

## 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 sùng rễ ở cây họ thập tự.

#### 3. Kiểm tra tìm bằng chứng bệnh tuyến trùng (nốt sùng 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  $\times 100$ ). 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  $\times 400$ ).

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 lamên 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  $\times 10$ .
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

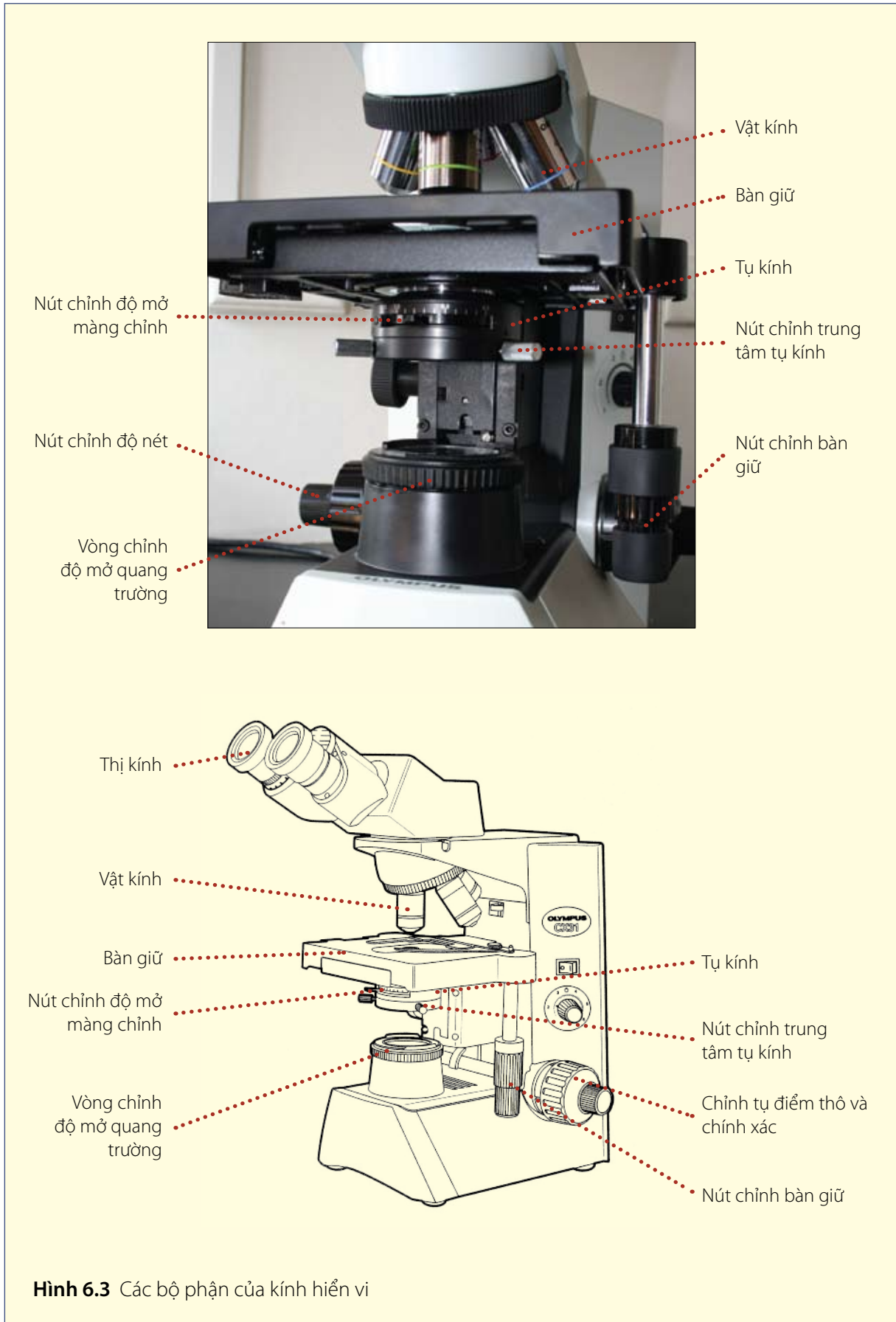
1. Nhỏ một giọt nước cất nhỏ lên lam kính.
2. Đặt mẫu vào vị trí giọt nước, dưới một kính lúp soi nổi.
3. Đặt lamén sao cho một cạnh chạm lam kính gần mép giọt nước.
4. Từ từ hạ cạnh bên kia của lamén xuống sao cho lamén trùm lên trên giọt nước - phương pháp này giúp đẩy các bọt khí ra khỏi mẫu lam.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

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 lamén. 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 agar)
- 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 quý báu 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 hơi 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 cấy, 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 axit 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 hơi 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 mẫu 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 ethanol 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 mẫu 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

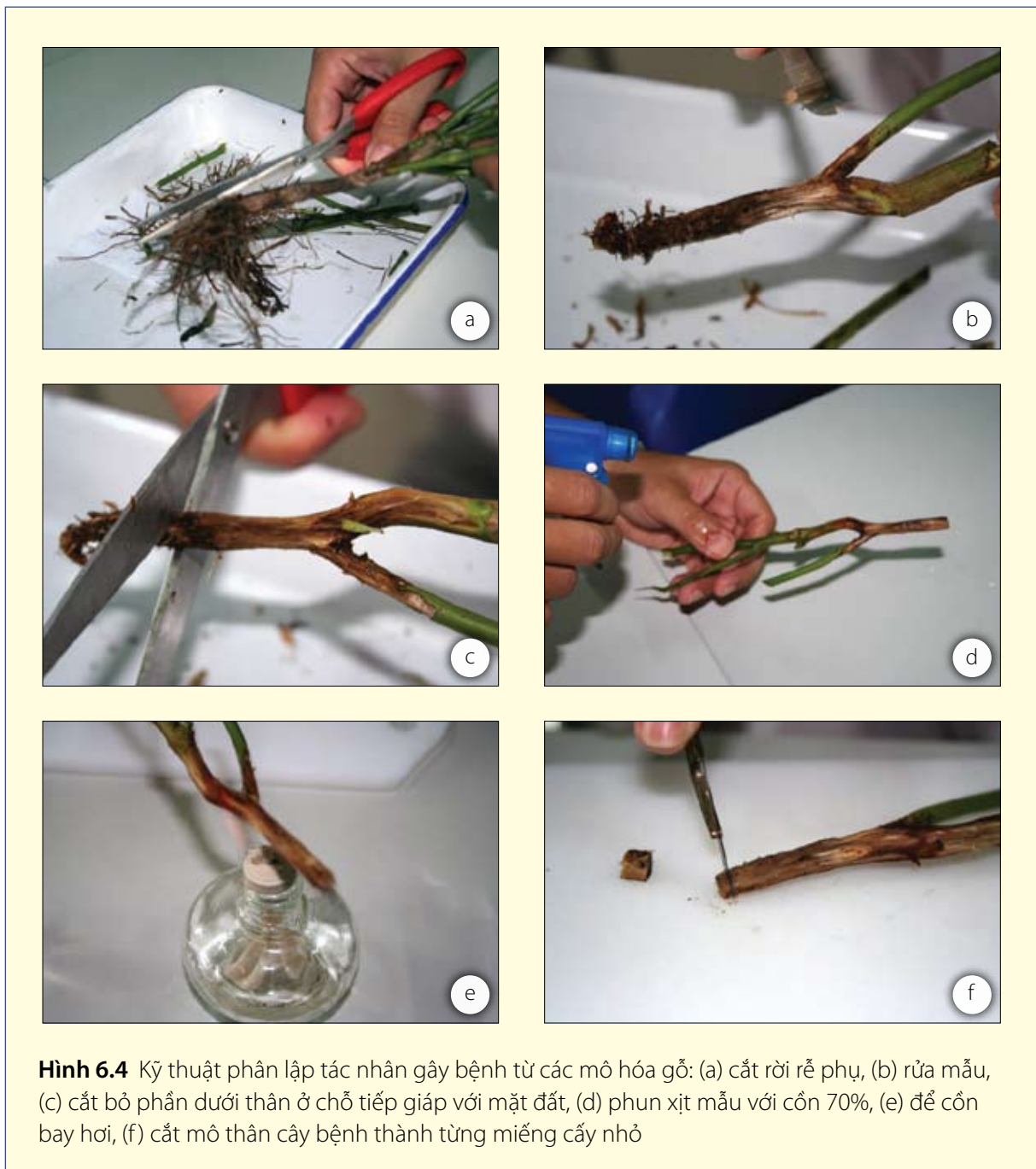
1. Lau táo với cồn.
2. Dùng một cái khoan nút chai sạch cắt một lỗ có đường kính khoảng 10 mm từ một bên tới lõi.
3. Bỏ đất đầy lỗ và dán lỗ bằng một miếng băng dính để đất khỏi rơi ra ngoài.
4. Đặt táo ở nhiệt độ phòng có ánh sáng.
5. Phân lập nấm sau 1-3 ngày từ phần ranh giới giữa mô khỏe và mô bệnh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



3. Thả vào cốc những mẫu bộ phận tươi của cây trồng mắc cảm với bệnh, các vật liệu bấy 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 bấy sau khi rửa trong nước vô trùng và khử trùng bề mặt, dùng môi trường chọn lọc (như PSM).

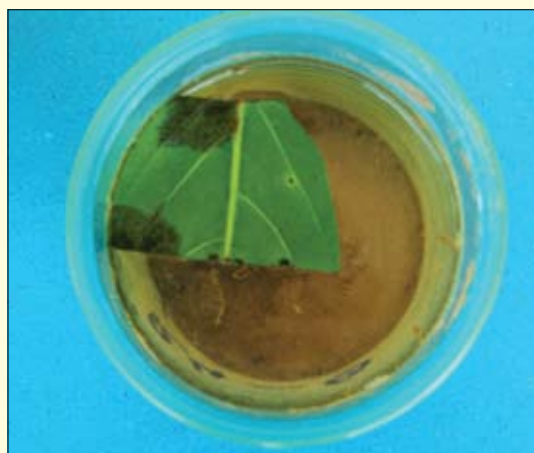
Vật liệu bấy cũng có thể là các loại cây trồng ký chủ của *Phytophthora* hoặc *Pythium*. Vật liệu có thể dùng để bấy bao gồm lá ớt, cánh hoa hồng, lá cây có múi, cây con ớt, đậu lupin và đậu tương. Nếu bấy không tự nổi được, có thể treo bấy lên nắp cốc sao cho bấy lơ lửng ở mặt nước hoặc gắn vào một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

#### Phân lập từ rễ con dùng cây ký chủ làm bấy

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 bấy 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

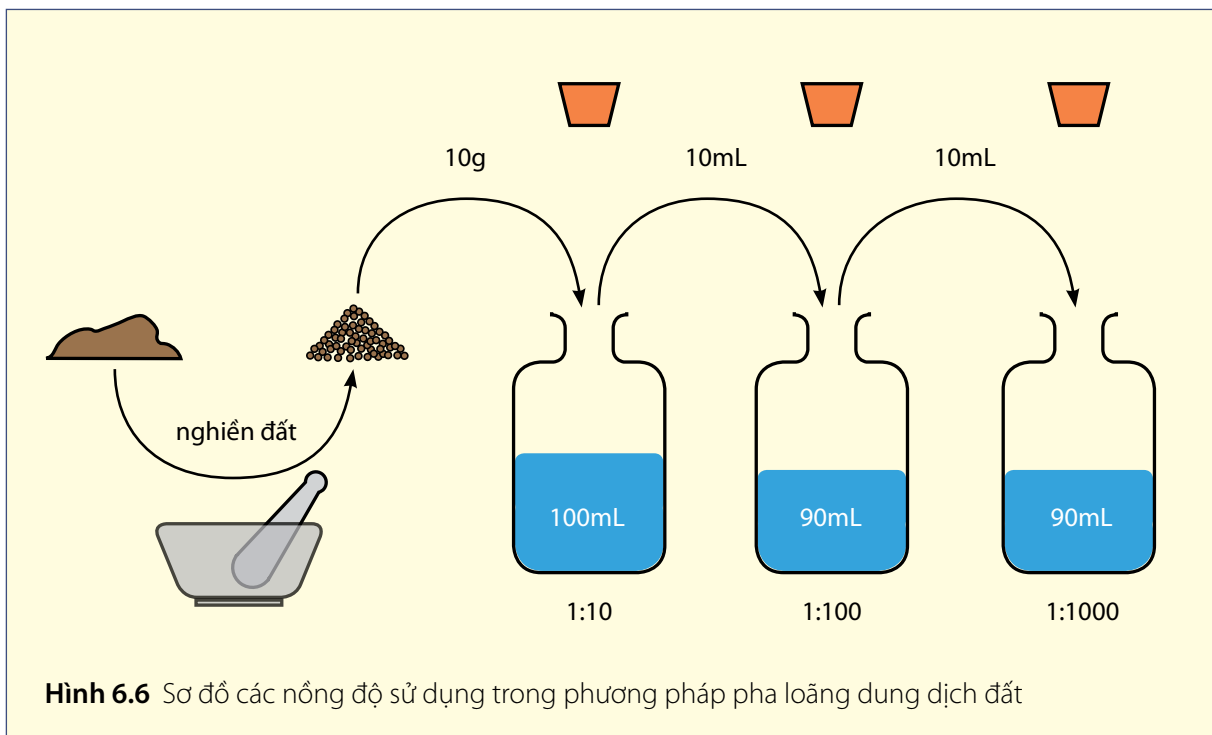
Phương pháp pha loãng dung dịch đất được sử dụng để phân lập các loài *Fusarium* từ đất khô bằng môi trường chọn lọc PPA. Phương pháp này có thể được áp dụng để phân lập một số loài nấm khác sử dụng các môi trường chọn lọc thích hợp.



Hình 6.5 Bấy *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 cảm chiếu (CLA), hoặc thạch nước cất có chứa một mẫu mô cây đã khử trùng.



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:

$$\text{Độ loãng} \times \text{số tản nấm trung bình của loài nấm trên các đĩa phân lập} = \text{CFU/g đất}$$

## 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 ( $2 \times 2$  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.

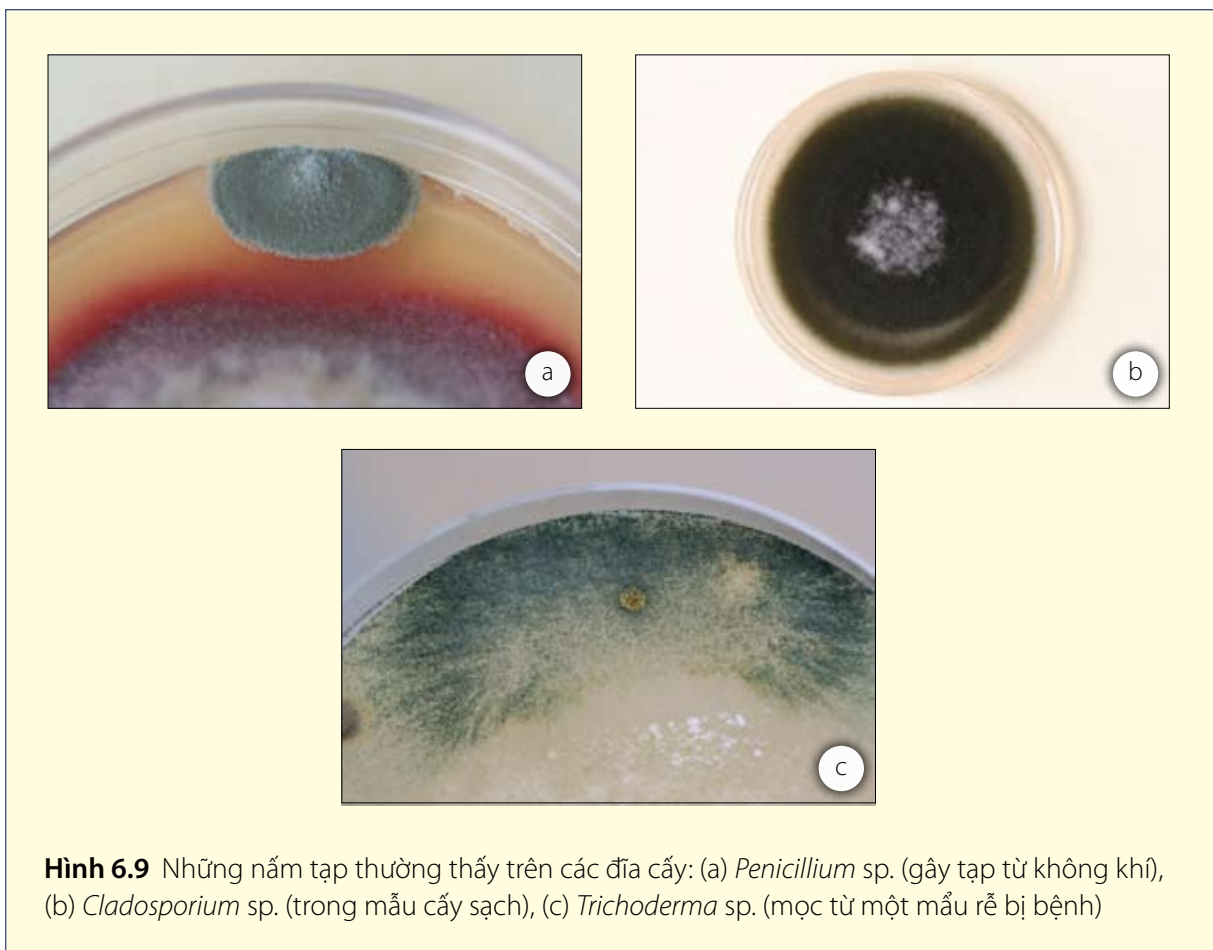
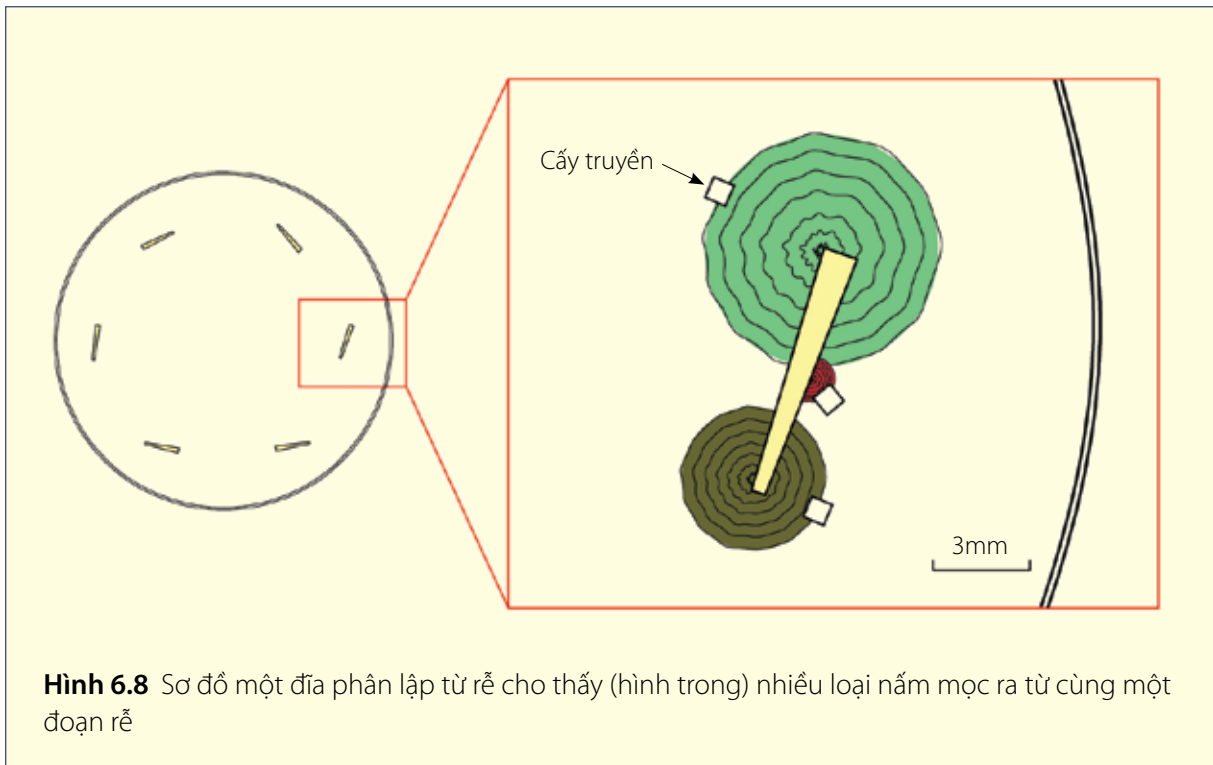
Vì vậy, cần kiểm tra các đĩa phân lập hàng ngày để tìm nấm mọc. Quan sát các miếng cấy xem có hiện tượng hình thành bào tử không, đây có thể là dấu hiệu nhận ra tác nhân gây bệnh. Tuy nhiên, nên lưu ý rằng bào tử hình thành có thể từ nấm hoại sinh.



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.





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 tử 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 kính 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 đẹp 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 đẹp).

Khử trùng  
que cấy



1

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



6

Cạo các bào tử  
từ rìa tản nấm



2

Đổ bỏ dịch  
bào tử thừa



7

Cho bào tử  
vào nước vô  
trùng



3

Để dựng đĩa  
lên trong 18  
giờ



8

Kiểm tra mật  
độ bào tử



4

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



9

Làm loãng  
nếu cần



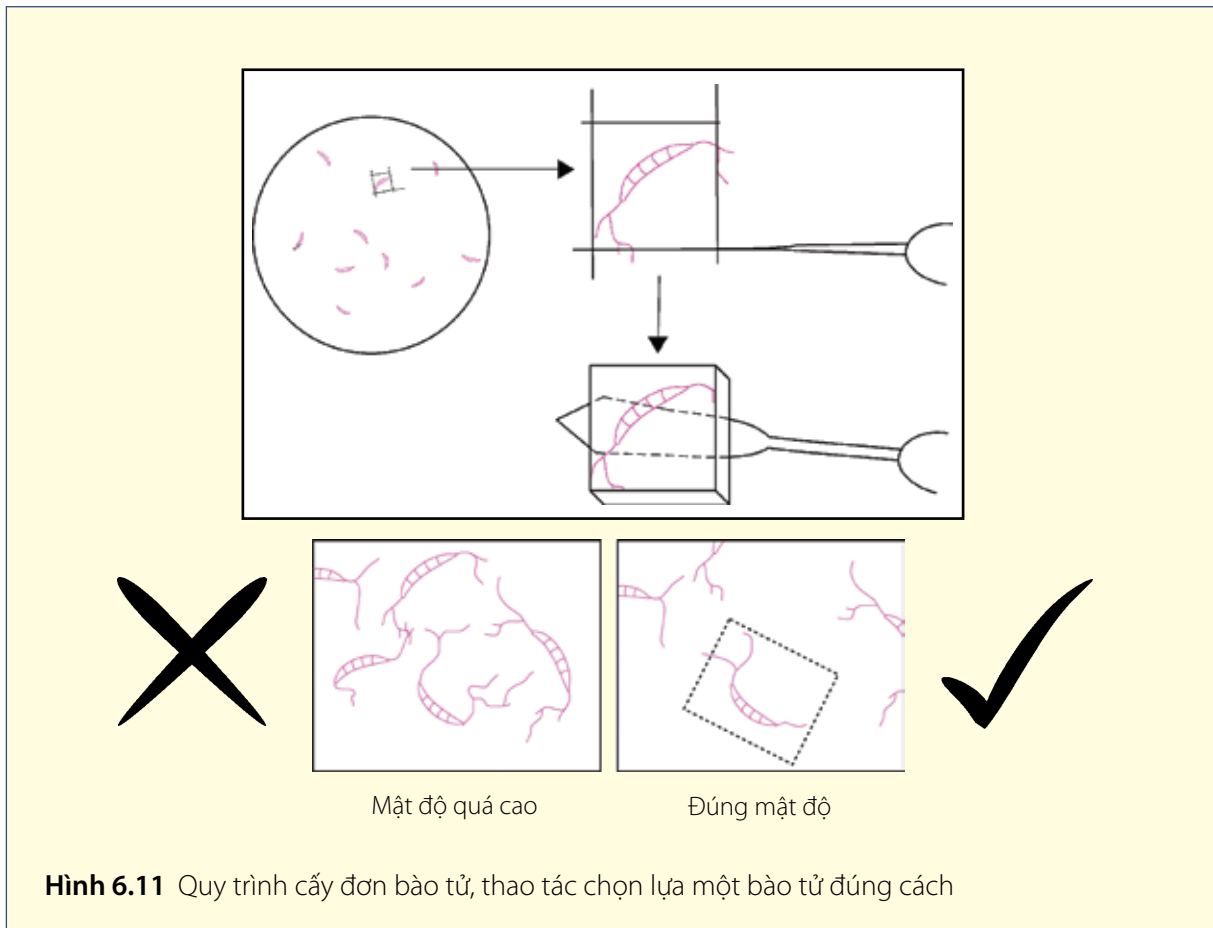
5

Chuyển sang  
một môi  
trường mới



10

**Hình 6.10** Các bước cấy đơn bào tử



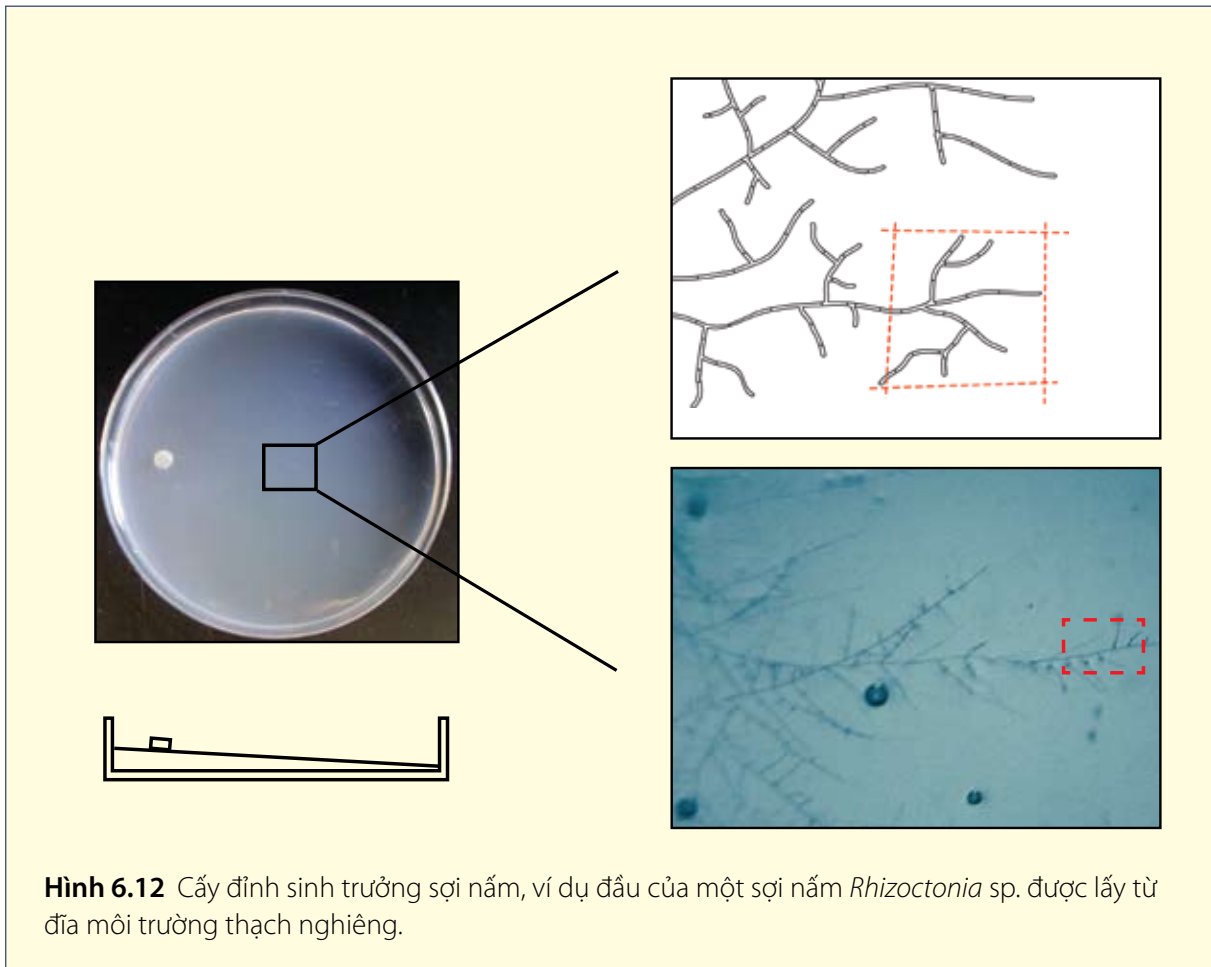
### 6.5.2 Cấy đỉnh sinh trưởng sợi nấm

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

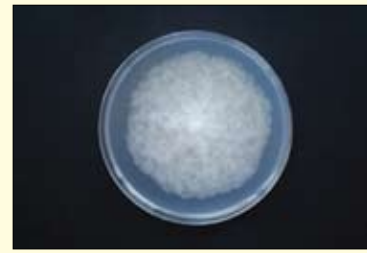
Có thể có sự khác nhau đáng kể trong hình thái và màu sắc các tản nấm của cùng một loài. Việc chẩn đoán trở nên dễ dàng hơn khi các cán bộ chẩn đoán học cách nhận biết tản nấm của các loài nấm thông thường trên môi trường nhân tạo (Hình 6.13). Các mẫu nấm sau đó có thể được phân loại dễ dàng thành nhóm 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*



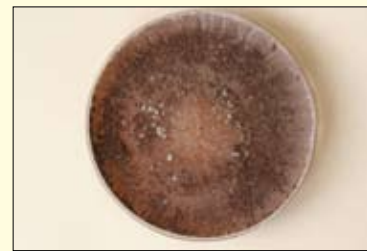
*Aspergillus niger*



*Rhizoctonia* sp.



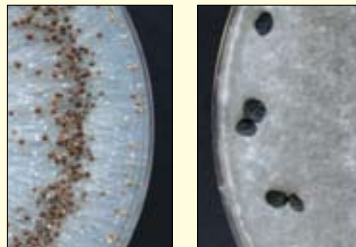
*Rhizoctonia* sp.



*Rhizoctonia* sp.



*Sclerotium rolfsii*



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



*Sclerotinia sclerotiorum*



*Pestalotia* sp.



*Phoma terrestris*



*Colletotrichum* sp.

**Hình 6.13** Tàn 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.