là các tác nhân chủ yếu làm phân hủy chất hữu cơ trong đất.
- Vách tế bào sợi nấm - nấm thực có các vách tế bào cấu tạo bởi polysacarit và kitin, trong khi các sinh vật giống nấm có vách tế bào cấu tạo bởi xenlulô và polysacarit.

- Sợi nấm đa bào - nấm thực có vách ngăn trong khi sinh vật giống nấm không có. Đây là đặc điểm giúp phân biệt hai nhóm này khi quan sát dưới kính hiển vi.
- Bào tử động - nấm thực không có các bào tử động, ngoại trừ nhóm nấm cổ sinh Chytrids. Các du động bào tử (hình thành từ sinh sản vô tính) thường phổ biến ở nhiều loài thuộc nhóm vi sinh vật giống nấm Oomycota (như *Pythium* và *Phytophthora*) và loài gây bệnh sương mai. Các du động bào tử có thể lan truyền qua nước trong đất và trên bề mặt cây.
- Bào tử lan truyền nhờ gió - nhiều loài nấm thực sản sinh ra các bào tử vô tính hoặc hữu tính với chức năng lan truyền nhờ gió. Đây là một đặc tính phổ biến của nấm gây bệnh trên lá. Tuy nhiên một số bào tử lại thích ứng với hình thức lan truyền nhờ mưa và nước tưới.
- Cấu trúc bảo tồn - các bào tử vách dày (như bào tử trứng và bào tử hậu), hạch nấm và các cấu trúc sinh sản đa bào (như quả cành và quả thể) có vai trò rất quan trọng trong chu kỳ bệnh. Trong các điều kiện ngoại cảnh bất lợi hoặc không có ký chủ hay các giá thể thích hợp khác, những vi sinh vật này thường tồn tại ở các dạng cấu trúc bảo tồn đặc biệt như vậy.

7.2 Phân loại nấm gây bệnh thực vật

Phân loại nấm đã có những thay đổi đáng kể trong vòng 15 năm qua, dưới tác động của các phân tích về tiến hóa sử dụng kỹ thuật phân tử. Một hệ thống phân loại mới được tóm tắt dưới đây. Hệ thống này nhìn chung được xây dựng theo hệ thống trong Agrios (2005) và bổ sung thêm một số nấm bệnh, nấm hoại sinh và đại diện, các loài hoại sinh và mycorrhizal.

Giới	Ngành	Lớp	Bộ	Họ	Chi	Loài
Protozoa						
	Plasmodiophoromycota (nấm nhầy nội ký sinh)					
		Plasmodiophoromycetes				
			Plasmodiophorales (ký sinh chuyên tính)			
				Plasmodiophoraceae		
					Plasmodiophora	
						brassicae (gây sưng rễ cây họ thập tự)

Giới	Ngành	Lớp	Bộ	Họ	Chi	Loài
Các sinh vật giống nấm						
Chromista						
	Oomycota (các vi sinh vật dạng sợi sản sinh các sợi nấm không có vách ngăn, các du động bào tử vô tính với lông roi từ bọc bào tử, cũng như bào tử trứng thông qua sinh sản hữu tính; các vách tế bào cấu tạo bởi polysacarit và xenlulô)					
		Oomycetes				
			Peronosporales			
				Pythiaceae		
					Pythium	
					Phytophthora	
				Peronosporaceae (tạo thành các bọc bào tử lan truyền nhờ gió trên các cành mang bọc bào tử, ký sinh chuyên tính)		
					Peronospora	
					Pseudoperonospora	
					Peronosclerospora	
				Albuginaceae (bệnh gỉ trắng)		
					Albugo	
						candida (gỉ trắng cây họ thập tự)
Nấm thực						
Nấm (thường sản sinh sợi nấm, vách tế bào cấu tạo chủ yếu từ polysacarit và kitin)						
	Chytridiomycota (sản sinh du động bào tử)					
		Chytridiomycetes				
			Chytridiales			
				Olpidiaceae		
					Olpidium	
						brassicae (ký sinh trên rễ cải bắp và có thể truyền một số virút thực vật)

Giới	Ngành	Lớp	Bộ	Họ	Chi	Loài
	Zygomycota (sản sinh các bào tử vô tính trong các bọc bào tử, lan truyền nhờ gió, không có du động bào tử)					
		Zygomyecetes				
			Mucorales			
				Mucoraceae		
					Rhizopus	
					Choanephora	
						cucurbitarum (gây thối nhũn ở bí)
			Glomales (nấm rễ nội cộng sinh)			
	Ascomycota[1] (việc sinh sản hữu tính liên quan đến sự tạo thành 8 bào tử túi trong một túi bào tử nằm trong hoặc trên một quả thể, nhiều loài cũng sản sinh bào tử vô tính gọi là bào tử phân sinh)					
	Ascomycetes dạng sợi					
		Plectomycetes	Erysiphales (phấn trắng, túi bào tử nằm trong các quả thể kín)			
		Pyrenomycetes (sản sinh bào tử túi trong các quả thể bầu)				
					Gibberella	
						zeae
					Ceratocystis	
					Glomerella	
					Diaporthe	
		Loculoascomycetes (tạo các bào tử túi trong các túi bào tử có thành kép hình thành trong ngăn nhỏ của tử tọa túi)				
					Mycosphaerella	
					Pleospora	
		Discomycetes (sản sinh bào tử túi trong một cấu trúc hình đĩa gọi là quả thể đĩa)				
					Monilinia	
					Sclerotinia	
						sclerotiorum

1 Việc sắp xếp các lớp trong ngành Ascomycota gần đây đã được thay đổi nhằm phản ánh các tiến bộ trong phân loại nấm. Các lớp truyền thống vẫn được giữ lại ở đây bởi vì chúng được biết đến rộng rãi ở Việt Nam. Xem tài liệu tham khảo để có thêm thông tin.

Giới	Ngành	Lớp	Bộ	Họ	Chi	Loài
		Deuteromycetes (nấm không có trạng thái hữu tính hoặc trạng thái hữu tính hiếm, sản sinh các bào tử vô tính)				
					Penicillium	
					Aspergillus	
					Oidium	
					Trichoderma	
					Verticillium	
					Fusarium	
					Colletotrichum	
					Cercospora	
					Septoria	
					Alternaria	
					Stemphylium	
					Cladosporium	
					Botrytis	
					Monilia	
					Rhizoctonia	
					Sclerotium	
	Basidiomycota (basidiomycetes, sản sinh bào tử đảm hữu tính trên đảm, nhiều loài tạo thành đảm trên hoặc trong quả thể đảm)					
		Basidiomycetes				
			Ustilaginales (nấm than đen)			
			Uredinales (nấm gỉ sắt, ký sinh chuyên tính)			
			Agaricales (nấm lớn, một số gây bệnh ở rễ, đặc biệt trên cây lâu năm, nhiều loại là nấm rễ)			
			(Vài bộ khác trong ngành Basidiomycotina cũng bao gồm một số nấm gây bệnh)			

7.3 Tài liệu tham khảo

Agrios G.N. 2005. Plant pathology, 5th edition. Elsevier Academic Press: San Diego, California.

8 Lây bệnh nhân tạo

Để thực hiện quá trình lây bệnh nhân tạo, các loài cây mẫn cảm được trồng trong các điều kiện có kiểm soát và được cấy vi sinh vật nghi là gây bệnh. Việc lây bệnh nhân tạo có thể cung cấp thông tin để:

- khẳng định một sinh vật được phân lập là tác nhân gây bệnh theo quy tắc Koch (Khung 8.1)
- xác định phổ ký chủ của tác nhân gây bệnh
- đo độc tính các mẫu cấy khác nhau của tác nhân gây bệnh.

Khi chọn lựa những cây khỏe mạnh để lây bệnh nhân tạo theo quy tắc Koch, nên lưu ý dùng cùng một giống với cây bị bệnh mà từ đó tác nhân gây bệnh được phân lập. Như vậy các triệu chứng biểu hiện khi lây bệnh nhân tạo sẽ rất gần với các triệu chứng bệnh ban đầu ngoài tự nhiên - các giống cây trồng có thể có độ mẫn cảm khác nhau đáng kể đối với một tác nhân gây bệnh.

Khung 8.1 Các bước thực hiện quy tắc Koch

1. Mô tả các triệu chứng biểu hiện ở cây trồng bị bệnh.
2. Phân lập vi sinh vật có thể là tác nhân gây bệnh — các mẫu cấy giống nhau được phân lập từ các cây có triệu chứng giống nhau.
3. Dùng một mẫu cấy sạch đã được làm thuần để lây lên cây khỏe mạnh.
4. Quan sát các triệu chứng biểu hiện ở các cây đã được lây bệnh — các triệu chứng phải giống như đã quan sát ban đầu trên cây trồng bị bệnh.
5. Phân lập lại tác nhân gây bệnh từ các bộ phận cây mới bị bệnh — mẫu cấy phải giống như mẫu cấy được làm thuần ban đầu.

Các yếu tố cần được cân nhắc trong quá trình lây bệnh nhân tạo bao gồm:

- nhiệt độ
- quá ít hoặc quá nhiều nước
- độ độc hoặc thiếu hụt chất dinh dưỡng
- lượng nguồn bệnh trộn vào đất không thực tiễn (quá ít hoặc quá nhiều)
- các điều kiện trồng nói chung.

Nếu tất cả các thí nghiệm và các công thức lây bệnh đều được bố trí các công thức đối chứng (không lây bệnh) để so sánh với các công thức được lây bệnh, ảnh hưởng của những yếu tố này có thể được đo và giải thích. Công thức đối chứng cũng là một phương tiện để so sánh và có thể làm nổi bật các thiếu sót trong thí nghiệm nếu có.

Luôn luôn bố trí công thức đối chứng (bao gồm các cây không được lây bệnh) trong các thí nghiệm lây bệnh nhân tạo.

8.1 Các phương pháp lây bệnh nhân tạo

Một phần quan trọng của việc chẩn đoán bệnh là việc tái tạo bệnh trong quá trình lây bệnh nhân tạo nhằm hoàn tất các quy tắc Koch. Bệnh có thể được tái tạo bằng cách cấy tác nhân gây bệnh lên bề mặt cây trồng theo cơ chế xâm nhiễm của tác nhân đó, hoặc bằng cách đưa mầm bệnh trực tiếp vào cây. Chọn phương pháp nào là tùy thuộc vào tác nhân gây bệnh được thí nghiệm (Bảng 8.1).

Bảng 8.1 Các phương pháp lây bệnh nhân tạo

Phương pháp	Phù hợp cho
Lây bệnh vào thân cây	*Sclerotinia, Sclerotium* và các nấm hoặc vi khuẩn gây héo
Lây bệnh lên lá (trong điều kiện để ẩm)	*Septoria*, *Colletotrichum*
Lây bệnh vào đất	
Hỗn hợp	*Pythium*, *Phytophthora*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*
Lớp mỏng	*Sclerotium*, *Rhizoctonia*
Dịch bào tử (có hoặc không gây vết thương cơ giới)	Héo vi khuẩn và Fusarium

Độ ẩm cao tạo điều kiện cho việc xâm nhiễm và lan truyền của nhiều bệnh. Phun sương hoặc để ẩm (bằng túi ny lông che phủ chậu trồng cây) có thể tạo một môi trường ẩm và làm tăng đáng tỷ lệ thành công của thí nghiệm lây bệnh nhân tạo. Không nên đặt các chậu trong tủ ẩm hoặc có ny lông che phủ trực tiếp dưới ánh nắng.

8.1.1 Lây bệnh lên lá và thân

Lây bệnh lên lá và thân là một thí nghiệm đơn giản không đòi hỏi nhân sinh khối nguồn bệnh trong bình tam giác (Hình 8.1). Các triệu chứng được tái tạo nhanh chóng, nhưng mô cây được tạo vết thương bằng một dụng cụ nhọn, không mô phỏng được quá trình xâm nhiễm ngoài tự nhiên.

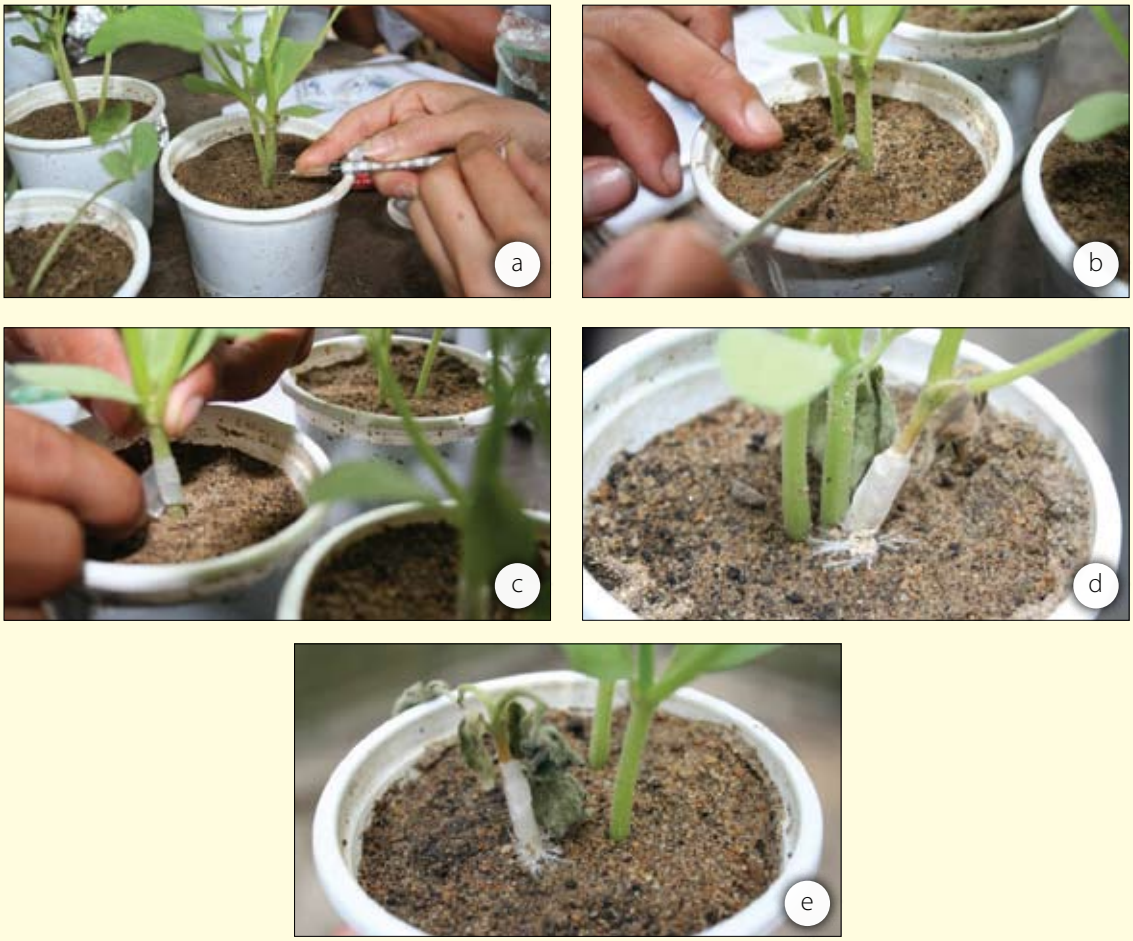
Nên trồng hai cây trong một chậu - một được lây bệnh và cây kia dùng làm đối chứng để so sánh. Phương pháp này cũng có thể áp dụng thành công để lây bệnh lên các bộ phận khác của cây, như hoa và quả.

Lây bệnh lên thân cây

1. Dùng que cấy hoặc kim tiêm chọc vào phần thân dưới của cây được lây bệnh và gắn một miếng thạch nhỏ từ mẫu tác nhân gây bệnh đã làm thuần vào vị trí vết thương (hoặc tiêm một lượng nhỏ dịch bào tử vào thân, dùng kim và ống tiêm).
2. Dùng que cấy hoặc kim tiêm chọc vào phần thân dưới của cây đối chứng nhưng không lây bệnh.
3. Dùng parafilm hoặc màng ny lon bọc vết thương hoặc vị trí lây bệnh.
4. Tưới ẩm cho đất mỗi ngày.
5. Kiểm tra và so sánh những cây được lây bệnh với những cây đối chứng. Quan sát và ghi nhận các triệu chứng và so sánh những triệu chứng này với các triệu chứng đã quan sát trên đồng ruộng.

Lây bệnh lên lá

1. Phun dịch bào tử lên lá cây được lây bệnh (hoặc nhỏ vài giọt dịch bào tử lên một số lá).
2. Phun nước vô trùng lên lá cây dùng làm đối chứng (hoặc nhỏ vài giọt nước vô trùng lên một số lá).
3. Đặt chậu trong tủ ẩm hoặc che bằng túi ny lông trong nhà lưới, tránh ánh nắng trực tiếp.
4. Kiểm tra và so sánh những cây được lây bệnh với những cây đối chứng. Quan sát và ghi nhận các triệu chứng và so sánh những triệu chứng này với các triệu chứng đã quan sát được trên đồng ruộng.

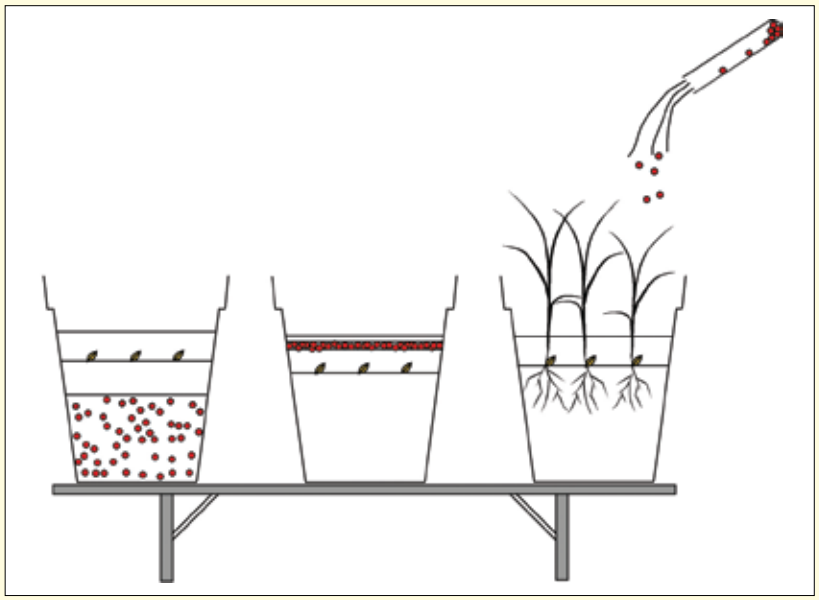


Hình 8.1 Lây bệnh nhân tạo bằng phương pháp lây bệnh lên thân: (a) gây vết thương vào thân dưới của cây, (b) cấy nguồn bệnh vào vị trí vết thương, (c) bọc vị trí vết thương bằng ny lông, (d) sợi nấm phát triển trên mặt đất từ thân bị bệnh, (e) cây được lây bệnh (trái) và cây đối chứng (phải)

8.1.2 Lây bệnh vào đất

Có thể lây bệnh trực tiếp vào đất bằng dung dịch bào tử lấy từ môi trường thuần hoặc từ sinh khối vi sinh vật gây bệnh được nhân trong bình tam giác (Hình 8.2). Dịch bào tử nấm hoặc dịch khuẩn có thể được tưới vào đất sau khi nảy mầm sao cho chúng được tiếp xúc trực tiếp với hệ thống rễ. Phương pháp này được thực hiện để lây bệnh nhanh ban đầu.

Một quá trình lây nhiễm tự nhiên hơn được thực hiện bằng phương pháp hỗn hợp hoặc phương pháp lớp mỏng. Cả hai phương pháp này đều yêu cầu nhân sinh khối nguồn bệnh trên một giá thể tự nhiên, như hạt kê hoặc vỏ trấu. Việc nhân sinh khối mẫu cấy trên các giá thể này trong bình tam giác cần thời gian khoảng 2-3 tuần. Một lượng sinh khối nguồn bệnh tiêu chuẩn được dùng cho cả hai phương pháp. Tuy nhiên do tác nhân gây bệnh được đưa vào đất cùng thời điểm trồng cây nên cây có thể nhiễm bệnh khi còn ở giai đoạn cây con - việc này có thể gây ra các kết quả sai lệch nếu mục đích của lây bệnh nhân tạo là để tái tạo bệnh trên cây trưởng thành.



Hình 8.2 Các phương pháp lây bệnh nhân tạo bằng cách đưa vi sinh vật vào đất

8.2 Chuẩn bị nguồn bệnh cho quá trình lây bệnh nhân tạo

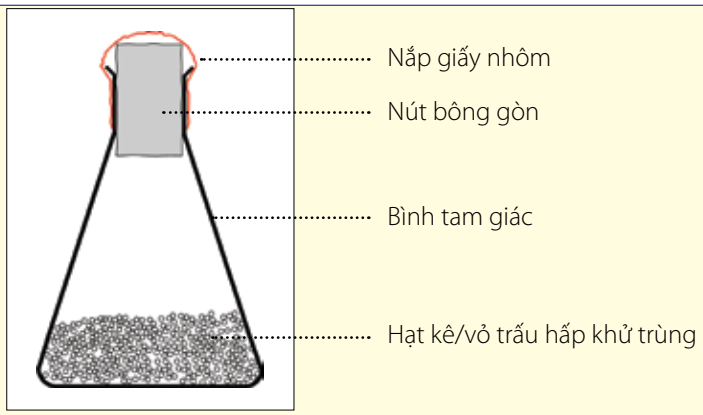
8.2.1 Dịch bào tử

Chuẩn bị nguồn nấm bệnh cho việc tạo dịch bào tử bằng cách nuôi nấm trên môi trường thạch nước cất chứa hạt, mẩu thân hoặc lá đã khử trùng, trên môi trường thạch lá cẩm chướng, hoặc trên môi trường thạch đường khoai tây nửa độ mạnh. Một cách đơn giản là cạo các bào tử và sợi nấm ra khỏi đĩa cấy và cho vào nước vô trùng. Dịch bào tử này có thể được đổ lên trên đất.

8.2.2 Môi trường hạt kê/vỏ trấu (thể tích 50:50)

1. Ngâm hạt kê và vỏ trấu trong nước và để qua đêm trong tủ lạnh, để hỗn hợp ngấm nước.
2. Chắt bỏ phần nước.
3. Cho khoảng 150mL giá thể vào một bình tam giác dung tích 250 mL (Hình 8.3-8.5).
4. Cuộn thật chặt một nút bông gòn, bọc ngoài bằng vải màn để nút chặt miệng bình tam giác.

5. Dùng giấy nhôm phủ lên miệng bình và hấp khử trùng. (Mục đích là giữ cho phần miệng bình được tiệt trùng trước khi cấy nguồn bệnh và nút bông gòn vẫn khô trong khi hấp.)
6. Để bình nguội.
7. Cấy các miếng thạch có sợi nấm hoặc dịch bào tử vào giá thể trong bình tam giác, chú ý để nút bình vẫn trong điều kiện vô trùng, thao tác này được thực hiện trong tủ cấy vô trùng.
8. Đặt các bình tam giác ở nhiệt độ khoảng 25°C trong 2 tuần trong điều kiện sáng và tối xen kẽ để hoàn thành quá trình nhân sinh khối nấm trên giá thể.
9. Lắc bình tam giác 2-3 ngày sau khi cấy để đảm bảo nguồn bệnh được phân bố đều trong giá thể.



Hình 8.3 Một bình tam giác chứa nguồn bệnh

Dùng các mẫu cấy 'còn mới' (mới phân lập) để chuẩn bị nguồn bệnh. Các mẫu đã được cấy truyền nhiều lần trên môi trường giàu dinh dưỡng thường bị giảm độc tính.

Hình 8.4 Chuẩn bị giá thể hạt kê/vỏ trấu trong bình tam giác

Hình 8.5 Chuẩn bị giá thể hạt kê/vỏ trấu cho quá trình lây bệnh nhân tạo: (a) hạt kê và vỏ trấu đã được ngâm trong nước cất 24 giờ, (b) trộn đều các thành phần của giá thể, (c và d) đưa giá thể vào bình tam giác dùng một phễu tự chế, (e) bình tam giác được nút kín bằng bông gòn gói trong vải màn, (f) cổ bình được phủ bằng giấy nhôm sẵn sàng cho vào nồi hấp.

9 Quản lý bệnh hại tổng hợp

Việc phòng trừ đa số các bệnh cây trồng đòi hỏi phải áp dụng một số các biện pháp phòng trừ hỗ trợ lẫn nhau. Chiến lược (chương trình) này được gọi là quản lý bệnh hại tổng hợp (Integrated Disease Management - IDM). Việc xây dựng một chương trình IDM đòi hỏi dựa vào những kiến thức sâu rộng về các chu kỳ của bệnh tác động đến một hay nhiều vụ trồng, cũng như phổ ký chủ của mỗi tác nhân gây bệnh.

Tóm lại, với mỗi tác nhân gây bệnh tối thiểu cần có những hiểu biết về:

- sự tồn tại của tác nhân gây bệnh khi vắng bóng ký chủ mẫn cảm
- con đường xâm nhiễm của tác nhân gây bệnh vào ký chủ
- sự lan truyền của tác nhân gây bệnh trong mỗi vụ trồng và qua các vụ trồng
- sự tác động của các biện pháp canh tác và các yếu tố môi trường đến sự tồn tại, xâm nhiễm và lan truyền của tác nhân gây bệnh
- phổ ký chủ của tác nhân gây bệnh.

Cán bộ bệnh cây cũng cần hiểu biết thấu đáo về hệ thống canh tác. Một số hệ thống canh tác chỉ liên quan đến một cây trồng, như trong trường hợp các cây trồng lâu năm hay các cây trồng tập trung với diện tích lớn: cà phê, đào lộn hột, sầu riêng, dứa và chuối. Việc quản lý bệnh trong những hệ thống này chỉ tập trung vào một cây trồng và các bệnh liên quan đến cây trồng đó.

Ngược lại, trong các hệ thống canh tác hỗn hợp một nông dân có thể trồng nhiều vụ cây trồng mỗi năm, như các loại rau cùng với lúa nước hoặc ngô. Nhiều tác nhân gây bệnh tồn tại trong đất gây hại cho một phổ rộng lớn các ký chủ. Vì vậy, một chương trình IDM cho một hệ thống canh tác hỗn hợp liên quan đến việc quản lý bệnh trên một nhóm cây trồng.

Các chiến lược IDM chính (Hình 9.1) là:

- luân canh
- quản lý cây trồng
  - thoát nước tốt
  - để ruộng ngập nước (ruộng lúa)
- cây giống, hạt, thân rễ, củ vv giống sạch bệnh
- kiểm dịch
- giống kháng bệnh và chống chịu bệnh
- gốc (ghép) kháng bệnh
- thuốc trừ nấm
- vệ sinh.

9.1 Luân canh

Luân canh là một biện pháp quan trọng trong IDM ở các hệ thống canh tác hỗn hợp như các hệ thống trồng rau màu.

Luân canh là biện pháp chủ yếu nhằm giảm thiểu lượng vi sinh vật gây bệnh tồn tại trong đất.

Trước khi đề xuất một chương trình luân canh cần hiểu rõ các phổ ký chủ của các tác nhân gây bệnh. Ở Việt Nam, nhiều loại rau mẫn cảm với bệnh héo vi khuẩn (*Ralstonia solanacearum*). Vì vậy, một chương trình IDM cho một hệ thống canh tác rau màu nên kết hợp luân canh với những loại cây trồng kháng bệnh héo do vi khuẩn.

Ngô, lúa, cỏ nhiệt đới, cải bắp và cải xanh là những ví dụ về các cây trồng không bị bệnh héo vi khuẩn. Những cây trồng này có thể được khuyến cáo luân canh để giảm thiểu nguồn bệnh. Một ví dụ về chương trình luân canh nhằm hạn chế bệnh là ớt–ngô–đậu–mướp đắng (khổ qua). Một ví dụ về chương trình luân canh sẽ làm cho bệnh héo vi khuẩn thêm trầm trọng là: ớt–cà chua–cà tím–mướp đắng.

Nhiều cỏ dại đóng vai trò là những ký chủ phụ cho các tác nhân gây bệnh quan trọng trên cây trồng (như *Ageratum conyzoides*). Cỏ dại cũng có thể là ký chủ cho các côn trùng là vectơ truyền virút. Cỏ dại mẫn cảm với bệnh cần được phòng trừ trong quá trình luân canh.

Nhiều tác nhân gây bệnh tồn tại trong đất gây hại cho các họ cây trồng nhất định. Chẳng hạn như héo vi khuẩn gây hại cho hầu hết các cây trồng trong họ *Solanaceae* bao gồm cà chua, ớt và cà tím, không nên trồng các loại cây này kế tiếp nhau. *Sclerotinia sclerotiorum* gây bệnh cho nhiều cây họ đậu (như đậu tương, đậu cô ve lùn và cô ve leo), cũng như xà lách, cà chua và khoai tây. Không nên luân canh những cây trồng này kế tiếp nhau tại những vùng có mùa đông lạnh và ẩm, như miền bắc và miền trung Việt Nam.

Biện pháp luân canh không hiệu quả trong việc phòng trừ các bệnh lan truyền nhờ gió từ khoảng cách xa, như cháy lá, phấn trắng và gỉ sắt.

9.2 Quản lý cây trồng

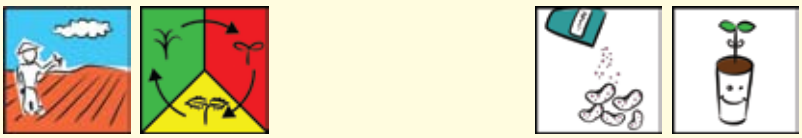
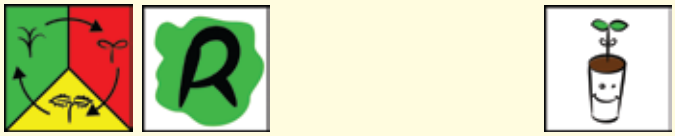
Thay đổi biện pháp quản lý cây trồng có thể giúp giảm thiểu bệnh. Ví dụ, có thể thay đổi thời gian vụ trồng để tránh những giai đoạn thời tiết mưa và lạnh thuận lợi cho sự phát triển của nhiều bệnh ở giai đoạn cây con. Việc tưới tiêu có thể được quản lý để tránh stress cho cây trồng và giảm thiểu việc úng nước cũng như hạn chế sự di chuyển của tác nhân gây bệnh trong nước từ khu vực này sang khu vực khác trong ruộng.

Dinh dưỡng cho cây là điều quan trọng bởi vì các cây trồng khỏe mạnh với bộ rễ khỏe có thể chịu đựng được một số tác nhân gây bệnh. Phân bón hữu cơ (nhất là phân gà) có thể ngăn chặn sự phát triển của một số nấm bệnh trong đất (như *Phytophthora)*.

Các tàn dư hữu cơ trên mặt đất, như trấu, có thể làm tăng một số bệnh; chẳng hạn như *Sclerotium rolfsii* có thể phát triển mạnh hơn nếu có tàn dư hữu cơ trên mặt đất. Tuy nhiên, tàn dư hữu cơ và phân bón hữu cơ lại có tác dụng cải thiện cấu trúc đất, làm cho bộ rễ phát triển mạnh hơn. Những nghiên cứu gần đây ở Australia (Stirling và Eden 2007) cho thấy là bã mía, chất hữu cơ phủ luống và các chất bổ sung khác có thể làm giảm đáng kể nguồn bệnh tuyến trùng sưng rễ (*Meloidogyne incognia*) trong đất. Thông thường nên bổ sung thêm đạm như Nitrat amôn vào chất hữu cơ phủ đất để tránh hiện tượng thiếu đạm.

9.2.1 Thoát nước tốt

Đất ướt tạo điều kiện thuận lợi cho sự phát sinh và phát triển các bệnh ở rễ do các tác nhân gây bệnh tồn tại trong đất. Đặc biệt, đất ướt tạo điều kiện thuận lợi cho các bệnh ở cây con và thối rễ gây ra bởi *Pythium* và *Phytophthora* do các tác nhân này sản sinh ra các du động bào tử di chuyển (bơi) được trong môi trường nước. Vì vậy, thoát nước tốt là biện pháp phòng trừ chủ yếu trong các chương trình IDM đối với các bệnh Pythium và Phytophthora. Để thoát nước tốt, nên lên luống với chiều cao ít nhất 30cm và dọn sạch cỏ dại ở các rãnh thoát nước (Hình 9.2).

Thối rễ cây con Pythium Phytophthora Rhizoctonia	
Thối rễ Phytophthora	
Thối rễ Pythium	
Sclerotinia sclerotiorum	
Sclerotium rolfsii	
Héo vi khuẩn	
Tuyến trùng nốt sưng	
Đốm/cháy lá do nấm	
Sương mai	
Phấn trắng	
Gỉ sắt	

Vệ sinh

Giống kháng

Quản lý cây trồng

Cây giống khỏe mạnh

Xử lý hạt (trộn hoặc bọc hạt với thuốc trừ bệnh)

Kiểm dịch

Thuốc trừ nấm

Luân canh

Hình 9.2 Cuốc cỏ rãnh làm tăng khả năng thoát nước trong một vườn hồ tiêu bị bệnh thối rễ Phytophthora

9.2.2 Làm ngập ruộng

Đưa nước vào ruộng trong quá trình trồng lúa sẽ làm giảm mật độ một số tác nhân gây bệnh tồn tại trong đất. Ví dụ, một nghiên cứu của ThS. Đặng Lưu Hoa và các đồng nghiệp (thông tin cá nhân) đã chứng minh rằng duy trì hai vụ lúa nước liên tiếp có thể loại trừ hạch nấm *Sclerotium rolfsii*. Thậm chí một vụ lúa cũng làm giảm đáng kể lượng hạch nấm. Hạn chế sản xuất lúa nước có thể dẫn đến sự tăng gia một vài tác nhân gây bệnh tồn tại trong đất.

9.3 Cây giống, hạt giống và các nguồn giống sạch bệnh khác

Việc sử dụng hạt và cây giống sạch bệnh là hết sức cần thiết. Theo kinh nghiệm của chúng tôi ở Việt Nam, cây giống thường bị nhiễm một số tác nhân gây bệnh tồn tại trong đất. Những tác nhân gây bệnh này có thể phát triển trên ruộng và lan rộng ra những khu vực mới.

Nếu hạt bị nhiễm, cần xử lý hạt bằng thuốc trừ nấm được khuyến cáo cho cây trồng đó. Một số thuốc trừ nấm có ảnh hưởng tới sự nảy mầm, nên tốt hơn hết là dùng hạt sạch bệnh nếu có thể. Nhiều tác nhân gây bệnh có trong thân rễ, rễ củ và các loại thân củ làm giống. Điều quan trọng là tránh dùng những nguồn giống đó. Cán bộ bảo vệ thực vật cấp tỉnh (Chi cục Bảo vệ thực vật) và cấp huyện nên giúp đỡ nông dân xây dựng những chương trình sản xuất cây giống sạch bệnh. Vấn đề này cần được ưu tiên đối với nhiều cây trồng sử dụng những dạng vật liệu làm giống đó (như gừng và khoai tây).

9.4 Kiểm dịch

Các biện pháp kiểm dịch rất hữu ích trong việc loại trừ các tác nhân gây bệnh ngoại lai từ một quốc gia hoặc một vùng. Những biện pháp này rất khó áp dụng ở Việt Nam do có đường biên giới đất liền dài với Trung Quốc, Lào và Campuchia. Nhiều tác nhân gây bệnh trên lá và vectơ côn trùng truyền bệnh có thể lan truyền một cách đơn giản theo gió qua đường biên giới. Tuy nhiên, Việt Nam có thể được lợi từ việc tăng cường các biện pháp kiểm dịch cấp quốc gia trong việc nhập khẩu hạt giống và các vật liệu làm giống khác. Ở cấp địa phương, các cán bộ bảo vệ thực vật cần phải cẩn thận lau sạch giày dép sau những lần đi điều tra giữa các ruộng trồng khỏe mạnh và các ruộng trồng bị bệnh (xem phần vệ sinh).

9.5 Dùng giống kháng bệnh hoặc chống chịu bệnh

Sử dụng giống kháng bệnh là một biện pháp phòng trừ bệnh hiệu quả. Bất cứ khi nào có điều kiện, các cán bộ tỉnh và huyện nên khuyến cáo sử dụng biện pháp này.

9.6 Dùng gốc ghép kháng bệnh

Việc ghép những giống cây trồng với tính trạng mong muốn nhưng mẫn cảm với bệnh lên gốc của giống kháng bệnh là một biện pháp hiệu quả ngăn ngừa những bệnh do tác nhân tồn tại trong đất gây ra. Ví dụ như nhiều loài họ bầu bí mẫn cảm với bệnh héo *Fusarium* và/hoặc *Pythium*. Những bệnh này có thể được phòng trừ bằng cách ghép những cây họ bầu bí mẫn cảm lên gốc cây bí đỏ kháng bệnh. Đây là một phương pháp đã được áp dụng khá lâu ở Việt Nam và nhiều nơi khác ở Châu Á.

Biện pháp này có thể được áp dụng trên cây ăn quả. Chẳng hạn như một số giống cây có múi mẫn cảm với bệnh *Phytophthora* có thể được ghép lên gốc cây cam ba lá (*Poncirus trifoliata*) kháng bệnh. Cần phải cẩn thận đánh giá tác động của gốc ghép đến sức tăng trưởng của mầm ghép.

9.7 Thuốc trừ nấm

Thuốc trừ nấm thường được dùng để phun lên lá phòng trừ các bệnh ở lá và quả. Tuy nhiên, chúng có thể được dùng để xử lý hạt trong phòng trừ các bệnh hạt giống hoặc để ngăn ngừa bệnh trên cây mầm. Ngoài ra, chúng có thể được dùng tưới vào đất ở các luống ươm cây con hoặc các cây ăn quả có giá trị.

Giám định chính xác các bệnh nấm trước khi lựa chọn thuốc trừ nấm. Các nấm bệnh khác nhau đòi hỏi sử dụng các thuốc trừ nấm khác nhau, vì vậy việc phân loại là rất quan trọng! Chẳng hạn như bệnh sương mai cần sử dụng thuốc trừ nấm khác hoàn toàn với bệnh phấn trắng.

Dịch bệnh của nấm gây bệnh bộ lá, như đốm lá, gỉ sắt và sương mai, phát triển nhanh trong những điều kiện lá ướt và nhiệt độ thích hợp. Những nấm bệnh này sản sinh ra vô số bào tử, lan truyền dễ dàng nhờ gió và/hoặc mưa trong và giữa các ruộng trồng.

Cần theo dõi thời tiết và dự tính dự báo khi nào thì bệnh trên lá sẽ phát triển mạnh. Bằng cách đó, có thể phun thuốc trừ nấm khi mật độ nấm còn ở mức độ rất thấp do đó việc phòng trừ sẽ có hiệu quả nhất.

Rất khó phòng trừ bệnh nấm trên lá khi chúng đã phát triển mạnh. Nấm bệnh có thể phát triển khả năng đề kháng với một số thuốc trừ nấm, làm cho thuốc mất công hiệu. Để giảm thiểu nguy cơ kháng thuốc ở nấm bệnh, cần giảm thiểu số lần phun thuốc trừ nấm trong mỗi mùa vụ. Việc này có thể thực hiện được bằng cách:

- phun thuốc trước khi bệnh biểu hiện quá rõ ràng
- luân phiên dùng thuốc trừ nấm bảo vệ và thuốc đặc hiệu
- phun thuốc trừ nấm ở nồng độ khuyến cáo và với khoảng cách đồng đều.

Phải đảm bảo thuốc trừ nấm có hiệu quả đối với bệnh. Nên mua từ các công ty và cửa hàng đáng tin cậy.

9.8 Vệ sinh

Việc tuân thủ nghiêm ngặt các biện pháp vệ sinh đặc biệt quan trọng đối với việc sản xuất rau và hoa có giá trị trong nhà lưới. Việc thực hiện nghiêm ngặt các biện pháp vệ sinh cũng rất cần thiết trong các vườn ươm cây giống, nơi mà cây con được sản xuất để cung cấp cho sản xuất đại trà trên đồng ruộng hoặc trong nhà lưới.

Các biện pháp vệ sinh bao gồm:

- giữ gìn đất sạch bệnh
- sử dụng nguồn giống sạch bệnh
- khử trùng bàn, giá và các chậu trồng cây
- khử trùng các thiết bị
- dùng bao (loại dùng một lần) để bao ngoài giày dép và sử dụng bồn rửa chân có chất khử trùng để ngăn ngừa cán bộ mang tác nhân gây bệnh trong giày dép (Hình 9.3)
- kiểm tra đều đặn xem các cây trồng có dấu hiệu nhiễm các bệnh có nguồn gốc từ đất
- loại bỏ và đốt các cây bị bệnh
- loại bỏ đất bị nhiễm bệnh.

Khử trùng giày dép kỹ càng sau khi kiểm tra một khu trồng có nhiễm bệnh có nguồn gốc từ đất. Không được điều tra các khu trồng khỏe mạnh khi còn mang giày dép có dính đất bị nhiễm.

Hình 9.3 Các biện pháp ngăn ngừa mang nguồn bệnh qua giày dép: bao bọc ngoài giày dép bằng nhựa (trái) và khử trùng giày sau khi kiểm tra một ruộng trồng bị bệnh có nguồn gốc từ đất (phải)

9.9 Tài liệu tham khảo

Stirling G.R. and Eden L.M. 2007. The impact of organic amendments and mulch on root-knot nematode and Pythium root rot of capsicum. Presented at the Australasian Plant Pathology Society Conference, Adelaide, 24–27 September 2007.

10 Các bệnh thối rễ và thân có nguồn gốc từ đất

Các bệnh thối rễ và thân do tác nhân gây bệnh tồn tại trong đất là nguyên nhân gây thiệt hại năng suất nghiêm trọng cho cây trồng ở Việt Nam. Tính chất trồng trọt quanh năm tại các vùng châu thổ Việt Nam, sự lan truyền của các tác nhân gây bệnh trong nước tưới, thoát nước kém, cây giống không sạch bệnh và khí hậu nhiệt đới là những yếu tố tạo điều kiện thuận lợi cho sự phát triển của các bệnh này.

Bệnh do các tác nhân có nguồn gốc từ đất gây ra các triệu chứng không điển hình, như còi cọc, vàng lá, héo và chết cây. Cần lưu ý rằng một số tác nhân gây bệnh khác cũng như sâu đục thân, sùng cuốn ăn rễ, và những điều kiện đất bất lợi cũng có thể gây ra những triệu chứng này.

Những bệnh này do một số tác nhân gây bệnh phổ biến, bao gồm nấm, vi khuẩn gây bệnh và tuyến trùng ký sinh thực vật.

Những tác nhân gây bệnh liệt kê ở Bảng 10.1 có những đặc tính chính sau:

- chúng tồn tại trong đất qua một thời gian dài khi không có mặt ký chủ, và nguồn bệnh trong đất tăng dần qua vài năm (chu kỳ mùa vụ)
- chúng đều có phổ ký chủ rộng, ngoại trừ các dạng loài (formae speciales) của *Fusarium oxysporum*
- chúng có thể lan truyền theo:
  - nước tưới
  - đất do động vật và người mang
  - giống bị nhiễm bệnh (củ khoai tây, củ gừng, cây giống)
- chúng thường không phân tán nhờ gió.

Vi khuẩn gây bệnh héo cũng có thể tồn tại trong hạt giống.

Bảng 10.1 Các đặc tính của các tác nhân gây bệnh phổ biến tồn tại trong đất ở Việt Nam

Tác nhân gây bệnh	Bệnh	Phổ ký chủ	Tồn tại (bảo tồn)	Nhận xét
Pythium species[a] (như *P. aphanidermatum*[a], *P. myriotilum*[a], *P. spinosum*[a])	Chết cây con, thối rễ con, thối rễ	Rộng	Bào tử trứng trong đất	Du động bào tử lan truyền qua nước trong đất và nước mưa hoặc nước tưới
Phytophthora palmivora[a]	Nhiều bệnh ở rễ, thân, lá và quả của cây trồng lâu năm	Rộng	Bào tử hậu, sợi nấm trong tàn dư cây bệnh và có thể cả bào tử trứng trong đất	Du động bào tử lan truyền qua nước trong đất và nước mưa hoặc nước tưới
Phytophthora capsici[a]	Thối gốc (héo nhanh) hồ tiêu, thối rễ ớt và các bệnh khác	Rộng	Bào tử hậu, sợi nấm trong tàn dư cây bệnh trên ruộng và có thể cả bào tử trứng trong đất	Du động bào tử lan truyền qua nước trong đất và nước mưa hoặc nước tưới
Phytophthora nicotianae[a]	Thối nõn dứa và các bệnh khác	Rộng	Bào tử hậu, sợi nấm trong tàn dư cây bệnh và có thể cả bào tử trứng trong đất	Bào tử hậu trong đất, du động bào tử lan truyền qua nước trong đất và nước mưa hoặc nước tưới
Fusarium oxysporum, f. sp. *lycopersici*[a]	Héo Fusarium	Cà chua	Bào tử hậu trong đất, xâm nhiễm cả rễ cây không phải là ký chủ	Mạch dẫn hóa nâu
Fusarium oxysporum, f. sp. *pisi*[a]	Héo Fusarium	Đậu Hà lan	Bào tử hậu trong đất, xâm nhiễm cả rễ cây không phải là ký chủ	Mạch dẫn hóa nâu
Fusarium oxysporum, f. sp. *cubense*[a]	Héo Fusarium	Chuối	Bào tử hậu trong đất, xâm nhiễm cả cây không phải là ký chủ; trong nguồn giống	Mạch dẫn hóa nâu
Sclerotinia sclerotiorum	Thối thân và quả	Rộng	Hạch nấm lớn, màu đen trong đất	Hạch nấm là dấu hiệu chẩn đoán trên đồng ruộng
Sclerotium rolfsii	Thối gốc thân	Rộng	Hạch nấm tròn, nhỏ, màu nâu trong đất	Hạch nấm là dấu hiệu chẩn đoán trên đồng ruộng

Tác nhân gây bệnh	Bệnh	Phổ ký chủ	Tồn tại (bảo tồn)	Nhận xét
Rhizoctonia sp.[a]	Chết cây con, thối rễ và thân	Rộng	Hạch nấm hoặc sợi nấm điển hình trên tàn dư cây bệnh trong đất	Hạch nấm là dấu hiệu chẩn đoán cho một số loài trên đồng ruộng; sợi nấm phân nhánh vuông góc trong mẫu cấy trên môi trường
Verticillium albo-atrum[ab]	Héo Verticillium	Rộng	Sợi nấm trong tàn dư cây bệnh	Mạch dẫn hóa nâu
Verticillium dahliae[ab]	Héo Verticillium	Rộng	Hạch nấm cực nhỏ trong đất, sợi nấm trong tàn dư cây bệnh	Mạch dẫn hóa nâu
Ralstonia solanacearum[a]	Héo vi khuẩn	Rộng	Vi khuẩn trong đất, tàn dư cây bệnh và vật liệu nhân giống	Thân hóa nâu và dịch khuẩn là những đặc tính chẩn đoán trên đồng ruộng
Meloidogyne	Tuyến trùng nốt sưng	Rộng	Tuyến trùng ngủ nghỉ trong đất	Tuyến trùng cái sống trong nốt sưng rễ - một đặc tính chẩn đoán
Tuyến trùng gây loét rễ[a]	Gây vết bệnh trên rễ và làm cây còi cọc	Rộng	Tuyến trùng ngủ nghỉ trong đất	Có thể nhìn thấy các vết loét trên rễ bằng kính lúp cầm tay
Plasmodiophora brassicae	Sưng rễ cây thuộc họ thập tự	*Brassica* và *Raphanus*	Bào tử ở dạng bảo tồn trong đất	Các triệu chứng sưng rễ có thể chẩn đoán được trên đồng ruộng; thêm vôi vào đất để phòng trừ

a Việc chẩn đoán chính xác những tác nhân gây bệnh này phụ thuộc vào quá trình phân lập và giám định sau đó trong phòng thí nghiệm. Cần thực hiện thí nghiệm lây bệnh nhân tạo để chứng minh chúng là tác nhân gây bệnh chính trên các ký chủ tại địa phương, trừ khi việc lây bệnh nhân tạo đã được thực hiện trước đây ở Việt Nam.

b Những loài này chưa được chính thức ghi nhận ở Việt Nam.

Những tác nhân gây bệnh này thường bị bỏ sót do khó giám định (xem Khung 10.1) - đa số những vi sinh vật này chỉ có thể được giám định chính xác trong phòng thí nghiệm.

Hai hoặc nhiều tác nhân gây bệnh này có thể cùng lúc ảnh hưởng đến một cây trồng trong các vùng trồng rau thâm canh ở Việt Nam. Chẳng hạn như một ruộng ớt có thể bị bệnh héo vi khuẩn, thối rễ Phytophthora và thối gốc thân. Sâu đục thân cũng có thể cùng lúc gây hại. Tất cả những tác nhân này đều gây ra cùng triệu chứng (héo và chết).

Lý tưởng nhất là các cây bị bệnh thối rễ và thân được kiểm tra tại phòng thí nghiệm trong vòng vài giờ sau khi thu thập, khi 'còn tươi'. Vì vậy, các phòng thí nghiệm chẩn đoán bệnh cây cơ bản cần được đặt ở các Chi cục Bảo vệ thực vật cấp tỉnh gần khu vực sản xuất nông nghiệp.

Các phòng thí nghiệm chẩn đoán bệnh cây quốc gia như Viện Bảo vệ thực vật ở Hà Nội có thể giám định mẫu vi sinh vật nuôi cấy, mẫu tiêu bản, vi rút, tuyến trùng và vi khuẩn gây bệnh thực vật.

Khung 10.1 Lưu ý khi chẩn đoán: phân biệt héo mạch dẫn do thối rễ và thối thân

Trong một số trường hợp rất khó quyết định nguyên nhân của các triệu chứng không điển hình như còi cọc, vàng lá và héo. Các bệnh gây héo mạch dẫn và các bệnh thối rễ, thối thân thường gây ra các triệu chứng này. Sơ đồ dưới đây hướng dẫn cách phân biệt các bệnh này.

Thân (mạch dẫn) bị nâu + có dịch khuẩn*	→	Héo vi khuẩn
Thân (mạch dẫn) bị nâu + không có dịch khuẩn	→	Héo Fusarium hoặc Héo Verticillium
Thân (mạch dẫn) không hóa nâu + không có dịch khuẩn	→	Tác nhân gây bệnh thối rễ và thân (do nấm hoặc vi sinh vật giống nấm) hoặc Tuyến trùng ký sinh thực vật hoặc Sưng rễ

Ghi chú: Dịch khuẩn có thể khó phát hiện trong những giai đoạn đầu khi cây mới nhiễm bệnh do *Ralstonia solanacearum*.

Có thể dễ nhầm lẫn héo Fusarium với héo vi khuẩn và héo Verticillium (hiện là một bệnh ngoại lai ở Việt Nam). Chúng gây ra các triệu chứng tương tự và đều gây hiện tượng hóa nâu mạch dẫn. Tuy nhiên, cây bị héo do vi khuẩn thường được chẩn đoán nhờ sự xuất hiện của dịch khuẩn. Nếu không có dấu hiệu của dịch khuẩn thì nên phân lập để xác định xem nguyên nhân là do *F. oxysporum* hay *Verticillium*. Các dạng loài của *F. oxysporum* có thể được phân biệt dễ dàng với *Verticillium albo-atrum* và *V. dahliae* trên môi trường nhân tạo. Các tản nấm *Verticillium* mọc chậm so với các tản nấm *F. oxysporum*.

Luôn luôn lây bệnh nhân tạo cho các mẫu *Fusarium* phân lập từ rễ trước khi kết luận chúng là tác nhân gây bệnh.

Các loài *Fusarium* chủ yếu gây các bệnh héo và thối thân củ, rễ củ trên rau và hoa. Chúng không phải là tác nhân phổ biến gây bệnh thối rễ. Tuy nhiên, nấm *F. oxysporum* và *F. solani* thường sống hoại sinh trên các mô rễ ảnh hưởng bởi các tác nhân gây bệnh khác, và dễ dàng được phân lập trên môi trường không chọn lọc.

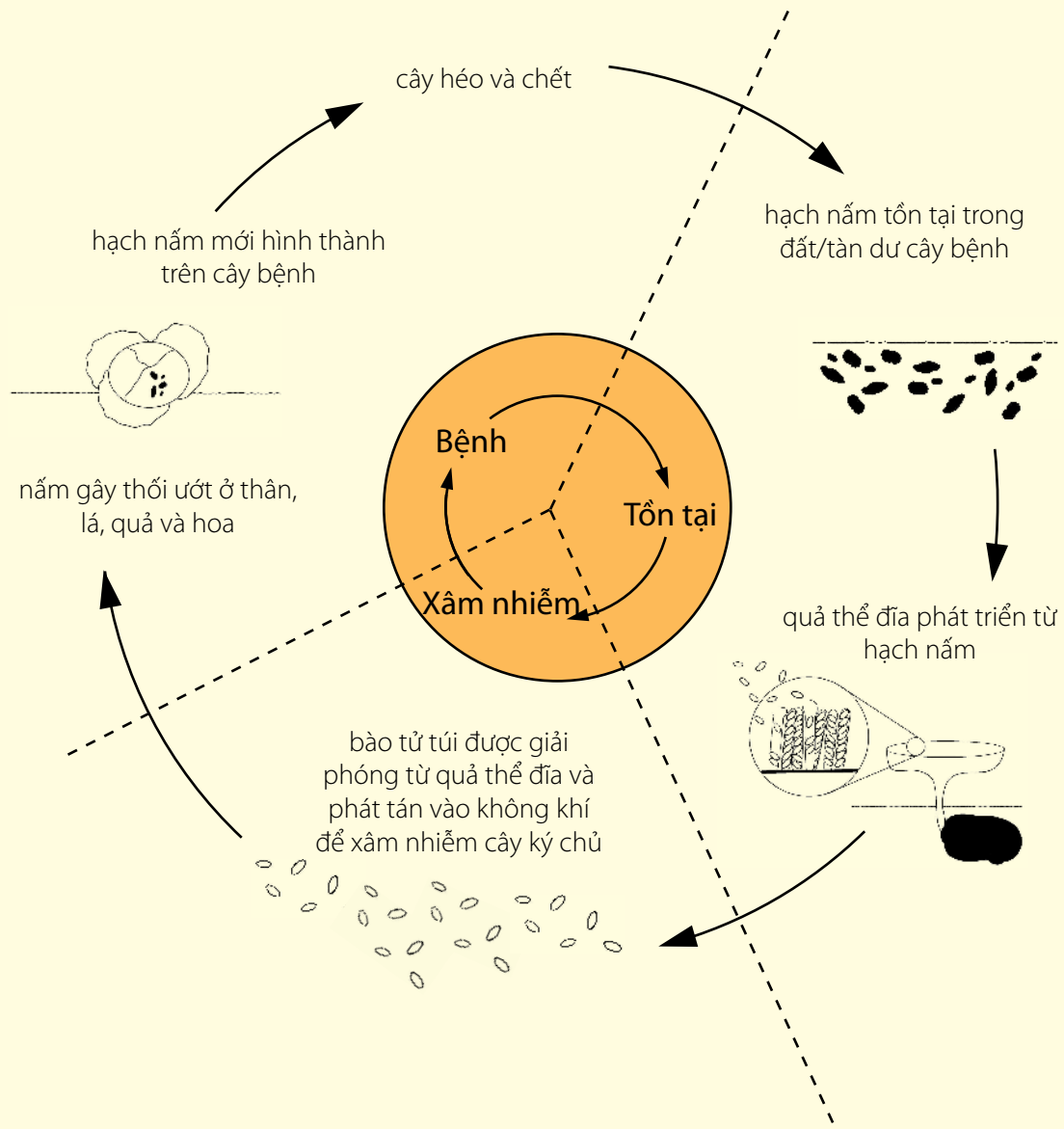
10.1 *Sclerotinia sclerotiorum*

Bảng 10.2 cung cấp thông tin về *Sclerotinia sclerotiorum*, một loại nấm gây thối ở thân, quả và hoa.

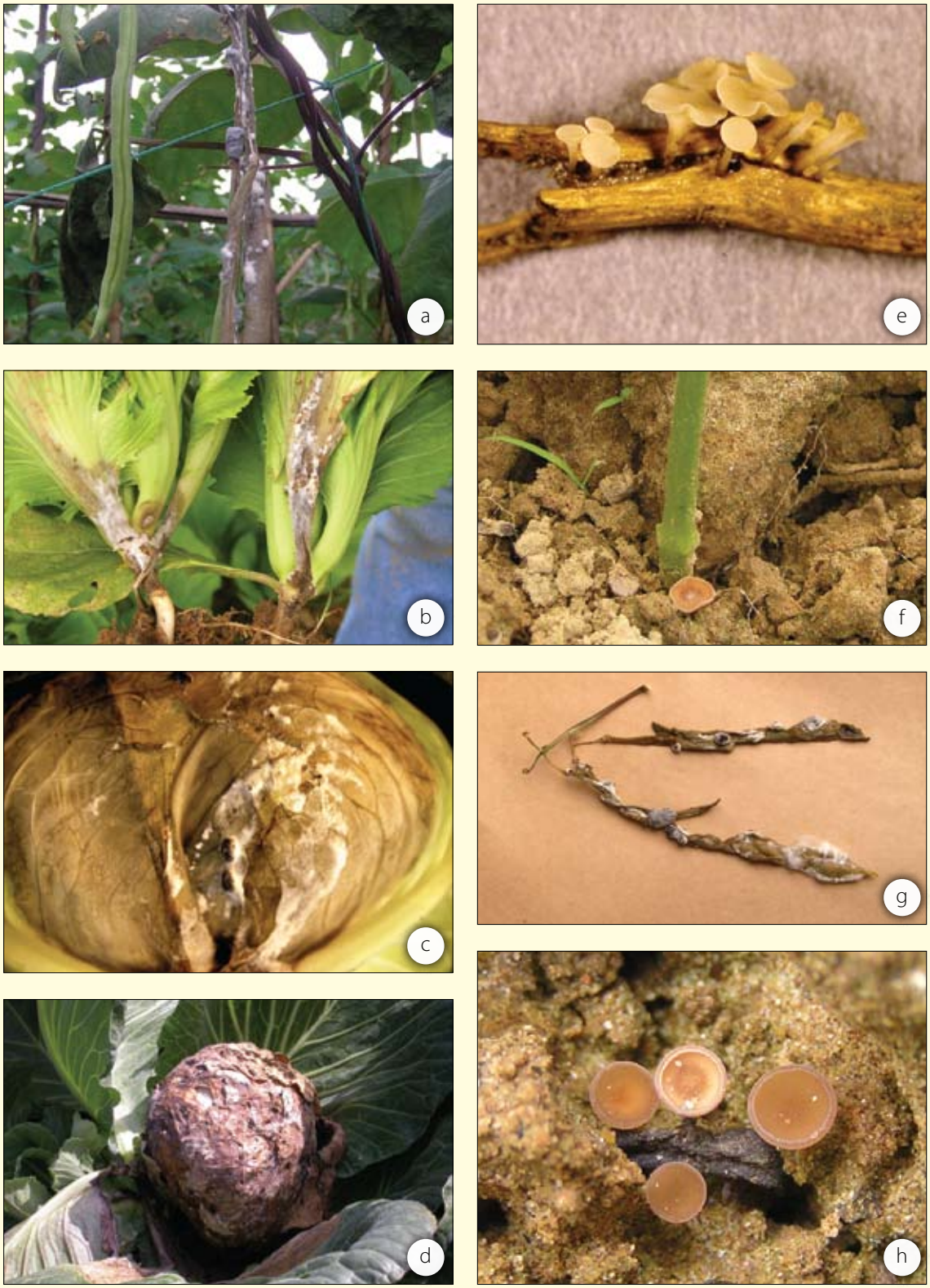
Bảng 10.2 Đặc tính của *Sclerotinia sclerotiorum*

Các triệu chứng chính	Thối ướt mô cây
Các dấu hiệu chẩn đoán	Sự có mặt của sợi nấm màu trắng và các hạch nấm lớn, màu đen với hình dạng bất định
Phổ ký chủ	Gây hại trên nhiều cây trồng hai lá mầm (lá rộng) bao gồm cà chua và khoai tây, xà lách, đậu tương, lạc, đậu cô ve lùn, đậu cô ve leo, cải bắp, súp lơ xanh, súp lơ trắng và bầu bí.
Thời tiết	Thích hợp với thời tiết ẩm ướt và lạnh
Bảo tồn	Hạch nấm tồn tại trong đất qua thời gian dài. Trong điều kiện hơi ẩm, hạch nấm nảy mầm tạo ra quả thể đĩa. Các quả thể đĩa tạo ra các bào tử túi xâm nhiễm vào cây.
Xâm nhiễm	Bào tử túi được sinh ra từ quả thể đĩa. Các bào tử túi thường xâm nhiễm vào cây ở vị trí nách lá. Các cánh hoa già cũng tạo điều kiện thuận lợi cho nấm bệnh trong quá trình xâm nhiễm.
Phòng trừ	Luân canh với các cây trồng như ngô và bông, tránh để tán cây quá dày (tán dày làm cho độ ẩm bên trong cao tạo điều kiện thuận lợi cho nấm bệnh xâm nhập).
Phân lập	1. Khử trùng bề mặt thân cây bệnh bằng cách nhúng trong cồn êtyl 70% và để khô trên giấy đã khử trùng (giấy lau mặt hoặc giấy vệ sinh chất lượng cao cũng có thể dùng được). 2. Cắt những miếng cấy từ ranh giới giữa mô khỏe và mô bệnh rồi dùng dụng cụ vô trùng cấy lên môi trường thạch đường khoai tây. 3. Làm thuần bằng phương pháp cấy đỉnh sinh trưởng sợi nấm. Nấm cũng có thể được phân lập từ hạch nấm: 1. Khử trùng bề mặt hạch nấm 1 phút trong cồn êtyl 70%. 2. Rửa lại bằng nước vô trùng và để tự khô. 3. Cắt đôi hạch nấm. 4. Cấy miếng hạch lên môi trường thạch đường khoai tây sao cho mặt cắt tiếp xúc với mặt thạch.

Hình 10.1 minh họa chu kỳ bệnh của *Sclerotinia sclerotiorum* và Hình 10.2 là một loạt các hình ảnh cho thấy sự gây hại của *Sclerotinia sclerotiorum* trên nhiều cây trồng khác nhau, cũng như các hạch nấm và quả thể đĩa.



Hình 10.1 Chu kỳ bệnh *Sclerotinia sclerotiorum*



Hình 10.2 *Sclerotinia sclerotiorum* gây hại: (a) đậu cô ve leo, (b) xà lách, (c) cải bắp (thối ướt), (d) cải bắp, (e) quả thể đĩa từ hạch nấm ở tàn dư cây đậu tương; (f) quả thể đĩa cạnh cây đậu cô ve lùn; (g) đậu cô ve leo (hạch nấm hình thành trên quả đậu); (h) hạch nấm nảy mầm tạo ra quả thể đĩa

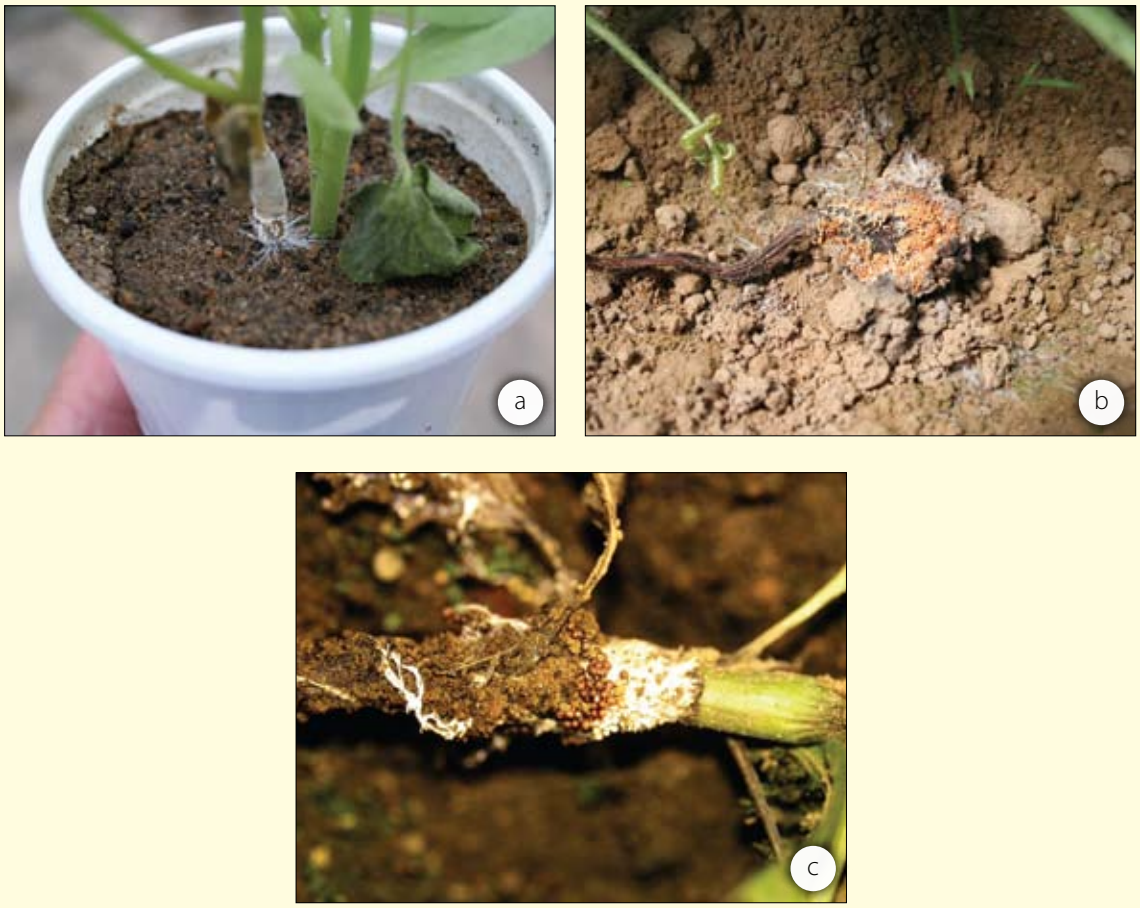
10.2 *Sclerotium rolfsii*

Bảng 10.3 cung cấp thông tin về *Sclerotium rolfsii*, nấm gây thối gốc thân.

Bảng 10.3 Đặc tính của *Sclerotium rolfsii*

Các triệu chứng chính	Gây thối ở gốc thân, cây bệnh héo và chết.
Các dấu hiệu chẩn đoán	Các sợi nấm màu trắng và các hạch nấm nhỏ màu nâu tròn dạng hạt cải được hình thành trên bề mặt gốc thân bị bệnh. Các sợi nấm trắng phát triển mạnh khi bệnh lan từ cây bệnh sang cây khỏe.
Phổ ký chủ	Phổ ký chủ rộng bao gồm cà chua, ớt, bầu bí, đậu cô ve, cà rốt và hành. Nấm bệnh thường xâm nhiễm vào các cây trồng đã bị ảnh hưởng bởi các tác nhân gây bệnh khác.
Thời tiết	Bệnh trầm trọng nhất trong điều kiện thời tiết ấm đến nóng, mưa hoặc ẩm.
Bảo tồn	Tồn tại dưới dạng hạch nấm trong đất qua thời gian dài.
Xâm nhiễm	Sợi nấm phát triển từ hạch nấm xâm nhiễm vào cây qua gốc thân. Quá trình xâm nhiễm sẽ nhanh và mạnh hơn ở những nơi có tàn dư cây bệnh sót lại trên bề mặt đất. Các sợi nấm có thể mọc lan đến vài cm trên mặt đất từ cây hoặc mô bị bệnh để xâm nhiễm những cây gần đó.
Phòng trừ	Luân canh. Đưa nước ngập ruộng trong quá trình trồng hai vụ lúa nước liên tiếp sẽ diệt trừ tất cả các hạch nấm trong đất.
Phân lập	Có thể phân lập nấm trên môi trường thạch đường khoai tây từ mô thân đã được khử trùng bề mặt, cắt miếng cấy từ ranh giới giữa mô bệnh và mô khỏe. Các mẫu *S. rolfsii* cũng có thể được phân lập từ hạch nấm: 1. Khử trùng bề mặt hạch nấm 1 phút trong cồn êtyl. 2. Rửa lại trong nước vô trùng và để tự khô. 3. Cắt hạch làm đôi và cấy lên môi trường thạch đường khoai tây sao cho mặt cắt tiếp xúc với mặt thạch.

Hình 10.3 đặc điểm của *Sclerotium rolfsii*.



Hình 10.3 *Sclerotium rolfsii:* (a) trong thí nghiệm lây bệnh nhân tạo (chú ý các sợi nấm lan ra), (b) trên dưa hấu đã bị thối, (c) thối gốc với sự hình thành các hạch nấm hình cầu màu nâu

10.3 Các loài *Rhizoctonia*

Có nhiều loài và chủng *Rhizoctonia* ở Việt Nam. Những loài này khá đa dạng về phân bố và phổ ký chủ của chúng. Việc giám định hình thái đến loài là rất khó.

Ở Việt Nam có nhiều bệnh do *Rhizoctonia* gây ra (Hình 10.4). Một số loài phát triển, xâm nhiễm, gây bệnh trên thân cây và bề mặt lá trong điều kiện thời tiết ấm, mưa hoặc ẩm độ cao. Ví dụ, một loài *Rhizoctonia* xâm nhiễm vào lá ngô và gây ra triệu chứng bệnh khô vằn điển hình trên lá (Hình 10.4d). Người ta cho rằng cũng loài đó, hoặc một loài tương tự, gây thối bắp cải bắp. Những nấm này có thể sinh ra các hạch nấm màu nâu với hình dạng bất định trên bề mặt cây bị bệnh. *Rhizoctonia oryzae* gây bệnh khô vằn trên lúa, một bệnh rất phổ biến.

Hình 10.4 Các ví dụ về bệnh Rhizoctonia: (a) triệu chứng nhọn như đầu mác ở rễ bệnh, (b) bệnh khô vằn trên lúa do *Rhizoctonia*, (c) hạch nấm của *Rhizoctonia* trên cải bắp bị bệnh, (d) bệnh do *Rhizoctonia* trên vỏ ngô

Các loài *Rhizoctonia* cũng gây hiện tượng lở cổ rễ cây con như đậu cô ve, cải bắp, lạc và bông. Triệu chứng lở cổ rễ do nấm xâm nhiễm ở phần cổ rễ sát mặt đất có thể làm chết cây con.

Bệnh thối rễ *Rhizoctonia* hình thành do nấm xâm nhập vào cây ở đỉnh sinh trưởng của các rễ phụ nhỏ. Nấm sau đó phát triển từ đầu rễ và lan vào rễ chính làm thối rễ. *Rhizoctonia* xâm nhiễm ở đỉnh sinh trưởng của rễ con thường đưa đến triệu chứng 'đầu mác' ở rễ (Hình 10.4a).

Bảng 10.4 cho thấy những đặc điểm của nấm *Rhizoctonia*, là nấm gây ra nhiều bệnh trên nhiều cây trồng khác nhau.

Bảng 10.4 Đặc điểm của các loài *Rhizoctonia*

Triệu chứng chính	Các triệu chứng phụ thuộc vào loài, chủng nấm và cây ký chủ, bao gồm lở cổ rễ cây con, héo, chết cây con, thối rễ con và thối rễ. Thối bắp cải do *Rhizoctonia* gây ra những vết thối đen trên lá. Bệnh khô vằn lúa và khô vằn ngô gây ra các vết bệnh màu vàng và các vết mất màu bất thường xen kẽ.
Dấu hiệu chẩn đoán	Việc chẩn đoán thường phụ thuộc vào quá trình phân lập và giám định nấm thuần trên môi trường nhân tạo. Các hạch nấm điển hình màu nâu, hình dạng bất định được hình thành ở một số loài trên các mô ký chủ bị bệnh.
Phổ ký chủ	Đa dạng, tùy thuộc loài và chủng nấm.
Thời tiết	Thời tiết mưa ướt, ấm tới nóng tạo điều kiện thuận lợi cho sự phát triển của các bệnh ở lá và thân cây. Các bệnh ở cây con và thối rễ lại gây hại nặng hơn trên cây trồng ảnh hưởng bởi những điều kiện thời tiết không thuận lợi. Ví dụ, cây con đậu cô ve dễ mẫn cảm với bệnh lở cổ rễ khi trời lạnh vì nhiệt độ thấp làm chậm việc nảy mầm và nhú chồi.
Bảo tồn	Các loài *Rhizoctonia* tồn tại trong đất dưới dạng hạch nấm hoặc sợi nấm trong tàn dư cây ký chủ.
Xâm nhiễm	Các sợi nấm *Rhizoctonia* trong tàn dư cây bệnh xâm nhiễm trực tiếp vào mô cây và một số tạo các cấu trúc xâm nhiễm đặc biệt. Hạch nấm nảy mầm tạo ra sợi nấm xâm nhiễm vào cây.
Phòng trừ	Bệnh chết rạp cây con (lở cổ rễ) có thể được giảm thiểu bằng cách xử lý hạt với thuốc trừ nấm như quintozene (pentachloronitrobenzene) và thay đổi thời vụ (ngày) trồng sao cho nhiệt độ và độ ẩm đất có lợi cho nảy mầm và nhú chồi nhanh. Hiệu quả của việc luân canh tùy thuộc vào phổ ký chủ của các loài *Rhizoctonia* là đối tượng phòng trừ.
Phân lập	Nấm bệnh có thể được phân lập dễ dàng từ mẫu bệnh khô vằn lúa, khô vằn ngô và thối bắp cải bằng cách khử trùng bề mặt mô bệnh, cấy lên môi trường thạch nước cất và cấy truyền lên môi trường thạch đường khoai tây có bổ sung kháng sinh. Việc phân lập từ rễ hoặc rễ con bị thối khó khăn hơn: 1. Rửa rễ cho sạch đất. 2. Khử trùng bề mặt trong cồn êtyl 70% trong 5 giây. 3. Rửa lại bằng nước vô trùng và để khô trên giấy thấm đã khử trùng. 4. Cấy các mẩu rễ nhỏ (1-2 mm chiều dài) cắt từ ranh giới giữa mô bệnh và mô khỏe lên môi trường thạch nước cất. 5. Cấy truyền lên môi trường thạch đường khoai tây. *Rhizoctonia* có thể phân biệt được với *Pythium* và *Phytophthora* trên môi trường thạch nước cất bằng đặc điểm hình thái sợi nấm phân nhánh vuông góc và sự có mặt của các sợi nấm sợi lớn có vách ngăn. Hạch nấm có thể hình thành trong môi trường nhân tạo, đặc biệt trên môi trường thạch thân lúa.

10.4 *Phytophthora* và *Pythium*

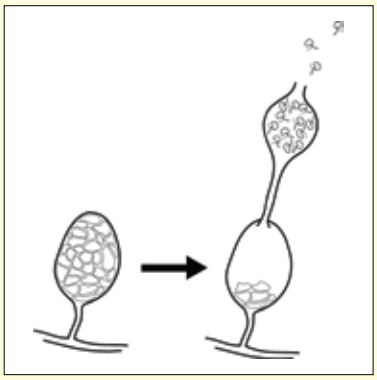
Các chi *Phytophthora* và *Pythium* thuộc lớp Oomycetes trong Giới Chromista. Như vậy, chúng không phải là nấm thực mà là vi sinh vật giống nấm. Những chi này sản sinh ra các sợi nấm không vách ngăn, một đặc điểm chính phân biệt chúng với các chi nấm thực.

10.4.1 Sinh sản vô tính

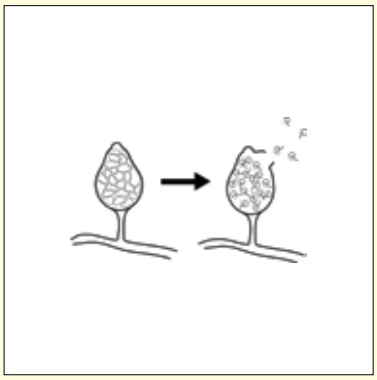
Sinh sản vô tính tạo thành các cấu trúc gọi là bọc bào tử động, nơi hình thành và giải phóng du động bào tử. Những du động bào tử này di chuyển được và có vai trò quan trọng trong chu kỳ bệnh, đặc biệt là chức năng lan truyền trong đất ướt hoặc trên bề mặt cây trồng. Sự hình thành du động bào tử cũng là một đặc điểm phân biệt *Phytophthora* và *Pythium* với các chi nấm thực. Du động bào tử giúp cho việc lan truyền bệnh nhanh chóng từ cây bệnh sang cây khỏe.

Các bọc bào tử động của *Pythium* được hình thành ở đỉnh hoặc đoạn giữa các sợi nấm, hình tròn (hình cầu) hoặc hình sợi (giống như sợi nấm phình ra). Một ống tháo được hình thành từ bọc bào tử của *Pythium*, với một bọc giả có thành rất mỏng hình thành ở cuối ống tháo (Hình 10.5). Tế bào chất di chuyển từ bọc bào tử qua ống tháo vào bọc giả. Các du động bào tử sau đó phát triển trong bọc giả và được tung ra khi màng bọc giả vỡ.

Ngược lại, các loài *Phytophthora* tạo các túi bào tử có những hình dạng nhất định một cách rõ rệt trên cành mang bọc bào tử. Các du động bào tử hình thành trong bọc bào tử và được giải phóng trực tiếp từ bọc bào tử. Một số loài như *P. infestans* và *P. palmivora* tạo các bọc bào tử rất dễ rụng ra khỏi cành mang bọc bào tử và có thể được phân tán nhờ gió.



Pythium



Phytophthora

Hình 10.5 Du động bào tử *Pythium* được giải phóng qua bọc giả (trái), và du động bào tử *Phytophthora* được giải phóng trực tiếp từ bọc bào tử (phải)

Một số loài *Phytophthora*, như *P. cinnamomi*, tạo bào tử hậu trên môi trường nhân tạo. Các bào tử này có chức năng bảo tồn trong đất.

10.4.2 Sinh sản hữu tính

Sinh sản hữu tính liên quan đến sự hình thành các túi noãn (thể 'cái') và túi đực (thể 'đực'). Sau khi thụ tinh, noãn cầu (giao tử 'cái') trong túi noãn phát triển thành bào tử trứng có vách dày. Bào tử trứng là bào tử bảo tồn và có vai trò quan trọng trong chu kỳ bệnh. Bào tử trứng của *Pythium* có thể có vách mịn hoặc dạng trang trí như sừng. Bào tử trứng của *Phytophthora* có vách mịn.

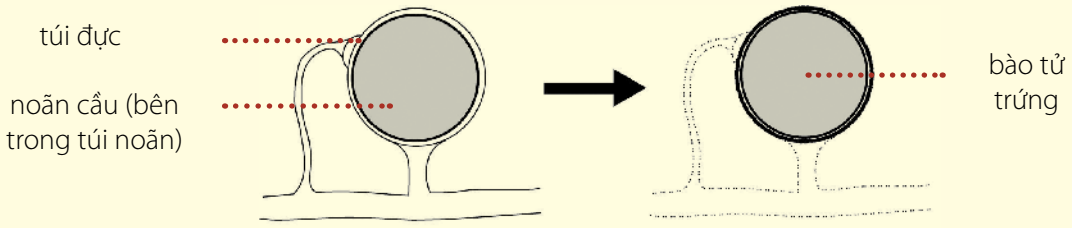
Sterol là chất cần thiết cho việc sản xuất túi noãn. Vì vậy, những nấm này cần được nuôi cấy trên môi trường PCA (thạch cà rốt khoai tây) bởi vì chất chiết từ cà rốt chứa sterol. Môi trường PCA nên có một số vụn chiết cà rốt.

Một số loài *Pythium* có đặc tính dị tản; tuy nhiên, nhiều tác nhân gây bệnh thông thường là đồng tản và tạo các cấu trúc sinh sản hữu tính ngay trong một mẫu cấy đã làm thuần từ đỉnh sinh trưởng của một sợi nấm. Sinh sản hữu tính ở loài đồng tản chỉ cần một cá thể. Sinh sản hữu tính ở loài dị tản đòi hỏi sự kết hợp của hai cá thể có dạng giới tính khác nhau.

Khoảng 50% loài *Phytophthora* là khác tản và đòi hỏi sự kết hợp của hai cá thể có dạng giới tính khác nhau (A1 và A2) để việc sinh sản hữu tính xảy ra. Hình 10.6 minh họa quá trình sinh sản hữu tính ở *Pythium*—cũng trải qua một tiến trình tương tự như ở *Phytophthora*.

10.4.3 Xác định và phân biệt giữa *Phytophthora* và *Pythium*

Các tản nấm của nhiều loài *Phytophthora* và *Pythium* có hình thái tương đối giống nhau trên môi trường nhân tạo. Việc giám định chính xác các loài này có thể dựa vào hình thái của các bọc bào tử và sự sắp xếp của các túi noãn và túi đực. Sự có mặt hoặc vắng mặt của bào tử hậu cũng là một đặc tính trợ giúp cho việc giám định, cũng như hình thái sợi nấm của một số loài *Phytophthora*.



Hình 10.6 Sơ đồ minh họa quá trình sinh sản hữu tính ở *Pythium*, liên quan đến sự tiếp xúc giữa túi đực và túi noãn để tạo ra bào tử trứng

Các loài *Pythium* thường tạo ra rất nhiều sợi nấm bông xốp màu trắng trên môi trường thạch đường khoai tây (PDA), choán ngập đĩa cấy (Hình 10.7). Một số loài *Pythium* mọc rất nhanh, và có thể che kín một đĩa PDA lớn (đường kính 90mm) trong vòng dưới 2 ngày. Ngược lại, các loài *Phytophthora* thường mọc chậm hơn, tạo ra ít sợi nấm trắng hơn. Tuy nhiên, đây không phải là một tiêu chí tin cậy để phân biệt hai chi này.

Hình 10.7 *Pythium sp.* (trái) và *Phytophthora sp.* (phải), cho thấy đặc tính mọc nhanh và tạo thành các sợi nấm khí sinh trên đĩa *Pythium*

Các loài *Pythium* thường sản sinh bọc bào tử và du động bào tử trên môi trường thạch nước cất (WA) hoặc PCA sau khi đổ nước ngập môi trường. Trạng thái sốc với nhiệt độ thấp (5-10°C trong khoảng 2 giờ) có thể giúp cho việc sản sinh bọc bào tử ở *Pythium*. Một số loài *Pythium* đồng tản cũng có thể sản sinh bào tử trứng trên WA. Tuy nhiên, một số mẫu cấy của các loài *Pythium* đồng tản mọc trên môi trường nước vô trùng có chứa lá lúa đã được khử trùng sản sinh rất nhiều túi noãn và túi đực ở điều kiện nhiệt độ thường.

Tham khảo tài liệu mô tả hình thái các loài *Pythium* nhằm giúp việc giám định tới mức độ loài và chuyển mẫu cấy đến các phòng thí nghiệm có uy tín để khẳng định lại kết quả giám định.

Các loài *Pythium* đã phân lập được ở Việt Nam cũng sản sinh bọc bào tử và du động bào tử trên môi trường nước lá lúa.

Một số loài *Phytophthora* sản sinh bọc bào tử trên môi trường chọn lọc cho *Phytophthora* (PSM) nếu được đặt trong điều kiện có chiếu sáng. Một số loài cũng sản sinh bọc bào tử trên PCA, môi trường nuôi cấy đã được chuẩn bị sẵn trong phòng thí nghiệm.

Việc hình thành bọc bào tử có thể được kích thích bằng cách cấy một miếng agar khoảng 1cm² từ môi trường PSM hoặc PCA vào một đĩa Petri đã đổ nước vô trùng và để dưới ánh sáng trong 2 ngày.

Nên tham khảo nhiều cuốn sách hay đã được xuất bản để có thêm thông tin sâu rộng hơn. Tham khảo sách *Phytophthora Diseases Worldwide* của Erwin và Ribeiro (1996) để tìm thông tin mô tả chi tiết các bọc bào tử của các loài *Phytophthora* nhằm giúp cho việc giám định. Để trợ giúp cho việc giám định *Phytophthora*, nên tham khảo thêm cuốn *Practical Guide to Detection and Identification of Phytophthora* của Drenth và Sendall (2001)

Phần lớn các loài *Phytophthora* gây bệnh phổ biến ở Việt Nam là dị tản, như P. *capsici, P. palmivora, P. nicotianae, P. infestans, P. cinnamomi* và *P. colocasiae*. Lưu ý *P. heveae* là loài đồng tản, và việc sinh sản hữu tính ở *P. citrophthora* là hiếm.

Trong loài dị tản, để sinh sản hữu tính được cần lai các cá thể có dạng giới tính khác nhau. Việc này có thể không thực hiện được ở các phòng thí nghiệm chẩn đoán bệnh cây cấp tỉnh.

Cách thức hình thành và hình thái của các bọc bào tử *Phytophthora* là tiêu chí thực tiễn cho việc giám định những loài quan trọng nhất ở Việt Nam nếu có các tài liệu tham khảo đáng tin cậy như Erwin và Ribeiro (1996).

Du động bào tử của *Pythium* thường được hình thành trong bọc giả ở cuối ống tháo. Ngược lại, các du động bào tử của *Phytophthora* thường được hình thành trực tiếp trong bọc bào tử. Đây là một đặc điểm tin cậy để phân biệt giữa hai chi này.

10.4.4 Chu kỳ bệnh của nấm Oomycete - *Phytophthora* và *Pythium*

Hình 10.8 là sơ đồ minh họa chu kỳ bệnh của nấm oomycete (nấm trứng) và Hình 10.9 cho thấy các đặc tính của *Pythium* và bọc bào tử của *Phytophthora* sp.

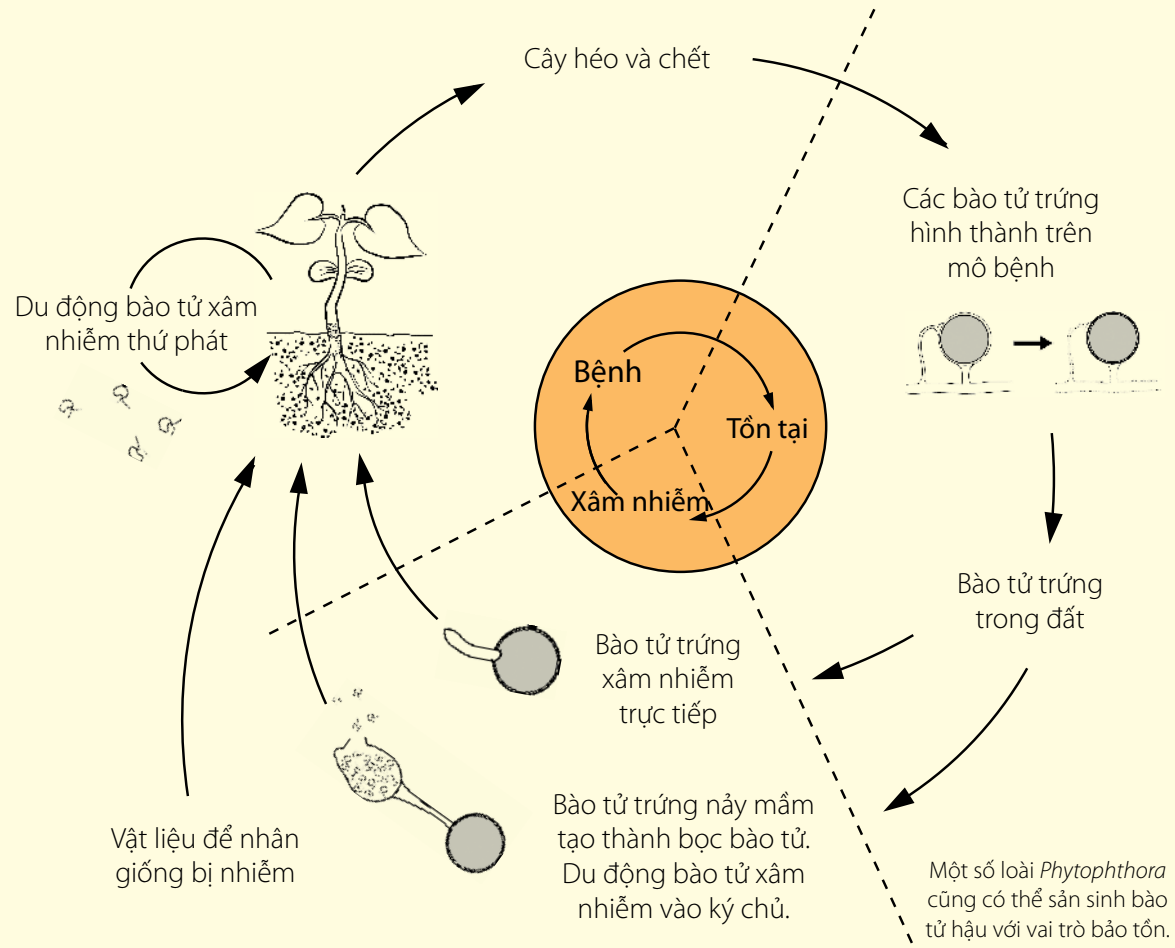
10.4.5 Các loài *Pythium*

Pythium thuộc lớp Oomycete (nấm trứng). Chúng không phải là nấm thực bởi vì lớp này thuộc giới Chromista.

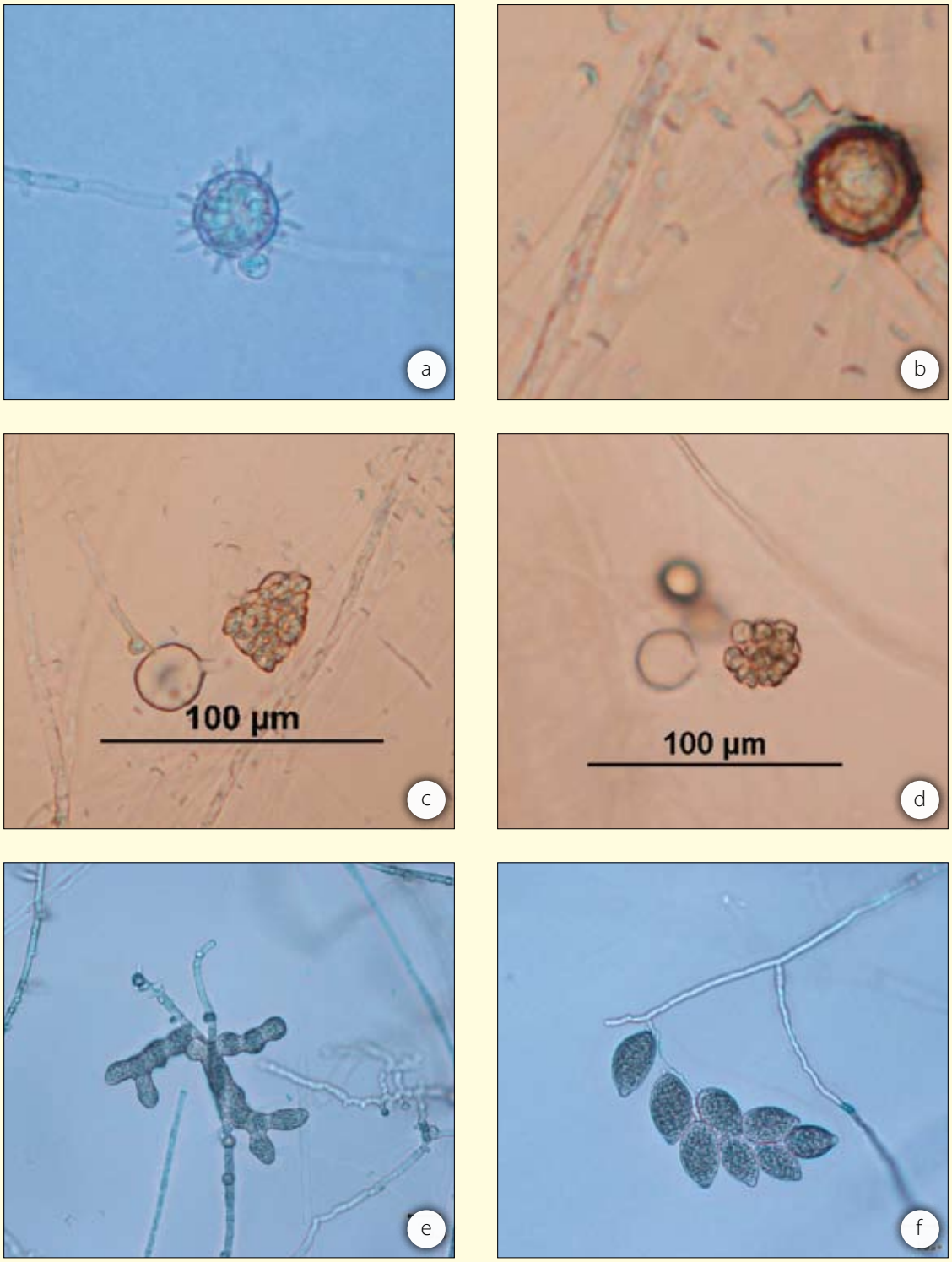
Pythium (và *Phytophthora*) sản sinh ra các bào tử di chuyển được, hay còn gọi là du động bào tử, có vai trò rất quan trọng. Đây cũng là đặc điểm để phân biệt những nấm này với nấm thực trong giới Nấm (Mycota). Du động bào tử vô tính tạo điều kiện cho những nấm này lan truyền trong đất ướt và nước tưới. Hình 10.10 cho thấy bệnh ở cây lạc do *Pythium* gây ra.

Pythium có thể gây chết cây con, nhưng hiếm khi gây chết cây trưởng thành. Tuy nhiên, chúng có thể gây thối rễ con trầm trọng và cản trở quá trình hấp thu chất dinh dưỡng, khiến cây còi cọc, hơi vàng và giảm năng suất.

Bảng 10.5 cung cấp thông tin về *Pythium*, là nấm trứng gây bệnh trên nhiều cây trồng khác nhau.



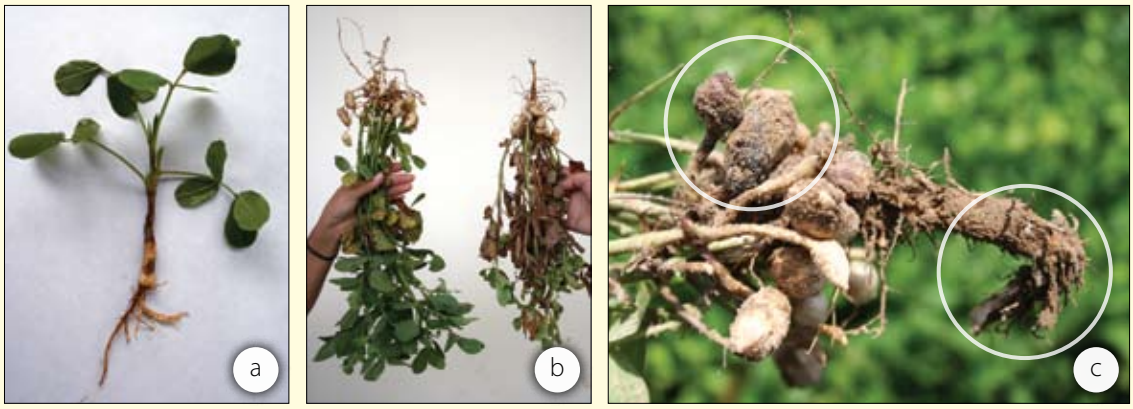
Hình 10.8 Chu kỳ bệnh đã được đơn giản hoá của tác nhân gây bệnh thuộc lớp nấm trứng



Hình 10.9 (a) Thể trứng của *Pythium spinosum* với thùy thể đực bám vào, (b) bào tử trứng trưởng thành của *P. mamillatum*, (c) bọc bào tử *P. mamillatum* với ống tháo và bọc giả chứa các du động bào tử đang phát triển, (d) bọc bào tử của *P. irregulare* với các du động bào tử trưởng thành trong bọc giả có vách mỏng trước khi được giải phóng ra ngoài, (e) Các bọc bào tử hình ngón ở *P. myriotilum*, (f) cành mang bọc bào tử và bọc bào tử đặc trưng của *Phytophthora* sp.

Bảng 10.5 Đặc tính của các loài *Pythium*

Bệnh	*Pythium* gây bệnh tàn lụi và chết rạp cây con (bệnh do ẩm ướt), và gây thối rễ con ở cây trưởng thành. Chúng cũng gây thối củ khoai tây, cà rốt và các nông sản bảo quản khác. Thối rễ và quả do *Pythium* là một bệnh chủ yếu ở lạc.
Các triệu chứng chính	Các triệu chứng bệnh điển hình ở cây con là héo và chết do thối nâu rễ con và thối thân. *Pythium* cũng có thể gây hại rễ con nuôi cây, gây hiện tượng còi cọc, và vàng lá ở các cây trưởng thành. Khi cây bị bệnh trưởng thành, *Pythium* có thể phát triển và gây thối rễ chính hay rễ cái. *Pythium* cũng có thể gây thối quả ở lạc.
Các dấu hiệu chẩn đoán	Không có các dấu hiệu chẩn đoán đặc trưng cho *Pythium*. Cần phân lập và giám định mẫu nấm nuôi cấy nhằm xác định chính xác tác nhân gây bệnh.
Phổ ký chủ	Hầu hết các loài *Pythium* có phổ ký chủ rộng.
Thời tiết	Đất ướt tạo điều kiện thuận lợi cho các du động bào tử *Pythium* xâm nhiễm và lan truyền qua đất. Các điều kiện đất và môi trường ngăn cản sự phát triển của rễ sẽ làm tăng nguy cơ tàn lụi cây con và thối rễ con nuôi cây.
Bảo tồn	Các loài *Pythium* tồn tại dưới dạng bào tử trứng được tạo thành qua quá trình sinh sản hữu tính. Trong các điều kiện thuận lợi, những bào tử vách dày này nảy mầm và bắt đầu quá trình xâm nhiễm vào rễ con.
Xâm nhiễm	Trong đất ướt, du động bào tử được thu hút tới đầu rễ con, ở đó chúng tạo ra các ống mầm (sợi nấm còn non) xâm nhập qua đầu rễ con và khởi đầu quá trình làm thối rễ.
Phòng trừ	Có thể xử lý hạt bằng thuốc trừ nấm, và xử lý rễ cây con bằng cách nhúng rễ vào dung dịch thuốc trừ nấm trước khi trồng. Luân canh là một biện pháp quan trọng nhằm giảm tỷ lệ bệnh thối rễ do *Pythium*. Cần lưu ý sử dụng các cây giống sạch bệnh.
Phân lập	Các loài *Pythium* có thể được phân lập từ các rễ con bị bệnh: 1. Nhúng nhanh rễ trong cồn êtyl 70% và rửa lại trong nước vô trùng. 2. Để ráo trên giấy thấm vô trùng. 3. Cấy lên môi trường thạch nước cất. Thạch nước cất thường được dùng cho việc phân lập, bởi vì *Pythium* mọc rất nhanh trên mặt thạch—hầu hết các loài *Pythium* phát triển rất nhanh. Sợi nấm trắng mịn và dầy hình thành trên môi trường PDA. Nhiều loài có thể mọc phủ kín một đĩa PDA lớn trong vòng ít hơn 48 giờ. Làm thuần các mẫu *Pythium* bằng cách cấy đỉnh sinh trưởng sợi nấm. *Pythium* thường sản sinh rất nhiều bọc bào tử động và bào tử trứng trong môi trường nước lá lúa.



Hình 10.10 Các bệnh do *Pythium* trên lạc: (a) thối rễ con và thối thân cây con do *Pythium* trong điều kiện rất ẩm ướt, (b) so sánh hai cây trưởng thành, cây khỏe (trái), cây còi cọc do thối rễ nặng (phải), (c) thối rễ cái và quả lạc trầm trọng do *Pythium*.

10.4.6 Các loài *Phytophthora*

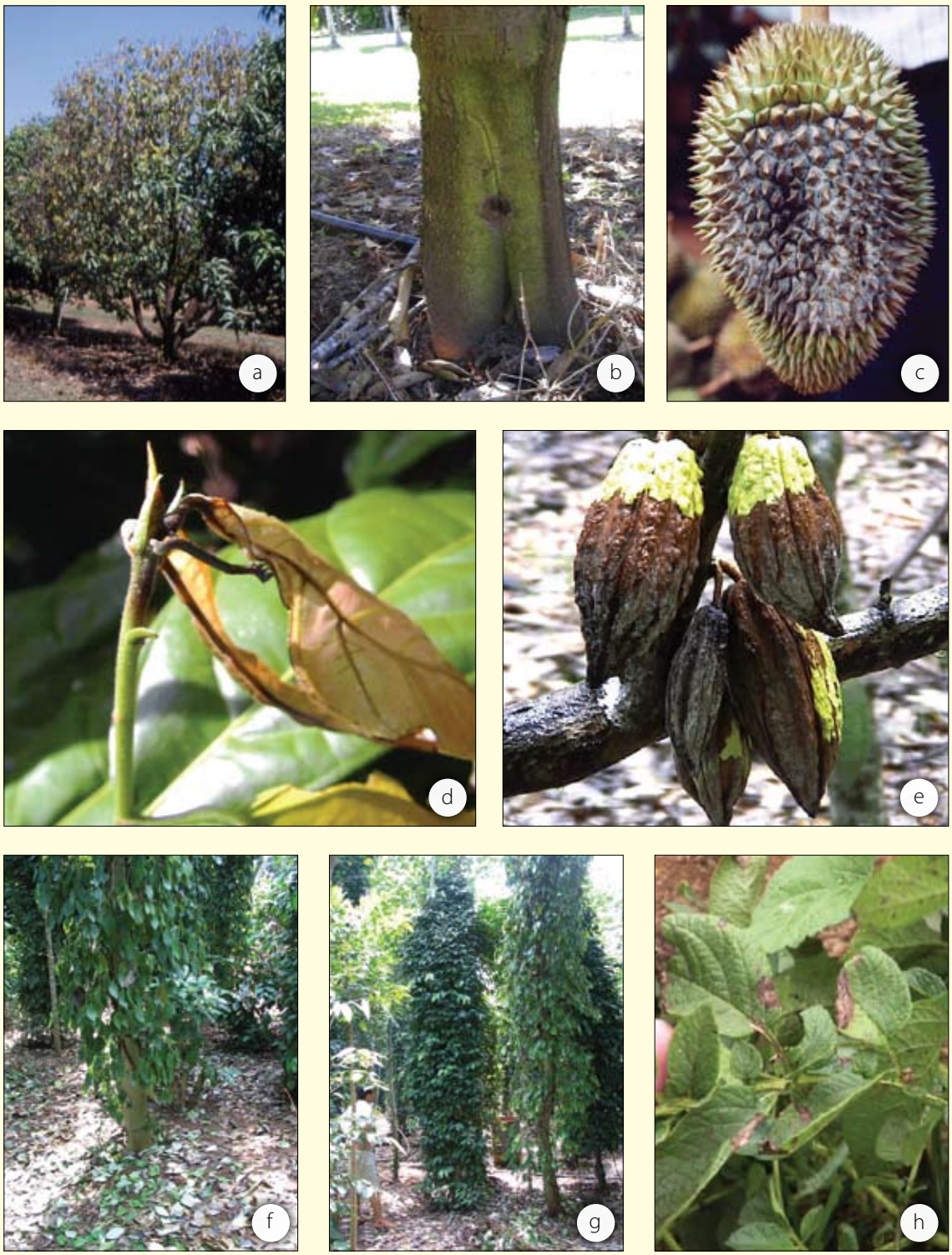
Giống như *Pythium*, *Phytophthora* thuộc lớp nấm trứng, không phải nấm thực và sản sinh ra du động bào tử. Vì vậy, phòng trừ *Phytophthora* và *Pythium* khác với phòng trừ các bệnh do nấm thực gây ra và các thuốc trừ nấm dùng trong phòng trừ cũng khác nhau.

Các bệnh do *Phytophthora* gây hại cho cây lâu năm, rau và các cây trồng khác làm tổn thất đáng kể về kinh tế cho vùng Đông Nam Á. Việc phân lập và giám định các loài *Phytophthora* cũng như phương pháp quản lý bệnh hại tổng hợp được đề cập chi tiết trong các tài liệu liệt kê ở phần tủ sách. Bảng 10.6 cung cấp thông tin về *Phytophthora*, một loại nấm trứng gây ra một loạt các bệnh trên nhiều cây trồng khác nhau ở Việt Nam. Một số bệnh này được đề cập ở Hình 10.11.

Bảng 10.6 Đặc tính của các loài *Phytophthora*

Bệnh	*Phytophthora* là nguyên nhân gây rất nhiều bệnh trên cây ăn quả, rau màu và cây công nghiệp ở Việt Nam. Các bệnh bao gồm thối rễ; thối thân và quả sầu riêng; thối rễ ớt; thối nõn dứa; thối gốc (héo nhanh) hồ tiêu; mốc sương cà chua, khoai tây; thối rễ, thân và quả đu đủ; tàn lụi cao su và các cây trồng khác.
Các triệu chứng chính	Cây bị bệnh chết dần từ ngọn cây và có thể có triệu chứng thối rễ và nứt ở phần thân gần mặt đất. Các cây rau bị thối rễ, như ớt, trở nên còi cọc và héo. Cây thường chết nhanh sau khi các triệu chứng héo trầm trọng xảy ra.

Các dấu hiệu chẩn đoán	Việc chẩn đoán đòi hỏi quá trình phân lập và giám định tác nhân gây bệnh. Triệu chứng héo cũng có thể do các tác nhân khác làm thối rễ và thân.
Xâm nhiễm	Cách thức xâm nhiễm tùy thuộc từng loài. Tuy nhiên, bào tử trứng, bọc bào tử động và du động bào tử tạo điều kiện cho việc xâm nhiễm vào các bộ phận khác nhau của cây. Mưa tạt phân tán bào tử lên bộ lá của cây vì vậy quá trình xâm nhiễm có thể bắt đầu từ thân, lá và quả, tùy thuộc loài *Phytophthora* và ký chủ. Côn trùng bò hoặc bay cũng có thể mang nấm từ đất tới các bộ phận phía trên của cây.
Phổ ký chủ	Phổ ký chủ của *Phytophthora* tùy thuộc vào từng loài cụ thể. Một số loài như *P. palmivora* có phổ ký chủ rộng, trong khi các loài khác như *P. infestans* có phổ ký chủ hẹp.
Bảo tồn	Các tác nhân gây bệnh bảo tồn dưới dạng bào tử trứng và/hoặc bào tử hậu trong đất, và có thể được di chuyển theo vật liệu nhân giống, đất hoặc nông cụ có chứa nấm bệnh.
Khí hậu	Các bệnh do *Phytophthora* thích hợp với điều kiện ẩm ướt. Lượng mưa cao tại các vùng nhiệt đới thúc đẩy quá trình lan truyền của du động bào tử và các mầm bệnh khác theo nước mưa tạt. Du động bào tử cũng di chuyển theo nước trong các lạch và kênh tưới tiêu. Nhiều loài *Phytophthora* ưa điều kiện nóng ẩm trong khi đó một số loài như *P. infestans* (mốc sương), lại ưa điều kiện ẩm ướt và mát.
Phòng trừ	Để phòng trừ thành công các bệnh do *Phytophthora* thường phải có sự kết hợp các biện pháp phòng trừ khác nhau: • thoát nước tốt • dùng giống sạch bệnh • ngăn chặn *Phytophthora* vào những vùng không nhiễm bệnh • dùng phân gà để ức chế hoạt động của tác nhân gây bệnh trong đất • tiêm phosphonate vào cây • nhúng rễ cây con vào thuốc trước khi trồng để giảm số cây con chết.
Phân lập	*Phytophthora* có thể được phân lập trực tiếp từ các phần lá cây bệnh, như lá dứa, dùng môi trường phân lập chọn lọc. Về phương pháp, tham khảo quy trình phân lập từ mẫu bệnh thối nõn dứa được mô tả bằng hình ảnh trong phần nghiên cứu cụ thể bệnh thối nõn dứa (Phần 3.1). Phân lập từ rễ cây bệnh có thể khó hơn nhiều do có nhiều nấm và vi khuẩn hoại sinh mọc trong các mô rễ bệnh. Tham khảo quy trình phân lập tác nhân gây bệnh rễ ở Phần 6.3.2. Nên dùng bẫy để phân lập *Phytophthora* từ rễ nhỏ và đất. Tham khảo chi tiết về phương pháp này ở phần bẫy tác nhân gây bệnh từ rễ và đất (Phần 6.3.4).



Hình 10.11 Bệnh do *Phytophthora palmivora* ở sầu riêng: (a) cây vàng lá, (b) thối mục thân, (c) thối quả. Bệnh do *P. palmivora* ở cacao: (d) tàn lụi cây con, (e) quả bị đen. Thối rễ (héo nhanh) hồ tiêu do *P. capsici*: (f) rụng lá, (g) héo. Bệnh do *P. infestans*: (h) mốc sương khoai tây. Các hình ảnh (a) đến (e) do David Guest cung cấp, (f) đến (g) do N. V. Truong cung cấp.

10.5 *Fusarium*

10.5.1 Giới thiệu

Chi *Fusarium* bao gồm nhiều loài gây bệnh cho cây như héo do tắc bó mạch, thối rễ, thân và bắp, thối cổ rễ cây con và thối củ. Một số loài gây bệnh cũng sản sinh độc tố nấm lẫn tạp trong hạt ngũ cốc (xem các loài *Fusarium* có độc tố, Phần 12.3).

Nhiều loài *Fusarium* khác là hoại sinh phổ biến trong đất. Các loài hoại sinh thường có mặt trên rễ và thân cây bệnh. Những loài hoại sinh này mọc nhanh trên môi trường và được phân lập dễ dàng từ rễ và thân bị bệnh, khiến cho việc phân lập các tác nhân gây bệnh chính trở nên khó khăn. Vì vậy việc lây bệnh nhân tạo các mẫu *Fusarium* phân lập từ rễ bệnh là rất cần thiết. Đây là phần quan trọng trong quá trình chẩn đoán, và là một trong những lý do tại sao chẩn đoán một bệnh rễ lại khó khăn. Ví dụ, *Fusarium oxysporum* bao gồm nhiều dạng loài gây các bệnh héo do tắc bó mạch và một số bệnh thối rễ. Tuy nhiên, *F. oxysprorum* cũng bao gồm nhiều dạng hoại sinh có mặt phổ biến trên rễ cây bệnh sau khi tác nhân gây bệnh đã làm thối mô rễ. Một số loài hoại sinh này cũng có thể sống nội sinh trong các tế bào lớp ngoài của rễ mà không làm tổn thương rễ.

Các loài *Fusarium* hoại sinh ở rễ mọc nhanh trên môi trường PDA và thường được chẩn đoán nhầm là tác nhân gây bệnh.

Không sử dụng PDA để phân lập nấm gây bệnh từ rễ.

10.5.2 Nấm *Fusarium* gây bệnh ở Việt Nam

Các bệnh héo *Fusarium* là vấn đề quan trọng ở Việt Nam và những bệnh này được đề cập đến một cách chi tiết sau trong phần này. Những bệnh héo này do các dạng loài của *F. oxysporum* gây ra. Một vài dạng *F. oxysporum* cũng có thể gây thối dưa hấu và củ khoai tây đã bị sâu hoặc dụng cụ gặt hái làm tổn thương.

Thối bắp ngô, chủ yếu do *F. graminearum* và *F. verticillioides* gây ra, ngày càng trở nên nghiêm trọng ở Việt Nam. Cả hai loài đều sản sinh độc tố nấm tồn tại trong hạt (tham khảo độc tố nấm *Fusarium* trong Phần 12).

Một số dạng *Fusarium solani* gây thối cổ rễ cây con họ đậu như đậu Hà Lan, đậu cô ve, và thối rễ ở các cây trưởng thành. Các dạng khác có thể gây hại ở khu vực gốc thân cây lớn, như cây vải, bị yếu đi do yếu tố môi trường làm stress và do các bệnh khác.

Fusarium decemcellulare đã được phân lập từ cành nhãn bị thối ở miền bắc Việt Nam (L. Burgess, thông tin chưa xuất bản) và từ cà phê ở Tỉnh Đắc Lắc (TS. Trần Kim Loang, giao tiếp riêng).

Danh mục này chưa phải là đầy đủ và còn nhiều loài khác có thể có mặt ở Việt Nam. Hình 10.12 minh họa một số bệnh do *Fusarium* gây ra.

Bảng 10.7 Danh mục một số dạng loài *Fusarium oxysporum* gây héo.

Hình 10.12 Bệnh do các loài *Fusarium* gây ra: (a) *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* gây héo đậu Hà Lan, (b) khối bào tử phân sinh *Fusarium oxysporum* f. sp. *zingiberi* trên củ gừng, (c) thân cây bị hóa nâu do *F. oxysporum*, (d) quả thể của *F. graminearum* trên thân ngô.
Các ảnh (a) và (c) do Ameera Yousiph cung cấp.

Bảng 10.7 *Fusarium oxysporum* (héo do tắc bó mạch)

Bệnh	Các bệnh héo Fusarium do các dạng loài của *F. oxysporum* gây ra. Mỗi dạng loài thường chỉ có thể gây héo trên một loài ký chủ. Trên thế giới có tới hơn 100 bệnh héo Fusarium. Ở Việt Nam, bệnh héo Fusarium trên chuối là một trong những bệnh héo quan trọng và được biết đến nhiều. Một số dạng loài Fusarium gây héo và các bệnh do chúng gây ra ở Việt Nam:	
	F. oxysporum f. sp. *cubense*	Héo Fusarium trên chuối (bệnh Panama)
	F. oxysporum f. sp. *lycopersici*	Héo Fusarium trên cà chua
	F. oxysporum f. sp. *pisi*	Héo Fusarium trên đậu Hà Lan
	F. oxysporum f. sp. *niveum*	Héo Fusarium trên dưa hấu
	F. oxysporum f. sp. *callistephi*	Héo Fusarium trên cúc tây
	F. oxysporum f. sp. *zingiberi*	Héo Fusarium trên gừng
	F. oxysporum f. sp. *dianthi*	Héo Fusarium trên cẩm chướng
	Cần điều tra các bệnh héo Fusarium ở Việt Nam bởi vì theo các tác giả, có nhiều bệnh héo Fusarium ngoại lai quan trọng chưa được công bố (như héo Fusarium trên cải bắp). Cách tốt nhất để hạn chế những bệnh này là đưa ra các quy định chặt chẽ về kiểm dịch thực vật.	
Triệu chứng	Các triệu chứng sớm bao gồm vàng lá, hơi héo trong ngày và còi cọc. Khi trời nóng, những cây bệnh như cà chua và đậu Hà Lan sẽ chết trong vòng vài ngày. Chuối bị bệnh thường chết chậm hơn, trong vòng 1-2 tháng.	

Vàng lá, héo và còi cọc là các triệu chứng chung của nhiều bệnh trên rễ và thân.

Hóa nâu mạch dẫn bên trong thân cây là triệu chứng điển hình của các bệnh héo do tắc bó mạch, bao gồm cả các bệnh héo Fusarium.

Hình 10.13 cho thấy một số bệnh héo Fusarium xuất hiện ở Việt Nam.

Bảng 10.8 cung cấp thông tin về các dạng loài của *Fusarium oxysporum*, nấm gây héo do tắc bó mạch trên cây trồng.

Hình 10.13 Héo Fusarium trên chuối do *F. oxysporum* f. sp. *cubense*: (a) các triệu chứng héo trầm trọng, (b) triệu chứng nứt thân, (c) hóa nâu mạch dẫn. Héo Fusarium trên cẩm chướng do *F. oxysporum* f. sp. *callistephi*: (d) héo trầm trọng gây chết cây, (e) thân cây héo với nhiều khối bào tử phân sinh màu trắng trên bề mặt. Héo Fusarium ở đậu Hà Lan do *F. oxysporum* f. sp. *pisi:* (f) các triệu chứng héo trên đồng ruộng (chú ý các đám cây chết), (g) hóa nâu mạch dẫn ở cành bị héo. Ảnh (f) do Ameera Yousiph cung cấp.

Bảng 10.8 Đặc điểm của bệnh héo Fusarium

Các dấu hiệu chẩn đoán	**Chuối** Ban đầu, mép lá của cây bị nhiễm có triệu chứng hóa vàng, sau đó lá rũ xuống và héo. Ở giai đoạn phát triển bệnh tiếp theo, triệu chứng nứt thân thể hiện rất rõ và cây chết. Thân bị hóa nâu là triệu chứng điển hình của bệnh. Lưu ý là sâu đục thân chuối cũng có thể gây ra các triệu chứng vàng lá và héo tương tự. **Cà chua** Những triệu chứng đầu tiên thường là vàng lá sau đó là héo và cây chết trong vài ngày. Hiện tượng hóa nâu ở phần ngoài của thân (triệu chứng hóa nâu mạch dẫn) thường thể hiện rõ rệt. **Bầu bí** Cây bệnh có thể héo và chết rất nhanh khi thời tiết nóng, đặc biệt là vào cuối vụ khi cây có nhiều quả. Hiện tượng vàng lá xảy ra ở một số giống dưới các điều kiện mát hơn và ít stress hơn. Hóa nâu rễ và thân có thể không biểu hiện rõ cho đến khi héo trầm trọng xảy ra.
Phổ ký chủ	Mỗi dạng loài thường chỉ gây héo do tắc bó mạch trên một loài ký chủ nhất định. Chẳng hạn như *F. oxysporum* f. sp. *niveum* chỉ gây héo trên dưa hấu.
Thời tiết	Các bệnh héo Fusarium thường nghiêm trọng hơn trong điều kiện thời tiết ấm và ẩm ướt.
Bảo tồn	Các tác nhân gây bệnh héo Fusarium tồn tại dưới dạng bào tử hậu trong đất qua thời gian dài. Bào tử hậu có hình tròn, là các bào tử một tế bào với vách tế bào dày và có sức chống chịu cao, được hình thành trong mô bệnh. Các tác nhân gây bệnh héo Fusarium cũng có thể có mặt ở vỏ rễ một số cây không phải là ký chủ, kể cả cỏ dại và cây trồng. Bào tử hậu hình thành trong vỏ rễ khi cây chết. Như vậy những cây trồng không phải là ký chủ phải được kiểm tra trước khi được khuyến cáo là cây trồng luân canh để phòng trừ héo Fusarium.
Xâm nhiễm	Sợi nấm và bào tử vô tính nảy mầm trong tàn dư cây bệnh và đất xâm nhiễm vào rễ con còn non và lan dần vào các mạch xylem. Nấm bệnh sau đó sẽ phát triển trong mạch xylem và lan lên hệ thống mạch dẫn trong thân. Quá trình này gây phản ứng của cây, tạo ra các hợp chất phenol và thể sần có màu nâu. Những hợp chất này gây hiện tượng hóa nâu của mạch dẫn, một dấu hiệu dễ nhận thấy của bệnh héo khi cắt ngang thân. Hiện tượng tắc mạch xylem làm giảm lượng nước di chuyển lên cây, khiến cho cây bệnh bị héo rồi chết. Bệnh héo Fusarium thường liên hệ với tuyến trùng nốt sưng. Nấm *Fusarium* xâm nhiễm vào cây qua vết thương do tuyến trùng gây ra.

Phòng trừ	Các bệnh héo Fusarium rất khó phòng trừ do bào tử hậu tồn tại qua thời gian dài trong đất, Luân canh các cây trồng có khả năng kháng bệnh ít nhất 2 năm trước khi trồng lại các cây trồng mẫn cảm có thể giúp làm giảm nguồn bệnh. Tuy nhiên, loại nấm này vẫn có thể tồn tại bằng cách xâm nhiễm vào vỏ rễ các cây trồng không phải là ký chủ và không biểu hiện triệu chứng. Việc này nêu rõ sự cần thiết nghiên cứu đặc tính sinh học của loại nấm này ở từng quốc gia nhằm xác định vai trò của những cây trồng không phải là ký chủ và thời gian tồn tại của bào tử hậu trong đất. Có những giống cây trồng có khả năng kháng bệnh héo Fusarium. Tuy nhiên một giống kháng bệnh không có nghĩa là có khả năng kháng với tất cả các chủng của một dạng loài nào đó. Một số bệnh héo Fusarium đã được phòng trừ thành công bằng phương pháp sử dụng gốc ghép có khả năng kháng bệnh. Ví dụ, phương pháp này đã được áp dụng để phòng trừ bệnh héo Fusarium trên dưa hấu. Không có thuốc trừ nấm hữu hiệu để phòng trừ.
Phân lập	Có thể phân lập nấm bệnh *Fusarium* một cách dễ dàng từ mô thân bị bệnh (Phần 6.3.1), dùng môi trường chọn lọc cho *Fusarium* (PPA) hoặc WA. Cần sử dụng các mẫu thân mới nhiễm bệnh để phân lập.

10.5.3 Phân lập nấm *Fusarium* gây héo

Kỹ thuật sau dùng để phân lập các loài *Fusarium* từ cây trồng:

1. Chọn một mẩu thân dài 4cm, cách mặt đất ít nhất 20cm.
2. Rửa thân trong nước máy và khử trùng bề mặt bằng cồn êtyl 70% trong 1 phút.
3. Để khô trên giấy thấm đã khử trùng hoặc hơ khô trên ngọn lửa đèn cồn nếu thân dày.
4. Dùng dụng cụ vô trùng cắt ngang thân thành những miếng cấy dày khoảng 1-2mm.
5. Cấy các miếng cấy này lên môi trường phân lập (WA hoặc PPA). Một tản nấm sẽ được phát triển từ mỗi miếng cấy sau 2-3 ngày.
6. Cấy truyền lên môi trường thạch lá cẩm chướng hoặc môi trường thạch thân lúa và để mẫu cấy dưới ánh sáng.
7. Làm thuần bằng kỹ thuật cấy đơn bào tử (Phần 6.5.2) và nuôi nấm thuần trên môi trường CLA hoặc môi trường thạch thân lúa và môi trường PDA dưới ánh sáng.
8. Không dùng Parafilm® hoặc băng dính bọc kín đĩa cấy vì điều này sẽ hạn chế sự phát triển, sản sinh bào tử và hình thành quả thể hữu tính của một số loài *Fusarium*.

Giám định tác nhân gây bệnh trên CLA hoặc môi trường thạch thân lúa qua các đặc tính chính như sau:

- bào tử nhỏ hình bầu dục hình thành trong những bọc giả gắn trên tế bào sinh bào tử ngắn
- bào tử lớn hình quả chuối có chiều dài trung bình với các tế bào cuối hình bàn chân trong khối bào tử trên các mẩu lá
- bào tử hậu (tạo thành sau 2-3 tuần)

Không sử dụng bào tử hình thành trên môi trường PDA để giám định *Fusarium* đến loài.

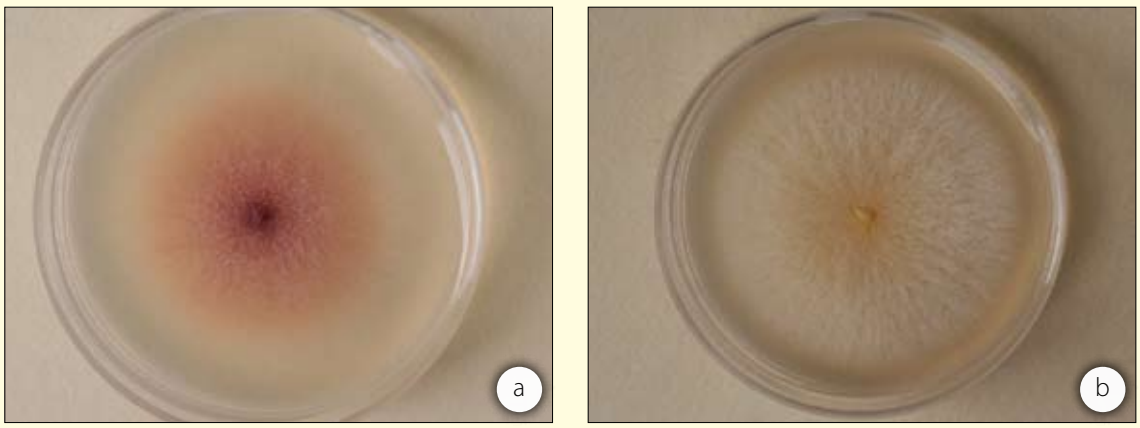
Trên PDA *F. oxysporum* sản sinh ra:

- một loạt các sắc tố do các tản nấm phát triển trên môi trường thạch, từ không màu đến tía đến tím
- sợi nấm có màu trắng đến tía.

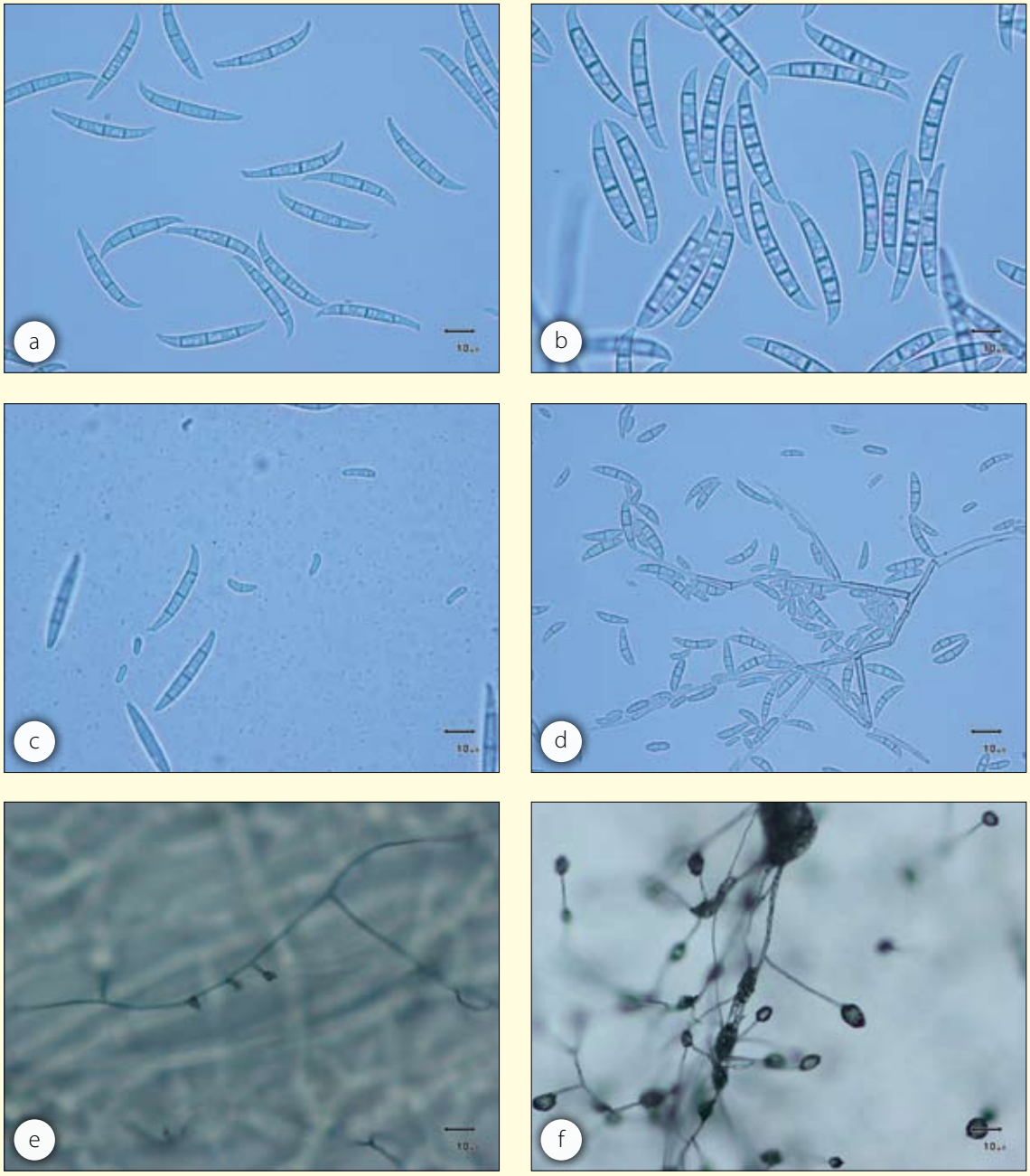
10.5.4 *Fusarium oxysporum* và *Fusarium solani*—các đặc điểm hình thái chính giúp cho việc giám định

Những người nghiên cứu không có kinh nghiệm về *Fusarium* khó có thể phân biệt nấm *F. oxysporum* và *F. solani* (Bảng 10.9 và Hình 10.14-10.16). *F. oxysporum* chủ yếu gây bệnh héo do tắc bó mạch, trong khi *F. solani* chủ yếu gây thối rễ và cổ rễ.

Điều quan trọng nên lưu ý là một số *F. oxysporum* và *F. solani* hoại sinh (không phải tác nhân gây bệnh) lại thường được phân lập từ rễ khỏe và rễ bệnh. Vì vậy, cần tiến hành lây bệnh nhân tạo trước khi đi đến kết luận về vai trò gây bệnh của chúng.



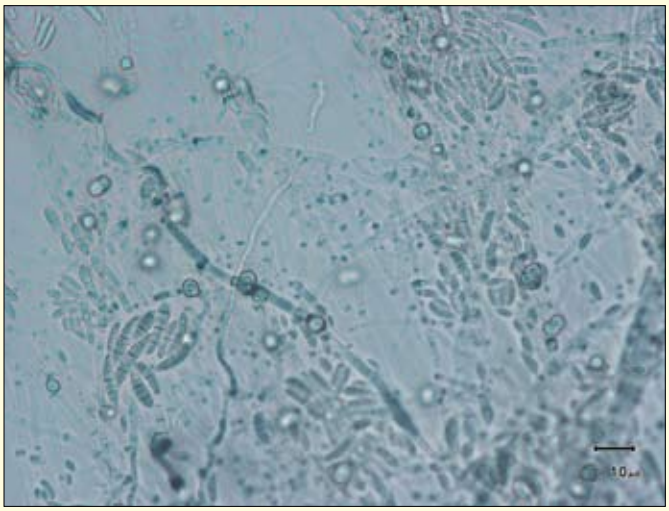
Hình 10.14 Mẫu cấy *Fusarium oxysporum* (trái) và *F. solani* (phải) nuôi cấy được bốn ngày, trong đĩa Petri 60mm trên môi trường thạch đường khoai tây



Hình 10.15 Phân biệt giữa *Fusarium oxysporum* (trái) và *F. solani* (phải): (a) và (b) bào tử lớn, (c) và (d) bào tử nhỏ và một số bào tử lớn, (e) và (f) bào tử nhỏ trong bọc giả trên tế bào sinh bào tử (lưu ý *F. oxysporum* có tế bào sinh bào tử ngắn và *F. solani* có tế bào sinh bào tử dài)

Bảng 10.9 Các đặc điểm để phân biệt *Fusarium oxysporum* và *Fusarium solani*

	F. oxysporum	*F. solani*
Trên PDA	Các tản nấm tạo sắc tố tím đến tía trên môi trường thạch và sợi nấm	Các tản nấm có màu trắng tới màu kem, một số có sắc tố hơi xanh lá cây tới xanh lam
Trên CLA (hoặc thạch thân lúa xanh)	Bào tử lớn trong khối bào tử thon hơn và có chiều dài trung bình	Bào tử lớn trong khối bào tử to ngang so với chiều dài và lớn hơn bào tử lớn của *F. oxysporum*
	Bào tử nhỏ có kích thước nhỏ, thường không có vách ngăn và được hình thành trong bọc giả gắn trên những tế bào sinh bào tử rất ngắn	Bào tử nhỏ có kích thước lớn, thường có 1-3 vách ngăn và được hình thành trong bọc giả gắn trên các tế bào sinh bào tử rất dài hoặc trên các cành bào tử phân sinh phân nhánh

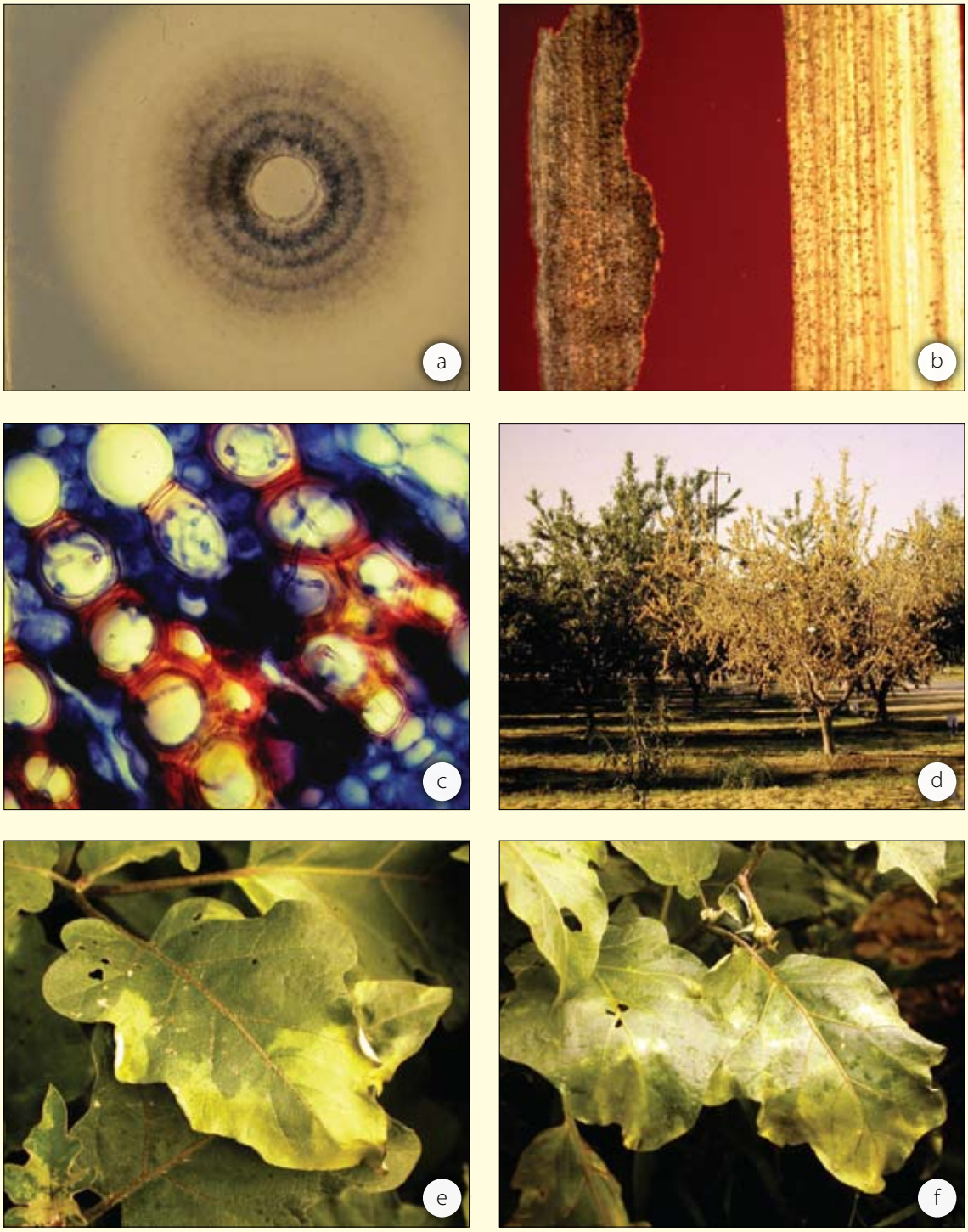


Hình 10.16 Bào tử hậu của *Fusarium solani* hình thành trên môi trường thạch lá cẩm chướng (CLA) (Bào tử hậu *F. oxysporum* trông tương tự)

10.6 *Verticillium albo-atrum* và *V. dahliae*— nấm gây bệnh héo ngoại lai

Nấm gây bệnh héo *Verticillium albo-atrum* và *V. dahliae* chưa được công bố ở Việt Nam và *V. albo-atrum* có trong danh mục đối tượng kiểm dịch ở Việt Nam. Hai loài *Verticullium* này gây ra những triệu chứng tương tự (Hình 10.17).

Bảng 10.10 cung cấp thông tin về *Verticillium albo-atrum* và *V. dahliae*, hiện là những nấm gây bệnh héo ngoại lai đối với Việt Nam.



Hình 10.17 *Verticillium dahliae:* (a) Mẫu nấm trên môi trường thạch đường khoai tây (nấm mọc chậm), (b) hạch nấm nhỏ trên thân cây bông già, (c) sợi nấm trong mạch xylem bị bệnh, (d) cây hồ trăn héo do *V. dahliae*, (e) và (f) lá cà tím héo do *V. dahliae*

Bảng 10.10 Đặc điểm của *Verticillium albo-atrum* và *V. dahliae*

Các triệu chứng chính	Các triệu chứng bao gồm vàng lá, héo và hóa nâu gân lá. Các mô mạch dẫn trong thân thường có màu nâu.
Dấu hiệu chẩn đoán	Héo và hóa nâu mạch dẫn. Để chẩn đoán chính xác cần phân lập và giám định nấm.
Xâm nhiễm	Những nấm này xâm nhiễm qua các rễ con và lan vào mạch xylem. Sau đó chúng mọc lan trong mạch xylem của thân vào cuống lá và lá. Nấm phát triển trong thân làm thân hóa nâu và giảm quá trình hấp thụ nước, gây héo và chết cây.
Phổ ký chủ	Cả hai loài đều có phổ ký chủ rộng, gây héo do tắc bó mạch nhiều cây lá rộng (cây hai lá mầm) bao gồm cà chua, khoai tây, bông, bầu bí, dâu tây và một số cây ăn quả ôn đới như hạnh nhân và hồ đào.
Bảo tồn	*Verticillium albo-atrum* tồn tại dưới dạng sợi nấm trên tàn dư cây ký chủ. *V. dahliae* tồn tại dưới dạng hạch nấm nhỏ trên tàn dư cây ký chủ, trong đất và tồn tại dưới dạng sợi nấm trên tàn dư cây ký chủ.
Thời tiết	Cả hai loài nấm gây bệnh này thường phân bố ở các vùng ôn đới trên thế giới. Ở Việt Nam, các vùng núi tây bắc và vùng Đắc Lắc là những nơi có điều kiện thích hợp cho chúng. Chúng cũng có thể gây hại được ở các vùng miền bắc và miền trung, nơi có nhiệt độ mùa đông thấp.
Phòng trừ	Nếu có cây trồng kháng bệnh thì việc luân canh cây trồng là biện pháp hữu hiệu. Phổ ký chủ rộng của tác nhân gây bệnh hạn chế việc chọn lựa cây trồng luân canh tại các vùng trồng rau. Đối với các cây trồng như dâu tây thì yêu cầu hom giống và cây mẹ sạch bệnh là vô cùng cần thiết. Các ký chủ cỏ dại mẫn cảm với bệnh cần được phòng trừ triệt để.
Phân lập	*V. albo-atrum* và *V. dahliae* phát triển chậm trên môi trường nhân tạo. Việc phân lập chúng có thể khó khăn. Tốt nhất nên phân lập từ mẫu thân hoặc cuống lá khi mới xuất hiện triệu chứng hóa nâu trên thân. 1. Khử trùng bề mặt mẫu thân 1 phút trong cồn êtyl 70%. 2. Để khô trên giấy thấm. 3. Cắt các khoanh mô thân và cấy lên môi trường thạch nước cất hoặc thạch thân lúa xanh (môi trường thạch nước cất có chứa những mẩu thân lúa xanh nhỏ đã được khử trùng). 4. Cấy truyền, làm thuần bằng kỹ thuật cấy đơn bào tử và nuôi nấm trên PDA và thạch thân lúa xanh. *V. dahliae* sẽ tạo các hạch nấm nhỏ trên môi trường, đặc biệt là trên những mẩu thân hoặc mảnh rễ ký chủ sạch. **Những loài này sản sinh ra các cành bào tử phân sinh mọc vòng điển hình từ những mạch xylem của các miếng thân cấy trên môi trường WA hoặc thạch thân lúa xanh.**

10.7 Tuyến trùng ký sinh thực vật

Tuyến trùng ký sinh thực vật thuộc nhóm giun tròn nhỏ không phân đốt. Tuyến trùng ký sinh và không ký sinh thực vật đều có trong đất. Sự có mặt của kim chích hút (Hình 10.18a) là đặc tính chính của tuyến trùng ký sinh thực vật. Có thể quan sát được kim chích dưới kính hiển vi hoặc kính lúp soi nổi với độ phóng đại cao. Lưu ý rằng có một số loài có kim chích nhưng lại sống nhờ thức ăn là sợi nấm trong đất chứ không gây hại cho cây.

Hình 10.18 Tuyến trùng: (a) ký sinh thực vật với kim chích, (b) không ký sinh thực vật, không có kim chích.

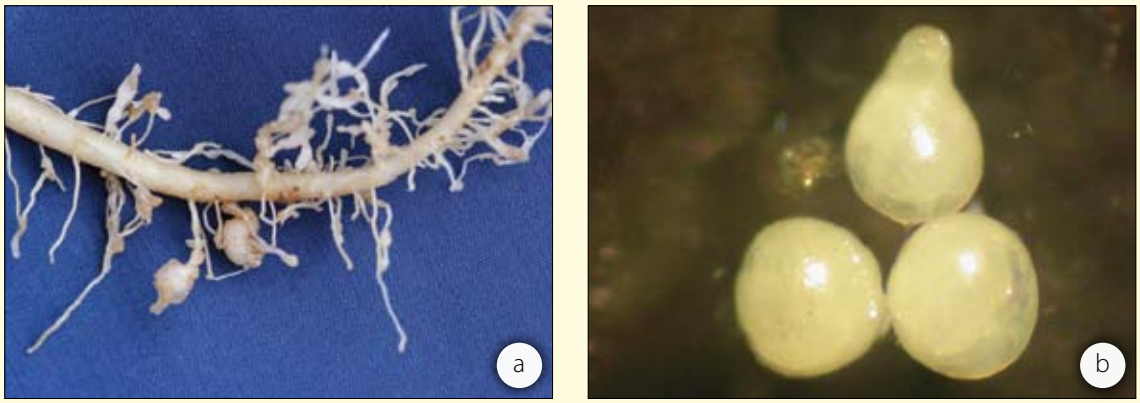
Tuyến trùng ký sinh thực vật là nguyên nhân của rất nhiều bệnh trên cây trồng ở Việt Nam (Nguyen 2003). Các bệnh thông thường nhất ở Việt Nam là tuyến trùng nốt sưng do các loài thuộc chi *Meloidogyne* và tuyến trùng gây vết thương nơi rễ do *Pratylenchus* và các loài khác (Hình 10.19).

Tuyến trùng nang gây hại ở rễ, gây hiện tượng mọc thêm rễ phụ. Các tuyến trùng nang cái có thể được phát hiện dễ dàng, bám vào bên ngoài rễ nơi rễ phụ mọc thành búi.

Tuyến trùng ký sinh thực vật thường gây hại ở bộ rễ, làm giảm quá trình hấp thụ nước và dinh dưỡng. Chúng thường gây triệu chứng còi cọc, năng suất thấp và đôi khi có biểu hiện vàng lá rõ rệt. Cây nhiễm tuyến trùng nặng có hiện tượng héo và tàn lụi trong điều kiện môi trường khắc nghiệt. Hiện tượng này phổ biến nhất ở cà chua bị tuyến trùng nốt sưng gây hại.

Tuyến trùng nốt sưng có thể được chẩn đoán trên đồng ruộng bằng các nốt sưng rõ rệt trên rễ.

Hình 10.19 Hệ thống rễ cây bị phá hủy do: (a) tuyến trùng nốt sưng, (b) tuyến trùng gây loét rễ, cả hai bệnh đều làm cây còi cọc và vàng lá



Hình 10.20 Các triệu chứng của tuyến trùng nốt sưng: (a) triệu chứng sưng rễ, (b) tuyến trùng cái ký sinh trong các nốt sưng

Khó nhận biết triệu chứng hại của tuyến trùng gây loét rễ ở rễ nhỏ trên đồng ruộng, nhưng có thể quan sát được các vết loét bằng kính lúp cầm tay. Dùng kính lúp soi nổi có thể quan sát được các vết loét dễ dàng hơn. Nếu nghi ngờ đối tượng gây hại là tuyến trùng gây loét rễ, có thể nhuộm màu rễ bệnh để quan sát sự có mặt của tuyến trùng dưới kính hiển vi. Tuyến trùng ký sinh và lấy thức ăn từ cây trồng được phân lập bằng các phương pháp tách tuyến trùng từ đất (xem Phần 10.7.1).

Các cây trồng có khả năng kháng đối với một số loài tuyến trùng nhất định thì không bị tuyến trùng đó gây hại và có khả năng ngăn chặn sự sinh sản của tuyến trùng ký sinh cây. Những ký chủ này giúp làm giảm mật độ tuyến trùng trong đất.

Các cây trồng có khả năng chịu đựng đối với một số loài tuyến trùng nhất định thì không bị tuyến trùng đó gây hại, nhưng lại cho phép tuyến trùng sinh sản. Những ký chủ này duy trì hoặc làm tăng nguồn tuyến trùng trong đất. Vì vậy, khi khuyến cáo các biện pháp phòng trừ cần hiểu biết về sự khác biệt này trong mối quan hệ ký chủ-tuyến trùng.

Tuyến trùng không bơi được. Chúng di chuyển trong đất hoặc rễ bằng cách uốn mình chuyển động như rắn dựa vào các phần tử đất hoặc mô cây. Tuyến trùng có thể được lan truyền theo dòng di chuyển của nước tưới, nhưng trong nước lặng chúng chìm xuống đáy. Chúng có thể di chuyển tất cả mọi hướng thông qua đất ướt để tìm rễ ký chủ.

Tuyến trùng có thể tồn tại khi không có ký chủ ở trạng thái ngủ nghỉ. Vào mùa khô, chúng thường di chuyển sâu hơn xuống dưới đất.

Đa số tuyến trùng ký sinh thực vật có phổ ký chủ rộng, nhưng mức độ mẫn cảm với bệnh thay đổi tùy từng loại ký chủ.

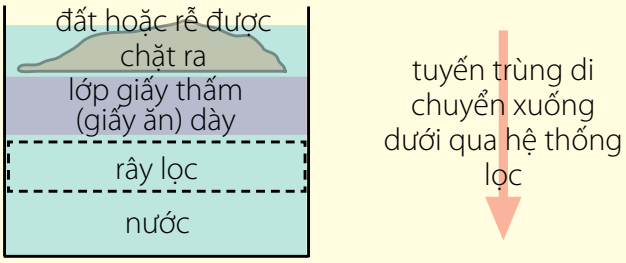
10.7.1 Tách tuyến trùng ra khỏi đất và rễ nhỏ.

Tuyến trùng không thể bơi trong nước. Đặc điểm này là cơ sở cho các phương pháp tách tuyến trùng đơn giản được mô tả dưới đây (Hình 10.21).

Phương pháp phễu Baerman

Phương pháp phễu Baerman này sử dụng thiết bị minh họa trong Hình 10.22.

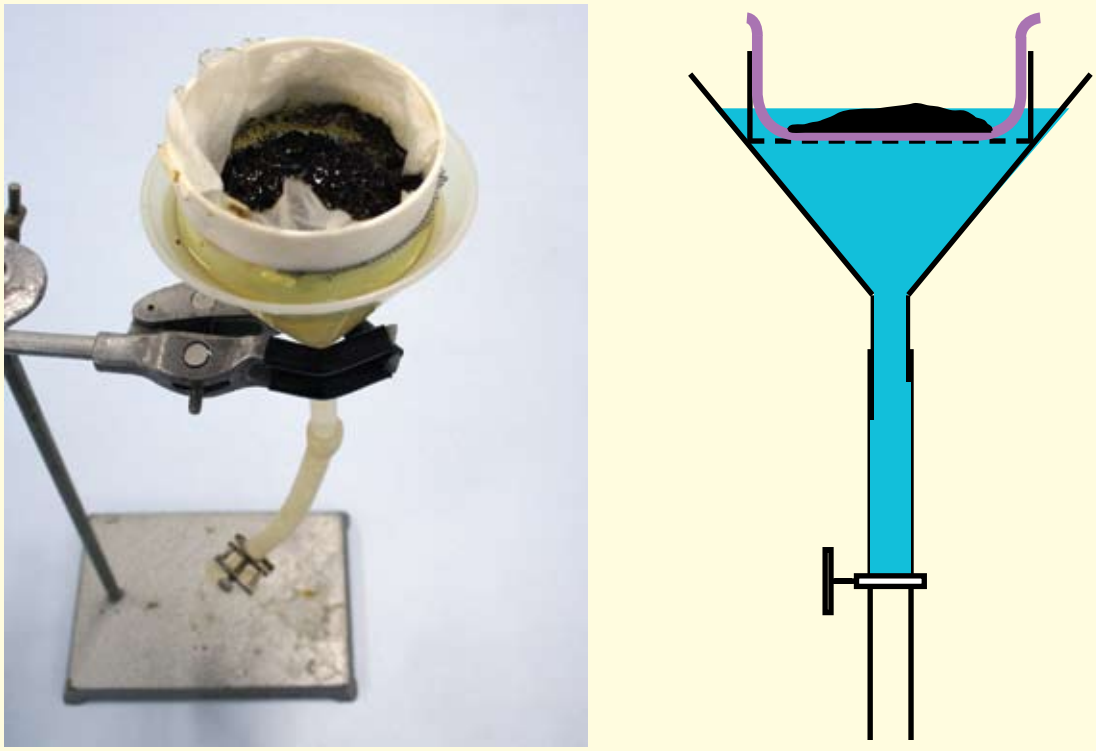
1. Lấy một lượng nhỏ đất từ một mẫu đất hỗn hợp (sau khi đã trộn đều 10 mẫu đất lấy từ vùng rễ của 10 cây).
2. Đổ từ từ lượng đất đó vào nước trong một phễu nhựa hoặc phễu thủy tinh có đặt một rây nhựa nhỏ với kích thước lỗ rây 1mm, phía trên lót giấy thấm. Không làm rách giấy.



Hình 10.21 Sơ đồ minh họa quy trình tách tuyến trùng từ rễ hoặc đất

3. Sau 24 giờ mở kẹp cho thoát 5mL nước từ ống sang một đĩa Petri nhỏ hoặc đĩa đếm. Tuyến trùng khi đó đã di chuyển từ đất ướt xuống qua giấy thấm vào trong nước. Bởi vì tuyến trùng không biết bơi, chúng sẽ chìm xuống và tích tụ ở đáy ống nhựa.
4. Dàn đều dung dịch tuyến trùng trên đĩa và kiểm tra dưới kính lúp soi nổi ở độ phóng đại lớn nhất, hoặc đưa sang một lam kính để kiểm tra dưới kính hiển vi.

Tuyến trùng ký sinh thực vật có thể được xác định nhờ sự có mặt của kim chích hút.



Hình 10.22 Bộ dụng cụ phễu Baerman để tách tuyến trùng

Phương pháp khay Whitehead

Phương pháp khay Whitehead cũng thường được sử dụng cho mẫu đất và rễ dùng thiết bị như minh họa trong Hình 10.23.

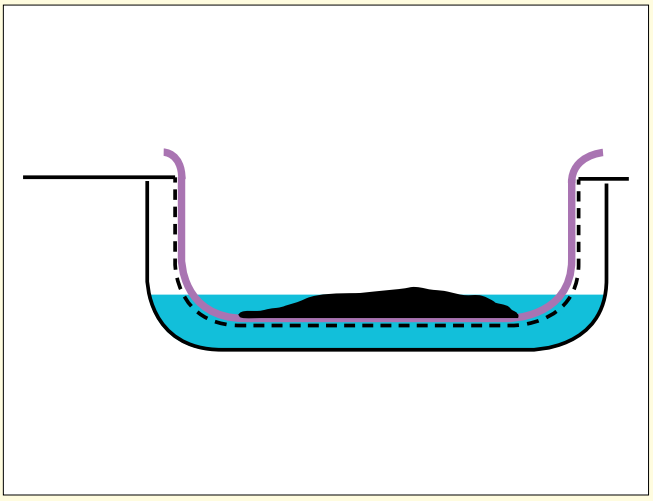
1. Đặt một rây lọc (loại thường dùng trong bếp gia đình) lên một cái bát to, trên rây lọc có lót một lớp giấy thấm dày.
2. Đổ nước vào rây sao cho mặt nước cách mặt rây khoảng 2cm.
3. Nhẹ nhàng đặt đất hoặc rễ trong nước trên rây. Chú ý không làm rách giấy. Tuyến trùng sẽ tập trung lại trong nước bên dưới lớp giấy thấm.

4. Sau 24 giờ, đổ nước vào một cốc đong hoặc lọ thủy tinh và để cho tuyến trùng lắng xuống đáy lọ.
5. Dùng pipet hút nước từ đáy lọ sang một đĩa Petri nhỏ để kiểm tra dưới kính lúp soi nổi.

Nhiều khả năng là cả tuyến trùng ký sinh và không ký sinh thực vật đều có mặt.

Những phương pháp này được xây dựng chủ yếu phục vụ cho việc chẩn đoán. Tuy nhiên, với kinh nghiệm và việc sử dụng các phương pháp lấy mẫu tiêu chuẩn, các cách phân lập tuyến trùng trên có thể giúp cung cấp các số liệu hữu ích về số lượng tuyến trùng. Khay Whitehead là phương pháp thích hợp nhất được sử dụng trong việc nghiên cứu số lượng.

Hệ thống lọc này có thể được làm từ các rây lọc và rá đỡ sẵn có bán trong các chợ và cửa hàng ở Việt Nam.



Hình 10.23 Bộ dụng cụ khay Whitehead để tách tuyến trùng

10.8 Bệnh do vi khuẩn gây ra

Nhiều loài vi khuẩn gây bệnh thực vật, trong khi các loài khác gây bệnh cho động vật và con người. Đa số vi khuẩn là hoại sinh và có mặt trong đất cũng như trong vật liệu hữu cơ với vai trò là tác nhân phân hủy.

Vi khuẩn gây bệnh cây là các vi sinh vật nhân nguyên thủy nhỏ có thể thấy được dưới kính hiển vi dùng vật kính ×100. Nhuộm màu vi khuẩn phù hợp sẽ dễ quan sát hơn. Chúng khá đa dạng về kích cỡ và hình thái; một số loài có lông roi và di chuyển được. Hầu hết vi khuẩn gây bệnh cây có thể được phân lập và nuôi cấy trên môi trường thích hợp.

Một tế bào vi khuẩn sinh sản bằng cách phân chia đơn giản thành hai tế bào. Vi khuẩn được nhân lên rất nhanh về số lượng trong các điều kiện thích hợp.

Các bệnh do vi khuẩn thường phổ biến ở những vùng nhiệt đới. Có rất nhiều bệnh do vi khuẩn gây ra, bao gồm héo vi khuẩn, đốm lá, cháy lá, u sưng và loét (Hình 10.24). Một số loài cũng gây thối nhũn ở rau quả trước và sau khi thu hoạch.

Các vi khuẩn gây bệnh cây thông thường ở Việt Nam bao gồm các chi *Ralstonia*, *Xanthomonas, Pseudomonas* và *Erwinia*. Một số vi khuẩn tồn tại trong hạt, một số khác trên cây giống nhiễm bệnh.

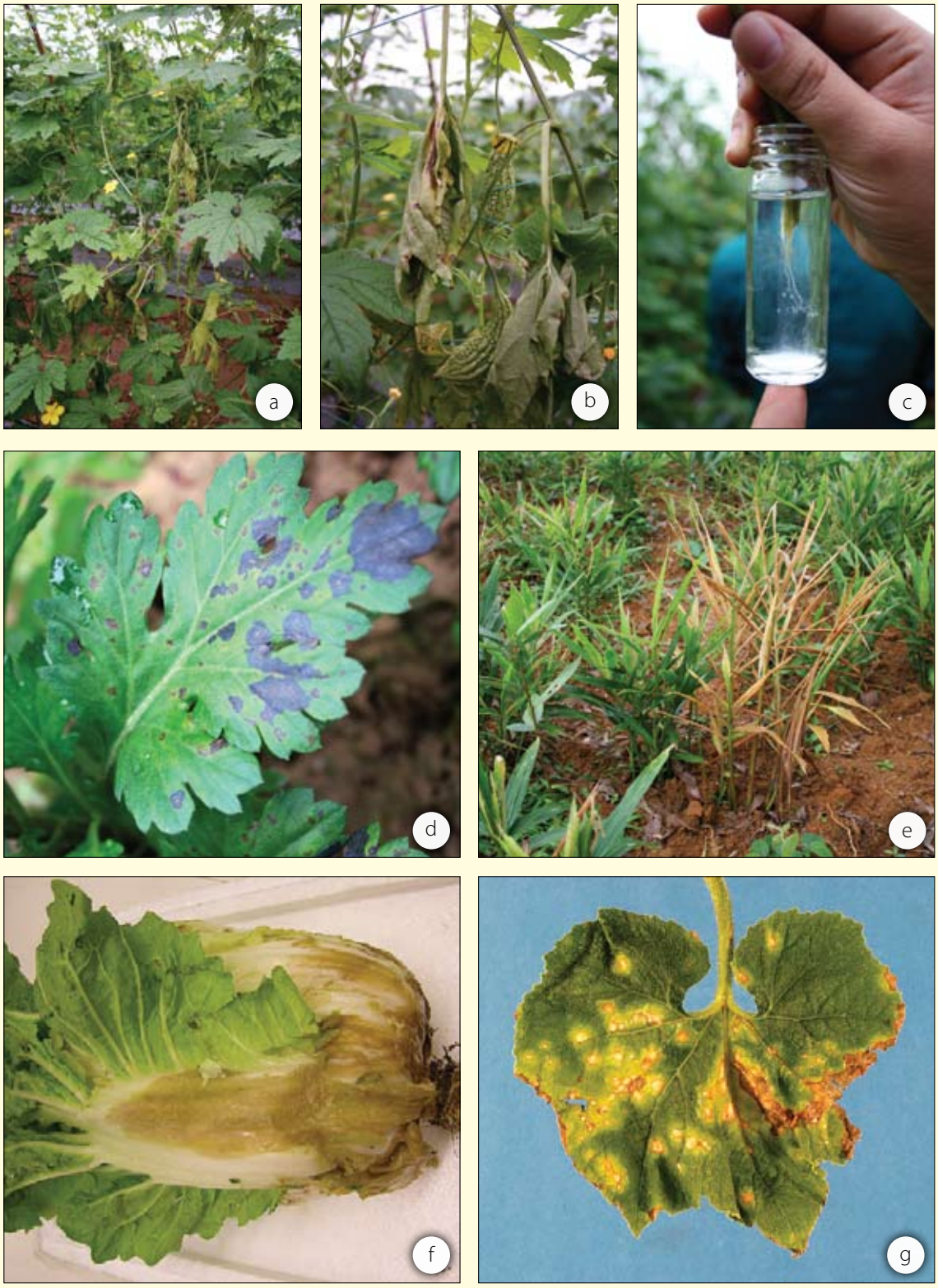
Dịch khuẩn là một dấu hiệu chỉ ra sự có mặt của vi khuẩn trong mô cây bệnh. Vi khuẩn gây bệnh có thể sản sinh ra dịch khuẩn trên các vết đốm lá trong điều kiện ẩm ướt và từ các mô mạch dẫn trong thân cây bị héo vi khuẩn.

10.8.1 Héo vi khuẩn

Héo vi khuẩn do *Ralstonia solanacearum* là một bệnh nghiêm trọng gây hại trên nhiều loại rau và cây trồng ở Việt Nam. Chẳng hạn như ở tỉnh Quảng Nam, héo vi khuẩn gây hại trên cà chua, ớt, cà tím, mướp đắng, thuốc lá và một số cây trồng, cỏ dại khác. Do có phổ ký chủ rộng, bệnh rất khó phòng trừ bằng biện pháp luân canh. Vi khuẩn này tồn tại lâu dài trên tàn dư ký chủ trong đất. *R. solanacearum* có thể lan rộng theo vật liệu làm giống nhiễm bệnh như khoai tây và gừng, theo cây con và dụng cụ làm ruộng cũng như động vật có dính đất.

Héo vi khuẩn có thể được chẩn đoán dựa vào mẫu cây héo trên đồng ruộng hoặc trong phòng thí nghiệm qua triệu chứng hóa nâu của mạch dẫn trong thân và sự xuất hiện dịch khuẩn. Nếu nhúng một đoạn cành mới cắt vào nước, những dòng dịch khuẩn dạng sợi trắng chảy ra trong nước.

Lưu ý là ngoài *R. solanacearum* cũng có các vi khuẩn khác gây bệnh héo.



Hình 10.24 Bệnh do vi khuẩn gây ra: (a-c) mướp đắng bị héo do vi khuẩn, (d) cháy lá do vi khuẩn, (e) *Ralstonia solanacearum* gây héo nhanh trên gừng, (f) thối nhũn cải thảo do *Erwinia aroideae*, (g) *Pseudomonas syringae* trên lá bầu bí

Các biện pháp phòng trừ bao gồm luân canh cây trồng như ngô và lúa, dùng cây giống sạch bệnh (cây con và cành giâm) và di chuyển hoặc đốt cây bệnh. Có một số giống lạc và các cây trồng khác có khả năng kháng bệnh. Bệnh héo vi khuẩn trên một số giống cây trồng mẫn cảm được phòng trừ bằng cách sử dụng cây giống với gốc ghép kháng bệnh.

10.8.2 Phân lập vi khuẩn gây bệnh cây

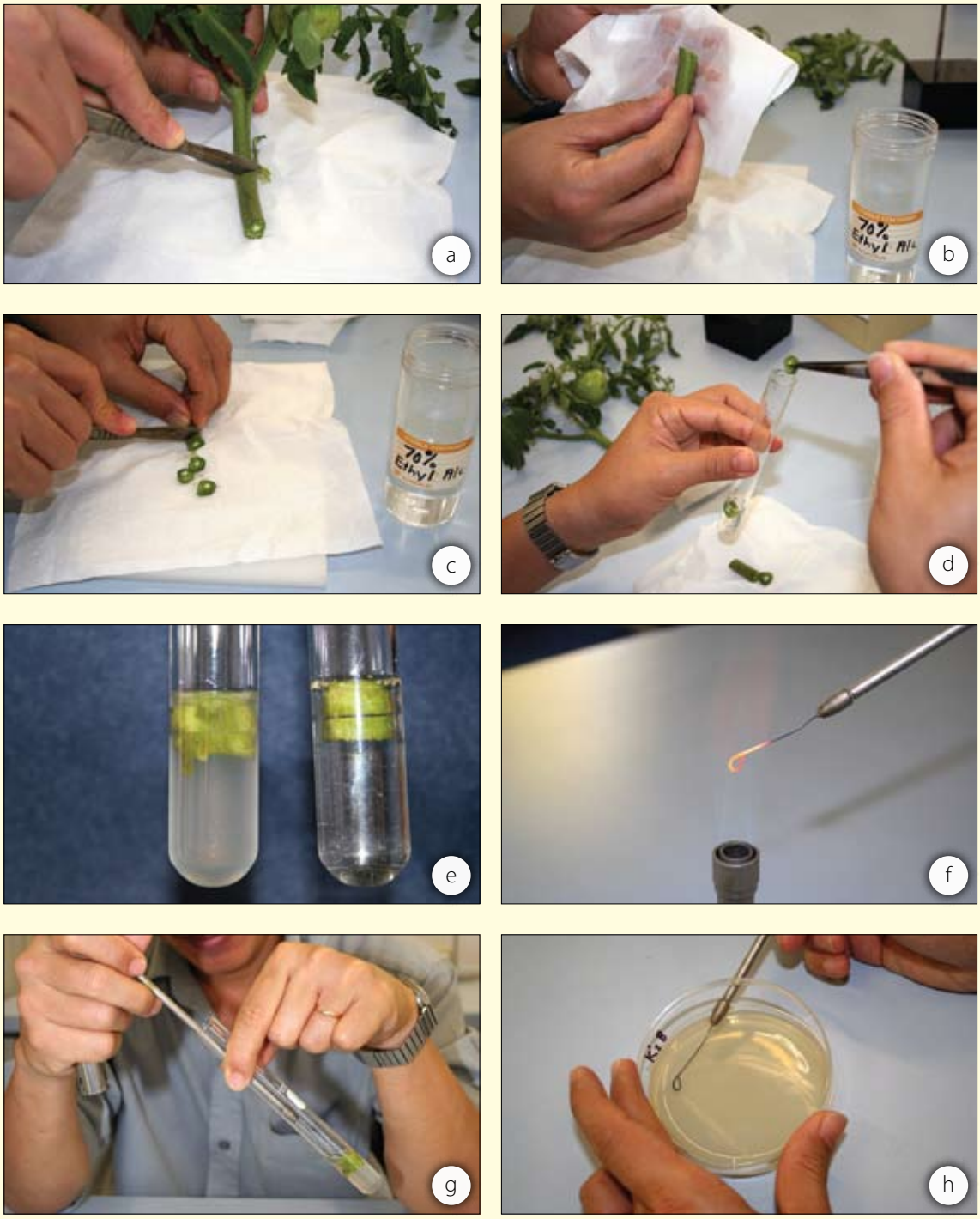
Héo vi khuẩn, đốm và cháy lá do vi khuẩn là những bệnh phổ biến ở Việt Nam. Nhiều vi khuẩn gây các bệnh này có thể được phân lập và làm thuần trong một phòng thí nghiệm cơ bản. Sau đó các mẫu thuần có thể được dùng để lây bệnh nhân tạo theo quy tắc Koch (xem Khung 8.1). Có thể gửi mẫu đến một phòng thí nghiệm vi khuẩn để xác định chính xác nguyên nhân nếu mẫu có khả năng gây bệnh. Việc giám định chính xác tới loài tốt nhất nên được thực hiện tại một phòng thí nghiệm chuyên môn.

Nên dùng môi trường King's B để phân lập các vi khuẩn gây bệnh phổ biến.

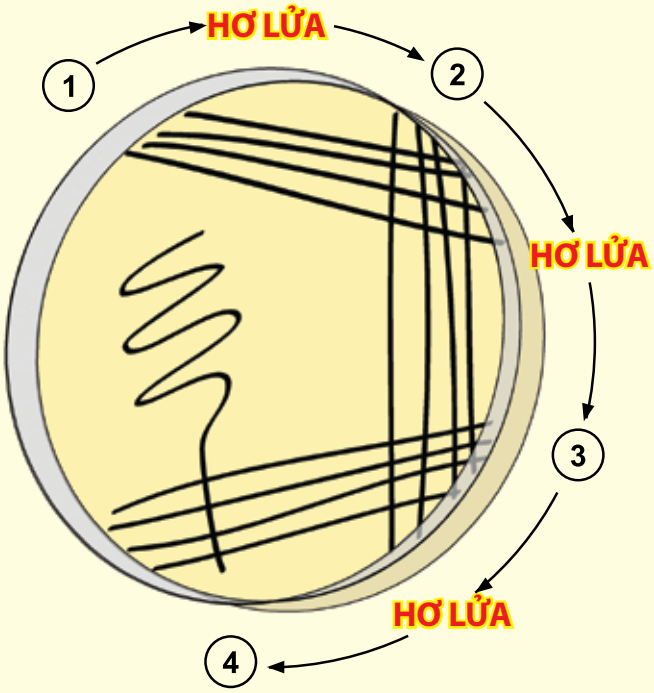
Quá trình phân lập *Ralstonia solanacearum*, nguyên nhân gây bệnh héo vi khuẩn

1. Cắt một đoạn thân cây bệnh dài khoảng 2-3cm, sau khi đã kiểm tra dịch khuẩn (Hình 10.25a).
2. Khử trùng bề mặt bằng cách dùng giấy thấm cồn êtyl 70% lau đoạn thân hoặc nhúng đoạn thân vào cồn êtyl 70% rồi hơ khô (Hình 10.25b).
3. Dùng dao mổ đã khử trùng cắt đoạn thân thành ba miếng (Hình 10.25c).
4. Đưa những miếng này vào trong một ống nghiệm chứa 10mL nước vô trùng (Hình 10.25d) và để yên cho đến khi dịch vi khuẩn ứa ra làm nước vẩn đục như sữa (Hình 10.25e).
5. Khử trùng que cấy khuẩn bằng cách hơ lửa đèn cồn rồi để nguội (Hình 10.25f).
6. Nhúng đầu que cấy vào dung dịch có chứa vi khuẩn (Hình 10.25g).
7. Cấy vi khuẩn lên đĩa môi trường King's B bằng cách chạm vào mặt thạch gần bên mép đĩa và vạch nhẹ nhàng 3-4 vạch trên mặt thạch (Hình 10.25h).
8. Khử trùng que cấy và để nguội.
9. Vạch nhẹ nhàng 3-4 vạch trên mặt thạch sao cho đầu que cấy đi ngang các vết vạch trước đó (Hình 10.26).
10. Làm lại các bước 8 và 9 một lần nữa, rồi vạch một đường cuối cùng hình chữ Z.
11. Đặt đĩa cấy ở nhiệt độ khoảng 25-30°C trong 2 ngày (Hình 10.27).
12. Kiểm tra đĩa để tìm những khuẩn lạc đơn nhỏ trên các vết vạch lần thứ ba hoặc thứ tư (Những khuẩn lạc lớn phát triển trong vòng 24 giờ không phải là *R. solanacearum*.
13. Dùng que cấy khuẩn đã khử trùng lấy một khuẩn lạc nhỏ và cấy lên môi trường King's B.
14. Để trong 2 ngày.

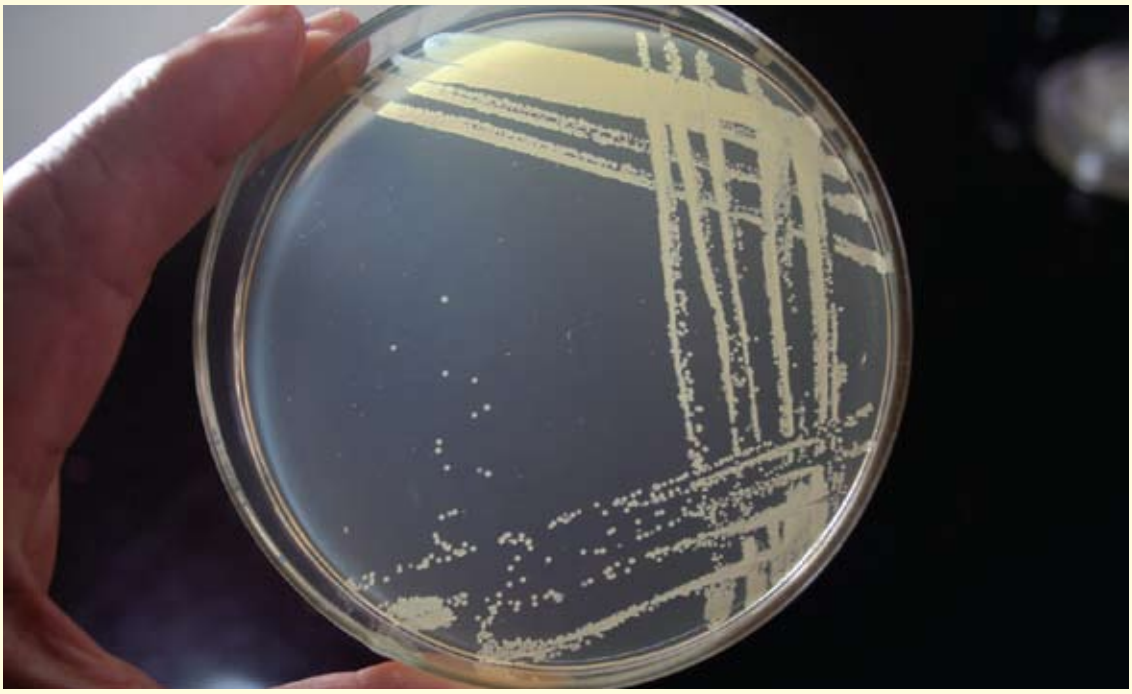
15. Cấy truyền một khuẩn lạc đơn mọc từ đĩa cấy mới sang một lọ McCartney hoặc ống nghiệm chứa môi trường King's B đổ nghiêng. Đây là những mẫu thuần và có thể sử dụng cho quá trình lây bệnh nhân tạo (xem ví dụ nghiên cứu cụ thể héo gừng trong Phần 3.1).



Hình 10.25 Phương pháp phân lập *Ralstonia solanacearum* từ thân bị bệnh



Hình 10.26 Sơ đồ minh họa đĩa cấy vi khuẩn, cho thấy thứ tự các vạch cấy và hơ lửa khử trùng que cấy giữa các bước



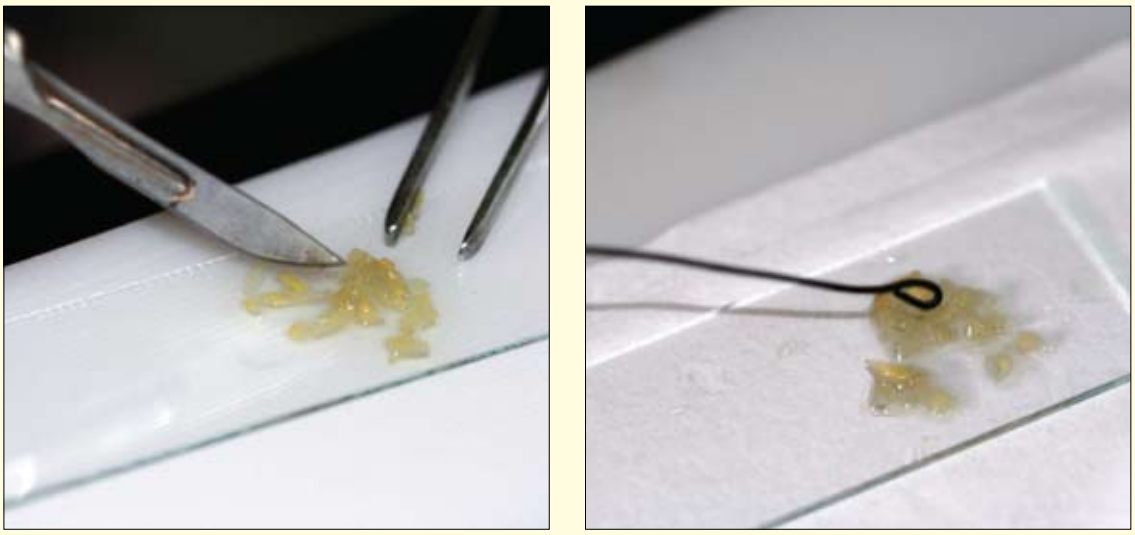
Hình 10.27 Đĩa cấy vi khuẩn phát triển sau 2 ngày ở nhiệt độ 25°C

Phân lập vi khuẩn từ vết đốm và cháy lá

1. Khử trùng bề mặt một lam kính và nhỏ một giọt nước vô trùng lên lam.
2. Nhẹ nhàng lau khử trùng bề mặt lá bằng giấy thấm cồn êtyl 70%.
3. Với dụng cụ đã được khử trùng, cắt một miếng nhỏ của vết đốm hoặc cháy lá, kể cả gân lá, và đưa sang giọt nước trên lam kính. Quan sát miếng cắt dưới kính hiển vi (vật kính X10). Nếu vết bệnh do vi khuẩn gây ra, thường sẽ thấy dịch khuẩn ứa ra từ chỗ gân lá bị cắt.
4. Cắt nhỏ, chà xát miếng cắt để giải phóng vi khuẩn vào giọt nước. Để khoảng 3-5 phút cho vi khuẩn có đủ thời gian giải phóng vào giọt nước.
5. Nhúng đầu que cấy khuẩn đã khử trùng vào giọt nước và cấy lên môi trường King's B như đã mô tả ở trên.
6. Làm thuần mẫu khuẩn như đã mô tả ở trên, thực hiện quá trình lây bệnh nhân tạo, và gửi mẫu sạch cho chuyên gia về vi khuẩn giám định chính xác nếu cần thiết.
7. Để thực hiện quá trình lây bệnh nhân tạo, phun dịch vi khuẩn sạch lên lá cây và để ẩm bằng cách bọc một túi nilon lớn. Không để ngoài nắng vì túi sẽ quá nóng, ngăn cản quá trình xâm nhiễm.

Phân lập vi khuẩn từ rễ hoặc thân rễ

Việc phân lập vi khuẩn từ rễ và thân rễ về căn bản tương tự như việc phân lập từ vết đốm và cháy lá (Hình 10.28). Tuy nhiên, mức độ khử trùng bề mặt thay đổi tùy theo độ dày của rễ và vi khuẩn cần phân lập. Nên gọt bỏ phần mô ngoài của rễ hoặc thân rễ trước khi khử trùng và phân lập.



Hình 10.28 Chà xát rễ hoặc thân rễ để chuẩn bị dịch vi khuẩn trước khi cấy

10.9 Bệnh do vi rút gây ra

Việc thảo luận chi tiết về vi rút gây bệnh cây nằm ngoài phạm vi của cẩm nang này. Cần tham khảo các tài liệu khác nếu nghi ngờ virút là tác nhân gây bệnh.

Mặc dù virút gây bệnh cây thường có các triệu chứng khá điển hình, việc giám định chúng thông qua việc sử dụng kỹ thuật phân tử hoặc các kỹ thuật chẩn đoán khác. Ký chủ chỉ thị có thể trợ giúp cho việc giám định.

Các phần tử vi rút thực vật rất nhỏ và không thể nhìn thấy được dưới kính hiển vi. Cần sử dụng kính hiển vi điện tử để quan sát các phần tử vi rút thực vật. Một phần tử vi rút thực vật được gọi là một virion. Vi rút có thể có hình sợi, hình cầu hoặc hình que. Tất cả các vi rút gây bệnh thực vật được cấu tạo từ axit nucleic, thường là ARN; tuy nhiên, một số cấu tạo từ ADN. Hầu hết vi rút có vỏ protein.

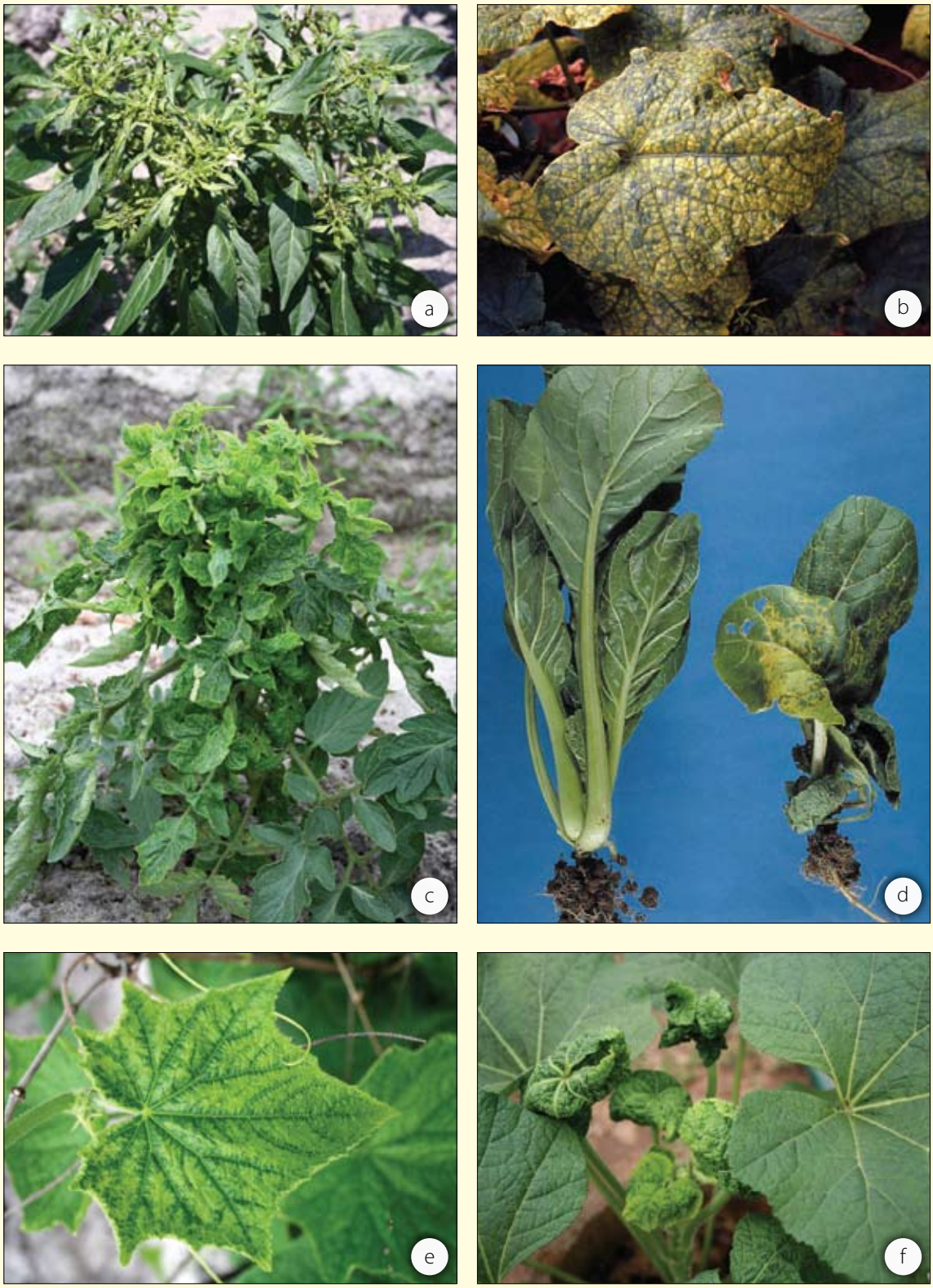
Không thể phân lập và nuôi cấy vi rút thực vật trên môi trường thạch, bởi vì chúng chỉ có thể tái tạo trong tế bào ký chủ còn sống.

Vi rút thực vật chỉ có thể xâm nhiễm vào tế bào cây ký chủ thông qua các vết thương nhỏ do sâu bọ hoặc các véc tơ khác, qua các vết thương cơ giới. Vi rút tái tạo trong tế bào cây, cản trở các hoạt động bình thường của tế bảo. Sự cản trở các tế bào cây tác động đến cây ký chủ và có thể đưa đến các triệu chứng rõ rệt. Các phần tử vi rút di chuyển từ tế bào này sang tế bào khác, lan đến các bộ phận khác của cây (Hình 10.29).

Cây có thể bị nhiễm nhiều vi rút cùng một lúc. Một số ký chủ bị nhiễm vi rút mà không biểu hiện triệu chứng.

Các triệu chứng bệnh do vi rút bao gồm cây còi cọc, biến vàng, khảm hoặc vằn lá, lá vàng hoặc có các vết loét, đốm vòng, lá biến dạng, lá cuốn, còi cọc, và trong một số trường hợp, gây chết cây. Một số triệu chứng do vi rút gây ra tương tự như các dấu hiệu rối loạn dinh dưỡng hoặc do các tác nhân khác gây ra.

Vi rút gây bệnh cây có thể lan truyền thông qua các véctơ côn trùng, rễ, thân củ giống nhiễm bệnh, gốc hoặc chồi giống sử dụng để ghép cây. Một số vi rút lan truyền qua hạt giống bị bệnh. Một số vi rút có thể được lan truyền một cách cơ học từ cây này sang cây khác thông qua các dụng cụ như dao ghép, kéo cắt cành (và với một số virút, qua tay người). Vi rút khảm lá thuốc lá dễ truyền lan qua dụng cụ cắt và tay người, và thậm chí có thể tồn tại trong điếu thuốc lá, lan truyền thông qua tay người.



Hình 10.29 Các bệnh do vi rút: (a) vi rút héo đốm cà chua ở ớt, (b) vi rút biến vàng củ cải đường ở dưa chuột, (c) vi rút vàng lá xoăn lá ở cà chua, (d) vi rút khảm củ cải ở cây ăn lá họ cải bắp (phải), cây khỏe (trái), (e) vi rút ở dưa chuột, (f) quăn lá do vi rút ở mãn đình hồng (*Althaea rosea*)

Việc giám định vi rút gây bệnh cây đòi hỏi phải có phòng thí nghiệm chuyên sâu. Các phòng thí nghiệm chẩn đoán cấp tỉnh ở Việt Nam nên yêu cầu trợ giúp từ Viện Bảo vệ thực vật trong việc chẩn đoán các bệnh do vi rút. Có một số bộ kít chẩn đoán cho một số vi rút để chẩn đoán nhanh trên đồng ruộng, nhưng các bộ kit này khá đắt tiền.

Khi không có mặt cây ký chủ, vi rút bảo tồn chủ yếu ở cỏ dại. Tuy nhiên, một số tồn tại trong hạt và có thể tìm thấy trong các cây nhân giống vô tính.

Việc phòng trừ bệnh vi rút tùy thuộc vào đặc tính của vi rút, phổ ký chủ, phương thức lan truyền và bảo tồn. Các biện pháp phòng trừ bao gồm:

- loại bỏ ký chủ cỏ dại của vi rút và véc tơ lan truyền
- phòng trừ véc tơ truyền vi rút trong vụ trồng
- sử dụng giống sạch bệnh
- dùng những hệ thống danh mục để cung cấp cây trồng sạch bệnh
- vệ sinh cây trồng tốt
  - giảm thiểu việc tiếp xúc với cây bệnh
  - khử trùng dụng cụ tỉa cây trước khi dùng

10.10 Tài liệu tham khảo

Erwin D.C. và Ribeiro O.K. 1996. Phytophthora diseases worldwide. American Phytopathological Society Press: St. Paul, Minnesota.

Drenth A. và Sendall B. 2001. Practical guide to detection and identification of *Phytophthora*. CRC for Tropical Plant Protection: Brisbane, Australia.

11 Các bệnh phổ biến trên một số cây trồng quan trọng

Trong phần này ví dụ về những bệnh phổ biến trên nhiều loại rau và một cây màu được đưa ra nhằm minh họa sự đa dạng của các bệnh trên cây trồng ở Việt Nam. Các bệnh được liệt kê trong mỗi bảng cũng cung cấp một danh sách kiểm tra nhằm giúp việc quan sát trên đồng ruộng. Các tác nhân gây ra nhiều bệnh trong số này chỉ có thể được chẩn đoán chính xác trong phòng thí nghiệm.

Việc chẩn đoán chính xác tác nhân gây bệnh là vô cùng cần thiết trước khi đưa ra biện pháp quản lý bệnh hại tổng hợp. Chẳng hạn như thối rễ do nấm có thể do nhiều tác nhân gây ra như *Pythium*, *Phytophthora, Rhizoctonia* và *Phoma*. Việc phòng trừ các loại nấm này đòi hỏi có các chiến lược quản lý bệnh hại tổng hợp khác nhau.

Sơ đồ minh họa cho mỗi cây trồng được đưa ra nhằm giúp người đọc nhận biết vị trí tìm các triệu chứng của từng bệnh.

Hiểu biết toàn diện về những bệnh này sẽ giúp người đọc trong việc chẩn đoán bệnh trên nhiều cây trồng khác.

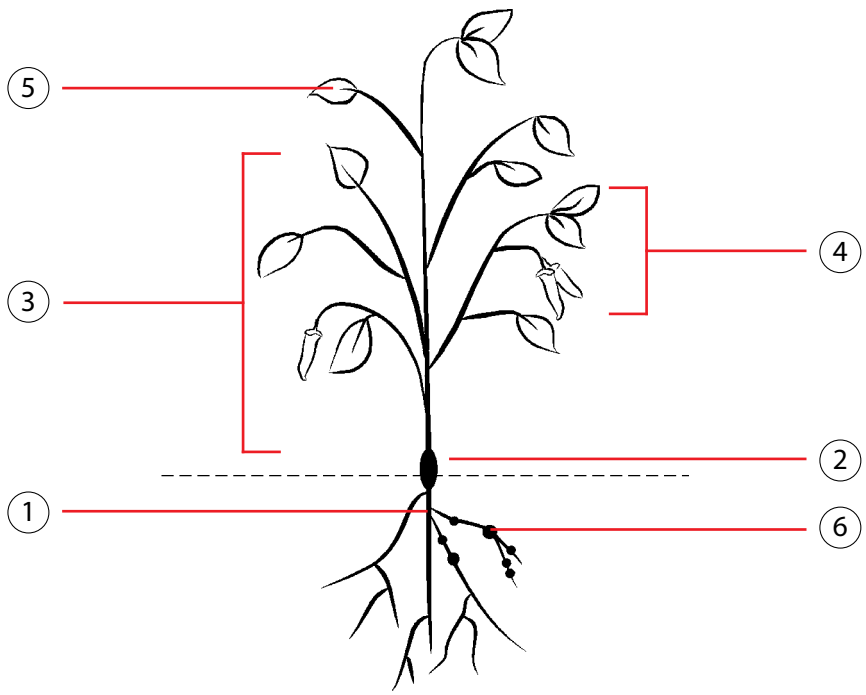
11.1 Các bệnh phổ biến trên ớt

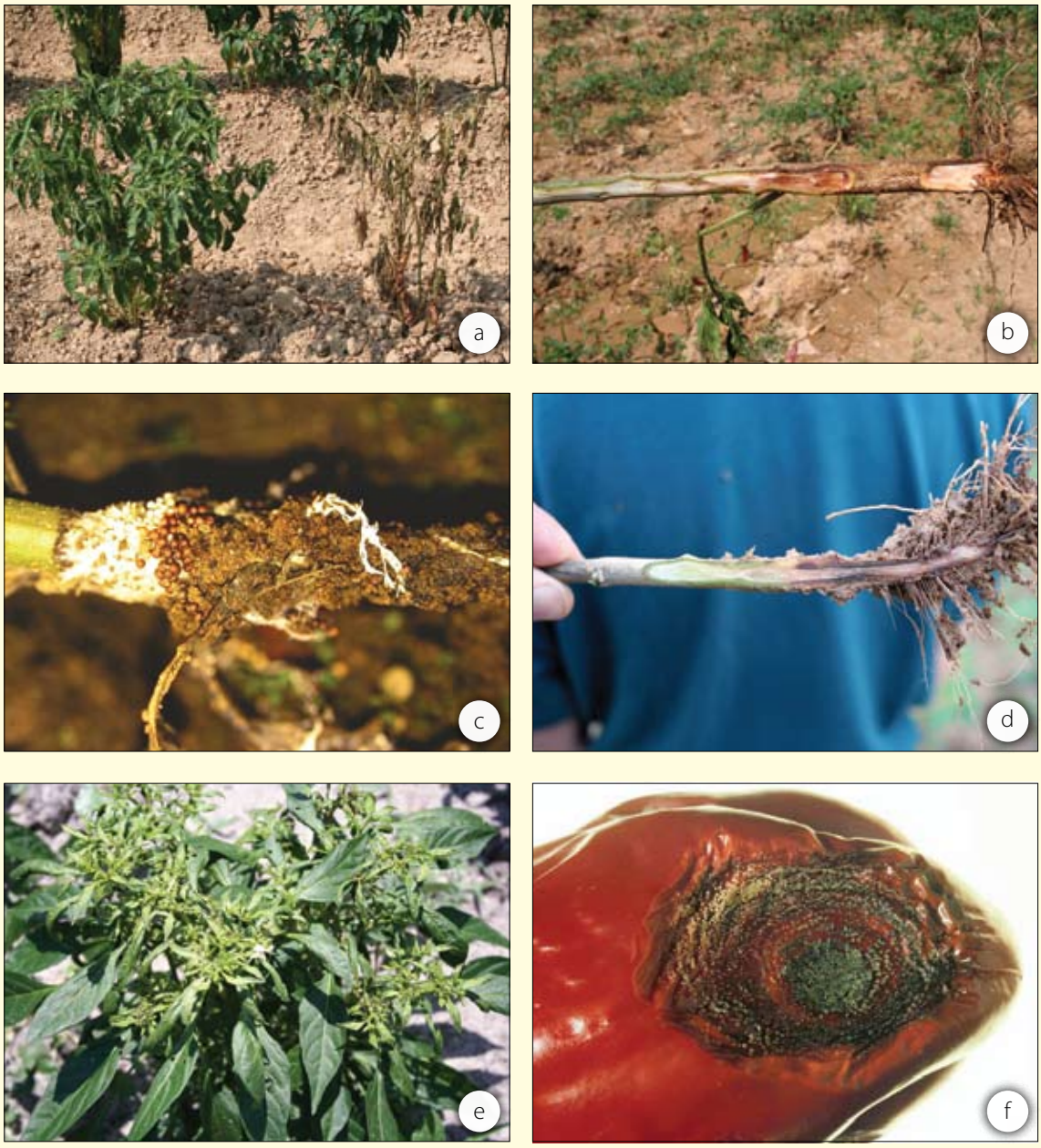
Bảng 11.1 cung cấp danh mục những bệnh phổ biến trên ớt ở Việt Nam (các con số tương ứng với con số trên biểu đồ). Tất cả các bệnh có thể cùng xuất hiện trong một vụ, và một cây có thể bị một hay nhiều bệnh gây hại (Hình 11.1).

Thối rễ Phytophthora, thối gốc thân, héo vi khuẩn, sưng rễ do tuyến trùng và sâu đục thân đều gây ra triệu chứng héo tương tự.

Bảng 11.1 Các bệnh phổ biến trên ớt

Bệnh	Tác nhân gây bệnh	Dấu hiệu chẩn đoán chính
1 Thối rễ Phytophthora	*Phytophthora capsici*	thối rễ và héo
2 Thối gốc	*Sclerotium rolfsii*	Các hạch nấm nhỏ tròn màu nâu và sợi nấm trắng ở gốc thân
3 Héo vi khuẩn	*Ralstonia solanacearum*	Dịch khuẩn xuất hiện ở thân, thân bị biến màu nâu
4 Thán thư	*Colletotrichum* sp.	Vết bệnh màu đen, lõm xuống
5 Bệnh virút	Vi rút thực vật	Lá non còi cọc, kém phát triển
6 Sưng rễ tuyến trùng	*Meloidogyne* sp.	U sưng trên rễ





Hình 11.1 Các bệnh trên ớt: (a) cây ớt khỏe (trái) và bị héo (phải) có thể do một số bệnh gây ra, (b) thân biến màu nâu, triệu chứng điển hình của bệnh héo xanh do vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* gây ra, (c) thối gốc mốc trắng do *Sclerotium rolfsii* gây ra, (d) thối rễ Phytophthora do nấm *Phytophthora capsici* gây ra, (e) ớt bị nhiễm vi rút héo đốm cà chua, (f) quả ớt bị bệnh thán thư do nấm *Colletotrichum sp.* gây ra.

11.2 Các bệnh phổ biến trên cà chua

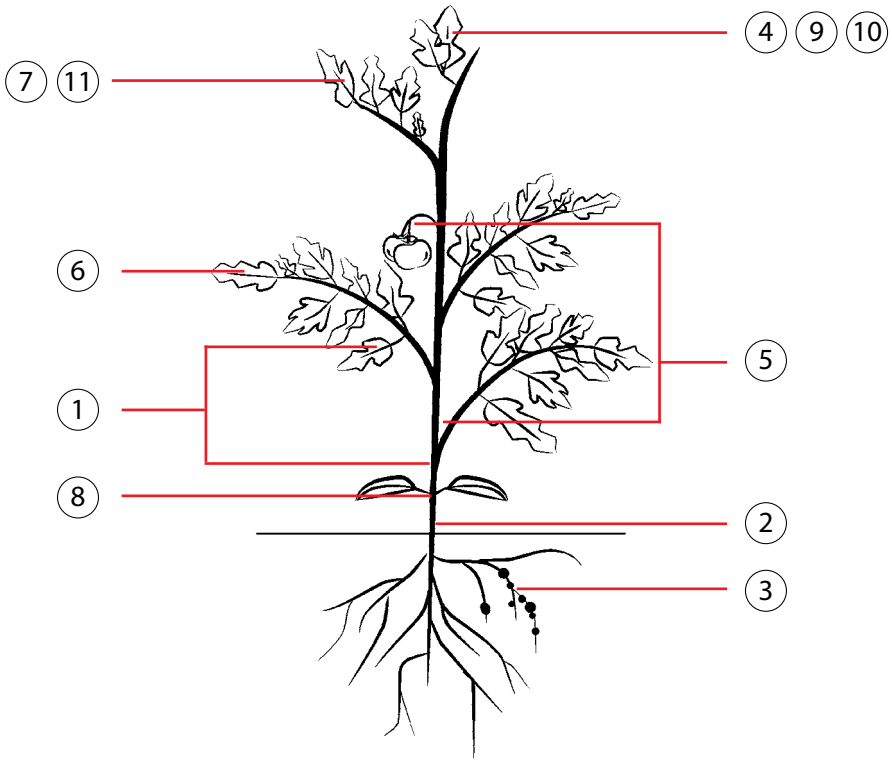
Cà chua mẫn cảm với nhiều loại bệnh khác nhau. (Bảng 11.2). Cần có các điều tra thêm về bệnh cà chua ở Việt Nam nhằm xác định tất cả các loại bệnh nghiêm trọng hiện có. Đặc biệt là cần có các nghiên cứu chẩn đoán về virút và vi khuẩn gây bệnh trên cà chua.

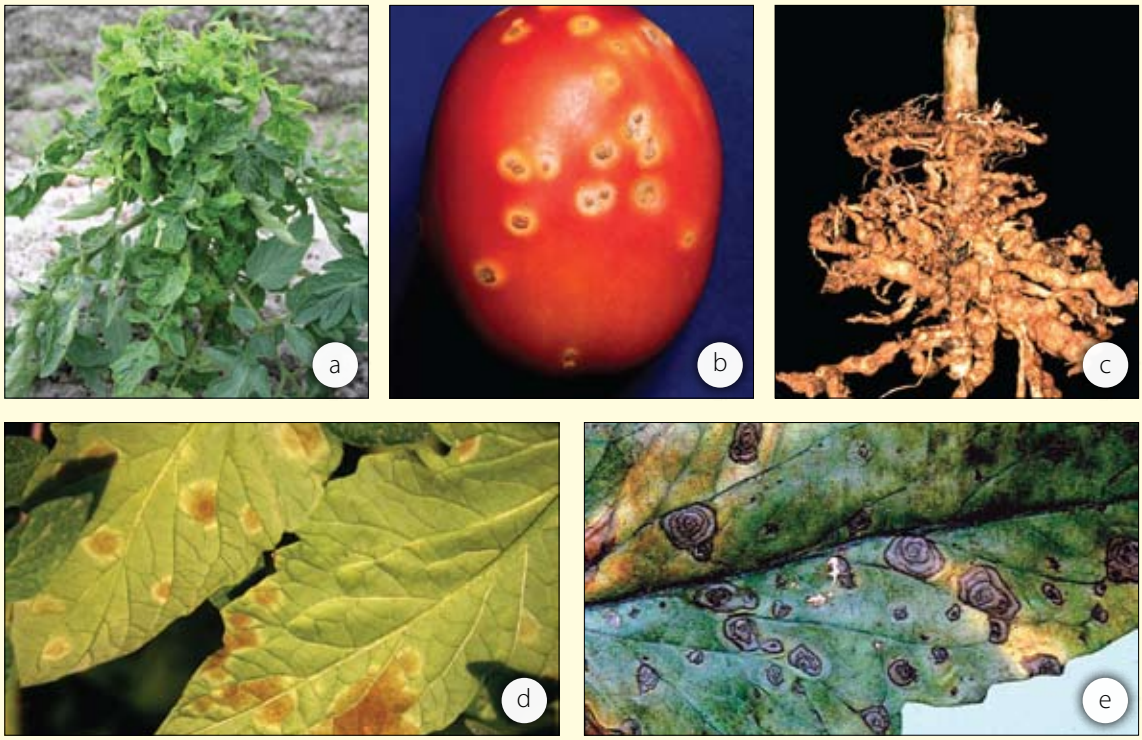
Các vụ trồng cà chua ở Việt Nam thường bị ảnh hưởng bởi một số bệnh. Một cây có thể bị nhiễm nhiều bệnh, làm cho việc chẩn đoán trở nên khó khăn.

Bảng 11.2 Các bệnh phổ biến ở cà chua

Bệnh	Tác nhân	Dấu hiệu chẩn đoán chính
1 Héo vi khuẩn	*Ralstonia solanacearum*	Héo, dịch khuẩn xuất hiện ở thân, thân biến màu nâu.
2 Thối gốc	*Sclerotium rolfsii*	Hạch nấm nhỏ màu nâu, tròn và sợi nấm màu trắng xuất hiện ở gốc thân.
3 Sưng rễ tuyến trùng	*Meloidogyne* sp.	Héo, u sưng trên rễ
4 Mốc sương	*Phytophthora infestans*	Nấm màu xám mọc ở mặt dưới lá
5 Thối vi khuẩn[a]	*Clavibacter michiganensis*	Lá vàng, héo, thân biến màu nâu, đốm trên quả
6 Đốm vi khuẩn[a]	*Pseudomonas syringae*	Đốm hoại trên lá
7 Virút héo đốm cà chua[a]	Virút	Lá non bị biến màu nâu cục bộ, có các đốm hoặc vòng màu tối ở lá già
8 Héo Fusarium[a]	*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*	Héo, mạch dẫn biến màu nâu
9 Đốm vòng	*Alternaria solani*	Các vòng tròn đồng tâm màu đen trên lá
10 Mốc lá	*Cladosporium fulvum (Fulvia fulva)*	Nấm màu xám/tía mọc ở mặt dưới lá
11 Virút vàng ngọn	Virút	Lá quăn, nhỏ, biến màu vàng

a Cần xác nhận sự có mặt của những tác nhân gây bệnh này ở Việt Nam.





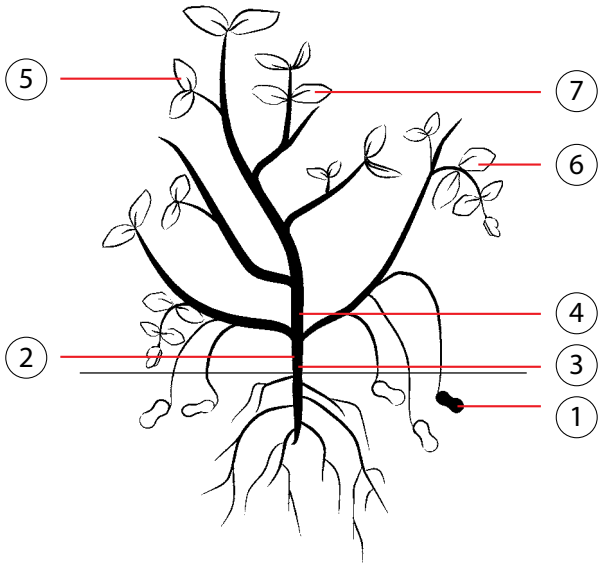
Hình 11.2 Các bệnh ở cà chua: (a) triệu chứng lá quăn, vàng do vi rút gây ra trên những chồi mới mọc. (b) vết loét do vi khuẩn *Pseudomonas syringae* gây ra trên quả cà chua, (c) Sưng rễ tuyến trùng do *Meloidogyne* sp. gây ra, (d) đốm mốc lá do *Cladosporium fulvum*, (e) đốm vòng trên lá do *Alternaria solani*

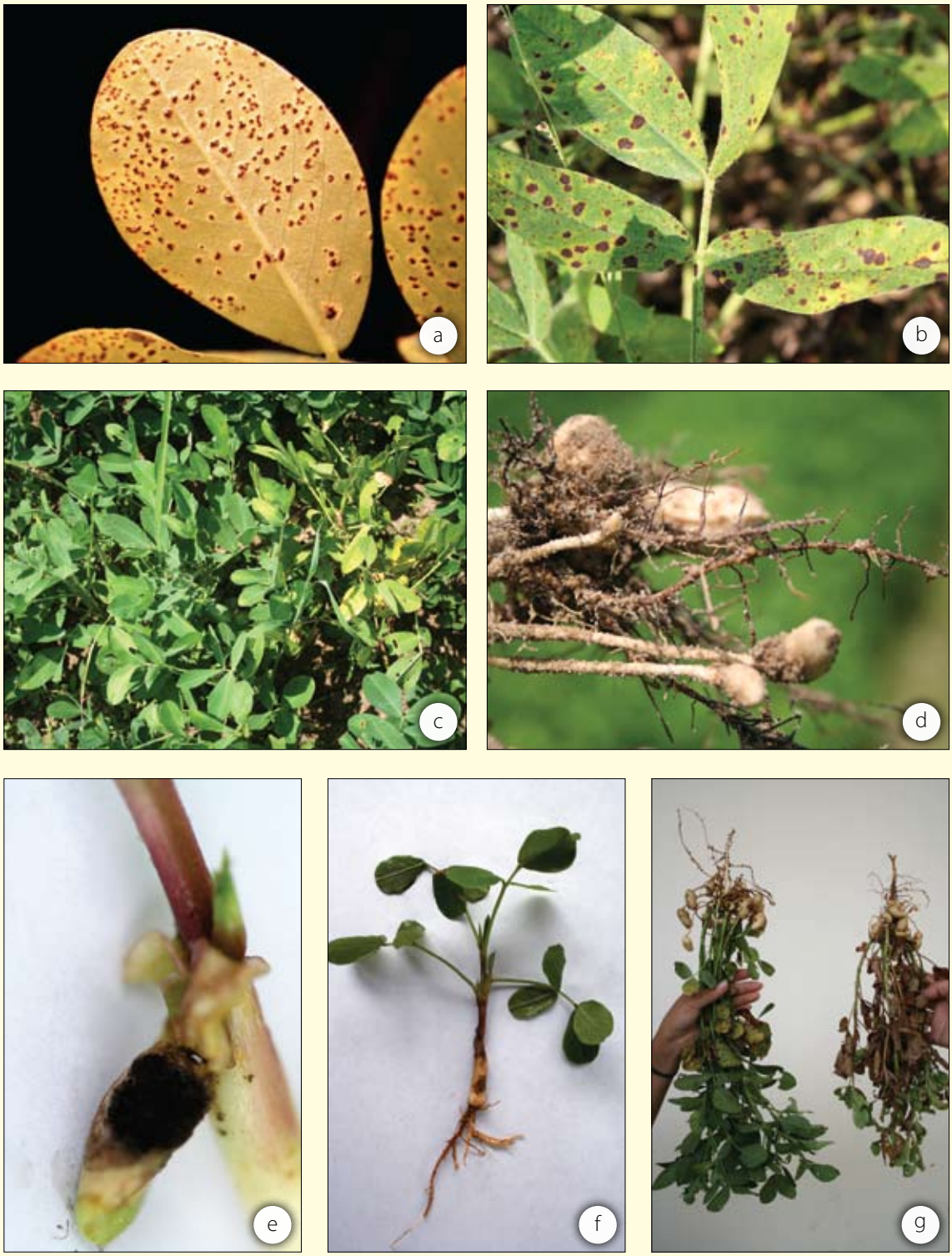
11.3 Các bệnh phổ biến trên lạc

Lạc dễ bị nhiễm các bệnh trên rễ, quả, thân và lá (Bảng 11.3 và Hình 11.3). Cần nghiên cứu chẩn đoán thêm để xác định nguyên nhân chính gây thối rễ và vỏ.

Bảng 11.3 Các bệnh phổ biến trên lạc

Bệnh	Tác nhân	Dấu hiệu chẩn đoán chính
1 Thối rễ và quả	*Pythium/Rhizoctonia*	Chết cây con/thối rễ Cây biến vàng và héo Còi cọc Rễ bên bị biến màu ở giai đoạn giữa vụ Rễ cái thối vào cuối vụ và thối quả
2 Thối gốc mốc trắng	*Sclerotium rolfsii*	Hạch nấm tròn nhỏ màu nâu và sợi nấm màu trắng trên gốc
3 Thối gốc mốc trắng	*Aspergillus niger*	Cây còi cọc và héo Sợi nấm và bào tử màu đen ở gốc thân và lá mầm
4 Thối thân	*Sclerotinia sclerotiorum*	Héo, thối ướt thân và lá, hạch nấm lớn màu đen
5 Gỉ sắt	*Puccinia arachidis*	Mụn gỉ sắt màu đỏ trên lá
6 Đốm lá Cercospora	*Cercospora arachidicola*	Vết bệnh màu nâu sô-cô-la đậm
7 Virút khảm lá	Virút	Khảm, cần chẩn đoán trong phòng thí nghiệm





Hình 11.3 Các bệnh ở lạc: (a) gỉ sắt lạc do nấm *Puccinia arachidis* gây ra, (b) đốm lá Cercospora (*Cercospora arachidicola*) và gỉ sắt, (c) lạc bị thối rễ gây triệu chứng biến vàng và còi cọc, (d) thối rễ con và thối quả do *Pythium* sp., (e) vết bệnh trên lá mầm lạc với rất nhiều bào tử của nấm *Aspergillus niger*, (f) thối rễ Pythium ở cây con, (g) cây khỏe (trái) và cây bị thối rễ gây còi cọc (phải)

11.4 Các bệnh nấm phổ biến trên hành

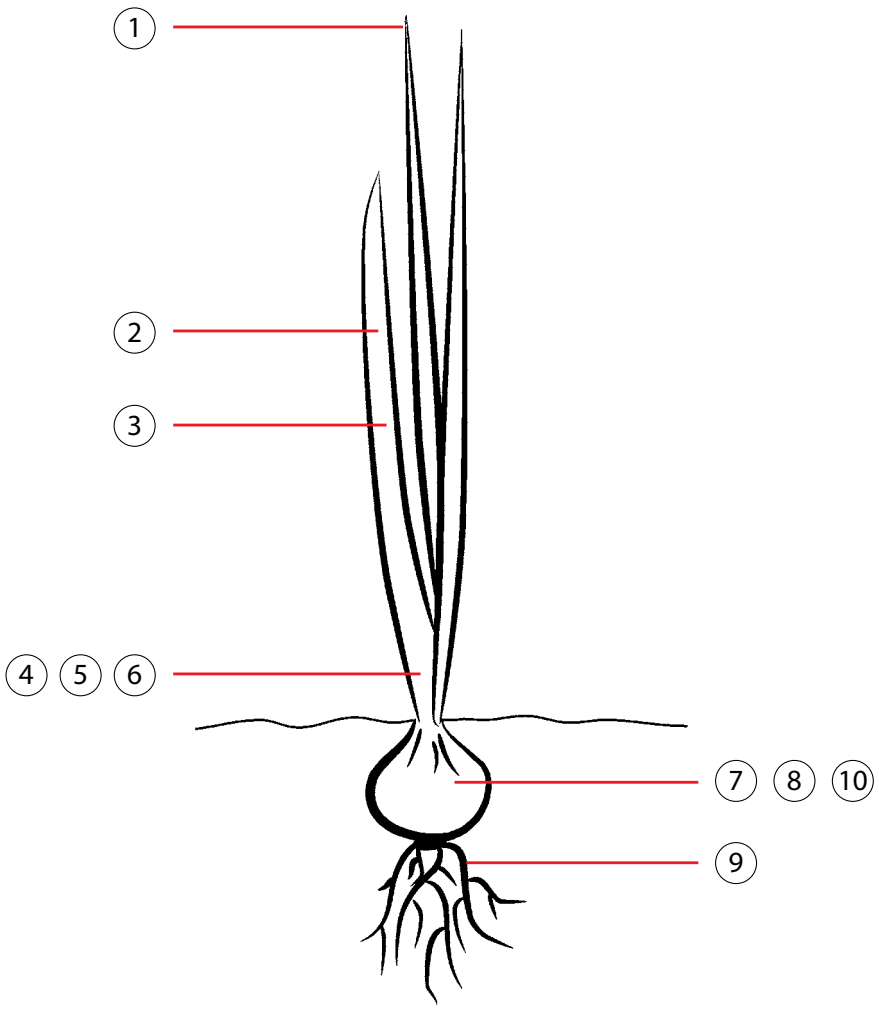
Hành bị nhiễm nhiều bệnh nấm trên lá, thân củ và rễ (Bảng 11.4). Hầu hết nấm gây bệnh có thể được phân lập khá dễ dàng trên môi trường nhân tạo. Lưu ý tác nhân gây bệnh sương mai là nấm ký sinh chuyên tính và không thể nuôi cấy được trên môi trường nhân tạo.

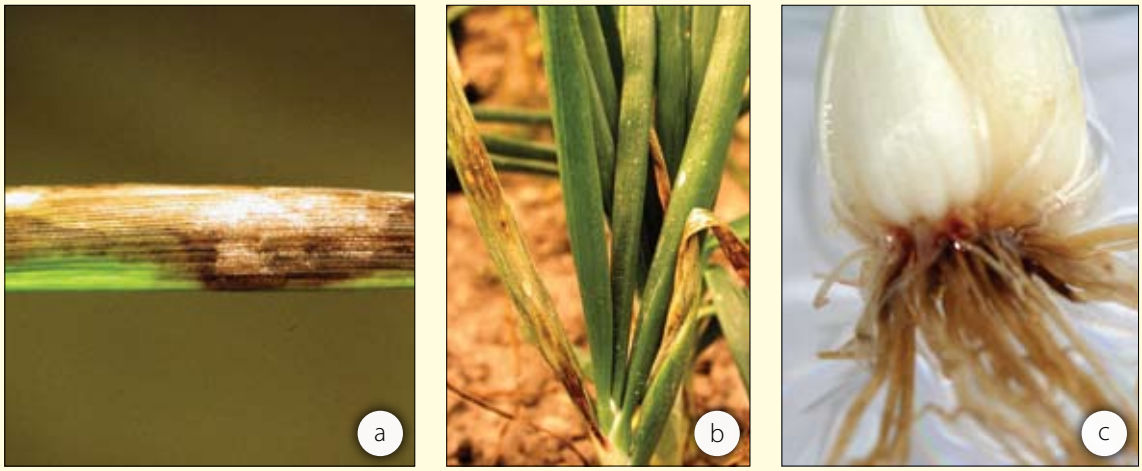
Những bệnh liệt kê trong Bảng 11.4 có các triệu chứng điển hình và thường có thể dễ dàng phân biệt ngay trên đồng ruộng và sau đó xác nhận trong phòng thí nghiệm. Nấm gây thối củ có thể tiếp tục lây nhiễm trong quá trình bảo quản.

Bảng 11.4 Các bệnh nấm phổ biến trên hành

Bệnh	Tác nhân	Dấu hiệu chẩn đoán chính
1 Cháy đầu lá	*Colletotrichum* sp.	Đầu lá biến màu nâu trắng, có đĩa cành.
2 Sương mai	*Peronospora* sp.	Nấm xám mọc
3 Đốm lá Stemphylium	*Stemphylium* sp.	Đốm lá dạng giống đốm vòng
4 Thối cổ rễ	*Botrytis byssoidea*	Nấm màu nâu xám và các khối bào tử xuất hiện trên củ
5 Thối gốc mốc trắng	*Sclerotium rolfsii*	Sợi nấm màu trắng và hạch nấm màu nâu trên gốc
6 Thối (ướt) cuống lá	*Sclerotinia sclerotiorum*	Sợi nấm màu trắng, hạch nấm to màu đen.
7 Thối Fusarium	*Fusarium* spp.	Sợi nấm có màu trắng đến tím nhạt, không có hạch nấm
8 Mốc đen (thối củ)	*Aspergillus niger*	Các đám bào tử như bột màu đen (cũng là bệnh gây thối trong quá trình bảo quản)
9 Thối rễ màu hồng	*Phoma terrestris* (*Pyrenochaeta terrestris*)	Rễ màu hồng và vảy ngoài màu hồng
10 Thối thân củ	*Rhizopus stolonifer* (*R. nigricans*)	Nấm mọc dày trông như bông gòn với các túi bào tử đen rõ rệt

Hành cũng bị nhiễm bệnh cháy lá do vi khuẩn, thối thân củ do vi khuẩn, một số virút thực vật, và một vài bệnh rễ do tuyến trùng (Hình 11.4). Các bệnh do tuyến trùng chủ yếu gây còi cọc và ít khi làm cây chết, vì vậy thường không được chú ý đến.





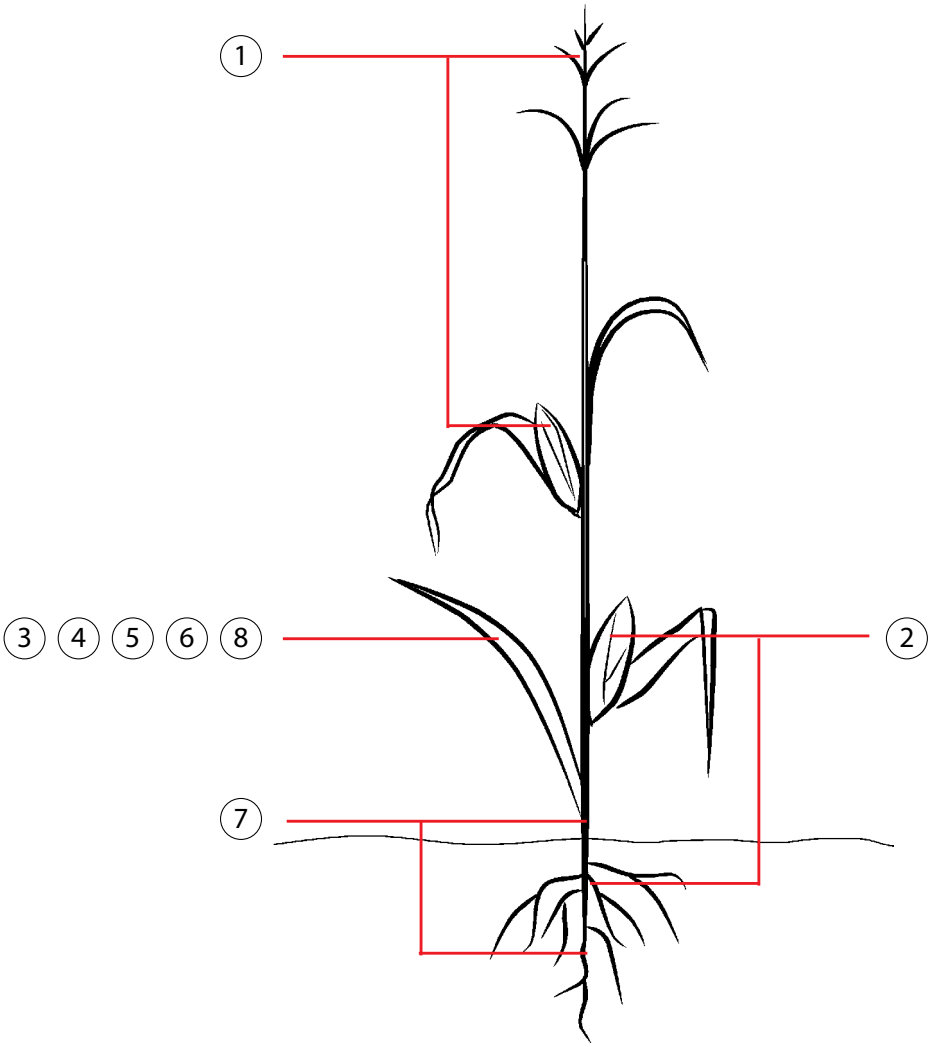
Hình 11.4 Các bệnh ở hành: (a) đốm lá Stemphylium, (b) sương mai do nấm *Peronospora* sp., (c) Các triệu chứng thối rễ màu hồng do nấm *Phoma terrestris*

11.5 Các bệnh nấm phổ biến ở ngô

Ngô được khuyến cáo trồng luân canh với cây rau để phòng trừ nhiều tác nhân gây bệnh tồn tại trong đất. Ngô có khả năng kháng bệnh héo do vi khuẩn (*Ralstonia solanacearum*), *Sclerotinia sclerotiorum*, hầu hết các loài *Phytophthora* và tuyến trùng gây sưng rễ. Tuy nhiên, ngô khá mẫn cảm với các loài *Pythium* phổ biến và tương đối mẫn cảm với *Sclerotium rolfsii* và *Rhizoctonia* spp. (Bảng 11.5 và Hình 11.5). Ngô cũng dễ bị nhiễm bệnh thối thân và bắp do một số loài *Fusarium* nhưng các loài này lại thường không ảnh hưởng đến cây rau. Danh sách chi tiết hơn về các bệnh trên cây ngô có thể tìm thấy trên trang web http://www.cimmyt.org/english/docs/field_guides/maize/diseases.htm.

Bảng 11.5 Các bệnh nấm phổ biến trên ngô

Bệnh	Tác nhân	Các dấu hiệu chẩn đoán chính
1 Ung thư ngô	*Ustilago maydis*	Các u sưng lớn màu trắng trên hạt, các đám bào tử đen; cũng có thể gây nhiễm hoa đực và thân.
2 Thối rễ, bắp và thân do *Fusarium*	*Fusarium graminearum*	Thối trong thân thường dẫn đến hiện tượng lõi thân bị chẻ vụn. Thân và bắp thối có thể có màu hồng tới đỏ, và có xuất hiện sợi nấm.
	Fusarium verticillioides *Fusarium subglutinans* *Fusarium proliferatum*	Thối trong thân thường dẫn đến hiện tượng lõi thân bị chẻ vụn. Lõi thường có màu tím đến tía. Sợi nấm trắng phát triển trên bắp bị bệnh bên dưới lớp vỏ.
3 Gỉ sắt	*Puccinia sorghi*	Các mụn hoại tử dài trên lá.
4 Khô vằn trên rễ, thân và lá	*Rhizoctonia* spp.	Gây ra những vết bệnh lớn màu nâu nhạt, loang lổ trên lá và thân. Các hạch nấm màu nâu hình dạng bất định xuất hiện ở các vị trí bị bệnh.
5 Cháy lá	*Bipolaris maydis* (*Cochliobolus heterostrophus*)	Các vết hoại tử hình thành trên lá.
6 Cháy lá Turcicum	*Exserohilum turcicum*	Vết bệnh có kích thước nhỏ hình bầu dục và mọng nước trên lá sau đó hình thành các vết hoại tử lớn hơn.
7 Thối Pythium trên rễ và thân	*Pythium* spp.	Thối ướt ở mô thân và các vết bệnh màu nâu ở rễ.
8 Sương mai	*Peronosclerospora* spp. *Sclerospora* sp. *Sclerophthora* spp.	Nấm màu xám (cành mang bọc bào tử) mọc ở mặt dưới lá.



Hình 11.5 Các bệnh ở ngô: (a) ung thư ngô do *Ustilago maydis*, (b) khô vằn do *Rhizoctonia solani*, (c) sợi nấm trắng mọc trên bắp ngô bị nhiễm bệnh do *Fusarium verticillioides*

12 Nấm, người và động vật: các vấn đề về sức khỏe

Một số nấm gây bệnh trên người và các động vật khác - những bệnh này được gọi là các bệnh nấm. Chẳng hạn như *Aspergilllus flavus* có thể xâm nhiễm vào phổi người, gây ra các bệnh mãn tính về hô hấp. Vì vậy, phải thận trọng khi làm việc với các mẫu nuôi cấy nấm *A. flavus* (xem Phần 12.2.1). *Fusarium oxysporum* và *F. solani* liên quan với các bệnh mắt, móng tay và móng chân.

Một số nấm gây bệnh trên cây cũng có khả năng tạo các chất chuyển hóa bậc hai gọi là độc tố nấm. Độc tố nấm có thể lẫn vào thực phẩm của người hoặc của động vật và gây ra hiện tượng nhiễm độc tố nấm. Chẳng hạn như *A. flavus* tạo ra các độc tố aflatoxin, một trong những nhóm độc tố quan trọng nhất. Các afltoxin có trong một loạt các sản phẩm như lạc và ngô.

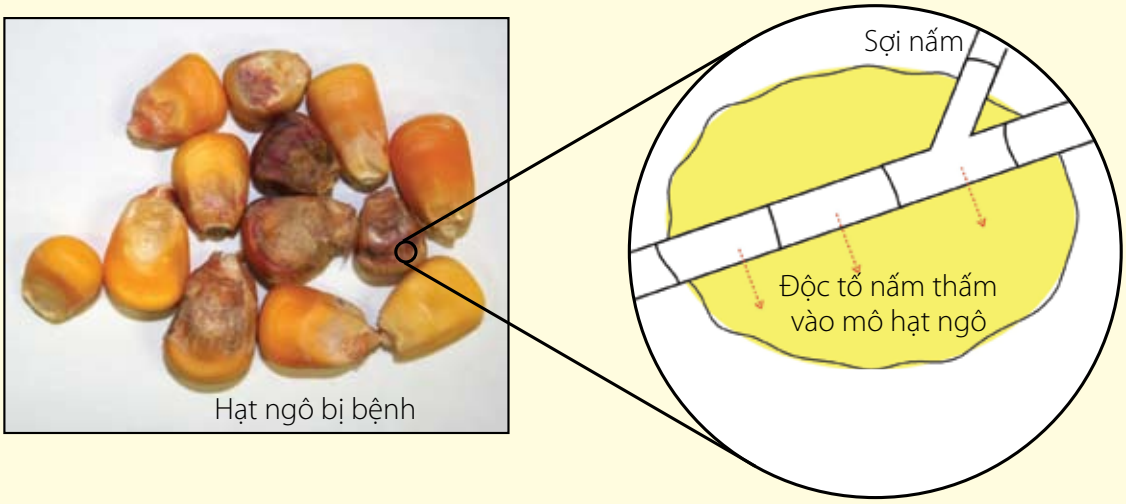
Độc tố nấm được sản sinh ra từ các sợi nấm và ngấm vào giá thể (như hạt, rơm hay trái cây, xem Phần 12.1).

Độc tố có thể được tạo ra và lẫn tạp vào trong nông sản trước khi thu hoạch hoặc trong quá trình bảo quản sau thu hoạch. Điều quan trọng là nên bảo quản hạt trong điều kiện khô để giảm thiểu sự phát triển của nấm và tạp nhiễm độc tố sau thu hoạch.

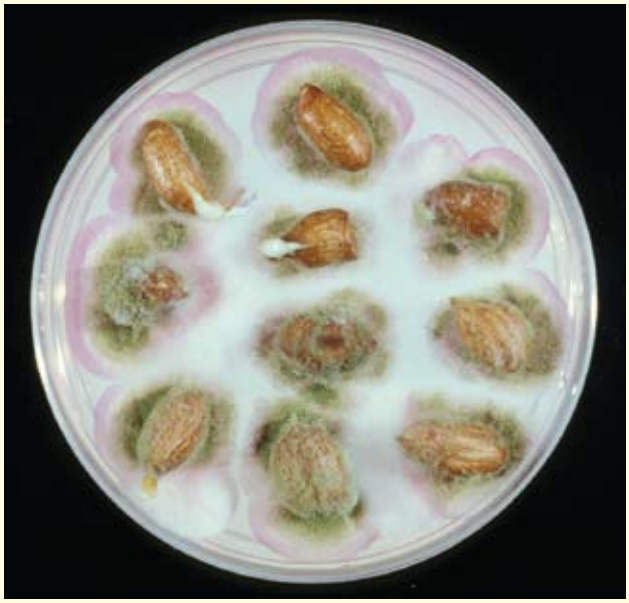
Việc sản sinh độc tố thay đổi tùy theo loài. Chẳng hạn như *Fusarium graminearum* sản sinh zearalenone trong hạt ngô nhưng không có trong hạt lúa mì. *Aspergillus flavus* cần điều kiện nóng ẩm để phát triển và sản sinh aflatoxins trong ngô và lạc (Hình 12.2). Ngay cả trong một loài, việc sản sinh độc tố cũng thay đổi đáng kể. Trong loài *F. graminearum*, các nguồn phân lập có thể sản sinh deoxynivalenol hoặc nivalenol. Những khác biệt này rất quan trọng, bởi vì các độc tính và tác động của chúng lên các loài động vật khác nhau đáng kể.

Một số nấm sản sinh độc tố trong các cấu trúc nấm như hạch nấm và bào tử. Những cấu trúc này có thể lẫn tạp vào hạt hay rơm rạ và vì vậy tác động đến người và động vật ăn thức ăn đã bị nhiễm nấm. Ví dụ như hạch nấm *Claviceps purpurea* tương đối độc.

Nhiều độc tố chịu được điều kiện nóng, vì vậy có thể tồn tại trong thực phẩm đã chế biến như các sản phẩm hạt ngũ cốc. Một số độc tố trong thức ăn gia súc có thể lây sang thịt, sữa và trứng. Con người tiêu thụ độc tố trong thức ăn từ ngũ cốc, các loại hạt, và các thực phẩm chế biến khác.



Hình 12.1 Hạt ngô nhiễm *Fusarium graminearum* và sơ đồ minh họa quá trình độc tố nấm từ sợi nấm thấm vào mô hạt.



Hình 12.2 *Aspergillus flavus* hình thành bào tử trên hạt lạc bị nhiễm bệnh trên môi trường phân lập

12.1 Các nấm có độc tính chủ yếu ở Việt Nam

Bảng 12.1 đưa ra danh sách các nấm chủ yếu có độc tính ở Việt Nam, cùng với độc tố do chúng sản sinh và đối tượng cây trồng cũng như động vật bị hại.

Bảng 12.1 Các nấm có độc tính chủ yếu ở Việt Nam

Loài	Độc tố	Cây trồng	Động vật
Aspergillus flavus	Aflatoxins	Lạc, ngô	Nhiều loài
Fusarium verticillioides	Fumonisins	Ngô	Ngựa, lợn
Fusarium graminearum	Deoxynivalenol	Lúa mì, lúa mạch, ngô	Lợn, gia cầm
	Nivalenol	Lúa mì, lúa mạch, ngô	Lợn, gia cầm
	Zearalenone	Ngô	Lợn
Penicillium	Cyclopiazonic acid	Ngũ cốc	Xem tài liệu
	Patulin	Trái cây	Xem tài liệu
	Ochratoxin A	Trái cây	Xem tài liệu

Độc tố do nấm sản sinh ảnh hưởng bởi một số yếu tố bao gồm:

- giá thể
- nhiệt độ
- độ ẩm trong giá thể
- dòng nấm.

12.2 Các loài *Aspergillus* có độc tính

12.2.1 *Aspergillus flavus*

Nguồn

Aspergillus flavus thường có trong lạc và ngô ở các vùng nhiệt đới, cũng có thể tìm thấy trong các sản phẩm bảo quản trong kho kể cả gia vị.

Phát sinh bệnh ở cây

Aspergillus flavus tồn tại trên cây lạc, nhưng dường như không gây bệnh cho cây đang phát triển. *A. flavus* liên quan tới bệnh thối bắp ngô trong điều kiện nóng ẩm.

Độc tố

Aspergillus flavus có thể sản sinh aflatoxin và axít cyclopiazonic. Một số mẫu phân lập có độc tính rất cao. Aflatoxin có tiềm năng gây ung thư và có thể gây ung thư gan.

Phòng ngừa

Loài này phát triển ở 37°C và có thể gây bệnh cho người, gây sưng phổi. Bào tử vô tính có thể chứa aflatoxin. Cần phải cẩn thận khi tiếp xúc với mẫu nuôi cấy của loài này (Hình 12.3). Tránh hít phải các bào tử (bào tử vô tính).

Hình 12.3 *Aspergillus flavus*, ba tản nấm trên môi trường Czapek yeast autolysate agar (trái), bào tử vô tính mọc đầy trên đầu cành bào tử phân sinh (giữa), bào tử vô tính (phải)

Mô tả

Aspergillus flavus tạo các tản nấm màu xanh-vàng, phát triển nhanh, nhất là ở 30-37°C. Một số mẫu phân lập sản sinh các hạch nấm có màu nâu đậm đến màu đen. Các đầu (head) *Aspergillus* màu xanh-vàng và có hình thái giống như chổi lau sàn khi quan sát dưới kính lúp soi nổi. Những đầu này thường được cấu tạo từ 2 lớp cuống, cuống cấp 1 và cuống cấp 2 (tế bào sinh bào tử), nhưng một số chỉ có lớp các tế bào sinh bào tử.

Không mở các đĩa cấy có *Aspergillus flavus*. Nấm này có thể gây bệnh phổi trầm trọng cho người.

12.2.2 *Aspergillus niger*

Nguồn

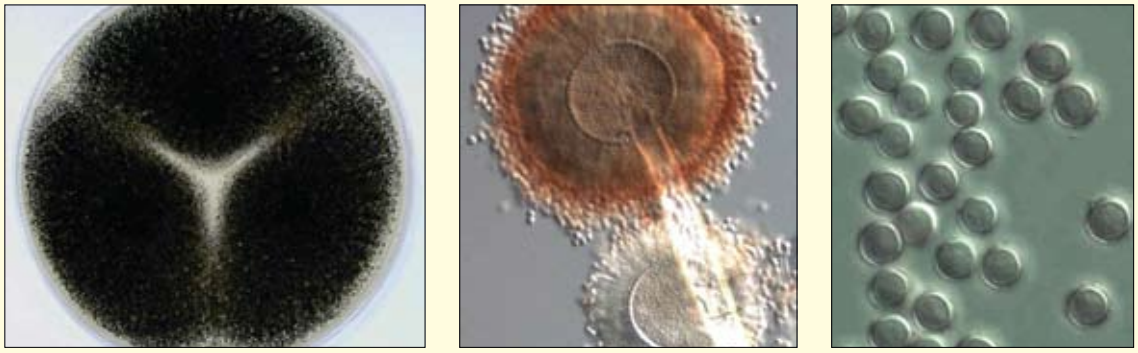
Aspergillus niger là một trong những loài *Aspergillus* phổ biến nhất. Nó thường có trong lạc, và có thể được phân lập từ hầu hết các sản phẩm để lâu được (như ngũ cốc, các loại đậu, gia vị) cũng như trong trái cây khô (Hình 12.4).

Phát sinh bệnh ở cây

Aspergillus niger gây ra nhiều bệnh khác nhau, bao gồm thối gốc lạc, thối và chết cây con, thối mục cây, thối chùm nho, thối đen hành tỏi và một loạt các bệnh thối trên rau quả sau thu hoạch.

Độc tố

Một số ít *A. niger* có thể tạo ochratoxin A. Loài tương tự *A. carbonarius* là nguồn quan trọng sản sinh ochratoxin A và có thể là nguồn ochratoxin chủ yếu trong các sản phẩm nho và cà phê.



Hình 12.4 *Aspergillus niger*, ba tản nấm trên môi trường Czapek yeast autolysate agar (trái), bào tử vô tính mọc đầy trên đầu cành bào tử phân sinh dài (giữa), bào tử vô tính (phải)

Phòng ngừa

Aspergillus niger và các Aspergilli đen phát triển nhanh trong điều kiện 37°C và có khả năng gây bệnh cho người. Chúng thường được phân lập từ tai người bị nhiễm bệnh. Cần phải cẩn thận khi làm việc với mẫu nuôi cấy của loài này. Tránh hít phải bào tử (bào tử vô tính).

Mô tả

Các tản nấm *A. niger* có màu nâu sô-cô-la đến màu đen và mọc nhanh, nhất là ở 30-37°C. Phức hợp *A. niger* bao gồm tập hợp của một số loài khác nhau. Đầu các loài này thường có màu nâu đậm đến màu đen sinh ra trên các cuống dài và trông giống như chổi lau sàn khi nhìn dưới kính lúp soi nổi. Hầu hết các loài sản sinh các đầu có cấu tạo 2 lớp cuống với cuống cấp 1 (metulae) lớn.

12.2.3 *Aspergillus ochraceus*

Nguồn

Aspergillus ochraceus là loài nấm quan trọng gây hại trên các đối tượng trong quá trình bảo quản. Sự có mặt của loại này đã được biết đến trên nhiều loại hàng dự trữ trong kho, nhất là ở những vùng nhiệt đới. *A. ochraceus* và các loài liên quan khác sản sinh ra độc tố ochratoxin A gây nhiễm độc cho cà phê, ca cao, hạt lấy dầu và các loại hạt dự trữ trong kho.

Phát sinh bệnh ở cây

Không phát sinh bệnh trong các điều kiện thời tiết bình thường.

Độc tố

Ochratoxin A được tìm ra đầu tiên trên môi trường nuôi cấy *A. ochraceus*. Độc tố này do một số loài thuộc nhóm *A. ochraceus* tạo ra.

Phòng ngừa

Có ít báo cáo về việc *Aspergillus ochraceus* gây bệnh cho người. Tuy nhiên, cũng như tất cả các nấm khác, cần phải cẩn thận tránh hít phải bào tử (bào tử vô tính).

Mô tả

Các tản nấm *A. ochraceus* có màu nâu vàng nhạt, và thường có màu nâu hồng ở mặt dưới đĩa nuôi cấy. Nhiều dòng cũng tạo các hạch nấm màu nâu hồng. Có một số các loài tương tự thuộc nhóm *A. ochraceus* (Hình 12.5). *A. ochraceus* mọc chậm hơn *A. flavus* và *A. niger*, nhất là ở 37°C. Một số loài trong nhóm này không phát triển ở 37°C.

Các tác giả chân thành cảm ơn Tiến sĩ Ailsa Hocking về những đóng góp trong việc mô tả và hình ảnh minh họa trong phần này.

Hình 12.5 *Aspergillus ochraceus*, ba tản nấm trên môi trường Czapek yeast autolysate agar (trái), bào tử vô tính mọc đầy trên đầu cành bào tử phân sinh (giữa), bào tử vô tính (phải)

12.3 Các loài *Fusarium* có độc tính

Fusarium verticillioides và *F. graminearum* là hai loài *Fusarium* có độc tính phổ biến nhất trên ngô ở Việt Nam. Những loài này có thể xuất hiện trong cùng một vùng. Các loài *Fusarium* khác xuất hiện trên ngô, nhưng thường ít phổ biến hơn hai loài được bàn đến ở đây.

12.3.1 *Fusarium verticillioides*

Nguồn

Liên quan chủ yếu đến ngô nhưng đôi khi cũng được phân lập từ các cây khác.

Phát sinh bệnh ở cây

Gây thối bắp, thân và rễ ngô. Phổ biến nhất trong các điều kiện ấm, nóng, khô, khi cây bị thiếu nước. Bệnh thối bắp cũng trở nên trầm trọng hơn ở những bắp đã bị sâu bọ phá hại. Nấm này có thể gây nhiễm không triệu chứng ở thân ngô trong các điều kiện thích hợp.

Độc tố

Fusarium verticillioides tạo nhóm độc tố fumonisin trong hạt ngô. Fumonisin B1 là chất độc nhất và phổ biến nhất. Fumosisin B1 gây phù phổi ở lợn và hóa lỏng não ngựa. Fumonisin B1 cũng liên quan đến ung thư thực quản ở người. Có các quy định hạn chế việc buôn bán ngô có lẫn tạp Fumonisin B1.

Mô tả

Sản sinh ra các sợi nấm màu trắng trên môi trường PDA và sắc tố tím trên thạch (Hình 12.6). Trên môi trường thạch nước cất có chứa lá cẩm chướng hoặc các mẩu thân lúa xanh đã tiệt trùng, *F. verticillioides* sản sinh các bào tử lớn dài, thon và khá thẳng tập trung thành khối trên các mẩu thân/lá và sản sinh ra các chuỗi dài bào tử nhỏ hình bầu dục từ các tế bào sinh bào tử đơn. Chúng không tạo bào tử hậu.

Hình 12.6 Thối Fusarium ở ngô do *Fusarium verticillioides* (trái), và mẫu nuôi cấy thuần trên môi trường PDA (phải)

12.3.2 *Fusarium graminearum*

Nguồn

Ở Việt Nam, *Fusarium graminearum* phổ biến trên ngô. Cũng phát hiện trên một số loại cỏ ở vùng Sapa.

Phát sinh bệnh ở cây

Gây thối lõi, rễ và thân ngô trong các điều kiện nhiệt độ ấm. Nấm này cũng gây bệnh bạc ngọn lúa mì và kê.

Độc tố

Sản sinh ra trichothecenes, nhất là deoxynivalenol và nivalenol. Có thể tìm thấy chúng trong thực phẩm cho người và động vật làm từ hạt ngô bị nhiễm bệnh. Deoxynivalenol (đôi khi viết ngắn DON) cũng được biết đến là 'độc tố gây ói mửa', bởi vì nó khiến lợn biếng ăn hoặc ói mửa tùy theo nồng độ trong thức ăn. *F. graminearum* cũng tạo zearalenone, một độc tố nấm gây động dục. Độc tố này gây vô sinh, nhất là ở lợn, nhưng cũng có thể ảnh hưởng đến trâu bò và các động vật khác.

Mô tả

Tạo ra sợi nấm từ màu hồng đến màu đỏ tía trên PDA và sắc tố đỏ tía trên thạch (Hình 12.7). Một số trường hợp sợi nấm có màu vàng nhạt. Bào tử lớn hình hơi cong với chiều dài trung bình tập trung thành khối nhỏ trên môi trường CLA hoặc trên các mẩu thân lúa xanh trong môi trường thạch nước cất. Không tạo bào tử nhỏ hay bào tử hậu. Tạo rất nhiều quả thể màu đen đồng tản trên CLA hoặc môi trường thạch nước cất có chứa giá thể thực vật thích hợp ở 20-23°C trong điều kiện chiếu sáng. Quả thể thường không hình thành ở điều kiện trên 25°C trên môi trường nhân tạo. Quả thể cũng có thể hình thành trên thân ngô và vỏ bắp cũ trong điều kiện ẩm và mát.

Hình 12.7 Thối Fusarium ở ngô do *F. graminearum* (trái), và mẫu nuôi cấy thuần trên môi trường PDA (phải)

13 Phòng thí nghiệm chẩn đoán và nhà lưới

13.1 Phòng thí nghiệm chẩn đoán

Những gợi ý sau dựa trên những phòng thí nghiệm chẩn đoán được xây dựng tại Chi cục Bảo vệ thực vật Quảng Nam, Thừa Thiên Huế, Nghệ An và Trường Đại học Nông lâm Huế thông qua tài trợ của dự án ACIAR "Chẩn đoán, khuyến nông và phòng trừ bệnh hại cây trồng tại các tỉnh miền Trung Việt Nam, CP/2002/115". Những phòng thí nghiệm này được xây dựng với mục đích chủ yếu là hỗ trợ công tác chẩn đoán bệnh do nấm. Tuy nhiên, các phương tiện trong phòng thí nghiệm cũng thích hợp cho việc phân lập các vi khuẩn gây bệnh cây phổ biến. Khi làm việc tại bất cứ một phòng thí nghiệm nào, các vấn đề an toàn và rủi ro ảnh hưởng đến sức khỏe đều phải được chú ý. Phụ lục 2, sức khỏe và an toàn, phác họa các rủi ro thường gặp phải trong một phòng thí nghiệm nghiên cứu chẩn đoán bệnh cây. Tuy nhiên, cần tham khảo ý kiến phụ trách phòng thí nghiệm trước khi vào một phòng thí nghiệm không quen thuộc.

13.1.1 Vị trí phòng thí nghiệm

Một phòng thí nghiệm chẩn đoán cần được bố trí trong một tòa nhà với tường bảo vệ tránh mưa. Tại những vùng nhiệt đới, nấm thường mọc ở mặt bên trong phía tường có mưa hắt. Nấm mọc như vậy có thể tạo các bào tử làm lẫn tạp môi trường nuôi cấy. Phòng thí nghiệm nên ở trên tầng hai là lý tưởng nhất. Điều này giảm các vấn đề về chuột và các sâu bọ khác như kiến. Phòng thí nghiệm nên có hai phòng lớn, một phòng để chuẩn bị và một phòng sạch.

Nên có một phòng hoặc một khu vực có mái che dùng để kiểm tra sơ bộ các mẫu từ đồng ruộng và rửa sạch đất khỏi mẫu rễ. Tại nơi này, các mẫu cây nhỏ được chọn lọc cho việc phân lập tác nhân nấm hoặc vi khuẩn trong phòng sạch. Nơi này cũng có thể được dùng để tách lấy tuyến trùng ký sinh thực vật từ đất.

Hình 13.1 Sắp xếp thiết bị trong một phòng thí nghiệm chẩn đoán (phòng thí nghiệm tại Chi cục BVTV Nghệ An): (a) và (b) hai vị trí trong phòng sạch, (c) và (d) hai vị trí trong phòng chuẩn bị.

13.1.2 Phòng chuẩn bị

Phòng chuẩn bị được dùng để chuẩn bị môi trường, bao gồm khử trùng dụng cụ và vật liệu trong nồi hấp, khử trùng đĩa Petri trong tủ sấy, rửa và cất giữ đồ thủy tinh, hóa chất và các vật dụng cơ bản khác. Phòng này cần có một quạt hút hơi để hút hơi nóng từ nồi hấp và tủ sấy.

13.1.3 Phòng sạch

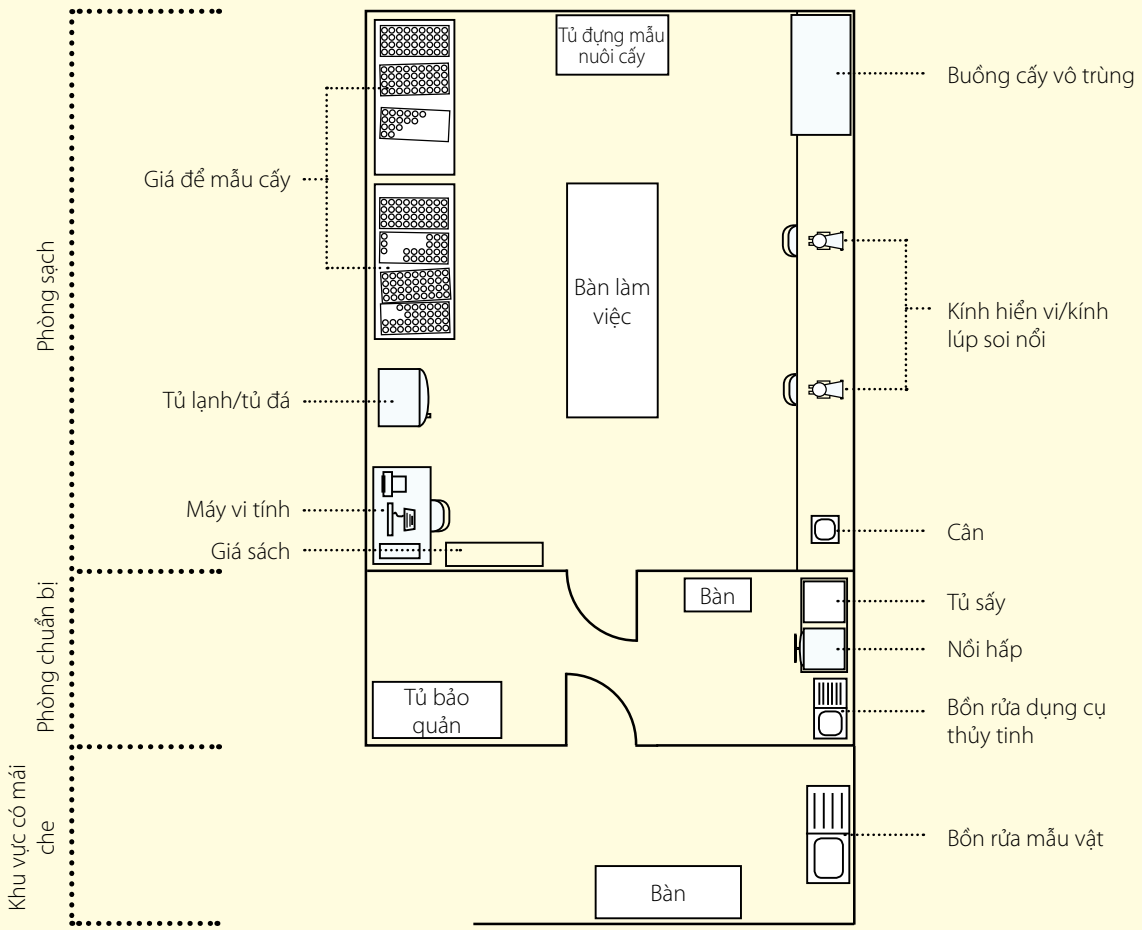
Phòng sạch dùng để phân lập nấm và vi khuẩn từ các mẫu cây bệnh đã được làm sạch. Phòng cũng được dùng để nuôi cấy các mẫu vi sinh vật trong điều kiện sạch. Các kính hiển vi được đặt trong phòng này nhằm kiểm tra các mẫu nuôi cấy và các cấu trúc nấm.

Không kiểm tra các cây lớn trong phòng sạch. Phân lập từ các mẫu cây nhỏ đã được rửa sạch bụi và đất bên ngoài trước khi đưa vào phòng thí nghiệm.

Nếu điều kiện cho phép, phòng này cần được trang bị máy điều hòa không khí để bảo vệ thiết bị và các mẫu nuôi cấy. Phòng cũng cần được giữ cho khỏi bụi và côn trùng. Tuy nhiên, đừng để phòng quá kín hơi, nếu không độ ẩm sẽ quá cao và nấm mốc sẽ phát triển trên tường cũng như trên thiết bị. Nên dùng một máy hút ẩm trong phòng này. Không được mang đất vào phòng sạch bởi vì đất là nguồn của nhện ăn nấm có thể làm lẫn tạp các mẫu nuôi cấy.

13.2 Bố trí phòng thí nghiệm

Khi thiết kế một phòng thí nghiệm, có nhiều khía cạnh cần xem xét. Điều quan trọng là công việc được tiến hành theo một thứ tự hợp lý và những bước chính của quá trình chẩn đoán nên được tách riêng khỏi nhau. Sau đây là sơ đồ bố trí của một phòng thí nghiệm chẩn đoán (Hình 13.2), chủ yếu là để chẩn đoán các tác nhân nấm gây bệnh thực vật.



Hình 13.2 Sơ đồ phòng thí nghiệm chẩn đoán, biểu thị sơ đồ bố trí thiết bị và bàn.

13.3 Thiết bị phòng thí nghiệm

13.3.1 Thiết bị cho phòng sạch

Những thiết bị cần thiết cho phòng này được liệt kê bên dưới và minh họa trong Hình 13.2:

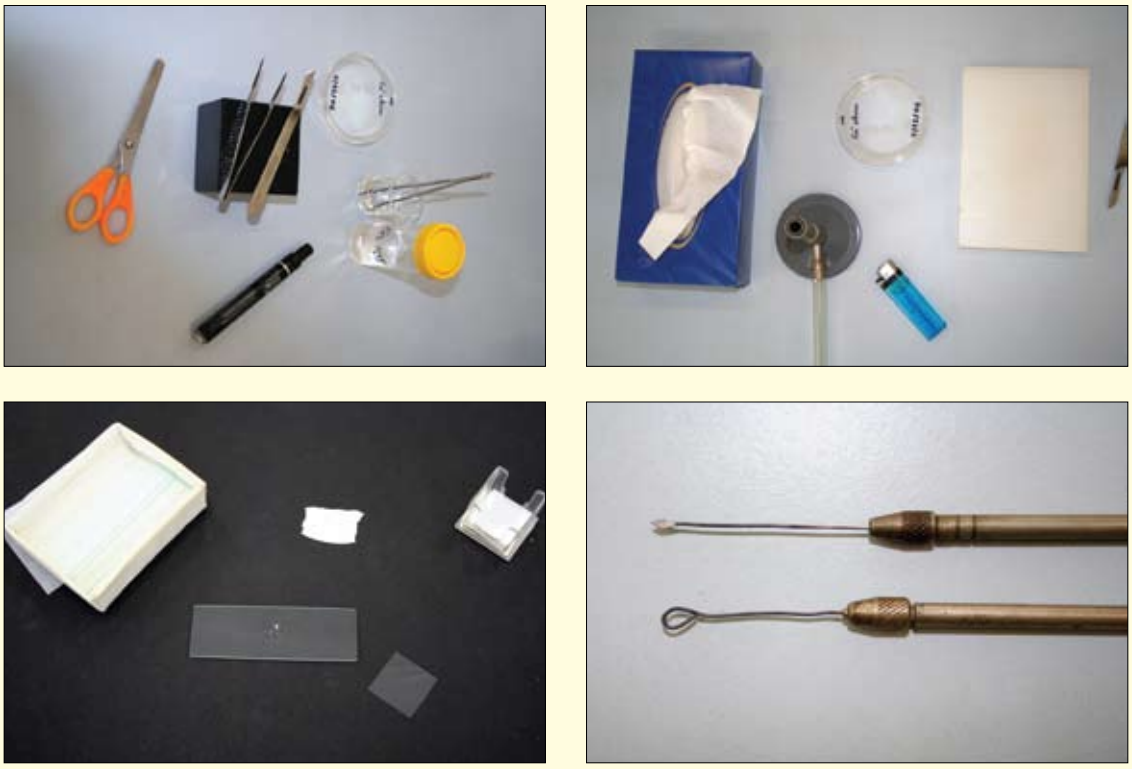
- Một kính hiển vi có gắn vật kính ×10, ×20, ×40, và ×100 (vật kính dầu). Một kính hiển vi cơ bản loại thường là đủ cho hầu hết các công việc chẩn đoán. Nếu có điều kiện tài chính, kính hiển vi có thể gắn với một vật kính luyện kim ×20 với khoảng cách làm việc xa. Vật kính này lý tưởng cho việc kiểm tra *in situ* các cấu trúc nấm trên môi trường nhân tạo, bởi vì khoảng cách từ vật kính tới mẫu quan sát khá xa (xem Phần 6.2.2).
- Một kính lúp soi nổi để kiểm tra các mẫu cây bệnh tìm cấu trúc nấm. Điều này đặc biệt quan trọng đối với nhiều tác nhân gây bệnh trên lá mà không thể nuôi cấy được trên môi trường nhân tạo. Kính cũng được dùng để cấy đơn bào tử nảy mầm hoặc cấy đỉnh sinh trưởng sợi nấm để làm thuần mẫu nuôi cấy, và để nghiên cứu tuyến trùng gây bệnh cây (xem Phần 6.2.1).
- Một tủ cấy vô trùng dùng để đổ môi trường và phân lập nấm khỏi mô cây. Trong điều kiện khí hậu nhiệt đới ở Việt Nam, có nhiều bào tử nấm trong không khí. Những bào tử này lẫn tạp môi trường khi đổ, cấy phân lập hoặc cấy truyền mẫu nuôi cấy, trừ khi các thao tác được tiến hành trong một tủ cấy vô trùng.
- Một giá dài có gắn đèn huỳnh quang bên trên để kích thích việc sản sinh bào tử và sắc tố ở nhiều loài nấm trên môi trường nhân tạo hoặc trên mẫu lá để ẩm. Nên có một giá cho các mẫu nuôi cấy sạch và một giá riêng cho các mẫu phân lập. Một tủ mẫu nuôi cấy sẽ thuận tiện cho việc nuôi các đĩa cấy cần điều kiện bóng tối. Việc này cần thiết đối với các mẫu nuôi cấy trên môi trường có chất kháng sinh bị phân hủy dưới tác động của ánh sáng (ví dụ như môi trường chọn lọc cho *Phytophthora*).
- Một tủ lạnh để dự trữ các môi trường trong chai lọ, đĩa Perti chứa môi trường (trong bịch ny lông hoặc giấy nhôm để tránh cho môi trường khỏi bị khô), cũng như chất kháng sinh, mẫu nuôi cấy và các mẫu bệnh nhỏ.
- Cần có một cân điện tử với độ chính xác 0,001 g để cân lượng kháng sinh hoặc hoá chất nhỏ.
- Các bàn làm việc lớn, một để kính hiển vi và cân điện tử, một cho công việc phân lập chung và nuôi cấy.
- Ghế ngồi thoải mái ở các bàn làm việc.
- Sổ ghi chép mẫu, để ghi chi tiết mỗi lần chẩn đoán cũng như danh sách các mẫu vi sinh vật lưu trữ.

- Một giá sách gồm một loạt các ấn bản thông tin về bệnh:
  - sách giáo khoa
  - cẩm nang
  - trích lược bệnh
  - các bài báo khoa học
- Ít nhất một máy vi tính nối mạng internet và một máy in cho:
  - công việc lưu trữ cơ sở dữ liệu
  - tìm kiếm thông tin
  - tiếp cận các thư viện hình ảnh
  - liên lạc qua thư điện tử.
- Các dụng cụ nhỏ cho công việc phân lập và cấy, bao gồm:
  - kẹp nhỏ
  - que cấy
  - cán dao mổ
  - que cấy khuẩn
  - lưỡi dao mổ
  - bút đánh dấu
  - dao nhỏ
  - cồn êtyl
  - que cấy truyền nấm (đầu dẹp)
  - giấy lau
  - thớt
  - lam kính và lamen
  - giấy lọc.

Kiểm tra tường và thiết bị thường xuyên để xem có bị nấm mọc hay không.

Sàn phòng sạch cần được lau chùi thường xuyên để loại bỏ bụi bẩn. Cần phải tắt quạt và đóng cửa sổ trong khi nuôi cấy để làm giảm sự di chuyển của không khí trong phòng. Công việc quan trọng cần được thực hiện trong buồng cấy đã được lau sạch bằng cồn 70%.

Khử trùng bề mặt khi cần.



Hình 13.3 Dụng cụ cần thiết cho việc phân lập, cấy truyền, làm thuần và giám định các tác nhân nấm và vi khuẩn gây bệnh

Khử trùng mặt bàn và rửa tay trước khi làm việc với bất cứ mẫu cấy sạch nào để giảm nguy cơ lẫn tạp.

13.3.2 Thiết bị cho phòng chuẩn bị

Những thiết bị cần thiết cho phòng chuẩn bị được liệt kê bên dưới và minh họa trong Hình 13.1:

- Một tủ sấy để khử trùng đĩa Petri, đĩa Petri cần được gói trong giấy báo hoặc túi giấy.
- Một nồi hấp nhỏ thích hợp cho khử trùng 1-2 lít môi trường hoặc nước trong bình tam giác hoặc chai Schott. Nồi hấp cũng có thể được dùng để khử trùng môi trường hoặc nước trong ống nghiệm thủy tinh hoặc chai McCartney, pipet và các đồ thủy tinh khác gói trong giấy hoặc giấy nhôm.

- Một nồi áp suất để khử trùng lượng nhỏ môi trường và nước. Có thể mua thiết bị này ở hầu hết các chợ lớn.
- Một cân (độ chính xác đến 0,1 g) để cân hóa chất, khoai tây, cà rốt và những nguyên vật liệu tương tự cho việc chuẩn bị môi trường.
- Một bếp điện để nấu khoai tây và cà rốt dùng cho môi trường.
- Một bàn để chuẩn bị môi trường.
- Một bồn để rửa đĩa Petri và các đồ thủy tinh khác.
- Một tủ đựng.

13.4 Nhà lưới cho việc nghiên cứu bệnh cây

Nhà lưới là một phần quan trọng của phòng thí nghiệm chẩn đoán bởi vì nhà lưới cần cho việc thực hiện quá trình lây bệnh nhân tạo, đánh giá thuốc trừ nấm và các phương pháp phòng trừ bệnh khác. Việc thiết kế cần đảm bảo điều kiện giúp cho cây mọc tốt và ngăn ngừa lẫn tạp giữa các thí nghiệm lây bệnh nhân tạo và các thí nghiệm khác (Hình 13.4).

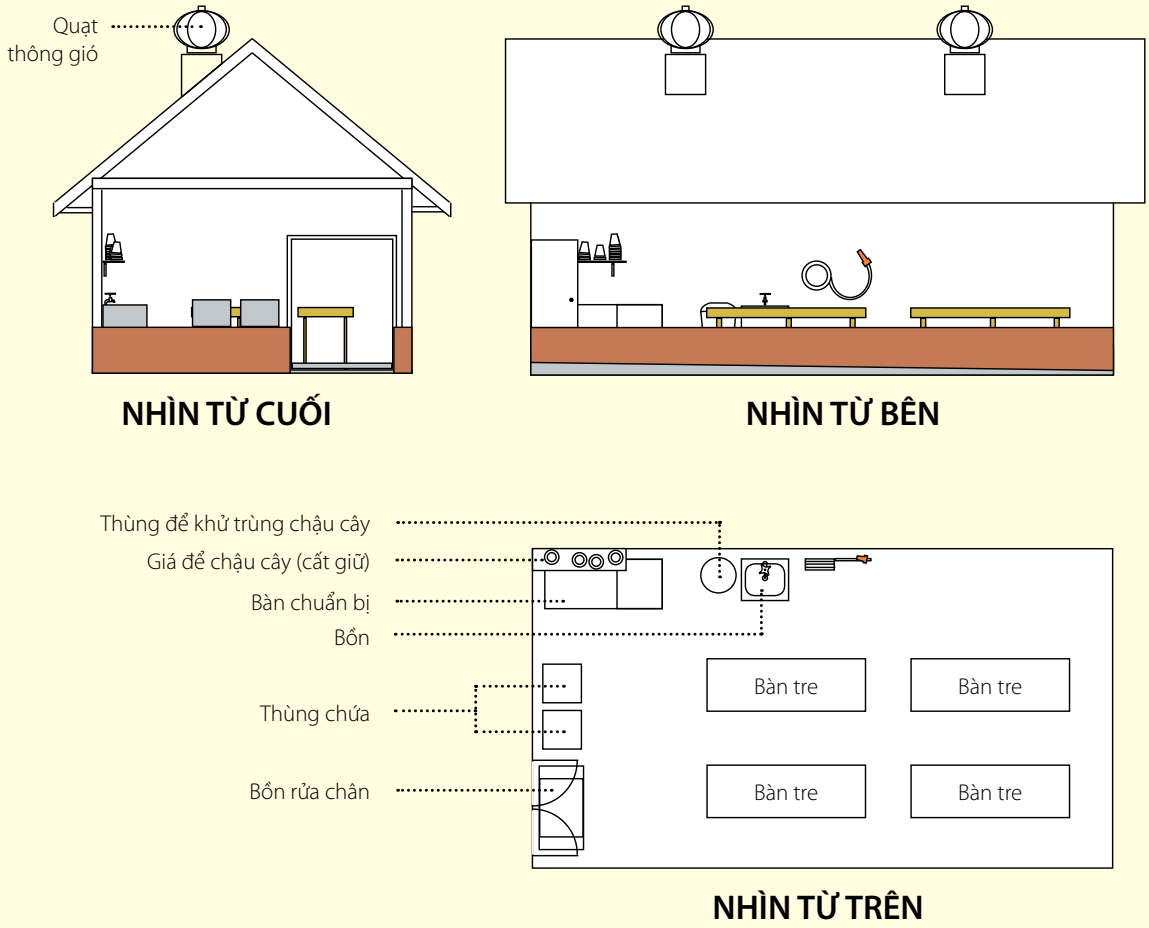
Một nhà lưới cơ bản cần có:

- mái che trong suốt
- sàn xi măng dốc thoát nước tốt
- thoáng khí tốt trong điều kiện trời nóng (quạt cầu thông gió rất hiệu quả) (Hình 13.5)
- thiết kế chống chuột
- nguồn cung cấp nước tốt
- các bàn dài (Hình 13.5)
- một khu vực chuẩn bị bên trong hoặc gần nhà lưới.

Mái trong suốt cho phép ít nhất 75% ánh nắng xuyên qua. Dùng vật liệu polycarbonate làm mái rất tốt vì chống được tia tử ngoại, rất bền và dễ gắn vào khung mái sắt hay gỗ.

Tấm nhựa cũng có thể dùng làm mái nhưng chỉ bền độ 1-2 năm. Mái thủy tinh không thích hợp cho những vùng có bão tố hoặc mưa đá. Tốt nhất là mái được gắn sao cho hiên được kín (tránh bão tố). Lưới che nắng có thể được dùng trong mùa hè để giảm nhiệt độ trong nhà lưới (Hình 13.5).

Một sàn xi măng dốc thoát nước tốt và có thể được giữ sạch bằng vòi xịt nước.



Hình 13.4 Sơ đồ minh họa thiết kế một nhà lưới thích hợp cho việc lây bệnh nhân tạo và các công việc thí nghiệm với tác nhân gây bệnh thực vật.

Hình 13.5 Nhà lưới dùng cho nghiên cứu bệnh cây tại Chi cục BVTV Quảng Nam: (a) hình ảnh tổng quát của nhà lưới với lưới chống côn trùng, (b) lưới che nắng và mái tôn nhựa polycarbonate phẳng với các bộ quạt cầu thông gió

Bốn bên nhà lưới có thể là tường gạch (cao khoảng 1m). Lưới sắt (như lưới B40) hoặc lưới sắt mạ kẽm (lỗ khoảng 1 cm đường kính) có thể gắn giữa các cột, tường gạch thấp và kèo cột đỡ mái. Lưới sắt giúp thông hơi tốt đồng thời ngăn chuột và chim chóc vào nhà lưới. Lưới chống côn trùng tuy tốn kém, nhưng quan trọng vì có thể ngăn côn trùng xâm nhập vào nhà lưới.

Cần một nguồn nước tốt để giữ cho sàn sạch và để cung cấp nước sạch bệnh cho cây. Ống dẫn nước phải được mắc trên tường sao cho đầu vòi tưới không bao giờ chạm sàn.

Có điện thắp sáng và vận hành thiết bị thì rất tiện lợi.

Các bàn thép chống gỉ để đặt các chậu cây nên cao khoảng 1 m và dài khoảng 2-3 m. Độ cao này giảm tối thiểu khả năng bị lẫn tạp từ sàn. Nên có bàn dài loại dễ di chuyển, để có thể di dời dễ dàng khi cần cho các cây cao, cây có thân leo lên giàn hoặc cây ăn quả còn nhỏ trồng trong chậu lớn. Có thể dùng bàn làm bằng tre nhưng phải được xử lý với thuốc trừ nấm để ngăn mốc.

Một cân đĩa 10 kg nên để trong nhà lưới để cân các chậu trồng cây nhằm theo dõi lượng nước trong giá thể trồng.

13.4.1 Khu chuẩn bị

Khu chuẩn bị có thể ở trong nhà lưới hoặc trong khu nhà gần đó. Nên có các giá đựng đồ cao khỏi mặt sàn để chứa các chậu và dụng cụ. Cũng nên có nơi chứa hỗn hợp giá thể hoặc cát, xơ dừa, mùn cưa đã mục hoặc các nguyên liệu sạch bệnh khác để trồng cây phục vụ thí nghiệm lây bệnh nhân tạo. Một bàn cần dùng cho việc chuẩn bị các chậu cây, lây bệnh vào đất và các công việc khác. Mặt bàn cần làm bằng vật liệu dễ khử trùng, như thép không gỉ hoặc đá hoa.

13.4.2 Hỗn hợp giá thể

Giá thể sạch bệnh rất cần thiết cho quá trình lây bệnh nhân tạo và nhiều thí nghiệm khác. Giá thể sạch bệnh cũng cần cho việc sản xuất cây con và giâm hom sạch bệnh trước khi đưa ra trồng ở ruộng thí nghiệm.

Có nhiều loại giá thể. Các đặc tính chính của hỗn hợp giá thể tốt là khả năng giữ nước tốt và dễ thoát nước. Có vài loại hỗn hợp giá thể được sử dụng ở Việt Nam. Vật liệu phổ biến bao gồm mùn cưa mục, xơ dừa, cát, than bùn và phân gà viên. Một số thành phần này có thể chứa tác nhân gây bệnh; cát có thể chứa các tác nhân gây bệnh như *Pythium* và *Phytophthora*. Xơ dừa và mùn cưa thường sạch bệnh.

Đất ruộng thường mang nhiều tác nhân gây bệnh thực vật. Những tác nhân này cần được diệt trừ bằng xông hơi hoặc xử lý nhiệt (khử trùng bằng hỗn hợp hơi nước/không khí ở 60°C trong 30 phút) trước khi đất có thể được dùng cho quá trình lây bệnh nhân tạo. Đất từ đồng ruộng chưa được xử lý không được mang vào nhà lưới bởi vì các tác nhân trong đất có thể làm lẫn tạp nhà lưới.

Hỗn hợp giá thể mùn cưa có thể được làm với mùn cưa, cát và phân gà viên (70:28:2 theo thể tích) và ủ trong 4-6 tháng. Đầu tiên, giá thể trộn này phải nóng tới khoảng 50°C trong thời gian dài để loại trừ bất cứ tác nhân gây bệnh nào tồn tại trong đó. Hỗn hợp giá thể cần được ủ mục trong các thùng lớn. Điều quan trọng là tránh để giá thể tiếp xúc trực tiếp với đất ruộng hoặc cây bệnh. Xơ dừa có thể là một thành phần lý tưởng cho giá thể. Hỗn hợp giá thể cũng có thể được tiệt trùng bằng hỗn hợp hơi nước/không khí nếu chưa được ủ mục.

Có thể trộn hỗn hợp giá thể trong máy trộn xi măng sạch. Hạt phân bón có thể được thêm vào trong khi trộn.

13.4.3 Vệ sinh nhà lưới

Cần có các quy định chặt chẽ đối với cán bộ sử dụng nhà lưới để tránh làm nhiễm tạp các thí nghiệm lây bệnh nhân tạo hoặc các nghiên cứu khác với tác nhân gây bệnh trong đất ruộng. Thiết bị và quy trình cần tuân thủ bao gồm:

- đặt một bồn rửa chân nơi cửa ra vào
- có dép hoặc ủng cao su chỉ để dùng trong nhà lưới
- không mang đất từ đồng ruộng hoặc cây bệnh vào nhà lưới
- loại bỏ cây và đất dùng trong thí nghiệm ngay sau khi thí nghiệm hoàn tất và đốt hủy các cây bệnh
- dùng nước sạch bệnh
- luôn giữ cho đầu vòi nước không chạm sàn nhà
- phun xịt rửa sàn đều đặn
- cán bộ không được vào nhà lưới ngay sau khi thăm ruộng mà phải tắm rửa và thay quần áo sạch trước khi sử dụng nhà lưới
- khử trùng tất cả các chậu với thuốc khử trùng mạnh sau khi dùng trong thí nghiệm, như dung dịch nước Javen 1% trong 24 giờ
- để các chậu đã khử trùng trên giá cao cách xa mặt sàn
- xử lý bàn tre với thuốc trừ nấm chứa đồng.

13.4.4 Quản lý và dinh dưỡng cây

Trồng cây trong chậu cho quá trình lây bệnh nhân tạo và các nghiên cứu khác đòi hỏi việc quản lý cẩn thận vấn đề dinh dưỡng cây.

Các chậu nên có lỗ dưới đáy để thoát nước tốt. Sỏi nhỏ có thể được để dưới đáy chậu để giúp cho việc thoát nước tốt. Mục đích là để tránh nước đọng trong đất nơi rễ phát triển. Cân chậu thường xuyên để duy trì độ ẩm ổn định trong hỗn hợp giá thể và tránh nước đọng. Chỉ nên tưới nước cho giá thể đến ngưỡng "năng lực đồng ruộng".

Cây cần được trồng trong hỗn hợp giá thể sạch bệnh. Việc chọn lựa loại hỗn hợp giá thể tùy thuộc loại cây trồng, nguyên liệu sẵn có và tính chất của thí nghiệm. Cần cung cấp đủ dinh dưỡng cho sự tăng trưởng bình thường của cây. Có thể cần bổ sung thêm phân bón dạng hạt vào giá thể trước khi trồng. Thường thì phân bón lỏng như dung dịch Hoagland's hoặc một sản phẩm thương mại được dùng 1-2 tuần một lần để duy trì sự tăng trưởng bình thường của cây (Hình 13.6). Cần bón thêm phân lỏng đều đặn đặc biệt nếu cây lớn được trồng trong chậu nhỏ trong thời gian dài. Phân N-P-K dạng lỏng đậm đặc và các phân vi lượng dạng lỏng đậm đặc có sẵn ở Việt Nam.

Hình 13.6 Chuẩn bị phân bón thương phẩm để dùng trong nhà lưới

Có thể dùng dung dịch Hoagland's thay thế (xem công thức trong Khung 13.1). Việc này đặc biệt có lợi nếu tình trạng dinh dưỡng cần được giám sát, hoặc các chất dinh dưỡng nào đó được cần được loại bỏ trong thí nghiệm nghiên cứu về dinh dưỡng.

Khung 13.1 Dung dịch Hoagland's

Dung dịch này có tất cả các chất dinh dưỡng cần thiết cho cây phát triển và tăng trưởng. Dung dịch Hoagland's được pha từ một số dung dịch mẹ pha sẵn, trộn với nước trước khi dùng.

Thêm vào mỗi lít nước:

- 5 mL dung dịch nitrat kali
- 5 mL dung dịch nitrat canxi
- 1 mL dung dịch photphat axit kali
- 2 mL dung dịch sunphat magie
- 1 mL dung dịch vi lượng mẹ pha sẵn
- 10 mL dung dịch sắt-EDDHA pha sẵn

Dung dịch mẹ:

- 1 M KNO_3 nitrate kali (khoảng 101 g trong 1 L)
- 1 M $Ca(NO_3)_2.4H_2O$ nitrate canxi (khoảng 236 g trong 1 L)
- 1 M KH_2PO_4 Photphat axit kali (khoảng 136 g trong 1 L)
- 1 M $MgSO_4.7H_2O$ sunphate magie (khoảng 246.5 g trong 1 L).

Dinh dưỡng vi lượng làm sẵn:

- 0.046 M H_3BO_3 axit boric (khoảng 2.86 g trong 1 L)
- 0.009 M $MnCl_2.4H_20$ clorua mangan (khoảng 1.81 g trong 1 L)
- 0.765mM $ZnSO_4.7H_2O$ sunphat kẽm (khoảng 0.22 g trong 1 L)
- 0.320mM $CuSO_4.5H_2O$ sunphat đồng (khoảng 0.08 g trong 1 L)
- 0.111mM $H_2MoO_4.H_2O$ molybdic acid (85%) (khoảng 0.02 g trong 1 L)

Dung dịch sắt-EDDHA pha sẵn

- 10mM $Fe(NO_3)_3$ sắt-EDDHA (khoảng 2.45 g trong 1 L)

Phụ lục 1

Cách làm một que cấy dẹp

Que cấy dẹp là một trong những dụng cụ quan trọng nhất trong phòng thí nghiệm. Một que NiChrome (Nickel và Chromium Alloy, 80:20) đường kính 1 mm, thường dùng để tạo nóng trong máy sấy tóc, là vật liệu thích hợp nhất (Hình A1.1).

1. Cắt một đoạn dài 60mm.
2. Đập dẹp một đầu que tới khoảng ba lần bề ngang của que ban đầu. .
3. Dùng kìm hoặc kéo nặng cắt gọn phần que dẹp thành đầu nhọn.
4. Mài gọn phần đập dẹp.
5. Gắn que vào cán.
6. Hoàn tất que cấy dẹp.

Hình A1.1 Hướng dẫn từng bước làm que cấy dẹp

Phụ lục 2

Sức khỏe và an toàn

Trên đồng ruộng

- Tuân thủ nghiêm ngặt tất cả các quy định về an toàn khi sử dụng thuốc trừ dịch hại, đặc biệt là thuốc trừ sâu. Chỉ dùng các hóa chất đã được đăng ký.
- Rửa tay cẩn thận trước khi ăn, nhất là sau các công việc có dính đất.
- Uống đủ nước vào những ngày nóng bức trên đồng ruộng.
- Cẩn thận với dao rựa để tránh cắt phạm vào chính mình hay người khác.

Trong phòng thí nghiệm

- Kiểm tra các chỉ dẫn an toàn của tất cả các hóa chất trước khi dùng. Có thể tìm thấy các thông tin đó trên bao bì sản phẩm hoặc từ mạng internet. Các công ty hóa chất lớn cung cấp các nối kết với Dữ liệu An toàn Vật liệu tương ứng với sản phẩm của họ.
- Dùng găng tay khi cần.
- Cồn êtyl rất dễ bắt lửa. Đừng lau bàn bằng cồn ở vị trí gần ngọn lửa.
- Giữ một chăn chống lửa trong phòng thí nghiệm để dập tắt cháy quần áo.
- Mang giày trong phòng thí nghiệm để bảo vệ tránh vật nhọn rơi lên chân. Giày kín cũng bảo vệ chân tránh thủy tinh vỡ và hóa chất.
- Không mở nồi hấp trước khi áp suất trong nồi trở lại bình thường (khi đồng hồ chỉ số 0). Luôn dùng găng tay dầy khi lấy bất cứ vật liệu gì từ nồi hấp hoặc tủ sấy.
- Cẩn thận khi mở tủ sấy. Nhiệt độ cao và hơi nước nóng có thể gây bỏng trầm trọng.

Phụ lục 3

Môi trường, khử trùng và bảo quản mẫu vi sinh vật

Phần môi trường bao gồm các công thức cho một số môi trường thông thường.. Có nhiều loại môi trường đã được tạo ra cho một số loài nấm hoặc quy trình thí nghiệm cụ thể. Những loại môi trường này được mô tả trong các tài liệu khoa học, nhất là trong các bài báo đăng các tạp chí khoa học.

Điều quan trọng là hiểu các nguyên tắc cơ bản trong việc khử trùng môi trường, dụng cụ thủy tinh và thiết bị khác bằng nhiệt. Thời gian xử lý cần được điều chỉnh cho phù hợp với số lượng và tính chất của vật liệu được khử trùng. Thời gian xử lý cũng khác nhau đáng kể giữa phương pháp khử trùng nóng ẩm (dùng nồi hấp) và nóng khô (dùng tủ sấy).

Có nhiều kỹ thuật bảo quản để lưu giữ mẫu nuôi cấy nấm. Một số phương pháp thông thường được trình bày trong phần này và nhiều phương pháp khác đã được nêu trong các tài liệu khác.

Có nhiều loại môi trường đã được tạo ra để nuôi cấy nấm. Trong số đó, có nhiều môi trường thích hợp cho việc nuôi cấy hầu hết các loại nấm như môi trường thạch nước cất (WA), môi trường thạch đường khoai tây (PDA). Các môi trường khác, như môi trường chọn lọc *Phytophthora* (PSM) và agar pentachloronitrobenzene peptone (PPA) là những môi trường chọn lọc dùng để phân lập một số nấm nhất định từ cây hoặc đất.

Môi trường tổng hợp, được làm hoàn toàn từ các hợp chất hóa học, có tính đồng nhất do cấu tạo hóa học của chúng là chuẩn. Các môi trường tự nhiên, như PDA hoặc thạch cà rốt khoai tây (PCA), rẻ tiền và tạo điều kiện cho nấm phát triển tốt. Tuy nhiên, các môi trường tự nhiên (làm từ vật liệu tự nhiên, thường là các chất chiết thực vật) thay đổi tùy theo chất chiết từ cây. Nếu dùng môi trường tự nhiên để phân biệt đặc điểm hình thái hoặc tỷ lệ phát triển thì nên dùng cùng một mẻ môi trường cho tất cả các mẫu cấy. Một số môi trường tự nhiên như PDA có hàm lượng hyđrat-cacbon cao, làm cho sợi nấm khí sinh mọc nhanh. Nếu tiếp tục lặp lại việc cấy truyền trên những loại môi trường như vậy có thể làm cho nấm nhanh bị thoái hóa và mất độc tính. Vì vậy, nên dùng môi trường dinh dưỡng thấp để duy trì việc nuôi cấy.

Trong khi khử trùng môi trường, nhớ nới lỏng nắp chai và vặn chặt sau khi đã khử trùng xong. Việc này tránh chai bị nổ trong điều kiện áp suất cao và tránh phải tốn nhiều công lau chùi.

Nên dùng đĩa Petri thủy tinh trong những phòng thí nghiệm chẩn đoán nhỏ tại các vùng nhiệt đới. Kinh nghiệm cho thấy môi trường trong đĩa Petri thủy tinh sẽ ít bị nhiễm tạp bởi các bào tử từ không khí hơn so với môi trường trong đĩa nhựa.

A3.1 Một số nhận xét về thành phần môi trường

Nước

Nước máy phù hợp cho hầu hết các loại môi trường, bởi vì nước máy có chứa các chất vi lượng thường không có trong nước cất. Tuy nhiên, ở một số vùng nước máy có thể chứa độc tố đối với nấm. Một trong những chất đó là đồng có khả năng ức chế đối với nhiều loài nấm. Trong những trường hợp này tốt hơn hết là nên dùng nước cất.

Agar

Agar là chất chiết xuất từ tảo, và chất lượng thay đổi tùy thuộc vào nguồn gốc. Agar có thể ở dạng bột, dạng thỏi hoặc dạng lớp. Nhiều agar bột dễ tan trong khi hấp; các công thức nấu môi trường dưới đây đều sử dụng loại agar này.

Dùng loại agar chất lượng cao để môi trường, ví dụ môi trường thạch nước cất (WA), được trong. Môi trường WA dùng cho việc phân lập, cấy đơn bào tử, cấy đỉnh sinh trưởng sợi nấm và giám định cần phải trong suốt để có thể quan sát được sợi nấm và bào tử dưới kính lúp soi nổi.

Chỉ dùng agar chất lượng thấp cho các môi trường không yêu cầu sự trong suốt, như PDA và PCA. Tuy nhiên nếu có thể tốt nhất không nên dùng agar chất lượng thấp.

Thạch nước cất là môi trường phân lập đa năng hữu hiệu nhất. Không dùng PDA để phân lập nấm từ các bộ phận cây. Chỉ dùng PDA để nuôi cấy cho việc xác định đặc điểm hình thái tản nấm và sự hình thành sắc tố. Dùng các môi trường khác để kích thích việc sinh sản và hình thành bào tử, như mẩu lá hoặc thân, hoặc quả đậu tiệt trùng trong môi trường thạch nước cất. Các môi trường chọn lọc rất hữu dụng cho việc phân lập nấm từ rễ hoặc mô bệnh nặng bị tạp nấm hoại sinh và vi khuẩn.

Chất kháng sinh

Chất kháng sinh có thể được cho vào môi trường phân lập nấm để ngăn ngừa sự phát triển của vi khuẩn hoặc nấm không cần thiết (Bảng A3.1). Hầu hết các chất kháng sinh (ngoại trừ chloramphenicol; xem bên dưới) đều không bền nếu đun nóng do đó chỉ cho chất kháng sinh vào môi trường sau khi hấp khử trùng. Những chất kháng sinh này được hòa tan trong một lượng nhỏ nước cất sạch, tùy theo công thức. Đối với hầu hết các mục đích, chất kháng sinh có thể được thêm trực tiếp vào môi trường, nhưng đối với các thí nghiệm quan trọng, dung dịch kháng sinh cần được lọc tiệt trùng trước khi dùng.

Bảng A3.1 Các chất kháng sinh thông dụng

Chất kháng sinh	Tác dụng kháng	Tính hòa tan
Penicillins	Vi khuẩn Gram dương	Tan trong nước
Streptomycin	Vi khuẩn Gram âm	Tan trong nước
Neomycin	Vi khuẩn Gram dương	Tan trong nước
Chloramphenicol	Vi khuẩn Gram dương và âm	Tan trong Ethanol

Chloramphenicol có thể thêm vào môi trường trước khi khử trùng. Chloramphenicol bị nghi gây ung thư, do đó cũng như tất cả các chất kháng sinh khác cần chú ý khi sử dụng.

Thuốc trừ nấm thường được dùng trong môi trường chọn lọc. Ví dụ loại nấm *Fusarium* có tính chịu tương đối với pentachloronitrobenzene (PCNB; Terrachlor® hoặc Quintozene) và dichloronitroaniline (DCNA; Allisan®) và những thuốc trừ nấm này được thêm vào môi trường chọn lọc cho *Fusarium*.

Rose Bengal được thêm vào một số môi trường dùng để phân lập nấm từ đất. Chất này ngăn cản việc phát triển của tất cả các loại nấm, và được thêm vào môi trường để ức chế các loài nấm mọc nhanh tràn lên các tản nấm của các loài nấm mọc chậm. Tính độc của Rose Bengal được tăng cường khi tiếp xúc với ánh sáng. Các đĩa môi trường Rose Bengal cần được cất giữ và ủ trong điều kiện bóng tối.

Khi thêm vào môi trường, cần hòa tan hoàn toàn lượng chất kháng sinh này trong 10 mL nước tiệt trùng nhằm đảm bảo chất kháng sinh được phân bố đều trong môi trường. Khi cho vào môi trường (ở 55°C) chất kháng sinh cần được trộn vào môi trường bằng cách lắc cẩn thận để tránh tạo ra quá nhiều bọt.

Thường thì có nhiều loại môi trường khác nhau được dùng trong phòng thí nghiệm ở cùng một thời điểm. Do đó, tốt nhất là nên dùng bút mực màu không phai có màu sắc khác nhau đánh dấu ở thành đĩa Petri để dễ dàng phân biệt các loại môi trường khác nhau. Nên có một cách đánh dấu cố định cho mỗi loại môi trường khác nhau và dán trên tường phòng thí nghiệm để tránh nhầm lẫn.

A3.2 Các môi trường tổng quát cho nấm

Thạch nước cất (WA)

WA (2%) gồm 20g agar trong 1 L nước và được dùng làm giá thể cho bào tử nảy mầm trước khi cấy đơn bào tử. Sợi nấm mọc thưa thớt trên môi trường này vì vậy rất thích hợp làm môi trường nền cho việc cấy đỉnh sinh trưởng của sợi nấm để nuôi cấy các tản nấm mới. Việc nấm mọc thưa trên WA cũng thuận lợi cho việc phân lập nấm từ các bộ phận của cây, nhất là rễ.

Để cấy đơn bào tử và cấy đỉnh sinh trưởng của sợi nấm, nên đổ môi trường ra đĩa khi còn khá nóng nhằm làm cho môi trường được giàn mỏng trong đĩa - việc này hạn chế sự phát triển của nấm và giúp cho việc cắt bào tử hoặc đỉnh sợi nấm được dễ hơn.

WA (0,05%), 0,5 g agar trong 1 L nước, dùng để chuẩn bị chuỗi pha loãng đất. Một lượng nhỏ agar làm chậm dần quá trình lắng của các phần tử nấm. Agar được hòa tan trong nước trước khi được chia sang các chai McCartney. Nắp chai được nới lỏng trong khi khử trùng và đóng chặt sau khi hoàn tất khử trùng.

Thạch lá cẩm chướng (CLA) hoặc thạch với các giá thể thực vật tự nhiên khác

CLA là môi trường giá thể tự nhiên (Fisher et al. 1982) được chuẩn bị bằng cách để các miếng lá cẩm chướng tiệt trùng (khoảng 1 mẩu cho mỗi 2 mL thạch) trong một đĩa Petri và sau đó đổ WA 2% đã tiệt trùng vào.

Các miếng lá cẩm chướng được chuẩn bị từ lá tươi không có dư lượng thuốc trừ nấm hoặc thuốc trừ sâu. Ngay sau khi thu thập, lá được cắt thành những mẩu dài 5-8 mm và sấy khô trong tủ sấy có thông gió ở khoảng 70°C trong 3-4 giờ cho đến khi lá giòn. Có thể làm khô trong lò vi sóng. Những miếng lá khô được gói trong giấy nhôm hoặc hộp nhựa polycarbonate và khử trùng bằng phóng xạ gamma (25 kilograys). Các miếng lá đã được khử trùng có thể dự trữ ở 2-5°C tới 12 tháng trước khi dùng.

Nhiều loài nấm sinh bào tử trên môi trường CLA trong vòng 6 đến 10 ngày. Trên môi trường này, hình thái bào tử vô tính đồng nhất hơn so với khi dùng môi trường nhiều hydrat cacbon như PDA. Bào tử lớn của *Fusarium* tạo thành từng khối trên các mẩu lá. Nên sử dụng bào tử lớn hình thành trong các khối bào tử này cho việc giám định, vì chúng có hình dạng và chiều dài ổn định hơn so với bào tử lớn hình thành đơn độc từ cành bào tử phân sinh trên sợi nấm trong môi trường thạch. Bào tử nhỏ thường hình thành chủ yếu trên sợi nấm mọc trên mặt thạch, cách xa các mẩu lá. Cách thức hình thành các bào tử nhỏ, sự hiện diện các chuỗi bào tử nhỏ, và bào tử hậu có thể được xác định bằng cách kiểm tra trực tiếp trên kính hiển vi khi đĩa CLA nhỏ (đường kính 5 cm) được dùng cho việc giám định các mẫu nấm *Fusarium*. CLA cũng thích hợp cho việc sản sinh số lượng lớn bào tử cho các thí nghiệm.

Nhiều bộ phận khác nhau của cây như các mẩu thân lúa xanh và quả đậu có thể thay thế cho lá cẩm chướng. Nếu cần thì khử trùng những mẩu cây này bằng nồi hấp. Bạn nên làm thí nghiệm để tìm ra loại vật liệu nào thích hợp nhất cho phòng thí nghiệm của bạn.

Thạch đường khoai tây (PDA)

PDA là môi trường nhiều hyđrat cacbon có chứa 20 g dextrose, 20 g agar và nước luộc 250 g khoai tây trắng, trong 1 lít nước. Khoai tây không gọt vỏ nhưng rửa sạch và cắt viên trước khi nấu cho vừa mềm. Khoai tây luộc chín được lọc qua vải thưa sao cho có một chút bã khoai tây trong nước luộc.

Bào tử vô tính hình thành trên PDA thường có hình dạng và kích thước không ổn định, và vì vậy ít được sử dụng trong việc giám định. Tuy nhiên, hình thái tản nấm, sự hình thành sắc tố và mức độ phát triển của nhiều loài nấm trên PDA khá ổn định, miễn là môi trường được chuẩn bị cẩn thận và mẫu vi sinh vật được nuôi cấy từ nguồn chuẩn và nuôi trong những điều kiện chuẩn. Đặc điểm của các tản được sử dụng như một đặc điểm phân loại thứ cấp. Mặc dù môi trường PDA được dùng để phân lập một số loài nấm bệnh, nhưng có nhiều loại nấm hoại sinh và vi khuẩn cũng phát triển nhanh trên PDA và có thể ức chế sự phát triển của tác nhân gây bệnh. Không nên dùng môi trường PDA cho việc phân lập, đặc biệt không dùng PDA để phân lập nguồn bệnh từ rễ.

Nên dùng PDA một phần tư độ mạnh cho các mục đích phân lập, có bổ sung kháng sinh khi phân lập từ mô thân hoặc lá.

Spezieller Nährstoffarmer Agar (SNA)

SNA là môi trường thạch nghèo dinh dưỡng, có thể dùng trong việc giám định và bảo quản các nguồn nấm *Fusarium* và *Cylindrocarpon* (Nirenberg 1976). Ngoài việc giúp hạn chế sự thoái hóa của mẫu nấm, môi trường này thúc đẩy sự hình thành bào tử nhỏ đồng đều. SNA được chuẩn bị bằng cách hấp khử trùng, trong 1L nước cất:

Agar	20 g
KH_2PO_4	1 g
KNO_3	1 g
$MgSO_4.7H_2O$	0.5 g
KCl	0.5 g
Glucose	0.2 g
Sucrose	0.2 g

Đặt 2 mẩu giấy lọc đã khử trùng (1 cm vuông) lên trên mặt thạch sau khi đông, giúp thúc đẩy việc hình thành bào tử.

Vì SNA trong suốt, nên có thể dễ dàng quan sát mẫu nuôi cấy trực tiếp dưới kính hiển vi hoặc có thể đặt một mẫu nhỏ môi trường có chứa nấm vào trên lam kính, nhỏ một giọt nước, đậy lamen lại và quan sát dưới kính hiển vi. Môi trường SNA lỏng (không có agar) được dùng để nuôi cấy sinh khối sợi nấm cho việc tách DNA.

Thạch cà rốt khoai tây (PCA)

Cà rốt nghiền nhừ	20 g
Khoai tây nghiền nhừ	20 g (khoai tây gọt vỏ)
Agar	20 g

Gọt vỏ và cắt khoai tây, cà rốt thành những mẩu nhỏ. Bỏ vào trong một cốc đong có khoảng 200 mL nước cất và đun sôi nhỏ lửa trong 30 phút. Sau đó nghiền hai thứ qua một rây mịn hoặc xay nhuyễn. Thêm agar và nước cất cho đủ 1L. Lắc đều rồi hấp. Khi đổ môi trường nên lắc thường xuyên để cho cà rốt/khoai tây được trộn đều trong môi trường.

Cà rốt nhuyễn có nhiều sterol, cần thiết cho việc hình thành thể cái ở các loài nấm trứng. PCA là một môi trường quan trọng kích thích việc hình thành thể cái ở *Pythium* và *Phytophthora*.

A3.3 Môi trường chọn lọc nấm

Môi trường chọn lọc *Phytophthora* (PSM)

Công thức này có cả penicillin và ban đầu đã được TS. Nguyễn Vĩnh Trường gợi ý các tác giả dùng ở Việt Nam.

Agar	8 g
Cà rốt nghiền nhuyễn	20 mL (công thức bên dưới)
Khoai tây nghiền nhuyễn	80 mL (công thức bên dưới)

Đổ đầy thành 1 L bằng nước cất, hấp và khi nguội xuống 55°C, thêm:

Hymexazol	3.7 mL dung dịch trong nước:
Pimaricin	400 µL
Penicillin	200 mg

Bọc các đĩa môi trường bằng giấy nylon và cất trong tủ lạnh tránh tiếp xúc với ánh sáng. Loại bỏ môi trường sau một tháng. Đối với môi trường chọn lọc cho cả *Phytophthora* và *Pythium*, không sử dụng Hymexazol.

Cà rốt nghiền nhuyễn

Rửa, cắt viên 400 g cà rốt và hấp 10 phút trong 400 mL nước cất. Nghiền nhuyễn rồi thêm 500 mL nước. Có thể chia ra trong hộp nhựa và để ngăn đá đến khi cần dùng.

Khoai tây nghiền nhuyễn

Cắt viên 200 g khoai tây và đun trong 500 mL nước máy cho đến khi mềm. Nghiền nhuyễn và thêm nước cho đủ 800 mL. Cất giữ như trên.

Dung dịch mẹ Hymexazol

Cho 0,3 g hymexazol nguyên chất vào 20 mL nước tiệt trùng.

Pimaricin

Pimaricin có thể được trực tiếp thêm vào agar lỏng. Lắc đều trước khi dùng. Gói bằng giấy nhôm và dự trữ trong tủ lạnh.

Peptone PCNB Agar (PPA / môi trường Nash-Snyder)

PPA gồm có môi trường nền cộng thêm chất kháng sinh và thuốc trừ nấm, có thể dùng để phân lập chọn lọc các loài *Fusarium* từ đất pha loãng (Nash và Snyder 1962) hoặc từ các bộ phận cây. Môi trường này có khả năng ức chế hầu hết vi khuẩn và các loài nấm khác nhưng cho phép *Fusarium* mọc chậm, tạo thành các tản nấm nhỏ đường kính 5-10 mm sau 5-7 ngày.

Môi trường nền trong 1 L nước:

Agar	20 g
Peptone	15 g
KH_2PO_4	1 g
$MgSO_4.7H_20$	0,5 g
Terrachlor®	1 g (chứa PCNB 75% w/w)

Hấp môi trường nền và để nguội xuống 55°C trước khi thêm vào 10 mL nước vô trùng chứa:

Streptomycin sulfate	1 g
Neomycin sulfate	0,12 g

Các đĩa môi trường đã chuẩn bị cần được 'để khô' trong chỗ tối và mát trước khi dùng sao cho phần nước trong dung dịch đất được thấm nhanh. Hầu hết các loài *Fusarium* không hình thành các tản nấm đặc trưng trên PPA; việc hình thành bào tử kém và hình thái bào tử vô tính không bình thường. Các tản nấm phải được cấy truyền và làm thuần cho việc giám định. Không nên duy trì mẫu *Fusarium* trên PPA bởi vì sự chuyển hóa của peptone dẫn đến việc tích tụ chất ammoniac độc.

PDA một phần tư độ mạnh có bổ sung kháng sinh.

Môi trường này được thiết kế chủ yếu là để phân lập các loài *Fusarium* từ mô cây, như thân cây bị nhiễm nấm *F. oxysporum* gây héo. Môi trường này cũng có thể được dùng cho một loạt các tác nhân khác, nhưng nên thử trước khi dùng cho một thí nghiệm quan trọng. PDA là một môi trường hữu dụng trong việc nghiên cứu chẩn đoán.

Không dùng môi trường này để phân lập *Fusarium* hoặc các loài nấm khác từ đất.

Trong 1 L nước, trộn:

Chất chiết từ khoai tây	Nước lọc từ 62,5 g khoai tây nấu
Agar	20 g
Dextrose	5 g
PCNB (Terrachlor®)	0.,1 g

Hấp môi trường nền và để nguội xuống 55°C trước khi thêm, trong 10 mL nước sạch:

Streptomycin sulfate	0,16 g
Neomycin sulfate	0,06 g

Dichloran chloramphenicol peptone agar (DCPA)

DCPA được dùng cho việc phân lập chọn lọc các loài *Fusarium* và dematiaceous hyphomycetes từ hạt ngũ cốc (Andrews và Pitt 1986). Môi trường nền, trong 1 L nước cất, chứa:

Agar	20 g
Peptone	15 g
K_2HPO_4	1 g
$MgSO_4.7H_2O$	0,5 g
Chloramphenicol	0,2 g (chất kháng sinh phổ rộng - có thể hấp)

Sau khi hấp, thêm, trong 10 mL ethanol:

Dichloran	0,002 g

Không nên dùng DCPA làm môi trường duy trì nấm bởi vì sự chuyển hóa của peptone dẫn đến việc tích tụ amoniac tới mức độ độc. Dichloran ngăn cản sự phát triển của nấm mucoraceous, và việc thiếu nguồn hyđrat cacbon trong môi trường cản trở sự phát triển của *Aspergillus* và *Penicillium*.

Môi trường lá lúa (hoặc lá cỏ) cho *Pythium*

Môi trường này hữu ích cho việc kích thích và quan sát sự hình thành bọc bào tử và thể cái ở nhiều loài *Pythium*. Bọc bào tử và thể cái hình thành từ sợi nấm mọc trên mặt nước gần các miếng lá. Môi trường này có thể được chuẩn bị bằng cách thả nổi các miếng lá lúa hay cỏ đã tiệt trùng trong đĩa Petri có nước:

1. Cắt lá lúa thành những mẩu dài 3cm.
2. Hấp và đặt 4-5 mẩu trong đĩa Petri lớn chứa 15 mL nước đã khử trùng.
3. Cấy một mẩu thạch chứa nguồn nấm vào môi trường.

Nấm sẽ phát triển trên các miếng lá, và sợi nấm sẽ mọc trên mặt nước. Để cố định nấm cho việc quan sát bằng kính hiển vi:

1. Đặt một miếng lamen dưới mặt nước.
2. Cẩn thận tách một chút sợi nấm và kéo lên trên lamen.
3. Lấy lamen ra khỏi môi trường, lật sấp, và đặt lên trên một lam kính có nhỏ sẵn một giọt nước.

A3.4 Môi trường dùng cho vi khuẩn

Môi trường King's B (KBM)

Agar	15 g
Proteose peptone số 3	20 g
Glycerol, C.P.	10 mL
K_2HPO_4	1,5 g
$MgSO_4$	1,5 g
Nước cất	1L

Trộn chung tất cả các thành phần ngoại trừ $MgSO_4$. Chỉnh độ pH tới 7,2± 0,2. Từ từ thêm $MgSO_4$ và lắc đều. Hấp và đổ vào đĩa Petri 90 mm.

Sucrose peptone agar (SPA)

Đường Sucrose	20 g
Peptone	5 g
K_2HPO_4	0,5 g
$MgSO_4.7H_2O$	0,25 g
Agar	20 g
Nước cất	1 L

Trộn chung tất cả các thành phần. Chỉnh độ pH tới 7,2± 0,2. Hấp và đổ vào đĩa Petri 90 mm.

Môi trường Tetrazolium

Môi trường này (Kelman 1954) có thể được dùng để phân biệt giữa các tản nấm của loài *Ralstonia solanacearum* đột biến và nguyên chủng. Dạng đột biến thường hình thành các khuẩn lạc đỏ đậm, tròn với viền hẹp màu hơi xanh. Khuẩn lạc loại nguyên chủng có hình tròn khác thường, màu trắng, trông như dạng lỏng với trung tâm màu hồng.

Peptone	10 g
Casein hydrolysate	1 g
Glucose	5 g
Agar	17 g
Triphenyl tetrazolium chloride	0,05 g
Nước cất	1 L

Trộn chung tất cả các thành phần. Hấp và đổ vào đĩa Petri 90 mm.

A3.5 Khử trùng

Khử trùng là quá trình tiêu diệt tất cả các vi sinh vật trong môi trường nuôi cấy hoặc trên bề mặt dụng cụ thủy tinh dùng trong các công việc cần vô trùng, như các đĩa Petri thủy tinh.

Khử trùng bằng nhiệt

Nhiệt độ và thời gian cần thiết để tiêu diệt vi sinh vật tỷ lệ nghịch với nhau. Bảng A3.2 cho thấy thời gian tối thiểu cần cho khử trùng hiệu quả ở các mức nhiệt độ cho cả hai loại nóng ẩm và nóng khô:

Bảng A3.2 Thời gian cần cho việc khử trùng nóng ẩm và nóng khô ở các mức nhiệt độ khác nhau

Nhiệt độ	Nóng ẩm	Nóng khô
100 °C	20 giờ	
110 °C	2,5 giờ	
121 °C	15 phút	8,0 giờ
130 °C	2,5 phút	
140 °C		2,5 giờ

Những thời gian này không bảo đảm tiệt trùng hoàn toàn. Đó là những mức thời gian được tính toán dựa trên kinh nghiệm và mức độ lẫn tạp bình thường của các vi sinh vật chịu nhiệt.

Loài, chủng và khả năng hình thành bào tử của vi sinh vật ảnh hưởng rất lớn đến tính mẫn cảm của vi sinh vật đối với nhiệt. Trong điều kiện khử trùng bằng nồi hấp, các dạng sinh trưởng sinh dưỡng của hầu hết các loại vi khuẩn, nấm men, nấm và hầu hết các virút gây bệnh động vật bị tiêu diệt trong khoảng nhiệt độ từ 50°C đến 60°C trong 10 phút. Tuy nhiên các bào tử vi khuẩn cần 15 phút ở nhiệt độ từ 100°C đến 121°C. Trong điều kiện nóng khô các bào tử vi khuẩn cần 1 giờ ở 160°C.

Tính chất của vật liệu trong đó vi sinh vật được khử trùng bằng nhiệt cũng là một yếu tố quan trọng. Hàm lượng các chất hữu cơ cao thường có khuynh hướng bảo vệ bào tử và các vi sinh vật sinh dưỡng chống lại tác động của nhiệt độ. Chất đạm, gelatin, đường, tinh bột, axít nuclêic, mỡ và dầu đều tác động cách này. Tác động của mỡ và dầu mạnh nhất trong điều kiện nóng ẩm bởi vì các chất này ngăn không cho hơi ẩm tiếp xúc với vi trùng. Độ pH cũng rất quan trọng. Sự chịu nhiệt của bào tử vi khuẩn cao nhất ở pH trung tính và giảm khi tăng độ axít hoặc độ kiềm.

Khử trùng nóng khô

Điều kiện nóng khô tiêu diệt vi trùng bằng quá trình oxi hóa. Quá trình nhiệt khô là phương pháp tốt nhất để khử trùng đồ thủy tinh khô như ống nghiệm, đĩa Petri thủy tinh, bình tam giác, pipet, tất cả các ống tiêm thủy tinh và dụng cụ như kẹp, dao mổ và kéo.

Đồ thủy tinh cần được gói lại sao cho hơi nóng đi vào được mọi chỗ cần sấy. Quá trình này được hỗ trợ bằng hệ thống quạt trong tủ sấy. Thời gian cần cho khử trùng là 160°C trong 1 giờ. Tuy nhiên hầu hết các tủ sấy, nhất là khi để nhiều, cần 2 đến 3 giờ mới đạt nhiệt độ. Như vậy 4 giờ ở 160°C là tối thiểu cho một lô dụng cụ lớn. Bốn tiếng đồng hồ ở 170°C là ranh giới an toàn.

Không được mở tủ sấy trong thời gian sấy bởi vì mở cửa trong vài giây có thể khiến nhiệt độ giảm tới 70°C, mà phải cần cả giờ sau đó để tủ sấy trở lại nhiệt độ mong muốn. Việc này sẽ làm cho lô dụng cụ đó không được khử trùng.

Khử trùng nóng ẩm

Nóng ẩm tiêu diệt vi sinh vật, có thể qua việc làm đông và làm biến tính enzym và protêin cấu trúc của chúng, một quá trình cần có nước. Vì vậy tất cả các môi trường nuôi cấy được khử trùng nóng ẩm bằng cách dùng nồi hấp.

Hấp ở nhiệt độ trên 100°C là phương pháp đáng tin cậy nhất và được sử dụng rộng rãi nhất trong việc khử trùng các môi trường nuôi cấy. Hầu hết các nồi hấp và nồi áp suất hoạt động ở 121°C, ở nhiệt độ này thời gian tối thiểu cho việc khử trùng là 15 phút. Việc quan trọng là tất cả không khí phải thoát ra khỏi nồi hấp, nếu không nồi hấp sẽ không đạt được đúng nhiệt độ. Nhiều nồi hấp lớn thực hiện việc này một cách tự động.

Nếu dùng nồi áp suất hoặc nồi hấp không tự động, để hơi nước xì ra ở van thoát hơi khoảng 2-3 phút trước khi đóng van hoặc vặn nắp. Phải dùng rổ thay vì hộp và không được hấp pipet trong hộp đựng bởi vì các túi không khí bên trong khiến việc khử trùng mất hiệu lực. Nhiệt độ chứ KHÔNG PHẢI áp suất là tiêu chí thực sự quyết định sự thành công của quá trình khử trùng.

Nồi hấp phải được chỉnh sao cho áp suất không giảm quá nhanh bởi vì sẽ dẫn đến hiện tượng môi trường sôi tràn và làm ướt nắp đậy. Môi trường cần để yên trong nồi khoảng 5 phút sau khi nồi trở lại áp suất không khí, bởi vì đôi khi các dung dịch còn ở trong tình trạng quá nóng và có thể bắn môi trường hoặc agar đang sôi lên người, gây ra bỏng. Nếu để trong nồi hấp quá lâu, sẽ mất bớt thể tích do chân không tích tụ trong nồi hấp.

Không nên hấp những bình chứa môi trường lớn nhỏ khác nhau cùng một mẻ bởi vì các lượng lớn cần nhiều thời gian hơn để đạt được nhiệt độ cần thiết, như vậy sẽ làm cho các lượng nhỏ nhận quá nhiều nhiệt. Bảng A3.3 đưa ra chỉ dẫn về thời gian cần thêm để đạt nhiệt độ mong muốn:

Bảng A3.3 Thời gian khuyến cáo để khử trùng các lượng dung dịch khác nhau

Thể tích dung dịch	Thời gian thêm (phút)	Tổng cộng thời gian ở 121°C (phút)
chai 100 mL	10	25
chai 250 mL	12	27
chai 500 mL	18	33
chai 1000 mL	22	37
chai 2000 mL	27	42

Khử trùng dụng cụ

Kẹp, que cấy và các dụng cụ khác phải được khử trùng trước khi tiếp xúc với mẫu cấy nhằm tránh lẫn tạp. Que cấy được khử trùng tốt nhất bằng cách hơ cho nóng đỏ trên ngọn lửa.

Phải để que cho nguội xuống nhiệt độ phòng trước khi dùng. Que cấy nóng là nguyên nhân phổ biến làm cho việc cấy truyền, cấy đỉnh sợi nấm và cấy đơn bào tử bị thất bại.

Kẹp và dao được khử trùng bằng cách nhúng vào cồn. Trước khi dùng, đốt sạch cồn bằng cách hơ qua ngọn lửa để cồn bốc cháy. Đừng giữ dụng cụ trên ngọn lửa vì sẽ làm cho dụng cụ quá nóng. Cẩn thận không đặt các dụng cụ nóng hoặc hơ lửa dung cụ trong hoặc gần cồn vì có thể gây hỏa hoạn.

Khử trùng bề mặt nơi làm việc

Khay, bàn và các bề mặt khác có thể được khử trùng với dung dịch khử trùng. Cồn là dung dịch thường được dùng nhất. Cồn pha nước là chất khử trùng tốt nhất, thích hợp nhất là cồn 70%. Cồn mêthyl cũng có thể sử dụng để khử trùng.

A3.6 Bảo quản mẫu cấy

Bảo quản mẫu vi sinh vật sống

Mẫu vi sinh vật sống được lưu giữ dùng làm mẫu tham khảo, hoặc để sau này dùng trong quá trình lây bệnh nhân tạo hoặc các thí nghiệm khác. Các mẫu vi sinh vật lưu trữ trong bộ sưu tập mẫu vi sinh vật quốc gia là một phần các vật liệu tham khảo nhằm hỗ trợ cơ sở dữ liệu quốc gia về tác nhân gây bệnh cây.

Bảo quản trong nước cất—*Pythium* và *Phytophthora*

Đây là một phương pháp đơn giản và ít tốn kém đặc biệt thích hợp cho *Pythium* và *Phytophthora*. Nên sử dụng tủ cấy vô trùng để thực hiện quy trình giữ mẫu này. Cắt các mẩu thạch vuông 1 cm từ viền của một tản nấm mọc mạnh và còn mới. Đặt những miếng thạch có chứa nấm này vào trong một lọ McCartney có chứa nước vô trùng và vặn chặt nắp. Lọ bảo quản được để nơi mát. Không bảo quản trong tủ lạnh bởi vì một số loài bị chết ở nhiệt độ thấp. Các mẫu có thể được cất giữ từ 6 tháng đến 2 năm, tùy theo loài. Các mẫu được hồi phục bằng cách lấy một miếng thạch từ lọ và cấy lên môi trường mới sao cho mặt có nấm tiếp xúc với bề mặt môi trường. Cần đảm bảo là nước và các miếng thạch không bị tạp vi khuẩn—sự có mặt của vi khuẩn sẽ làm cho nấm chết nhanh chóng.

Bảo quản hạch nấm

Hạch nấm có thể được lưu giữ trong thời gian dài ở điều kiện khô mát trong một lọ thủy tinh nhỏ có nắp vặn. Đây là kỹ thuật thích hợp để lưu giữ các loài như *Sclerotium rolfsii, Sclerotinia sclerotiorum, Rhizoctonia* spp. (các loài tạo hạch nấm).

Tại các vùng nhiệt đới thì tốt nhất nên lưu giữ hạch nấm trên giấy thấm tiệt trùng đặt bên trên silica gel màu xanh trong lọ McCartney (hoặc lọ có nắp vặn tương tự) để đảm bảo ẩm độ thấp trong quá trình bảo quản.

Bảo quản các mẩu thân hoặc lá bị bệnh.

Các mẫu vi sinh vật được nuôi cấy trên WA tiệt trùng có chứa các mẩu mô cây hoặc hạt tiệt trùng. Các mẩu mô thực vật có chứa vi sinh vật được làm khô rồi cất giữ trong các ống thủy tinh nhỏ. Một cách khác, các mẫu này có thể được bảo quản trong lọ kín trên giấy thấm vô trùng đặt bên trên lớp silica gel màu xanh để đảm bảo điều kiện bảo quản luôn khô.

Để có thông tin sâu rộng hơn về việc bảo quản các mẫu vi sinh vật, tham khảo Shivas and Beasley (2005), Quản lý mẫu bệnh thực vật.

Làm đông khô

Làm đông khô là phương pháp chọn lựa cho quá trình bảo quản lâu dài nhiều loại nấm và thường được dùng ở hầu hết các nơi quan trọng lưu giữ mẫu vi sinh vật. Điều trở ngại chính là cần có các thiết bị chuyên môn tốn kém. Phương pháp này thích hợp nhất cho những loài nấm mọc và sinh bào tử tốt trên mô cây tiệt trùng như các mẩu thân lúa xanh hoặc mẩu lá cẩm chướng. Cũng có nhiều loài nấm không thể bảo quản bằng phương pháp đông khô, như nấm trứng, gỉ sắt và sương mai.

Các mẫu nuôi cấy được làm đông khô bằng cách làm khô các miếng lá hoặc thân có chứa mẫu vi sinh vật trong các ống thuỷ tinh nhỏ trong điều kiện chân không cao (10^{-1} đến 10^{-2} Torr). Các ống thủy tinh được nút bằng một miếng bông gòn nhỏ và hấp trong một cốc đong đậy nắp sơ. Lấy năm mẩu lá hoặc thân từ mẫu nuôi cấy (sau hai tuần nuôi cấy từ đơn bào tử), và dùng dụng cụ vô trùng chuyển sang ống thủy tinh. Ống được đóng lại sau khi đã cho nhãn vào trong lọ, sau đó dùng đèn hàn hơ lửa và kéo dài ống ra thành hình dạng như đồng hồ cát. Ống được gắn vào máy đông khô và vận hành máy trong 12-24 giờ, rồi hàn kín dưới điều kiện chân không cao và bảo quản ở nhiệt độ thường hoặc ở 5°C. Nhiều loài *Fusarium* và các chi nấm khác đã được làm đông khô thành công với kỹ thuật này và được bảo quản trong nhiều năm.

Các mẫu vi sinh vật này có thể được hồi phục bằng cách cấy các mẩu lá hoặc thân đã làm đông khô lên một môi trường thích hợp. Ống thủy tinh chứa mẫu bảo quản phải được khử trùng bề mặt trước khi đập vỡ để lấy các mẩu lá.

Các phương pháp bảo quản mẫu vi sinh vật sống khác

Để bảo quản được lâu, các mẫu vi sinh vật cũng có thể được lưu giữ dưới dạng dung dịch bào tử trong glycerol ở -80°C. Nhiều loài cũng có thể được lưu giữ thành công trong nitơ lỏng. Tuy nhiên, những phương pháp này rất tốn kém.

Bảo quản mẫu nấm cho mục đích duy trì dữ liệu tiêu bản mẫu

Các mẫu gốc nuôi cấy trên môi trường PDA phải được nộp đến một trung tâm lưu giữ tiêu bản mẫu được thế giới công nhận khi việc mô tả chính thức một loài mới được công bố.

Các mẫu được nuôi cấy từ đơn bào tử nảy mầm và phát triển trong điều kiện nhiệt độ và ánh sáng bình thường từ 2 đến 3 tuần. Mẫu nuôi cấy sau đó được xử lý chết bằng cách để đĩa tiếp xúc với dung dịch formalin trong một hộp kín trong 3 ngày. Mẫu sau đó được bảo quản bằng cách dùng agar và glycerine. Ba gram agar hòa tan trong 147 mL nước, sau đó được chia thành những phần 6 mL bỏ trong ống nghiệm trước khi hấp. Lật ngược nắp đĩa mẫu nuôi cấy, cho 1,5-1,75 mL glycerine và 6 mL thạch nóng lên trên glycerine. Dùng dụng cụ vô trùng nhấc mẫu nuôi cấy

từ đĩa Petri lên và đặt lên trên hỗn hợp ở nắp đĩa. Các mẫu nuôi cấy sau đó được để cho khô trong ngăn kéo 3-5 ngày, che bằng một mảnh giấy. Khi khô, mẫu dẻo như cao su và có thể lấy ra khỏi đĩa Petri để lưu trữ. Quy trình này đầu tiên được phát triển để bảo quản các loài *Fusarium* ở Trung tâm Nghiên cứu *Fusarium*, Đại học Bang Pennsylvania. Quy trình này cũng phù hợp với nhiều loại nấm.

Bảo quản nấm trong dầu khoáng

Nhiều mẫu nấm có thể được bảo quản trong dầu khoáng (paraffin) tới 4-5 năm ở 15-20°C. Các mẫu nên được nuôi cấy trên môi trường PDA có thêm 0,1% yeast extract (như Vegemite®). Dầu khoáng được chuẩn bị như sau:

1. Đổ 11 mL dầu paraffin vào chai McCartney 25 mL không có nắp cao su.
2. Đậy nắp lỏng và hấp khử trùng ở 121°C trong 20 phút.
3. Để cho hoàn toàn nguội trong nồi hấp.
4. Lấy nước khỏi dầu nếu có, bằng cách làm nóng trong tủ sấy ở 120°C trong 8 giờ và để nguội dần trong tủ sấy qua đêm xuống nhiệt độ thường. Loại bỏ bất cứ lọ nào có dầu vẩn đục hoặc thực hiện lại quá trình làm nóng trong tủ sấy.

Các mẫu nấm cần được nuôi cấy trên mặt nghiêng môi trường PDA có thêm yeast extract trong lọ McCartney 25mL (không có nắp cao su) cho đến khi nấm mọc bao phủ toàn bộ bề mặt môi trường. Để bảo quản mẫu nuôi cấy, dùng dụng cụ vô trùng thêm 11 mL dầu thô đã khử trùng vào từng mẫu trong trong tủ cấy vô trùng. Ghi nhãn cẩn thận với số mẫu và ngày cất giữ

Các mẫu vi sinh vật có thể được cấy lại như sau:

1. Dùng dụng cụ tiệt trùng lấy một miếng thạch nhỏ từ mẫu bảo quản. .
2. Thấm dầu với giấy lọc hoặc giấy thấm tiệt trùng.
3. Cấy mẩu thạch lên một môi trường thích hợp.

Ghi chú: Mỗi lần nên bảo quản ba mẫu từ mỗi nguồn nấm, và mẫu bảo quản trong dầu thô cần được thay thế sau 4-5 năm.

Các tác giả chân thành cảm ơn N.J. Cother và M.J. Priest qua những đóng góp về mặt kỹ thuật này của họ.

Tài liệu tham khảo

Andrews S. and Pitt J.I. 1986. Selective medium for isolation of *Fusarium* species and dematiaceous hyphomycetes from cereals. Applied Environmental Microbiology 51(6), 1235–1238.

Fisher N.L., Burgess L.W., Toussoun T.A. and Nelson P.E. 1982. Carnation leaves used as a substrate and for the preservation of cultures of *Fusarium* species. Phytopathology 72, 151–153.

Kelman A. 1954. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on tetrazolium medium. Phytopathology 44, 693–694.

Nash S.M. and Snyder W.C. 1962. Quantitative estimations by plate counts of propagules of the bean root rot *Fusarium* in field soils. Phytopathology 52, 567–572.

Nirenberg H.I. 1976. Untersuchungen uber die morphologische und biologische differenzierung der Fusarium section liseola. *Mitt Biol Bundesanst Land.* Forstw Berlin-Dahlem.

Shivas R. and Beasley D. 2005. Management of plant pathogen collections. Australian Government Department of Agriculture, Fisheries and Forestry. At: <http://www.daff.gov.au/planthealth>.

Các chữ viết tắt

ACIAR	Trung tâm Nghiên cứu Nông nghiệp Quốc tế Australia
ATSE	Viện Khoa học Kỹ thuật và Công nghệ
CFU	đơn vị tạo tản nấm
CLA	thạch lá cẩm chướng
DCNA	Dichloronitroaniline
DCPA	dichloran chloramphenicol peptone agar
DNA	axít deoxyribonucleic
DON	Deoxynivalenol
EDDHA	axít ethylmediamine-di-o-hydroxyphenylacetic
IDM	quản lý bệnh hại tổng hợp
KBM	môi trường King's B
PCA	thạch cà rốt khoai tây
PCNB	pentachloronitrobenzene
PDA	thạch đường khoai tây
PPA	peptone PCNB agar (môi trường Nash-Snyder)
PPSD	Chi cục Bảo vệ thực vật
PSM	môi trường chọn lọc Phytophthora
RNA	axít ribonucleic
SNA	Spezieller Nährstoffarmer agar
SPA	sucrose peptone agar
UV	tử ngoại
WA	thạch nước cất

Chú giải thuật ngữ

Đĩa cành
Cấu trúc sinh sản vô tính hình đĩa sản sinh các bào tử vô tính.

Túi đực (thể đực)
Bộ phận sinh dục 'đực' tìm thấy ở một số loài nấm.

Chất kháng sinh
Một hợp chất hóa học, tổng hợp tự nhiên hoặc nhân tạo có khả năng ngăn chặn hoặc tiêu diệt một số vi sinh vật cụ thể nào đó.

Bào tử túi
Bảo tử sinh sản hữu tính hình thành trong túi bào tử ở nấm túi.

Nấm túi
Một lớp nấm thực sản sinh bào tử túi hữu tính bên trong các túi bào tử.

Túi bào tử
Thể hình túi trong đó bào tử túi được hình thành.

Không triệu chứng
Không hình thành triệu chứng.

Nấm đảm
Lớp nấm sinh sản hữu tính tạo bào tử đảm trên đảm bào tử.

Đảm
Thể hình chùy trên đó bào tử đảm hình thành.

Cháy
Một loại bệnh cây có triệu chứng là mô cây chết rất nhanh.

Bào tử hậu
Bào tử dạng bảo tồn có vách dày, hình thành qua quá trình sinh sản vô tính.

Hình thành và tạo tản nấm
Một quá trình tản nấm hình thành và phát triển trên giá thể.

Cành bào tử phân sinh
Sợi nấm chuyên biệt trên đó bào tử nấm vô tính hình thành.

Bào tử nấm vô tính
Bào tử nấm được hình thành qua quá trình sinh sản vô tính.

Giống trồng trọt
Một giống cây trồng được tạo ra bằng cách lai giống chọn lọc.

Chết ẻo (chết rạp)
Thối ở bộ phận cây tiếp giáp với mặt đất, khiến cho cây con gẫy rạp và chết nhanh. Thường liên quan với độ ẩm quá cao trong đất.

Nấm bất toàn

Một nhóm lớn và hỗn tạp gồm có các nấm thực mà mà giai đoạn sinh sản hữu tính không được biết đến.

Chẩn đoán

Đặc tính có thể được dùng để phân biệt một sinh vật với các sinh vật khác.

Chu kỳ bệnh

Một chuỗi các sự kiện theo chu kỳ liên quan đến sự sống của một tác nhân gây bệnh, bao gồm các giai đoạn gây nhiễm, phát triển, sinh sản và bảo tồn.

Sinh vật có nhân điển hình

Một sinh vật mà trong nhân chứa vật liệu di truyền (DNA).

Thuốc trừ nấm

Một hợp chất hóa học gây độc cho nấm.

Dạng loài

Một dạng sinh học chuyên tính của một tác nhân gây bệnh chỉ có thể gây nhiễm một chi hoặc một loài thực vật.

Giao tử

Một tế bào sinh sản chứa một nửa lượng vật liệu di truyền cần thiết cho quá trình sinh sản.

Nấm dị tản

Nấm cần hai cá thể để có thể tiến hành quá trình sinh sản hữu tính, mỗi cá thể có một giao tử 'đực' hoặc một giao tử 'cái'.

Nấm đồng tản

Một cá thể nấm có thể sản sinh cả hai giao tử 'đực' và 'cái' cho việc sinh sản hữu tính.

Sợi nấm

Một tế bào xôma dạng sợi do nấm tạo ra.

Sự xâm nhiễm

Sự xâm nhập của vi sinh vật ký sinh vào trong ký chủ.

Bị lây nhiễm

Một cây hoặc một bộ phận cụ thể bị tác động bởi số lượng lớn các vi sinh vật ký sinh.

Lây bệnh

Quá trình lây nhân tạo một tác nhân gây bệnh cho một ký chủ.

Phân lập

Quá trình lấy tác nhân gây bệnh từ một ký chủ phục vụ cho nghiên cứu.

Quy tắc Koch

Các điều kiện do Robert Koch đặt ra để kiểm tra xem một vi sinh vật có phải là tác nhân gây bệnh hay không.

Giầm nát

Làm vỡ thành các mảnh nhỏ cùng với nước.

Khảm

Một loại hình góc cạnh bất thường, thường thấy trên lá cây bị bệnh do tác nhân virút gây ra.

Lốm đốm

Dạng hình có các vùng đậm nhạt không đều đặn.

Sợi nấm

Một đám các tế bào nấm dạng sợi.

Độc tố nấm

Các chất chuyển hóa bậc hai do nấm tạo ra trên các phần cây bị bệnh mà có thể gây bệnh cho gia súc và người khi hấp thụ vào.

Hoại tử

Vật liệu hữu cơ mất màu và chết, được tạo ra trong và xung quanh vùng bị bệnh của cây.

Tuyến trùng

Một loại giun tròn không phân đốt. Một số tuyến trùng ký sinh trên thực vật.

Các triệu chứng không điển hình.

Các triệu chứng không hỗ trợ cho việc chẩn đoán.

Túi noãn (thể cái)

Bộ phận sinh dục 'cái' tìm thấy trong một số loài giống như nấm.

Nấm trứng

Nhóm phân loại các vi sinh vật giống như nấm, một số sinh sản vô tính tạo ra các bào tử di động có chức năng gây nhiễm.

Bào tử trứng

Một bào tử được sinh sản hữu tính trong ngành Nấm trứng

Bảo tồn

Khả năng sống sót của một tác nhân gây bệnh giữa các giai đoạn lây nhiễm trên một cây ký chủ.

Tác nhân gây bệnh

Một sinh vật có khả năng gây bệnh.

Tính gây bệnh

Khả năng gây bệnh

Quả thể

Thể quả sinh sản hữu tính tạo ra các bào tử túi.

Tế bào sinh bào tử

Một tế bào chuyên biệt trên đó bào tử vô tính được sinh ra.

Sinh vật chưa có nhân điển hình

Một vi sinh vật mà trong nhân có màng bọc không chứa vật liệu di truyền.

Mầm bệnh

Một phần của một sinh vật có thể tách ra khỏi sinh vật mẹ để tạo thành một sinh vật mới.

Quả cành

Một thể quả sinh sản vô tính tạo ra bào tử vô tính.

Thân rễ

Một dạng thân cây mọc ngang dưới đất có thể tạo ra cả mầm và rễ.

Vi sinh vật hoại sinh

Một vi sinh vật dùng chất hữu cơ chết làm nguồn thực phẩm.

Hạch nấm

Một đám tế bào sợi nấm dày đặc che phủ bởi một lớp ngoài đậm màu, có khả năng tồn tại lâu dài.

Có vách ngăn

Sợi nấm có vách ngăn cách.

Khối bào tử

Một cấu trúc tạo bào tử vô tính chứa các đám cành bào tử phân sinh trên một đám sợi nấm.

Bào tử

Bộ phận sinh sản của nấm. Bào tử có thể được sinh sản hữu tính hoặc vô tính.

Bọc bào tử

Một cấu trúc giống như túi chứa các bào tử sinh sản vô tính. Trong một số trường hợp, bọc bào tử có thể đóng vai trò như một mầm lây nhiễm.

Vectơ

Một sinh vật môi giới làm lan truyền tác nhân gây bệnh.

Tính độc

Mức độ tính gây bệnh của một vi sinh vật.

Du động bào tử

Một bào tử sinh sản vô tính, có lông roi. Các lông roi giúp bào tử di chuyển trong nước tự do.

Tủ sách

Tủ sách là một nguồn thông tin quan trọng nhất trong phòng thí nghiệm chẩn đoán. Một trong những cuốn sách có giá trị nhất cần có trong tủ sách là *Plant Pathology* (Agrios 2005). Cuốn sách này chứa đựng những thông tin giá trị về từng loại tác nhân gây bệnh - nấm, vi khuẩn, virút, mycoplasma và tuyến trùng. Một số lượng lớn bệnh được minh họa trong cuốn sách này cùng với nhiều sơ đồ xuất sắc.

Hiệp hội Bệnh cây Mỹ phát hành các cuốn trích yếu bằng hình ảnh các bệnh hại trên từng cây trồng hoặc các nhóm cây trồng. Đây là nguồn tài liệu quý giá và được khuyến cáo cho bất cứ một phòng thí nghiệm chẩn đoán nào. Nhiều tổ chức quốc tế như ACIAR cũng phát hành nhiều tài liệu về nhiều lĩnh vực khác nhau với giá thấp hoặc miễn phí.

Một lượng lớn các thông tin sẵn có từ các website chính thức của các cơ quan nông nghiệp nhà nước và các trường đại học. Nên tận dụng những nguồn thông tin này và lưu trữ để tham khảo trong tương lai, phân loại theo các cây trồng quan tâm hoặc theo nhóm tác nhân.

Tủ sách cần được cập nhật liên tục với các tài liệu tham khảo về bệnh và các phương pháp chẩn đoán bệnh hiện hành.

Dưới đây là danh mục các tài liệu tham khảo được các tác giả đề nghị thêm vào tủ sách của bạn trong phòng thí nghiệm chẩn đoán.

Agrios G.N. 2005. Plant pathology, 5th edition. Elsevier Academic Press: San Diego, California.

Allen C., Proir P. and Hayward A.C. 2005. Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex. American Phytopathological Society Press: St. Paul, Minnesota.

Andrews S. and Pitt J.I. 1986. Selective medium for isolation of *Fusarium* species and dematiaceous hyphomycetes from cereals. Applied Environmental Microbiology 51(6), 1235–1238.

Bridge J. and Starr J.L. 2007. Plant nematodes of agricultural importance: a colour handbook. Manson Publishing Ltd: London.

Cheng Y. and Horne P. 1998. Field experiments with forages and crops: practical tips for getting it right the first time. ACIAR Monograph No. 53.

Desjardins A.E. 2006. *Fusarium* mycotoxins: chemistry, genetics and biology. American Phytopathological Society Press: St. Paul, Minnesota.

Drenth A. and Guest D.I. 2004. Diversity and management of *Phytophthora* in Southeast Asia. ACIAR Monograph No. 114. At: <http://www.aciar.gov.au/web.nsf/doc/ACIA-67E8HU>.

Drenth A. and Sendall B. 2001. Practical guide to detection and identification of *Phytophthora*. CRC for Tropical Plant Protection: Brisbane, Australia.

Dugan F.M. 2006. The identification of fungi: an illustrated introduction with keys, glossary, and a guide to literature. American Phytopathological Society Press: St. Paul, Minnesota.

Erwin D.C. and Ribeiro O.K. 1996. Phytophthora diseases worldwide. American Phytopathological Society Press: St. Paul, Minnesota.

Fisher N.L., Burgess L.W., Toussoun T.A. and Nelson P.E. 1982. Carnation leaves used as a substrate and for the preservation of cultures of *Fusarium* species. Phytopathology 72, 151–153.

Hillocks R.J. and Waller J.M. 1997. Soilborne diseases of tropical crops. CAB International. University Press: Cambridge.

Jones J.B., Jones J.P., Stall R.E. and Zitter T.A. 1991. Compendium of tomato diseases. American Phytopathological Society Press: St. Paul, Minnesota.

Kelman A. 1954. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on tetrazolium medium. Phytopathology 44, 693–694.

Kokalis-Burelle N., Porter D.M., Rodriguez-Kabana R., Smith D.H. and Subrahmanyam P. 1997. Compendium of peanut diseases. 2nd edition. American Phytopathological Society Press: St. Paul, Minnesota.

Leslie J.F. and Summerell B.A. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. Blackwell Publishing: Oxford.

Luc M., Sikora R. and Bridge J. 2005. Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. 2nd edition. CABI Bioscience, Egham, Surry, U.K.

McMaugh T. 2005. Guidelines for surveillance for plant pests in Asia and the Pacific. ACIAR Monograph No. 119. At: <http://www.aciar.gov.au/web.nsf/doc/ACIA-6 Hz3TK>.

Nash S.M. and Snyder W.C. 1962. Quantitative estimations by plate counts of propagules of the bean root rot *Fusarium* in field soils. Phytopathology 52, 567–572.

Nguyễn N.C. 2003. Tuyến trùng thực vật và cơ sở phòng trừ. Nhà xuất bản Khoa học Kỹ thuật.

Nirenberg H.I. 1976. Untersuchungen uber die morphologische und biologische differenzierung der Fusarium section liseola. *Mitt Biol Bundesanst Land.* Forstw Berlin-Dahlem.

Ploetz R.C., Zentmyer G.A., Nishijima W.T., Rohrbach K.G. and Ohr H.D. 1994. Compendium of tropical fruit diseases. American Phytopathological Society Press: St. Paul, Minnesota.

Schadd N.W., Jones J.B. and Chun W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria, 3rd edition. American Phytopathological Society Press: St. Paul, Minnesota.

Schwartz H.F. and Mohan S.K. 2008. Compendium of onion and garlic diseases and pests. 2nd edition. American Phytopathological Society Press: St. Paul, Minnesota.

Shivas R. and Beasley D. 2005. Management of plant pathogen collections. Australian Government Department of Agriculture, Fisheries and Forestry. At: <http://www.daff.gov.au/planthealth>.

Stirling G.R. and Eden L.M. 2007. The impact of organic amendments and mulch on root-knot nematode and Pythium root rot of capsicum. Presented at the Australasian Plant Pathology Society Conference, Adelaide, 24–27 September 2007.

Summerell B.A., Leslie J.F., Backhouse D., Bryden W. L. and Burgess L.W. 2001. *Fusarium*: Paul E. Nelson memorial symposium. American Phytopathological Society Press: St. Paul, Minnesota.

Timmer L.W., Garnsey S.M. and Graham J.H. 2000. Compendium of citrus diseases. 2nd edition. American Phytopathological Society Press: St. Paul, Minnesota.

Waterhouse D.F. 1998. Biological control of insect pests: Southeast Asian prospects. ACIAR Monograph No. 051. At: <http://www.aciar.gov.au/web.nsf/doc/ACIA-5QY79K>.

White D.G. 1999. Compendium of corn diseases. 3rd edition. American Phytopathological Society Press: St. Paul, Minnesota.

Zitter T.A., Hopkins D.L. and Thomas C.E. 1996. Compendium of cucurbit diseases. American Phytopathological Society Press: St. Paul, Minnesota.

ACIAR
Research that works for developing countries and Australia
www.aciar.gov.au