

Phụ lục 1

Cách làm một que cấy đẹp

Que cấy đẹp 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 đẹp.



Hình A1.1 Hướng dẫn từng bước làm que cấy đẹp

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. Dùng khăn lau bàn bằng cồn ở vị trí gần ngọn lửa.
- Giữ một chần 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 dày 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 hydrat-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 tán nấm và sự hình thành sắc tố. Dùng các môi trường khác để kích thích việc sinh sản và hình thành bào tử, như mẫu 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 giòn mỏng trong đĩa - việc này hạn chế sự phát triển của nấm và giúp cho việc cấy 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 rời 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 mẫu 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 mẫu 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 mẫu 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 mẫu 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 mẫu thân lúa xanh và quả đậu có thể thay thế cho lá cẩm chướng. Nếu cần thì khử trùng những mẫu cây này bằng nổi 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 hydrat 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 ₂ PO ₄	1 g
KNO ₃	1 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5 g
KCl	0.5 g
Glucose	0.2 g
Sucrose	0.2 g

Đặt 2 mẫu 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 lamén 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 mẫu 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 trùng. 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 ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	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 ₂ HPO ₄	1 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	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 hydrat 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 mẫu dài 3cm.
2. Hấp và đặt 4-5 mẫu trong đĩa Petri lớn chứa 15 mL nước đã khử trùng.
3. Cấy một mẫu 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 lamên dưới mặt nước.
2. Cẩn thận tách một chút sợi nấm và kéo lên trên lamên.
3. Lấy lamên 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 ₂ HPO ₄	1,5 g
MgSO ₄	1,5 g
Nước cất	1L

Trộn chung tất cả các thành phần ngoại trừ MgSO₄. Chính độ pH tới 7,2± 0,2. Từ từ thêm MgSO₄ và lắc đều. Hấp và đổ vào đĩa Petri 90 mm.

Sucrose peptone agar (SPA)

Đường Sucrose	20 g
Peptone	5 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,25 g
Agar	20 g
Nước cất	1 L

Trộn chung tất cả các thành phần. Chỉnh độ pH tới $7,2 \pm 0,2$. 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 lẩn tạt 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 miễn cảm của vi sinh vật đối với nhiệt. Trong điều kiện khử trùng bằng nổi hấp, các dạng sinh trưởng sinh dưỡng của hầu hết các loại vi khuẩn, nấm men, nấm và hầu hết các virus 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, axit nucleic, 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 axit 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 protein 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 định sơi 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. Cần thận không đặt các dụng cụ nóng hoặc hơ lửa dụng 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 methyl 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 mẫu thạch vuông 1 cm từ viền của một tảng 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 mẫu thân hoặc lá bị bệnh.

Các mẫu vi sinh vật được nuôi cấy trên WA tiệt trùng có chứa các mẫu mô cây hoặc hạt tiệt trùng. Các mẫu 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 mẫu thân lúa xanh hoặc mẫu lá cẩm chướng. Cũng có nhiều loài nấm không thể bảo quản bằng phương pháp đông khô, như nấm trùn, 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 thủy 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 đầy nắp sơ. Lấy năm mẫu 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 nhân vào trong lọ, sau đó dùng đèn hàn hồ 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 mẫu 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 mẫu 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 nộm 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 nhắc 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 vẫn 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 mẫu 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. Cothier 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 über 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 khuẩn
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

Bào 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 bào 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 gãy 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 xoma 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.

Giảm 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, Surrey, 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. Tuyển 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