

**PHƯƠNG PHÁP  
QUẢN LÝ MẪU BỆNH  
THỰC VẬT**

---

*“Mọi tài liệu ghi chép nếu không thể được kiểm tra lại thì cũng chỉ là những mảnh giấy vụn mà thôi”*

R.W.G. Dennis, theo *British Ascomycetes* (1968),  
J. Cramer, Lehre, Germany.

---

## LỜI CẢM ƠN

Chúng tôi xin chuyển lời cảm ơn sâu sắc tới TS. John Alcorn, người đã hiệu đính cuốn sách này. Xin cảm ơn Tổ chức hỗ trợ phát triển Quốc tế Australia (AusAID) đã cung cấp nguồn kinh phí quý báu cho việc ra đời và xuất bản cuốn sách. Xin giành lời cảm ơn đặc biệt cho ông Eli Szandala, Văn phòng các chuyên viên bảo vệ thực vật cao cấp, Bộ Nông nghiệp, Thủy sản và Lâm nghiệp Australia đã điều hành chương trình xuất bản cuốn sách này.

Cuốn sách này mô tả nhiều phương pháp đã được thảo luận bởi các thành viên tham gia trong hội thảo tổ chức tại Chiang Mai, Thái Lan ngày 20 tháng 11 năm 2004. Chúng tôi xin cảm ơn TS. Srisuk Poonpolgul (Bangkok, Thái Lan), bà Srisurang Likhitekaraj (Bangkok, Thái Lan), TS. Pornpimon Athipunyakom (Bangkok, Thái Lan), ông Woothisak Butranu (Bangkok, Thái Lan), TS. Kartini Kramadibrata (Bogor, Indonesia), TS. Lee Su See (Kepong, Malaysia), TS. Hien Thuy Phan (Hà Nội, Việt Nam) và ông Eli Szandala (Canberra, Australia) vì những đóng góp quý báu cho sự thành công của cuốn sách này.

### **Các tác giả chính**

TS. Roger Shivas và TS. Dean Beasley, Bảo tàng bệnh cây, Sở Nông nghiệp và Thủy sản Queensland, Australia.

### **Các tác giả tham gia**

TS. John Thomas và TS. Andrew Geering, Khoa virus học, Sở Nông nghiệp và Thủy sản Queensland, Australia.

TS. Ian Riley, Chuyên gia tuyển trùng học, Trường Đại học Adelaide, Bang Nam Australia, Australia.

© Commonwealth, Australia 2005

Cuốn cẩm nang ‘Phương pháp quản lý mẫu bệnh thực vật’ được đảm bảo quyền tác giả. Tuy nhiên, bạn có thể tải xuống, in và sao chép cho việc sử dụng riêng, không vì mục đích thương mại hoặc sử dụng trong phạm vi cơ quan của mình. Ngoài mục đích sử dụng được phép trong phạm vi quy định của *Luật bản quyền năm 1968*, tất cả các quyền tác giả khác đều được đảm bảo.

ISBN 0-9751686-9-X

---

## BẢNG CHỮ VIẾT TẮT

AMV	Virus khảm lá linh lăng
ACIAR	Trung tâm nghiên cứu Nông nghiệp Quốc tế Australia
ASEAN	Hiệp hội các Quốc gia Đông Nam Á
ASEANET	Hội thiết lập và điều hành mạng lưới khu vực Đông Nam Á
AusAID	Tổ chức hỗ trợ phát triển Quốc tế Australia
BO	Bảo tàng Bogoriense
BRIP	Bảo tàng bệnh cây Queensland
DAFF	Bộ Nông nghiệp, Lâm nghiệp và Thủy sản
DAR	Bảo tàng bệnh cây New South Wales
DNA	Deoxyribonucleic Acid
ELISA	Kỹ thuật miễn dịch liên kết men
FAO	Tổ chức lương thực của Liên Hợp Quốc
GA	Glycerol Agar
GBIF	Phương tiện thông tin đa dạng sinh học toàn cầu
GPS	Hệ thống định vị toàn cầu
KBA	King's B Agar
ICTV	Ủy ban Quốc tế về phân loại virus
IJSB	Tạp chí Quốc tế về phân loại học vi khuẩn
IJSEM	Tạp chí Quốc tế về tiến hóa và phân loại vi sinh vật học
IMI	CABI Bioscience, UK Centre
IPPC	Công ước Quốc tế về bảo vệ thực vật
ISPM	Tiêu chuẩn Quốc tế về kiểm dịch động thực vật
LNYSV	Virus đốm vàng hoại sinh rau diếp
MEA	Malt Extract Agar
MTA	Văn bản thỏa thuận chuyển giao mẫu
NA	Nutrient Agar
NSW	New South Wales
OCPPO	Văn phòng chuyên viên bảo vệ thực vật cao cấp
PCR	Phản ứng trùng hợp chuỗi
PDA	Khoai tây - đường – Agar
PEMV	Virus khảm biến dạng đậu
PRA	Đánh giá nguy cơ dịch hại
PRSV	Virus đốm vòng đu đủ
QDPIF	Sở Nông nghiệp và Thủy sản Queensland
RIRDC	Tổ chức nghiên cứu và phát triển nông thôn
RNA	Ribonucleic Acid
SEM	Kính hiển vi điện tử quét
SPA	Sucrose Peptone Agar
SPS	Kiểm dịch động thực vật
SCBV	Virus hình que hại mía
SWG	Cân trọng lượng tiêu chuẩn
TMV	Virus khảm lá thuốc lá
TSWV	Virus đốm héo cà chua
TWA	Môi trường agar - nước máy
UV	Tia cực tím
VIDE	Cơ sở dữ liệu trao đổi thông tin giám định virus
WFCC	Hiệp hội lưu giữ mẫu vi sinh vật Thế giới
WTO	Tổ chức thương mại Thế giới

---

## LỜI TỰA

Cuốn cẩm nang về quản lý mẫu bệnh thực vật này được Bộ Nông nghiệp, Thủy sản và Lâm nghiệp Australia tài trợ thực hiện. Cuốn sách được ra đời với mục đích cung cấp tài liệu tham khảo cho các nước trong khu vực nhằm xây dựng danh mục dịch hại từ tiêu bản các mẫu bệnh thu được, đáp ứng nhu cầu của thương mại Quốc tế đối với hàng hóa nông nghiệp.

Sự thành lập tổ chức thương mại Thế giới (WTO) năm 1995 là tiền đề cho sự ra đời của một kỷ nguyên mới trong tự do thương mại. Hiệp định WTO về việc áp dụng các biện pháp kiểm dịch động thực vật (Hiệp định SPS) đã thúc đẩy sự phát triển của thương mại hóa nông sản, tuy vậy mục tiêu này đã bị lãng quên ở một số nước đang phát triển. Ở nhiều nước trên thế giới, bộ sưu tập sâu và bệnh hại rất nghèo nàn dẫn đến những hạn chế trong việc mô tả tình trạng lành mạnh của nền nông nghiệp cũng như lâm nghiệp nước đó. Đó cũng là nguyên nhân khiến nhiều tổ chức bảo vệ thực vật Quốc gia không thể thực hiện công tác phân tích nguy cơ dịch hại một cách đầy đủ và tin cậy. Tình trạng này còn tiếp diễn sẽ là một bất lợi lớn cho các nước đang phát triển ở khu vực trong việc đàm phán để mở rộng thị trường cho hàng nông sản.

Theo điều khoản 9 của hiệp định SPS, các nước phát triển đã chấp thuận trợ giúp về chuyên môn cho các nước đang phát triển thành viên để phát triển kỹ năng có liên quan đến hiệp định SPS và đáp ứng các điều kiện mà Hiệp định SPS đề ra. Australia đã đóng góp trách nhiệm của mình bằng nhiều cách khác nhau thông qua các chương trình trợ giúp song phương trong khu vực, với nguồn vốn tài trợ của Tổ chức hỗ trợ phát triển Quốc tế Australia (AusAID). Các hoạt động trợ giúp được tiến hành trên nhiều lĩnh vực, trong đó có việc xây dựng danh mục các dịch hại trên cơ sở mẫu tiêu bản. Văn phòng các chuyên viên bảo vệ thực vật cao cấp thuộc Bộ Nông nghiệp, Lâm nghiệp và Thủy sản Australia đã đảm nhận công việc này, đối tượng nhận được sự giúp đỡ trong chương trình là các nước ở khu vực Đông Nam Á. Chương trình chú trọng đến việc xây dựng năng lực của các nhà khoa học ở năm lĩnh vực cơ bản sau:

- Điều tra dịch hại thực vật
- Chẩn đoán
- Bảo quản mẫu
- Phụ trách và quản lý bộ sưu tập mẫu
- Quản lý dữ liệu

Cuốn cẩm nang này đã tóm tắt lại những phương pháp và kỹ thuật thường được sử dụng trong tất cả các vấn đề về bệnh cây, bao gồm cả thông tin về những bệnh hại có tầm quan trọng về kinh tế, các phương pháp thu thập mẫu bệnh trên đồng ruộng, phương pháp nuôi cấy trên môi trường nhân tạo, phương pháp phân lập, bảo quản mẫu cũng như các thông tin, các mẹo nhỏ trong việc quản lý tiêu bản mẫu bệnh và mẫu vi sinh vật hại. Để đáp ứng nhu cầu sử dụng rộng rãi, cuốn cẩm nang này đã được dịch sang tiếng Việt, tiếng Thái và tiếng Bahasa.

Lois Ransom  
Chuyên viên bảo vệ thực vật cao cấp  
Bộ Nông nghiệp, Thủy sản và Lâm nghiệp Australia.

---

## MỤC LỤC

<b>LỜI CẢM ƠN</b>	<b>III</b>
<b>BẢNG CHỮ VIẾT TẮT</b>	<b>IV</b>
<b>LỜI TỰA</b>	<b>1</b>
<b>MỤC LỤC</b>	<b>2</b>
<b>DANH MỤC HÌNH</b>	<b>5</b>
<b>DANH MỤC BẢNG</b>	<b>5</b>
<b>1 MỞ ĐẦU</b>	<b>6</b>
1.1 Những trách nhiệm mang tính toàn cầu	6
1.2 Tình trạng lưu giữ mẫu sinh học ở các nước ASEAN	8
1.3 Tầm quan trọng của việc lưu giữ hồ sơ tiêu bản	8
1.4 Xây dựng và phát triển công tác lưu giữ mẫu bệnh cây ở các nước ASEAN	9
<b>2 LƯU GIỮ MẪU BỆNH HẠI THỰC VẬT</b>	<b>10</b>
2.1 Bảo tàng mẫu	10
2.2 Bộ sưu tập vi sinh vật	10
2.3 Xây dựng bộ mẫu bệnh cây	11
2.4 Danh mục dịch hại	12
<b>3 XÂY DỰNG BỘ SƯU TẬP MẪU BỆNH</b>	<b>15</b>
3.1 Nguồn mẫu	15
3.2 Thu thập mẫu bệnh ngoài đồng ruộng	15
3.3 Thu thập và xử lý mẫu bệnh	17
3.3.1 Đối với lá, thân và quả	18
3.3.2 Đối với rễ và đất	19
3.3.3 Đối với nấm lớn	20
3.4 Cách ghi phiếu điều tra mẫu bệnh	21
3.5 Điều tra và lấy mẫu	22
<b>4 PHƯƠNG PHÁP KIỂM TRA MẪU BỆNH</b>	<b>24</b>
4.1 Nhuộm màu nấm và vi khuẩn	24
4.2 Kính hiển vi quang học	26
4.3 Chụp ảnh mẫu	27
4.3.1 Cách quản lý và đặt tên file ảnh	27
<b>5 PHƯƠNG PHÁP PHÂN LẬP NẤM, VI KHUẨN VÀ TUYẾN TRÙNG TRONG PHÒNG THÍ NGHIỆM</b>	<b>29</b>

---

<b>5.1</b>	<b>Phân lập nấm</b>	<b>30</b>
5.1.1	Buồng giữ ẩm	31
5.1.2	Phương pháp pha loãng	32
5.1.3	Phát triển và sản sinh bào tử	32
<b>5.2</b>	<b>Phân lập vi khuẩn</b>	<b>34</b>
<b>5.3</b>	<b>Phân lập tuyến trùng</b>	<b>35</b>
5.3.1	Mẫu đất	36
5.3.2	Mẫu cây bệnh	38
5.3.3	Bảo quản và làm tiêu bản	39
<b>5.4</b>	<b>Môi trường nuôi cấy</b>	<b>40</b>
<b>6</b>	<b>CÁCH BẢO QUẢN VÀ LƯU GIỮ MẪU BỆNH</b>	<b>44</b>
<b>6.1</b>	<b>Tiêu bản mẫu bệnh</b>	<b>44</b>
6.1.1	Tiêu bản khô	44
6.1.2	Tiêu bản chuẩn	46
6.1.3	Mẫu vi sinh vật khô	47
6.1.4	Tiêu bản lam	47
6.1.5	Đóng gói và vận chuyển tiêu bản	48
<b>6.2</b>	<b>Mẫu vi sinh vật đã phân lập</b>	<b>48</b>
6.2.1	Nuôi cấy trên môi trường agar	49
6.2.2	Bảo quản bằng dầu khoáng	49
6.2.3	Bảo quản trong nước vô trùng	50
6.2.4	Bảo quản đông khô	50
6.2.5	Bảo quản trong đất	50
6.2.6	Bảo quản bằng silica gel	50
6.2.7	Bảo quản trên giấy thấm	51
6.2.8	Bảo quản lạnh sâu	51
6.2.9	Bảo quản bằng nitơ lỏng	51
<b>7</b>	<b>GIÁM ĐỊNH VI SINH VẬT GÂY HẠI</b>	<b>52</b>
<b>7.1</b>	<b>Nấm</b>	<b>52</b>
7.1.1	Nấm gây bệnh trên rễ	53
7.1.2	Nấm gây bệnh trên thân	53
7.1.3	Nấm gây bệnh trên lá	54
7.1.4	Nấm gây bệnh trên quả và hạt	56
7.1.5	Nấm gỉ sắt	56
7.1.6	Nấm than đen	58

---

<b>7.2</b>	<b>Vi khuẩn</b>	<b>59</b>
<b>7.3</b>	<b>Phytoplasma</b>	<b>61</b>
<b>7.4</b>	<b>Virus và viroid</b>	<b>61</b>
7.4.1	Các loài virus và thông tin lưu giữ	62
7.4.2	Triệu chứng bệnh virus thực vật	63
<b>7.5</b>	<b>Tuyển trùng</b>	<b>66</b>
7.5.1	Những yêu cầu về giám định	67
7.5.2	Nhận dạng tuyển trùng ký sinh thực vật	67
7.5.3	Giám định đến loài	68
<b>7.6</b>	<b>Các kỹ thuật phân loại</b>	<b>69</b>
7.6.1	Kính hiển vi điện tử quét (Scanning electron microscopy - SEM)	69
7.6.2	Kỹ thuật hóa sinh và phân tử	69
7.6.3	Huyết thanh (miễn dịch)	69
7.6.4	Kỹ thuật nucleic axit	70
<b>8</b>	<b>QUẢN LÝ HỒ SƠ MẪU BỆNH</b>	<b>71</b>
8.1	Hệ thống cơ sở dữ liệu (Database)	71
<b>9</b>	<b>QUẢN LÝ BỘ SƯU TẬP MẪU</b>	<b>73</b>
9.1	Điều kiện phòng mẫu	73
9.2	Phòng trừ bộ cánh cứng hại tiêu bản mẫu	73
9.3	Phòng trừ nhện hại mẫu vi sinh vật	74
9.4	Cho mượn mẫu	75
9.5	Bảo đảm an toàn cho mẫu bệnh	76
<b>10</b>	<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO CHỌN LỌC</b>	<b>78</b>



---

## DANH MỤC HÌNH

Hình 1	Trang thiết bị cần thiết cho việc xây dựng một phòng tiêu bản và mẫu vi sinh vật...11
Hình 2	Nguồn thông tin giúp cho việc xây dựng danh mục dịch hại xếp theo thứ tự tin cậy 12
Hình 3	Ví dụ về danh mục dịch hại trên cây đu đủ ..... 12
Hình 4	Thông tin cần thiết cho một hồ sơ dịch hại, được xây dựng dựa trên ISPM 8 ..... 14
Hình 5	Dụng cụ thường dùng để lấy mẫu bệnh ..... 17
Hình 6	Lọ làm khô mẫu nghi ngờ nhiễm virus. .... 19
Hình 7	Ví dụ một nhãn lấy mẫu được sử dụng tại phòng lưu giữ mẫu bệnh BRIP ..... 22
Hình 8	Mặt cắt nghiêng của buồng để mẫu nấm phân lập có ‘ánh sáng đen’ ..... 33
Hình 9	Cách vạch phân lập vi khuẩn trên mặt agar. .... 35
Hình 10	Khay Whitehead dùng để tách tuyến trùng từ đất và cây ..... 37
Hình 11	Dùng phễu Baermann để tách tuyến trùng từ đất và cây bệnh..... 37
Hình 12	Tách tuyến trùng từ mô bệnh bằng phương pháp phun sương..... 39
Hình 13	Ví dụ một nhãn dán trên gói tiêu bản sử dụng tại phòng tiêu bản BRIP..... 45
Hình 14	Các gói tiêu bản ở Bảo tàng mẫu bệnh Ustilaginales Vánky (HUV) và Bảo tàng bệnh cây của QDPI&F (BRIP) ..... 48
Hình 15	Triệu chứng bệnh virus (từ trái qua phải): vòng biến màu, đốm vòng và khảm lá .. 65
Hình 16	Hình thái mặt trước của một số nhóm tuyến trùng ..... 68
Hình 17	Môđun Catalogue của KE EMu database ..... 71
Hình 18	Địa chỉ Internet và trang chủ của hai database phân loại tin cậy..... 72
Hình 19	Vết bò của nhện trong các giọt nước đọng trên nắp đĩa Petri ..... 75

## DANH MỤC BẢNG

Bảng 1	Một số triệu chứng bệnh thường gặp ..... 16
--------	---

---

## 1 MỞ ĐẦU

Tầm quan trọng của việc lưu giữ tiêu bản sinh vật, bao gồm cả các mẫu thực vật bị bệnh và các vi sinh vật gây bệnh đã được nói đến trong hàng loạt bài báo trên các tạp chí khoa học. Trong một bài có nhan đề *Trách nhiệm tương hỗ của phân loại nấm học và bệnh cây*, Walker (1975) đã trích dẫn ít nhất 18 tài liệu tham khảo và chính tác giả trong đó đã nhấn mạnh tầm quan trọng của phân loại học trong sinh học ứng dụng cũng như tầm quan trọng của công tác phân loại nấm, bao gồm nấm học nói chung và bệnh cây nói riêng. Những bài báo này có ảnh hưởng tới việc trợ giúp phát triển các bảo tàng bệnh hại và phân loại học hay không? Câu trả lời có lẽ là “không”, lấy dẫn chứng từ thực tế ở Australia, hầu hết các bảo tàng mẫu bệnh ở Australia đều do các cơ quan của Chính quyền các bang tài trợ.

Nguyên nhân tại sao chính phủ lại lưỡng lự trong việc đầu tư vào các bảo tàng (phòng) tiêu bản sinh học trong khi chúng là nền tảng cho những nghiên cứu về phân loại còn đang là vấn đề gây tranh cãi. Có lẽ vấn đề là ở chỗ những nhà phân loại học đã không chú ý đến nhu cầu của những người có khả năng sử dụng chúng... *những nhà phân loại học thường không nghĩ đến nhu cầu và công việc của các nhà sinh học ứng dụng trong đó có các nhà bệnh cây, thậm chí một số còn có xu hướng tách mình ra khỏi những lĩnh vực nghiên cứu và thực hành sinh học rộng lớn hơn* (Walker, 1975). Cùng với sự ra đời của Tổ chức thương mại thế giới năm 1995 và những điều luật của tổ chức này áp dụng cho hàng hóa nông nghiệp, tình trạng sức khỏe cây trồng đã trở thành một vấn đề chính trị thương mại lớn. Chịu áp lực từ nhiều thành phần khác nhau, các Quốc gia đang phải sử dụng các điều khoản của Hiệp định kiểm dịch động thực vật (Hiệp định SPS)<sup>1</sup> để tối đa hóa lợi thế cạnh tranh – hay nói cách khác là để thúc đẩy mở cửa những thị trường trước đây đã bị đóng lại do những nghi ngờ về vấn đề kiểm dịch và loại trừ việc nhập khẩu những hàng hóa có nguy cơ ảnh hưởng xấu tới các ngành sản xuất nông nghiệp trong nước. Dựa trên những cơ sở khoa học và đánh giá nguy cơ dịch hại, Hiệp định SPS đưa ra điều kiện để bảo vệ các ngành sản xuất nông nghiệp trước sự xâm nhập của dịch hại<sup>2</sup> từ ngoài vào, đồng thời tạo điều kiện cho sự phát triển của thương mại hóa nông sản. Hiệp định SPS cho phép các thành viên quản lý thương mại đối với hàng hóa nông nghiệp dựa trên tình trạng sức khỏe cây trồng và an toàn thực phẩm. Tuy nhiên các giới hạn đề ra phải rõ ràng và phải có bằng chứng kỹ thuật.

### 1.1 NHỮNG TRÁCH NHIỆM MANG TÍNH TOÀN CẦU

Công ước Quốc tế về bảo vệ thực vật (IPPC) và Hiệp định SPS quy định: các nước xuất khẩu phải có trách nhiệm cung cấp cho các nước nhập khẩu một danh mục dịch hại có khả năng đi theo hàng xuất khẩu. Cụ thể như sau:

- IPPC quy định các nước có hàng hóa xuất khẩu phải cung cấp các thông số kỹ thuật và sinh học hợp lệ cần thiết cho việc đánh giá nguy cơ dịch hại để

---

<sup>1</sup> Biện pháp kiểm dịch động thực vật (trong hiệp định SPS) là các tiêu chuẩn và quy định của một Quốc gia về các vấn đề như: sự lẫn tạp vi sinh vật, độc tố, kim loại nặng, tàn dư thuốc bảo vệ thực vật trong thực phẩm, sinh vật hại, cỏ dại.

<sup>2</sup> Định nghĩa ‘dịch hại’ được sử dụng để chỉ các động vật chân đốt, vi sinh vật và tuyến trùng gây hại cho thực vật và sản phẩm thực vật.

---

tạo điều kiện cho việc xác định những thông tin cụ thể về tình trạng dịch hại của một sản phẩm chuẩn bị xuất khẩu.<sup>3 4</sup>

- Điều khoản 6.3 trong Hiệp định SPS ghi rõ ‘Nếu các thành viên có hàng hóa xuất khẩu tuyên bố rằng những khu vực trong lãnh thổ của họ là những khu vực không có hoặc ít sâu bệnh thì sẽ phải đưa ra các bằng chứng cần thiết để chứng minh một cách khách quan cho các thành viên nhập khẩu rằng khu vực đó không có hoặc ít sâu bệnh. Để thực hiện được điều này, các thành viên xuất khẩu sẽ phải tạo điều kiện cho các thành viên nhập khẩu thanh tra, kiểm tra hay thực hiện các thủ tục liên quan nếu họ yêu cầu’.
- Phụ lục B, mục 3(b) trong Hiệp định SPS ghi rõ ‘mỗi thành viên đều phải bảo đảm rằng mọi thách thức hợp lý mà các thành viên đối tác đưa ra đều phải được trả lời thỏa đáng và phải cung cấp cho đối tác các tài liệu liên quan đến: (b) các biện pháp phòng trừ, giám sát, xử lý sản xuất và kiểm dịch; khả năng kháng thuốc của dịch hại và các thủ tục được áp dụng trong lãnh thổ đó’.

Để đáp ứng các quy định trên, để có thể thực hiện công tác đánh giá nguy cơ dịch hại và đưa ra các điều lệ về kiểm dịch thực vật với mục đích ngăn ngừa sự xâm nhập và lây lan của vi sinh vật gây hại, các nước cần phải duy trì công tác lưu trữ hồ sơ dịch hại.

Theo Tiêu chuẩn Quốc tế về biện pháp kiểm dịch động thực vật (ISPM) số 8<sup>5</sup>, ‘việc cung cấp hồ sơ dịch hại tin cậy và việc xác định tình trạng dịch hại là không thể thiếu trong hàng loạt các hoạt động được đề cập trong IPPC cũng như các nguyên tắc được đề cập trong ISPM số 1: *Nguyên tắc kiểm dịch thực vật trong thương mại Quốc tế*’.

ISPM 8 ghi rõ:

‘Tất cả các nước đều có thể sử dụng các thông tin về tình trạng dịch hại cho các mục đích sau:

- Các mục đích đánh giá nguy cơ dịch hại;
- Lập kế hoạch cho các chương trình quản lý dịch hại trong phạm vi một quốc gia, trong khu vực hay trong phạm vi Quốc tế;
- Xây dựng các danh mục dịch hại của Quốc gia;
- Xây dựng và duy trì các khu vực sạch sâu bệnh’.

Để phát huy hết quyền lợi trong tự do thương mại của WTO, các nước cần phải tuân thủ mọi điều kiện trong Hiệp định SPS do IPPC và WTO đề ra. Nếu như dịch vụ kiểm dịch thực vật nhằm mục đích đánh giá nguy cơ lây lan dịch hại trong hàng hóa thương mại thì việc xây dựng cơ sở hạ tầng tốt, làm nền tảng cho công tác bảo vệ thực vật là vô cùng cần thiết.

---

<sup>3</sup> Công ước Bảo vệ thực vật Quốc tế, 1997: Điều VII: Hợp tác Quốc tế: 1. “Các tổ chức tham gia hợp đồng phải hợp tác chặt chẽ trong phạm vi có thể để thực hiện mục tiêu của Công ước, đặc biệt là... c) hợp tác trong phạm vi có thể để cung cấp các thông tin kỹ thuật và sinh học cần thiết cho việc đánh giá nguy cơ dịch hại.”

<sup>4</sup> ISPM 11, Đánh giá nguy cơ dịch hại đối với dịch hại kiểm dịch, 1.2 Thông tin: “Việc cung cấp thông tin chính thức liên quan đến tình trạng dịch hại là quy định bắt buộc theo IPPC (Điều VIII.1c) mà các đối tác phải thực hiện (Điều VIII.2).”

<sup>5</sup> ISPM 8, Xác định tình trạng dịch hại trong một khu vực, IPPC, FAO, Tháng 11, 1998.

---

## 1.2 TÌNH TRẠNG LƯU GIỮ MẪU SINH HỌC Ở CÁC NƯỚC ASEAN

Năm 2001-2002, Tổ chức hỗ trợ phát triển Quốc tế Australia (AusAID) đã tài trợ cho công việc bước đầu của chương trình với mục đích đánh giá lại tình trạng lưu giữ sinh vật hại và mẫu tiêu bản bệnh cây ở các nước trong khối ASEAN. Công việc này bắt nguồn từ một quyết định được thông qua tại cuộc họp lần thứ hai của Ủy ban điều hành Hội thiết lập và điều hành mạng lưới khu vực ASEAN (ASEANET<sup>6</sup> LOOP) tổ chức năm 2000. Các đại biểu tại cuộc họp đã tán thành ý kiến về việc xây dựng báo cáo về các bảo tàng (phòng) lưu giữ sinh vật ở các nước thành viên.

Tác giả của các bản báo cáo về tình trạng lưu giữ tiêu bản dịch hại ở các nước ASEAN đều nhận xét rằng trong phạm vi dù lớn hay nhỏ, không một nước nào trong khu vực có khả năng mô tả đầy đủ về tình trạng sức khỏe nền nông nghiệp của mình. Vấn đề là ở chỗ, trong phạm vi lớn hơn, số lượng tiêu bản bệnh cây trong các phòng mẫu bệnh trong khu vực quá nhỏ. Số lượng tiêu bản côn trùng trong các phòng lưu giữ tiêu bản lớn hơn nhiều so với số lượng tiêu bản bệnh cây. Các nhà côn trùng học nhìn chung cũng thông thạo với công việc bảo quản tiêu bản và quản lý mẫu hơn là các nhà bệnh cây.

## 1.3 TẦM QUAN TRỌNG CỦA VIỆC LƯU GIỮ HỒ SƠ TIÊU BẢN

Các nguồn thông tin về sự tồn tại của một sinh vật hại rất nhiều và sẵn có với độ tin cậy khác nhau. Tuy nhiên, trong phạm vi thương mại Quốc tế, hồ sơ lưu trữ dựa trên các tiêu bản được xác nhận trong các phòng mẫu đạt tiêu chuẩn là nguồn thông tin đáng tin cậy nhất về tình trạng sức khỏe thực vật của một nước. **Hồ sơ** dịch hại bao gồm mẫu tiêu bản và dữ liệu đi kèm tiêu bản gồm có: địa điểm lấy mẫu, ngày lấy mẫu, người lấy mẫu, ký chủ và đặc tính của vi sinh vật hại. Các phòng mẫu bệnh hoạt động tốt bao giờ cũng có rất nhiều mẫu khác nhau của cùng một loài từ các ký chủ khác nhau, từ các khu vực địa lý và sản xuất nông nghiệp khác nhau. Các mẫu tiêu bản có thể được kiểm tra lại để xác định lại kết quả giám định hoặc để có được các thông tin chính xác hơn về điều kiện lấy mẫu và về phân bố của bệnh. Mặt khác, các **báo cáo** được xuất bản (công bố) mà không có mẫu tiêu bản bệnh làm chứng đều không có giá trị và còn là một cản trở cho thương mại nông nghiệp. Các báo cáo không đúng sự thật sẽ có thể gây khó khăn, tốn thời gian và tiền của để bác bỏ yêu cầu của đối tác thương mại sau này. Tiêu bản và các mẫu vật khác trong phòng mẫu sinh học là vũ khí đặc lực trong việc trợ giúp tiếp cận thị trường và để giải thích cho việc thực hiện các biện pháp ngăn ngừa sự xâm nhập của sinh vật hại từ ngoài vào.

---

<sup>6</sup> ASEANET là Hội thiết lập và điều hành mạng lưới BioNET Quốc tế trong khu vực Đông Nam Á, đây là một tổ chức hoạt động dựa trên sự hợp tác trong khu vực để tăng cường sự tự lực trong phân loại học sinh vật.

---

## 1.4 XÂY DỰNG VÀ PHÁT TRIỂN CÔNG TÁC LƯU GIỮ MẪU BỆNH CÂY Ở CÁC NƯỚC ASEAN

Nếu các nhà khoa học và những người công tác trong lĩnh vực bệnh cây hiểu được sự cần thiết phải gửi mẫu bệnh vào các phòng thí nghiệm được chỉ định thì việc xây dựng các phòng mẫu bệnh ở các nước Đông Nam Á sẽ dễ dàng hơn. Chính phủ Australia đã ưu tiên trợ giúp tổ chức các hội thảo nhỏ bao gồm các nhà bảo vệ thực vật để giải thích tầm quan trọng của việc lưu giữ mẫu sinh học trong mối liên quan với thương mại và vai trò của các nhà bảo vệ thực vật trong việc phát triển công tác này. Thêm vào đó, các chương trình đào tạo dành cho những người làm công tác bệnh cây cũng được tổ chức để bảo đảm rằng họ biết cách bảo quản mẫu và vận chuyển mẫu tới các phòng lưu giữ được chỉ định. Cuốn cẩm nang này chứa đựng những thông tin cần thiết để giúp cho tất cả những người làm công tác bệnh cây thực hiện trách nhiệm của họ trong việc xây dựng và phát triển bảo tàng Quốc gia về mẫu bệnh cây và mẫu vi sinh vật hại, cũng như cung cấp các tài liệu cần thiết cho những người quản lý bảo tàng.

---

## 2 LƯU GIỮ MẪU BỆNH HẠI THỰC VẬT

### 2.1 BẢO TÀNG MẪU

Bảo tàng mẫu là nơi lưu giữ các mẫu tiêu bản sinh học đã chết, khô, được ép hoặc các mẫu thực vật và nấm đã được xử lý bảo quản dài hạn, tất cả các mẫu tiêu bản đều phải có thông tin đi kèm. Đa số bảo tàng mẫu sinh vật chỉ dành một phần nhỏ để lưu trữ tiêu bản nấm và bệnh cây trong khi chỉ một số ít bảo tàng mẫu chuyên lưu trữ nấm và bệnh cây. Thực tế các bảo tàng bệnh cây đều có chức năng như hai bảo tàng, đó là lưu trữ tiêu bản thực vật bị bệnh và lưu trữ vi sinh vật gây bệnh như nấm, vi khuẩn, virus, viroid, tuyến trùng, phytoplasma và vi sinh vật có dạng vi khuẩn ký sinh nội bào.

Bảo tàng nấm và các thông tin được lưu trữ trong bảo tàng là đối tượng sử dụng của các nhà phân loại học, các nhà nấm học, các nhà bệnh cây, các nhà khoa học về bảo vệ thực vật, các cán bộ kiểm dịch, các nhà sưu tầm sinh vật và những người hoạch định chính sách trong rất nhiều lĩnh vực bao gồm cả việc duy trì an ninh sinh học và đa dạng sinh học. Tất cả các bảo tàng được chính thức công nhận trên thế giới đều có tên viết tắt, ví dụ Bảo tàng Bogoriense (**BO**) và bảo tàng CABI Bioscience, Trung tâm UK (**IMI**). Mỗi tiêu bản trong một bộ sưu tầm đều được đánh số thứ tự, đứng trước các số thứ tự là tên viết tắt của bảo tàng. Nếu biết số truy nhập của một tiêu bản ta có thể tìm ra nơi lưu giữ tiêu bản đó với sự trợ giúp của cuốn ‘Danh mục tra cứu các bảo tàng’ (*Index Herbariorum*). Cuốn sách chứa đựng thông tin về hơn 3.000 bảo tàng trên thế giới và hơn 9.000 nhân viên làm công tác lưu giữ trong các bảo tàng này. Danh mục tra cứu này có thể được truy cập qua mạng internet qua địa chỉ [<http://sciweb.nybg.org/science2/IndexHerbariorum.asp>] và các thông tin có thể được tìm kiếm từ các thông số như: tên cơ quan, tổ chức, tên viết tắt, tên nhân viên, chuyên ngành nghiên cứu. Cuốn danh mục tra cứu *Index Herbariorum* là kết quả của một dự án hợp tác giữa Hiệp hội phân loại thực vật Quốc tế và Vườn thực vật New York.

### 2.2 BỘ SƯU TẬP VI SINH VẬT

Bộ sưu tập vi sinh vật sẽ lưu giữ các mẫu nấm và vi khuẩn còn sống ở trạng thái ổn định cho đến khi được sử dụng ở những lần sau. Có nhiều cách bảo quản mẫu vi sinh vật khác nhau từ cách liên tục cấy truyền cho tới những phương pháp làm giảm hoặc gián đoạn quá trình trao đổi chất.

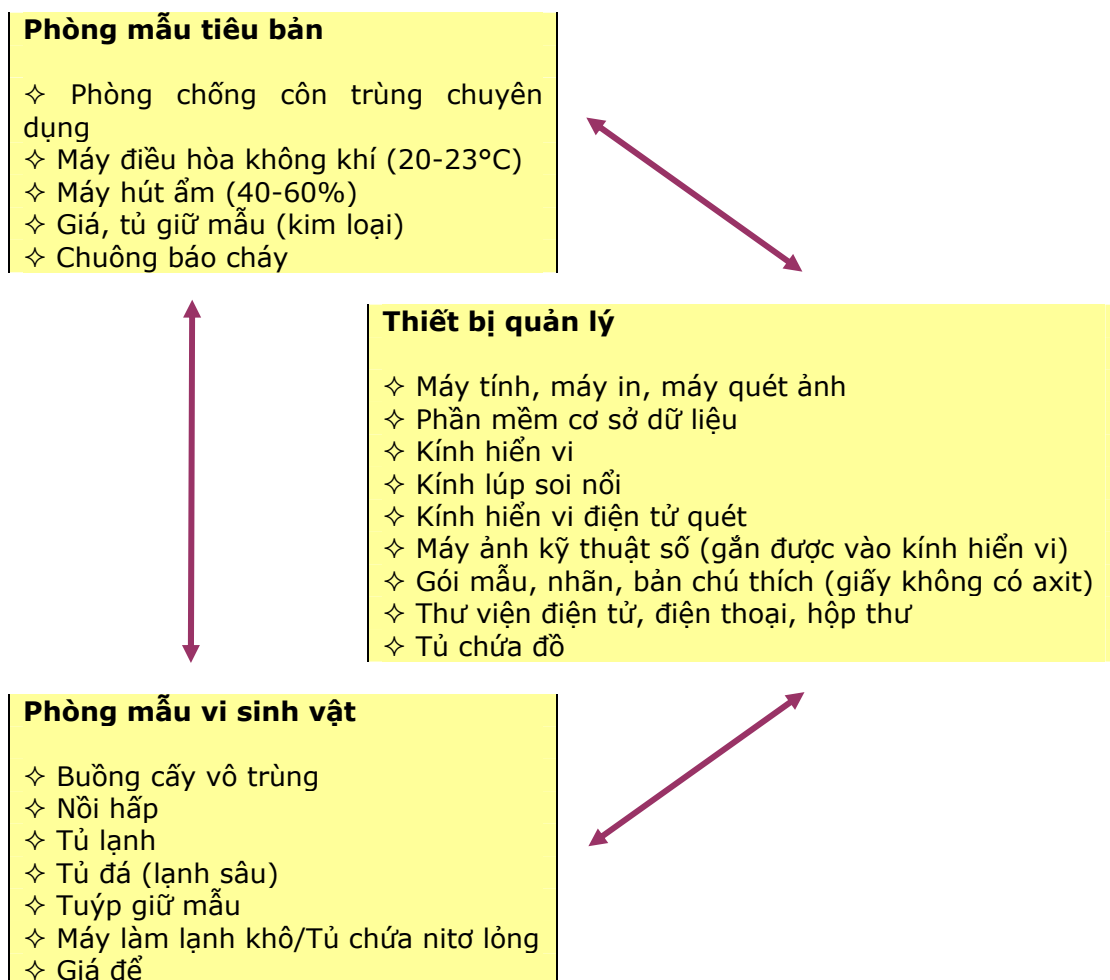
Hiệp hội lưu giữ mẫu vi sinh vật thế giới (WFCC) [[www.wfcc.info](http://www.wfcc.info)] đóng một vai trò vô cùng quan trọng trong việc lựa chọn, duy trì, mức độ chính xác và sự phân bố của các mẫu vi sinh vật cũng như mẫu tế bào sinh vật. Mục đích của liên đoàn là thúc đẩy và hỗ trợ việc xây dựng các bộ sưu tầm mẫu vi sinh vật và các dịch vụ có liên quan, là cầu nối thiết lập mạng thông tin giữa các trung tâm lưu giữ và những người sử dụng để bảo đảm sự tồn tại lâu dài của các trung tâm này. WFCC đã xây dựng một hệ thống dữ liệu mẫu vi sinh vật với phạm vi toàn cầu. Hệ thống cơ sở dữ liệu này được duy trì tại Viện di truyền Quốc gia ở Nhật Bản và lưu trữ thông tin của gần như 500 bộ sưu tập từ 62 nước khác nhau. Các thông tin được lưu giữ bao gồm tên các tổ chức, cách quản lý, dịch vụ và những dẫn liệu khoa học của các bộ sưu tập. Hệ thống cơ sở dữ liệu này đã hình thành một nguồn thông tin quan trọng cho tất cả

các hoạt động liên quan đến vi sinh vật và cũng đóng vai trò trung tâm cho các hoạt động về dữ liệu của các thành viên WFCC.

### 2.3 XÂY DỰNG BỘ MẪU BỆNH CÂY

Các tiêu bản được lưu giữ trong bảo tàng mẫu và các bộ sưu tập vi sinh vật là hoàn toàn khác nhau. Bảo tàng mẫu lưu giữ các tiêu bản chết trong khi bộ sưu tập mẫu vi sinh vật lưu giữ các vi sinh vật còn sống. Các nhà bệnh cây cần phải làm việc với cả hai loại mẫu (mẫu cây đã chết và mẫu vi sinh vật còn sống). Thông thường mỗi bảo tàng bệnh cây đều có lưu giữ một bộ sưu tập vi sinh vật. Ở một số nơi, hai nhóm khác nhau hoạt động trong cùng một tổ chức hoặc thậm chí hai tổ chức khác nhau trong cùng một Quốc gia đảm trách hai bộ sưu tập riêng rẽ. Giải pháp lý tưởng nhất là ở bất cứ vùng nào hay một Quốc gia nào cũng nên có mối quan hệ chặt chẽ giữa bảo tàng mẫu bệnh và bộ sưu tập mẫu vi sinh vật gây bệnh.

Những trang thiết bị cơ bản cần thiết cho một phòng mẫu tiêu bản và mẫu vi sinh vật hại được đưa ra ở Hình 1. Các trang thiết bị văn phòng có thể được dùng chung cho cả hai ví dụ như chương trình quản lý dữ liệu tiêu bản.



Hình 1 Trang thiết bị cần thiết cho việc xây dựng một phòng tiêu bản và mẫu vi sinh vật

## 2.4 DANH MỤC DỊCH HẠI

Danh mục dịch hại là tập hợp các sinh vật gây hại trên một ký chủ cụ thể tại một nước hoặc một khu vực nhất định. Ngoài những thông tin liên quan đến tình trạng sức khỏe cây nông nghiệp, cây lâm nghiệp, nguồn gốc (bản xứ hay du nhập), danh mục dịch hại có tầm quan trọng đặc biệt, nhất là đối với các nước đang tìm kiếm thị trường nước ngoài để xuất khẩu hàng hóa.

Những danh mục dịch hại đáng tin cậy nhất là những danh mục đã được xác định và có mẫu tiêu bản đi kèm, những danh mục dịch hại được xây dựng trên cơ sở các báo cáo, tài liệu được xuất bản mà không có tiêu bản đi kèm được coi là không có độ tin cậy cao. Mức độ tin cậy còn phụ thuộc vào kỹ năng của người lấy mẫu và người giám định, phương pháp giám định và danh tiếng của tạp chí đăng tải. Những bài mà tác giả là các nhà phân loại học và được xuất bản trên các tạp chí chuyên ngành thế giới chắc chắn sẽ đáng tin cậy hơn các bài không được đăng trên các tạp chí chuyên ngành (Hình 2).

### Nguồn thông tin sắp xếp theo độ tin cậy

1. Bộ sưu tập dịch hại thuộc Bộ Nông nghiệp, các trường, viện nghiên cứu.
2. Tài liệu tham khảo chủ yếu: các tạp chí khoa học, các bài báo công bố các công trình nghiên cứu, sách, báo cáo kiểm dịch, báo cáo từ các cơ quan về sức khỏe thực vật và kiểm dịch thực vật.
3. Tài liệu tham khảo thứ yếu: trích yếu bảo vệ thực vật của CABI.
4. Tài liệu liên quan khác: cẩm nang, tài liệu hội thảo, đánh giá nguy cơ dịch hại.
5. Các nguồn thông tin: thảo luận với các chuyên gia trong và ngoài nước, các bài báo phổ thông, thông tin qua mạng (internet).

### Hình 2 Nguồn thông tin giúp cho việc xây dựng danh mục dịch hại xếp theo thứ tự tin cậy

Các thông tin được đưa vào danh mục dịch hại phụ thuộc vào nhu cầu của người sử dụng. Những thông tin gì là cần thiết? Mục đích sử dụng thông tin? Hình 3 là ví dụ về một danh mục dịch hại bao gồm tên đầy đủ của các vi sinh vật gây bệnh trên 1 ký chủ và tên thường gọi của bệnh.

### CARICACEAE

#### *Carica papaya* L. (đu đủ)

*Alternaria tenuis* Nees – Đốm vỏ quả.

*Ascochyta caricae* Pat. – Đốm đen.

*Botryosphaeria rhodina* (Berk. & M.A. Curt.) Arx – Thối quả.

*Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds – Thán thư trên quả.

*Corynespora cassiicola* (Berk. & M.A. Curt.) C.T. Wei – Đốm lá.

*Glomerella cingulata* (Stoneman) Spauld. & H. Schrenk – Đốm quả chín.

*Macrophomina phaseolina* (Tassi.) Goid. – Thắt ngang thân.

*Phytophthora cinnamomi* Rands – Thối rễ.

*Sclerotium rolfsii* Sacc. – Chết rạp cây con.

*Thanatephorus cucumeris* (A.B. Frank) Donk – Chết rạp cây con.

*Verticillium dahliae* Kleb. – Chết héo.

### Hình 3 Ví dụ về danh mục dịch hại trên cây đu đủ



---

Danh mục dịch hại được xây dựng từ các công tác:

- Quan sát;
- Lấy mẫu;
- Bảo quản mẫu trong điều kiện phù hợp;
- Điều tra có kế hoạch tất cả các nông sản và các khu vực có liên quan;
- Hợp tác với các tổ chức khác;
- Việc lưu giữ các bộ sưu tập phải đáp ứng các tiêu chuẩn Quốc tế về kiểm dịch thực vật (tiêu chuẩn 8) (ISPM 8).

Từ xưa đến nay, việc xây dựng danh mục dịch hại thường gặp nhiều khó khăn do việc tiếp cận thông tin từ các phòng tiêu bản rải rác ở các cơ quan, tổ chức khác nhau trong đó có:

- Các Bộ Nông, Lâm nghiệp trực thuộc Quốc gia;
- Các bảo tàng lịch sử tự nhiên;
- Các viện nghiên cứu nông nghiệp chuyên ngành;
- Các nhà khoa học làm công tác nghiên cứu và các viện hàn lâm.

Các thông tin lưu trữ trong các phòng tiêu bản bệnh cây có tầm quan trọng đặc biệt. Vì vậy, việc xây dựng hệ thống cơ sở dữ liệu điện tử để người sử dụng có thể truy cập dễ dàng là việc làm hết sức cần thiết. Hệ thống công nghệ thông tin hiện nay lại sẵn có, tạo điều kiện cho việc tìm tiêu bản và thông tin lưu trữ một cách nhanh chóng và thuận lợi. Chi phí cho phần mềm thấp, tuy nhiên chi phí cho việc nạp thông tin và dữ liệu lại tốn kém hơn. Việc nạp cơ sở dữ liệu là vấn đề khá phổ cập trong giai đoạn đầu của việc xây dựng hệ thống cơ sở dữ liệu, vì vậy các cơ quan làm công việc này đòi hỏi phải làm việc liên tục và cập nhật thông tin thường xuyên. Một vấn đề đáng lưu tâm nữa là số lượng và chất lượng của các thông tin cơ bản. Ở đa số các nơi, công việc giám định, phân loại chiếm phần lớn bao gồm việc kiểm tra lại các kết quả giám định và ghi chép trước đây cũng như giám định các mẫu gửi đến mà chưa được phân loại. Các nước cần phải thiết lập một hệ thống tiêu chuẩn dữ liệu tối thiểu cho các hồ sơ dịch hại để đáp ứng các tiêu chuẩn Quốc tế do IPPC (ISPM 8) đề ra. ISPM 8 liệt kê các thông tin cơ bản cần thiết để xây dựng một hồ sơ dịch hại (Hình 4).

#### **Hồ sơ dịch hại bao gồm những gì?**

1. Tên khoa học của dịch hại (chi, loài, dưới loài)
2. Trạng thái hoặc giai đoạn của vòng đời
3. Nhóm phân loại
4. Phương pháp phân loại (bao gồm cả tên người phân loại)
5. Ngày lấy mẫu (bao gồm cả tên người lấy mẫu)
6. Thông tin chi tiết về nơi lấy mẫu
  - a. Địa điểm (thành phố & bang, huyện, tỉnh)
  - b. Nước
  - c. Thông tin về GPS (kinh độ & vĩ độ)
7. Tên khoa học của ký chủ (chi, loài, dưới loài)

- 
- |  |
|--|
| 8. Tình trạng bị hại của ký chủ<br>9. Tình trạng phổ biến của bệnh<br>10. Tài liệu tham khảo |
|--|

**Hình 4** Thông tin cần thiết cho một hồ sơ dịch hại, được xây dựng dựa trên ISPM 8

Hầu hết các nước không có trung tâm lớn lưu giữ các thông tin về tình trạng sức khỏe cây trồng bởi vì các phòng lưu giữ mẫu và hồ sơ dịch hại thường phân bố rải rác ở rất nhiều các cơ quan khác nhau. Điều này ảnh hưởng tới sự nhất quán của thông tin lưu giữ và chất lượng thông tin lưu giữ vì mỗi nơi có sự ưu tiên khác nhau đối với đối tượng lưu giữ. Cùng với sự phát triển gần đây về công nghệ thông tin, chúng ta có thể khắc phục được tình trạng tồn tại này. Công nghệ lưu trữ cơ sở dữ liệu bằng hệ thống máy tính tạo điều kiện cho các hệ thống quản lý dữ liệu ở các địa điểm xa nhau có thể nối kết được với nhau, vì vậy mà tất cả các điểm đều có thể truy cập được hệ thống mạng cơ sở dữ liệu. Có thể nói rằng sự phát triển của công nghệ đã giúp cho việc xây dựng một hệ thống cơ sở dữ liệu duy nhất ở cấp Quốc gia hoặc cấp khu vực, thông qua hệ thống này thông tin có thể được cập nhật thường xuyên ở cấp cơ sở. Hồ sơ bệnh hại được tiếp cận thông qua một trang chủ trên hệ thống internet và một số thông tin chỉ những người liên quan mới có thể truy cập được (thông qua mã khóa bảo vệ). Thông qua hệ thống này, người sử dụng có thể cung cấp các thông tin liên quan đến danh mục loài, phân bố và ký chủ.

Một hệ thống cơ sở dữ liệu có khả năng thu thập và tổng hợp dữ liệu về sức khỏe cây trồng từ rất nhiều tổ chức khác nhau với điều kiện là:

- Các cơ quan làm công tác lưu giữ mẫu sinh vật hại phải lưu giữ hồ sơ mẫu bệnh trong các hệ thống cơ sở dữ liệu điện tử kết nối với mạng internet.;
- Có khả năng phát triển và điều chỉnh các 'gateway' (cổng) hoặc 'broker' chuyên dụng mà các phần mềm cần để kết nối với các nguồn thông tin cơ sở dữ liệu khác nhau;
- Các cơ quan phải sẵn lòng chia sẻ thông tin và cam kết duy trì phòng lưu giữ của họ như một thành viên của hệ thống mạng dữ liệu (bao gồm cả việc đáp ứng các tiêu chuẩn Quốc tế).

---

### 3 XÂY DỰNG BỘ SƯU TẬP MẪU BỆNH

#### 3.1 NGUỒN MẪU

Nguồn tiêu bản chủ yếu trong các phòng mẫu bệnh cây được cung cấp bởi các nhà bảo vệ thực vật làm việc tại các phòng thí nghiệm chẩn đoán bệnh hại thuộc các viện và các cơ quan nghiên cứu trực thuộc Bộ. Các mẫu bệnh, sau khi được thu thập từ các cuộc điều tra ngoài đồng, thường được đưa đến các phòng thí nghiệm giám định. Tại đây, các nhà khoa học sẽ xem xét có nên lưu lại những mẫu bệnh này hay không. Bất cứ mẫu bệnh nào đại diện cho 1 vi sinh vật lần đầu tiên được phát hiện tại một địa điểm mới hay trên một ký chủ mới đều phải được gửi đến một trong các phòng lưu giữ mẫu bệnh có uy tín. Đa số phòng lưu giữ mẫu bệnh đều có đội ngũ nhân viên có thể xác định được các nhóm vi sinh vật hại khác nhau.

Cán bộ và sinh viên tại các trường đại học và các cơ quan nghiên cứu cũng là những người thường cung cấp mẫu cho các phòng lưu giữ mẫu bệnh cây. Hơn nữa, tất cả các công trình nghiên cứu khi được xuất bản trên các tạp chí, sách đều phải liệt kê ít nhất tên một phòng lưu giữ mẫu bệnh nơi họ gửi mẫu đến. Những mẫu tiêu bản này được sử dụng để kiểm tra và nhận dạng các vi sinh vật hại thu thập từ các cuộc điều tra và các công trình nghiên cứu về sinh thái, dịch hại, di truyền tiến hóa, hình thái, phân tử.

Ngoài ra, số lượng mẫu cũng được tăng thêm khi được cấy truyền và làm khô để trao đổi giữa các phòng lưu giữ mẫu. Việc tặng, biếu, mua bán mẫu cũng là một hình thức làm tăng số lượng mẫu trong một phòng lưu giữ mẫu. Sự chuyển nhượng sở hữu giữa các phòng lưu giữ mẫu do không đủ khả năng duy trì cũng là một việc đáng khích lệ để bảo vệ các bộ sưu tập mẫu bệnh có giá trị.

#### 3.2 THU THẬP MẪU BỆNH NGOÀI ĐỒNG RUỘNG

Hầu hết các mẫu tiêu bản trong một phòng lưu giữ vi sinh vật hại đều được thu thập từ đồng ruộng hoặc môi trường ngoài tự nhiên. Các cây bệnh đều được xác định nhờ các triệu chứng và dấu hiệu đặc trưng. Triệu chứng là những thay đổi bên ngoài của cây hoặc các bộ phận của cây bị nhiễm bệnh mà mắt thường có thể nhìn thấy được (Bảng 1). Triệu chứng xuất hiện do thực vật bị suy giảm khả năng quang hợp, sinh sản, hút nước hoặc trao đổi chất.

---

Triệu chứng	Mô tả
Thán thư	Vết hoại sinh màu đen do <i>Colletotrichum</i> gây ra
Muội đen	Các tản nấm ký sinh đen và dày đặc(Meliolales), thường xuất hiện trên bề mặt lá cây nhiệt đới.
Chết lụi	Mô bệnh bị chết, lan rộng rất nhanh.
Loét	Vết hoại sinh, thường lõm xuống trên thân gỗ, cành hoặc rễ.
Chết rạp cây con	Cây con bị gãy và thối ở điểm tiếp giáp với mặt đất trước hoặc ngay

Triệu chứng	Mô tả
	sau khi nảy mầm do nấm <i>Pythium</i> hoặc <i>Rhizoctonia</i> gây ra.
Khô cành	Rụng lá, chết cành thậm chí chết toàn bộ cây
Sương mai	Phần màu hơi trắng xuất hiện trên bề mặt lá và thân cây do sự xuất hiện của bọc bào tử và bào tử động của các loài thuộc bộ Peronosporales.
Biến dạng lá, hoa	Hiện tượng mô cây chủ sinh trưởng nhanh và không bình thường, kéo dài từ gân, đặc biệt là trên lá và hoa
Biến dạng chồi	Chồi bị phân ly thành từng bó chồi nhỏ cong hoặc xoắn.
Nốt sung	Hiện tượng sùng lên hoặc tạo thành u không bình thường
Chảy gôm	Chảy nhựa từ mô ký chủ.
Vết đốm	Các vết thương hoặc mô bệnh xác định.
Khảm	Sự biến đổi màu sắc từng khoảng xanh đậm, nhạt trên lá. Đây là triệu chứng của rất nhiều bệnh do virus gây ra.
Hóa lá	Hoa biến tính thành dạng cấu trúc giống như lá.
Phấn trắng	Hiện tượng các sợi nấm, cành bào tử phân sinh và bào tử phân sinh xuất hiện trên bề mặt cây có dạng bột màu trắng, nấm phấn trắng thuộc bộ Erysiphales.
Mụn sùi	Các bọc mọng nước, khi vỡ giải phóng ra nấm.
Nốt sùng	Các nốt sùng xuất hiện ở rễ do những loài tuyến trùng nhất định ( <i>Meloidogyne</i> ) gây nên.
Thối	Mô thực vật bị mềm và phân rã do enzyme của vi sinh vật hại sản sinh ra (có thể cứng, mềm, khô, ướt, đen hoặc trắng).
Gỉ sắt	Các khối bào tử do nấm gỉ sắt thuộc bộ Uredinales sản sinh ra.
Sẹo	Khu vực bị bệnh sần sùi, thô ráp, giống như có một lớp vỏ cứng.
Vết bong	Mô trông giống như bị gội nước nóng.
Thủng lá	Triệu chứng bệnh trên lá, các mô giữa vết bệnh rơi rụng tạo thành những lỗ hổng trên lá cây.
Than đen	Các khối bào tử trên lá, trên thân và hoa do nấm than đen ( <i>Ustilaginomycetes</i> ) gây ra.
Mốc đen	Các đám màu đen trên lá và thân của nấm hoại sinh bề mặt (thường là Capnodiales) sống nhờ các chất tiết ra từ côn trùng (thường là rệp).
Lục hóa	Các bộ phận của cây bị biến đổi thành màu xanh, đặc biệt là hoa.
Héo	Hiện tượng cây mất tính trương, các bộ phận của cây rũ xuống.
Chồi rỗng	Sự phân ly mạnh của chồi và mầm rất gần nhau hoặc tại cùng một điểm.

**Bảng 1 Một số triệu chứng bệnh thường gặp**

Dấu hiệu của bệnh là sự có mặt của các vi sinh vật dưới các dạng khác nhau, ví dụ như dạng quả thể mà mắt thường có thể nhìn thấy được. Một số dấu hiệu thường thấy của bệnh như sau:

- **Đĩa cảnh, cảnh bào tử phân sinh, quả cảnh:** các cấu trúc nấm nhỏ dạng quả thể sản sinh ra bào tử.
- **Đảm:** dạng quả thể của nấm đảm (nấm rỗ hoặc nấm mũ);
- **Thể sợi nấm:** khối sợi nấm;
- **Dịch tiết:** dịch lỏng và dính tiết ra từ vết thương hoặc các lỗ tự nhiên (khí khổng, bì khổng);
- **Sợi nấm dạng rễ:** các sợi nấm tập hợp bó lại giống như sợi dây (thường có màu tối).

### 3.3 THU THẬP VÀ XỬ LÝ MẪU BỆNH

Việc lựa chọn mẫu bệnh cho dù với mục đích giám định hay nghiên cứu về phân loại học đều phải hết sức cẩn thận. Thời điểm thu mẫu cây bệnh thích hợp nhất là ở giai đoạn đầu hoặc giữa của bệnh, khi vi sinh vật hại vẫn đang ở trạng thái hoạt động. Những mẫu bệnh bị nhiễm quá nặng thường không sử dụng được vì ở giai đoạn này vi sinh vật hại có thể không hoạt động nữa, thay vào đó là các vi sinh vật hoại sinh xâm nhập vào các mô bệnh đã chết hoại. Vì vậy, phân lập vi sinh vật hại từ các mẫu bệnh ở giai đoạn này thường rất khó. Việc lựa chọn vị trí lấy mẫu trên cây bệnh cũng rất quan trọng. Người thu thập mẫu bệnh cần phải có kiến thức cơ bản về triệu chứng bệnh và nguyên nhân gây bệnh để bảo đảm rằng mẫu lấy được có vi sinh vật hại. Trong một số trường hợp, triệu chứng có thể xuất hiện ở vị trí này của cây nhưng vi sinh vật hại thì có thể được tìm thấy ở vị trí khác. Ví dụ như bệnh héo: triệu chứng thường xuất hiện đầu tiên trên lá trong khi vi sinh vật gây bệnh lại ký sinh trong hệ thống mạch dẫn của rễ và thân. Một danh mục các dụng cụ cần thiết cho điều tra thu thập mẫu bệnh được trình bày ở hình 5.

<b>Dụng cụ</b>			
Kéo cắt cây	Cặp ép mẫu	Giấy báo	Nhãn
Kính lúp cầm tay	Bay, xẻng nhỏ	Túi giấy	Túi nilon
Kéo	Bút dạ	Phong bì	Bút chì
GPS	Cưa tay	Dao	Thùng đá
Bản đồ	Tài liệu tham khảo		

**Hình 5** Dụng cụ thường dùng để lấy mẫu bệnh

Một số nguyên tắc cần tuân theo khi thu thập và xử lý mẫu bệnh:

- Nhận dạng cây ký chủ. Nếu chưa xác định được tên cây ký chủ thì phải lấy mẫu cây khỏe, đặc biệt là hoa và quả. Người lấy mẫu phải bảo đảm rằng mẫu cây khỏe lấy về chính là cây ký chủ. Điều này đặc biệt quan trọng khi lấy mẫu bệnh than đen và một số bệnh phá hủy hoa của một số loài trong họ Hòa

---

thảo vì những bệnh này thường phát triển trên những tập đoàn ký chủ khác nhau.

- Sử dụng túi giấy để lấy giữ mẫu bệnh. Không bao giờ sử dụng túi nilon để giữ mẫu tươi vì mẫu vẫn có thể hô hấp, làm ẩm túi tạo điều kiện cho vi sinh vật hoại sinh xâm nhập và phát triển nhanh, phá hủy các mô thực vật. Túi nilon chỉ có thể được sử dụng để giữ các mẫu ướt trong thời gian ngắn.
- Đóng, gói mẫu cẩn thận để tránh va đập và hơi nước ngưng tụ. Bề mặt ẩm sẽ tạo điều kiện cho vi sinh vật hoại sinh phát triển, khiến cho mẫu bệnh không thể sử dụng được.
- Sử dụng bút chì để viết nhãn (mực sẽ không thích hợp vì có thể bị nhòe khi ẩm ướt).
- Xin các giấy phép cần thiết để thu thập và vận chuyển mẫu bệnh. Ở một số khu vực việc lấy mẫu sinh vật có thể bị hạn chế, ví dụ như ở các vườn Quốc gia hoặc ở các khu vực do tư nhân quản lý. Việc vận chuyển mẫu từ nước này sang nước khác có thể phải cần đến giấy phép xuất nhập khẩu và giấy phép kiểm dịch.

### 3.3.1 Đối với lá, thân và quả

Nên lấy mẫu lá có bề mặt khô ráo, nếu trong điều kiện mưa ẩm, bề mặt lá ướt thì có thể dùng giấy báo thấm khô trước khi kẹp mẫu giữa các lớp giấy báo hoặc các loại giấy thấm nước khác (không nên sử dụng giấy ăn vì khi ướt giấy ăn có thể tan rã ra và khó tách chúng ra khỏi mẫu lá). Khi ép và làm khô mẫu lá, cần chú ý rải lá ra sao cho không trùng lên nhau. Nếu lá dày và mọng nước, cần thay giấy báo hàng ngày cho đến khi lá khô hẳn.

Khi lấy mẫu thân cây bị bệnh cần lấy ở vị trí bao gồm cả mô khỏe và mô bệnh. Gói cẩn thận mỗi thân bệnh vào một tờ báo vì chúng rất dễ bị xây sát hoặc gãy khi được gói thành một bó chung.

Khi lấy mẫu quả mọng nước, thịt quả nhiều cần chọn những mẫu mới xuất hiện triệu chứng hoặc triệu chứng đang ở giai đoạn giữa của sự phát triển. Các vi sinh vật gây thối thứ yếu và hoại sinh thường xâm nhập quả ở giai đoạn cuối của sự phát triển bệnh, gây cản trở cho việc giám định vi sinh vật gây bệnh. Gói mỗi quả bệnh vào một tờ giấy báo riêng rẽ. Không dùng túi nilon để gói mẫu quả.

#### *Bệnh gỉ sắt và nấm than đen*

Khi lấy mẫu nấm gỉ sắt cần kiểm tra cả 2 mặt lá để tìm bào tử đông màu nâu đen và bào tử hạ màu vàng da cam. Nấm than đen thường phá hủy các bộ phận hoa của các loài trong họ Hòa thảo. Xác định đúng tên ký chủ là điều kiện cần thiết để giúp cho việc giám định nấm than đen, tuy nhiên việc xác định tên ký chủ đôi khi gặp khó khăn nếu hệ hoa bị phá hủy. Cần chú ý gói mẫu bệnh bằng giấy báo cẩn thận để bào tử nấm gỉ sắt và nấm than đen không bị rơi ra ngoài.

#### *Bệnh vi khuẩn*

Mô bệnh vi khuẩn thường bị phân rã rất nhanh, vì vậy khó thu thập và vận chuyển mẫu bệnh tới phòng thí nghiệm ở xa. Đặt mẫu bệnh vào túi giấy và dùng giấy báo ẩm

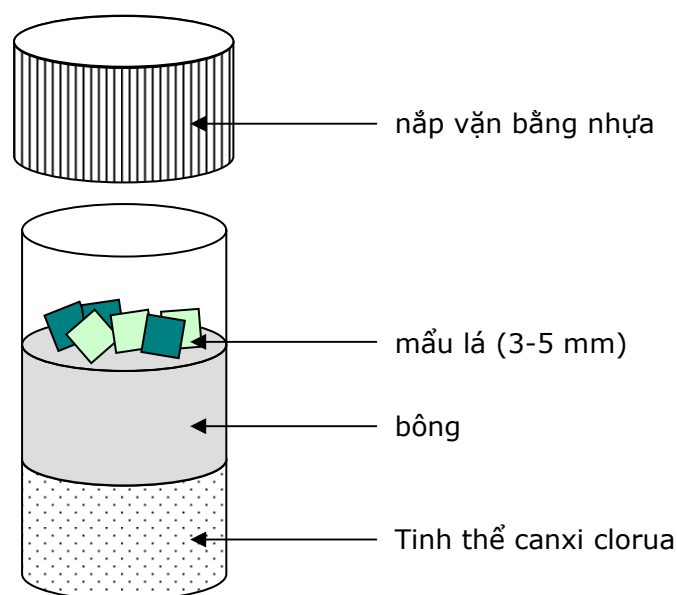
bọc lại để tránh cho mẫu khỏi bị khô. Nên giữ mẫu ở nơi mát mẻ, tránh ánh nắng mặt trời. Đối với mẫu đốm lá và tàn lụi do vi khuẩn, nên dùng giấy báo ép lại cho khô để lưu giữ. Nhiều vi khuẩn gây bệnh có thể sống sót hàng tháng, thậm chí hàng năm trong các mẫu khô ở nhiệt độ phòng.

#### *Bệnh virus*

Mẫu bệnh cây nghi ngờ nhiễm virus sau khi thu thập nên bảo quản tạm thời trong các lọ làm khô (Hình 6). Lọ làm khô có thể được làm bằng cách lấy một lọ nhựa, đổ tinh thể Clorua Canxi ( $\text{CaCl}_2$ ) khan vào đến 1/3 lọ, dùng bông phủ lên ngăn cách giữa các tinh thể Clorua Canxi và mẫu bệnh. Cách bảo quản mẫu này tốt nhất ở nhiệt độ 0–4°C, tuy nhiên cũng có thể áp dụng ở nhiệt độ môi trường.

Dùng kéo hoặc lưỡi dao để cắt lá. Nếu lá bị bụi bẩn hoặc côn trùng bám vào, có thể dùng nước hoặc cồn lau sạch trước khi cắt. Cắt lá thành từng mẫu nhỏ 3 - 5 mm, nên lấy ở gần phần giữa của phiến lá, sau đó đặt 5 - 10 mẫu lá vào một lọ làm khô. Lưỡi kéo hoặc dao phải được khử trùng bằng cồn hoặc dung dịch sodium hypochlorite ( $\text{NaOCl}$ ) 10% giữa các mẫu khác nhau để tránh bị tạp.

Ngoài cách xử lý mẫu như trên, có thể giữ mẫu bệnh virus trong túi nylon cùng với một ít giấy ẩm và giữ trong thùng đá cho đến khi đưa đến phòng thí nghiệm. Bằng cách này, lá cây vẫn tươi, giữ được sức trương cần thiết.



**Hình 6** Lọ làm khô mẫu nghi ngờ nhiễm virus.

### 3.3.2 Đối với rễ và đất

Thông thường các mô rễ hay các cấu trúc vi sinh vật hại ở vùng rễ thường rất mỏng manh. Không nên nhổ cây vì có thể làm đứt rễ, không lấy được phần rễ hay vi sinh vật hại, gây khó khăn cho việc giám định.

---

Lắc nhẹ để loại bỏ phần đất bám vào rễ, nếu có thể nên rửa rễ nhẹ nhàng (trong trường hợp định kiểm tra tuyến trùng thì không nên rửa). Trong đất có rất nhiều vi sinh vật hoại sinh xâm nhập vào các phần rễ đã chết hoặc đang chết, cản trở việc phân lập vi sinh vật gây bệnh. Khi loại bỏ đất khỏi rễ, không dùng bàn chải hoặc các vật dụng tương tự vì có thể làm mất các phần rễ quan trọng cho việc giám định. Bọc rễ trong giấy báo để vận chuyển đến phòng thí nghiệm.

Nên lấy mẫu đất đủ dùng cho việc phân tích rõ hơn về bệnh sau này. Tuy nhiên, hạn chế chủ yếu của việc lấy mẫu đất là chúng có thể khá nặng và cồng kềnh trong trường hợp điều tra lấy mẫu ở nhiều điểm. Khi xem xét có nên lấy mẫu đất hay không cũng nên tính đến thời gian và không gian cần thiết cho việc xử lý mẫu đất sau khi đem về.

Các vi sinh vật hại trong đất thường không phân bố đồng đều mà có xu hướng tập hợp thành từng nhóm trong điều kiện thích hợp hoặc xung quanh điểm xâm nhiễm trên cây ký chủ. Cách tốt nhất là nên lấy ngẫu nhiên một số mẫu đất. Kinh nghiệm cho thấy rằng mẫu thu thập được càng nhiều thì việc đánh giá tổng quan về bệnh càng chính xác.

Số lượng mẫu đất lấy ở từng điểm điều tra có thể khác nhau phụ thuộc vào điều kiện thực tế. Cách làm thông thường là ghi lại số lượng mẫu lấy, sau đó trộn lẫn vào nhau một cách kỹ lưỡng rồi từ đó lấy mẫu đại diện. Nếu lấy mẫu bệnh tuyến trùng, cần cẩn thận để khỏi va đập làm trầy xước tuyến trùng nằm trong đất.

Không nên lấy mẫu đất quá ướt hoặc quá khô. Đất lấy mẫu nên ở độ sâu ít nhất 5-10cm so với mặt đất vì đây là vùng rễ cây nên vi sinh vật hại tập trung nhiều nhất. Nếu triệu chứng bệnh tập trung thành từng đám trên khoảng ruộng thì nên lấy 2 mẫu đất riêng rẽ trên đám ruộng bị nhiễm nặng và đám ruộng không thể hiện triệu chứng để có thể so sánh. Mỗi mẫu đất nên lấy khoảng 250-300 g.

Nếu có thể nên lấy mẫu đất có chứa cả rễ cây, rễ có thể để lẫn trong đất hoặc để riêng. Đối với cây thân thảo, lấy khoảng 25-100 g rễ là đủ tùy thuộc vào loại cây, ví dụ đối với rau có thể lấy ít rễ (khoảng 25 g) trong khi đối với các loại cây có rễ to như chuối thì nên lấy nhiều hơn (khoảng 100 g). Đối với cây thân gỗ có thể phải đào sâu tới 30 cm gần gốc cây hoặc đào đến khi nhìn thấy đường ranh giới giữa mô khỏe và mô bệnh.

Mẫu đất nên giữ trong túi nilon và đặt nhãn giấy hoặc nhựa vào bên trong túi (ghi nhãn bằng bút chì nếu dùng nhãn giấy). Nên để mẫu nơi mát mẻ, tránh ánh nắng mặt trời. Giữ mẫu cẩn thận, gửi mẫu phân tích hoặc xử lý mẫu càng sớm càng tốt. Nếu điều kiện không thể gửi mẫu đi hoặc xử lý mẫu ngay thì nên bảo quản mẫu trong tủ lạnh tại 4 - 8 °C trong vài ngày mà không sợ mẫu bị hỏng.

### **3.3.3 Đối với nấm lớn**

Nấm lớn, đặc biệt là các loài thuộc bộ Agaricales rất dễ tìm khi điều tra nhưng lại là một trong những nhóm khó vận chuyển đến phòng thí nghiệm nhất. Vì vậy, nên chú ý lấy một số mẫu ở các giai đoạn sinh trưởng khác nhau của nấm. Không nên lấy mẫu nấm bằng cách nhổ lên, tránh làm gãy thân nấm khi lấy mẫu. Dùng dụng cụ đào



---

nấm để không làm hỏng phần gốc. Nên dùng giấy báo bọc từng cá thể riêng rẽ và đặt cẩn thận trong các hộp đựng sao cho nấm không bị nát.

Mẫu nấm lớn cần phải được làm khô càng nhanh càng tốt. Tùy từng trường hợp cụ thể có thể áp dụng một trong các cách sau:

- Sấy trong tủ sấy có quạt thông gió (45°C, qua đêm);
- Dùng máy sấy quả bằng điện;
- Dùng các nguồn năng lượng khác như: than củi, bếp ga, đèn dầu, dưới ánh nắng mặt trời.

Việc lấy dấu vết bào tử, đặc biệt là màu của chúng, có thể trợ giúp rất nhiều cho việc giám định, nhất là đối với các loài nấm lớn có bản mũ nấm (vách tia). Cách lấy dấu vết bào tử như sau: cắt lấy phần mũ nấm và đặt lên một tấm bìa màu trắng trong 15 phút đến một vài giờ (chú ý để mặt có bản mũ nấm ở dưới). Đặt một chiếc hộp không (đáy lên trên) sao cho luồng không khí bên ngoài không ảnh hưởng đến các dấu vết bào tử. Nếu nấm có bào tử màu trắng thì nên sử dụng bìa màu đen. Màu của bào tử cũng có thể được xác định từ các dấu vết bào tử, và ngược lại, nhờ có màu bào tử, dấu vết bào tử cũng hiện lên rõ hơn trên nền bìa.

### **3.4 CÁCH GHI PHIẾU ĐIỀU TRA MẪU BỆNH**

Những mẫu bệnh dù tốt đến mấy nhưng không ghi phiếu điều tra đầy đủ thì cũng coi như không có giá trị. Các thông số cần thiết phải ghi lại trên nhãn đi kèm mẫu bệnh bao gồm:

- Tên cây ký chủ và bộ phận cây bị nhiễm bệnh;
- Địa điểm chính xác nơi lấy mẫu, xã, thị xã/thị trấn, huyện, tỉnh, quốc gia (kinh độ/vĩ độ và độ cao nếu biết). Máy định vị vệ tinh (GPS) là phương tiện tốt nhất để xác định tọa độ. GPS có thể tìm kiếm các vệ tinh quay quanh quỹ đạo trái đất. Với 3 vệ tinh, GPS có thể tính toán chính xác kinh độ và vĩ độ. Với 4 vệ tinh, GPS có thể tính được độ cao so với mặt biển. GPS xác định được tọa độ, vì vậy giúp cho việc xây dựng bản đồ phân bố của vi sinh vật hại;
- Ngày lấy mẫu;
- Tên người lấy mẫu, đánh số mẫu;
- Triệu chứng bệnh và mức độ bệnh (ví dụ số cây bị nhiễm bệnh).

Tất cả các mẫu bệnh chuyển đến phòng mẫu đều phải ghi nhãn đầy đủ (Hình 7). Tên và địa chỉ liên lạc của người đưa mẫu cũng phải ghi lại. Giải thích lý do tại sao đưa mẫu đến, ví dụ với mục đích giám định hoặc lưu giữ.

## BRIP

Chi	Puccinia		
Loài	asparagi		
Chi ký chủ	Asparagus	loài	officinalis
Giống ký chủ	UC157		
Tên thương gọi	Asparagus		
Triệu chứng	reddish lesions on stems, some whole ferns had sporadic appearance of symptoms in block		
Người lấy mẫu	Christine Horlock and Lien-Heng Chen		
Ngày lấy mẫu	15 August 2003	Số hiệu mẫu	CMH 6093
Chu ruộng	Ian Neilson		
Địa điểm lấy mẫu	"Miandetta", Little Bridge Rd, approx 6 km east of Warwick		
Huyện	Warwick	Tỉnh (Bang)	QLD, Australia
Kinh độ	28° 16.368 S	Vĩ độ	152° 05.701 E
Ghi chú	Symptoms appear to indicate early and late infection, mainly urediniospores at this stage, some teliospores too.		

Hình 7 Ví dụ một nhãn lấy mẫu được sử dụng tại phòng lưu giữ mẫu bệnh BRIP

### 3.5 ĐIỀU TRA VÀ LẤY MẪU

Mục đích của các cuộc điều tra là xác định loại bệnh và mức độ gây hại của bệnh đến cây chủ. Điều tra bệnh cần thiết cho việc:

- Xác định phạm vi phân bố và tình trạng dịch hại trong một khu vực. Trước khi tham gia cung cấp hàng hóa cho các thị trường và xuất khẩu, những khu vực này phải được xác định xem có bệnh hại thuộc đối tượng kiểm dịch hay không;
- Xác định các bệnh quan trọng và hướng dẫn cách quản lý dịch hại để giúp cho định hướng công tác bảo vệ thực vật;
- Phát hiện các bệnh ngoại lai và các bệnh mới xuất hiện;
- Đánh giá thiệt hại do bệnh và xác định tình trạng sức khỏe cây trồng;
- Hiểu biết về đa dạng dịch hại;
- Xác định ký chủ chính;
- Đánh giá hiệu quả của các biện pháp phòng trừ;
- Xây dựng báo cáo về tình trạng dịch hại hiện tại và đối chiếu với thiệt hại về kinh tế;
- Phát hiện thiên địch tự nhiên.

Có hai dạng điều tra: điều tra định tính và điều tra điều tra định lượng. Điều tra định tính chỉ cần xác định xem một bệnh hại nào đó có xuất hiện hay không. Điều tra định

---

lượng xác định cả tỷ lệ bệnh và chỉ số bệnh liên quan đến mức độ thiệt hại cho cây ký chủ.

Điều tra phải chọn điểm đại diện cho khu vực và đủ lớn để bảo đảm mức độ chính xác. Phụ thuộc vào mục đích điều tra để chuẩn bị thiết bị, dụng cụ cũng như kỹ năng điều tra. Lượng thông tin thu thập và mức độ chính xác cũng phụ thuộc vào phạm vi điều tra.

Quy cách lấy mẫu cũng nên đơn giản, mang tính đại diện và bảo đảm độ tin cậy. Dựa vào các cuộc khảo sát sơ bộ trước khi tiến hành điều tra có thể giúp cho việc ước lượng trước số lượng mẫu lấy và ước tính mức độ bệnh hại với các số lượng mẫu lấy khác nhau. Từ việc so sánh các kết quả thu được trong các lần khảo sát, có thể lựa chọn số lượng mẫu lấy tối thiểu mà vẫn cho kết quả tin cậy về mức độ nhiễm bệnh.

Một điều quan trọng nên lưu ý là dù áp dụng phương pháp điều tra nào cũng nên tính đến sự phân bố của bệnh. Cây bị bệnh có thể phân bố rải rác, đồng đều hoặc thành từng cụm. Lấy mẫu theo phương pháp ngẫu nhiên thường cho kết quả tốt bởi vì rất nhiều bệnh phân bố thành từng cụm. Trong một số trường hợp, có thể phải điều tra với quy mô lớn hơn và hệ thống hơn.

Đối với các cuộc điều tra cụ thể, cần phải thu thập thêm thông tin để lên kế hoạch điều tra đạt hiệu quả cao nhất. Các yếu tố cần tính đến là thời gian tiến hành điều tra, giai đoạn sinh trưởng nào của cây trồng là thích hợp nhất cho việc thể hiện triệu chứng bệnh. Để biết thêm thông tin về cách tiến hành điều tra trong khu vực Châu Á Thái Bình Dương, có thể liên lạc với TS. Teresa McMaugh<sup>7</sup> tại Văn phòng chuyên viên bảo vệ thực vật cao cấp (OCPPO), Bộ Nông nghiệp, Thủy sản và Lâm nghiệp Australia (DAFF).

---

<sup>7</sup> TS. McMaugh đang điều hành việc xuất bản một cuốn cẩm nang về điều tra dịch hại ở Châu Á Thái Bình Dương (*Guidelines for Plant Pest Surveillance in Asia and the Pacific*), do Trung tâm nghiên cứu nông nghiệp Quốc tế Australia (ACIAR) và Tổ chức nghiên cứu và phát triển nông thôn (RIRDC) tài trợ.

---

## 4 PHƯƠNG PHÁP KIỂM TRA MẪU BỆNH

Việc giám định mẫu phải bắt đầu từ các đặc tính vĩ mô mà mắt thường có thể nhìn thấy được và kiểm tra dưới kính lúp soi nổi. Bước tiếp theo là dùng lam kính và kiểm tra cấu trúc của vi sinh vật hại dưới kính hiển vi quang học. Nếu người giám định chưa biết vi sinh vật này thì nên đo kích thước, vẽ hình và chụp ảnh vi sinh vật nếu có thể. Nên lưu giữ những ghi chép, hình vẽ và ảnh ban đầu cùng với tiêu bản bệnh.

### 4.1 NHUỘM MÀU NẤM VÀ VI KHUẨN

Hầu hết nấm và vi khuẩn có thể quan sát được dưới kính hiển vi bằng cách đặt lên lam kính, nhỏ một giọt nước và dùng lamén phủ lên. Có thể sử dụng axit lactic làm môi trường cố định nấm. Việc nhuộm màu thường áp dụng đối với các cấu trúc nấm không màu sắc. Hai hóa chất nhuộm màu thường dùng cho nấm là thuốc nhuộm bông xanh (cotton blue) và lacto-fuchsin.

#### **Cotton blue (hay trypan blue)**

Cotton blue (trypan blue)	0,1 g
Axit lactic	25 ml
Glycerol	50 ml
Nước cất	25 ml

#### **Lacto-fuchsin**

Acid-fuchsin	0,1 g
Axit lactic	100 ml

Việc quan sát vi khuẩn trong mô cây bệnh thường rất khó. Có thể dùng dung dịch Toluidine blue O 0,1% để nhuộm màu vi khuẩn. Cắt một mẫu nhỏ mẫu bệnh phần giữa mô khỏe và mô bệnh, đặt lên một lam kính và nhỏ một giọt chất nhuộm màu. Đặt lamén lên trên và quan sát với độ phóng đại 400 lần. Vi khuẩn (nếu có) thường di chuyển xung quanh phần mô cắt ở mép ngoài mẫu bệnh. Vi khuẩn được nhuộm thường có màu xanh nước biển đậm, mô cây màu nhạt hơn và hơi pha màu xanh lá cây.

#### **Toluidine blue O**

Toluidine blue O	0,05 g
Nước cất	50 ml

Vi khuẩn được phân làm hai nhóm chính: Nhóm có khả năng duy trì phức hợp của thuốc nhuộm crystal violet và iốt mà không bị hòa tan trong cồn ethanol (Gram dương) và nhóm không thể duy trì phức hợp này (Gram âm). Nhuộm màu Gram giúp cho việc giám định các đặc tính ban đầu của nhiều vi khuẩn gây bệnh cây. Hóa chất và phương pháp nhuộm màu Gram như sau:

---

Hòa tan 2 g thuốc nhuộm crystal violet trong 20 ml cồn ethanol 95%. Hòa tan 0,8 g amonium oxalat trong 80 ml nước cất. Đổ lần hai dung dịch vào nhau.

**Dung dịch crystal violet**

Crystal violet	2 g
Cồn ethanol 95%	20 ml
Ammonium oxalate	0,8 g
Nước cất	80 ml

Nghiền tinh thể iốt và muối kali iodide (KI) và hòa tan trong nước cất, đựng vào một bình kín, khuấy đều khoảng vài giờ đến khi hòa tan hoàn toàn.

**Dung dịch Lugol iốt**

Iốt	1 g
KI	2 g
Nước cất	300 ml

Pha dung dịch nhuộm màu safranin ban đầu bằng cách hòa tan 2,5 g safranin O trong 100 ml cồn ethanol 95%. Pha loãng 1:10 dung dịch này bằng nước cất trước khi sử dụng.

**Dung dịch nhuộm màu Safranin**

Safranin O	2,5 g
95% ethanol	20 g

Chuẩn bị dung dịch chứa các tế bào vi khuẩn từ một khuẩn lạc đang phát triển (sau khi cấy khoảng 24-48 giờ) và nước cất. Dùng que cấy vi khuẩn quét một vệt nhỏ (khoảng 1 cm<sup>2</sup>) dung dịch lên một lam kính sạch. Để khô trong không khí sau đó cố định mẫu bằng cách đưa đi đưa lại lam kính (mặt có vi khuẩn lên trên) vài lần qua ngọn lửa đèn cồn. Không được làm cho lam kính quá nóng. Bằng cách cố định này, vi khuẩn sẽ dính chặt vào bề mặt lam kính trong quá trình nhuộm màu. Ngâm lam kính vào crystal violet trong 1 giờ sau đó dùng vòi nước rửa nhẹ nhàng đến khi không thấy dung dịch màu bị rửa trôi nữa. Ngâm lam kính vào dung dịch Lugol trong một phút. Dùng vòi nước rửa nhẹ và thấm khô. Dội nhẹ nhàng ethanol 95% lên lam kính trong vài giây (không quá 39 giây) để rửa hết hóa chất nhuộm rồi thấm khô. Khử nhuộm màu bằng cách ngâm lam kính trong safranin trong 20 giây. Rửa sạch bằng nước sau đó thấm khô. Quan sát mẫu lam dưới kính hiển vi với độ phóng đại 1000 lần sau khi đã nhỏ 1 giọt dầu dùng cho vật kính dầu. Vi khuẩn Gram dương có màu tím xanh trong khi vi khuẩn Gram âm có màu hồng đỏ.

Để xác định mức độ tin cậy của phản ứng Gram, có thể dùng hydroxit kali (KOH) để kiểm tra lại. Dùng que cấy (nên dùng que tre hoặc gỗ) lấy một lượng nhỏ vi khuẩn từ

---

khuẩn lạc đang phát triển và trộn đều với một giọt dung dịch KOH 3% trên một lam kính. Nhấc đầu que cấy lên cách bề mặt của lam kính khoảng vài centimet. Nếu dịch vi khuẩn dạng nhớt dính, tạo thành sợi khoảng 5 - 20 mm thì vi khuẩn đó thuộc nhóm Gram âm. Nếu dịch vi khuẩn giống như nước, không nhớt dính thì vi khuẩn đó thuộc nhóm Gram dương. Các sợi nhớt do vi khuẩn Gram âm tạo ra là do các tế bào bị phá hủy giải phóng ADN có dạng sền sệt trong nước. Ngược lại, lớp vỏ tế bào của vi khuẩn Gram dương lại có khả năng chống chịu với KOH nên không bị phá hủy và không giải phóng ra ADN. Phương pháp thử này chỉ nên áp dụng trong trường hợp vẫn nghi ngờ kết quả của phương pháp nhuộm màu.

## 4.2 KÍNH HIỂN VI QUANG HỌC

Kính lúp soi nổi chỉ có ích trong trường hợp quan sát mẫu bệnh ban đầu. Kính hiển vi có độ phóng đại lên tới 1000 lần rất cần thiết cho việc quan sát hình thái của vi khuẩn và nấm.

Để giám định nấm, dùng que cấy hoặc dao đầu nhọn lấy một phần nhỏ mô có bào tử và đặt vào một giọt dung dịch nhuộm màu, thường sử dụng lacto-fuchsin (0,1 g axit fuchsin và 100 ml axit lactic), hoặc dung dịch cố định mẫu như axit lactic (100 ml axit lactic, 200 ml glycerol và 100 ml nước cất). Dùng kính lúp soi nổi sẽ giúp cho việc lấy bào tử dễ dàng hơn. Nếu mẫu cần quan sát hơi lớn thì có thể dùng lamén ép nhẹ cho mẫu phẳng ra. Có thể loại bỏ bọt khí bằng cách đưa đi đưa lại lam kính qua lửa (tránh không để muội than bám vào mặt dưới của lam kính). Nếu đốt lam kính quá nóng sẽ làm nổ hoặc nứt lamén.

Phương pháp dán băng dính rất có hiệu quả đối với việc định hướng bào tử khô (cả chuỗi bào tử và hình dạng bào tử). Cắt một mẫu băng dính và dùng panh giữ băng dính sát vào bề mặt tản nấm (hoặc bề mặt lá). Sau đó đặt miếng băng dính lên một lam kính (mặt dính lên trên) có nhỏ sẵn một giọt dung dịch nhuộm màu hoặc dung dịch cố định mẫu. Dùng lamén phủ lên trên và quan sát dưới kính hiển vi.

Một số nấm có bào tử dạng chuỗi rất mỏng manh, dễ dàng rời ra dưới tác động của những luồng không khí rất nhẹ. Có thể khắc phục tình trạng này bằng cách dùng lam kính cấy nấm như sau: Đặt một que thủy tinh đã gấp lại lên một tờ giấy lọc thấm nước để dưới đáy một đĩa Petri. Cắt một mẫu agar khoảng 1 cm<sup>2</sup> đặt lên một lam kính đã tiệt trùng rồi đặt lam kính này lên trên que thủy tinh. Cấy nấm vào bốn cạnh của miếng agar rồi đặt lamén lên trên. Sau vài ngày có thể quan sát hình thái nấm trên lam kính bằng kính hiển vi. Áp dụng phương pháp này có thể quan sát được cấu trúc của nấm nguyên vẹn khi đang phát triển. Sau đó, tách miếng agar ra khỏi lamén và lam kính, đặt lamén lên một lam kính mới và ngược lại tạo thành 2 mẫu để quan sát.

Đối với một số vi sinh vật, mối quan hệ về không gian giữa cấu trúc quả thể và mô ký chủ hay vị trí của cành bào tử phân sinh trong quả thể là những đặc tính phân loại quan trọng. Cắt mẫu thành lát mỏng có thể quan sát được các đặc tính này dưới kính hiển vi. Đặt mẫu dưới kính lúp soi nổi, dùng dao hoặc máy cắt vi phẫu để cắt mẫu thành lát mỏng. Đối với các mẫu tươi hoặc để trong tủ đá nên dùng máy cắt vi phẫu lạnh. Máy cắt vi phẫu lạnh được gắn một tấm nhỏ để đặt mẫu bệnh lên, mẫu có thể được làm lạnh ngay trên mặt tấm bằng nhiệt điện hoặc bằng chất lỏng làm lạnh ở nhiệt độ thấp.

---

Đối với vi khuẩn, thường rất khó quan sát ngay tại mẫu bệnh. Có thể sử dụng Toluidine Blue O để phát hiện vi khuẩn. Cũng có thể áp dụng phương pháp nhuộm màu Gram để phân biệt giữa hai nhóm vi khuẩn khác nhau về mặt hóa học, Gram dương và Gram âm (tế bào vi khuẩn Gram dương có màu tím đậm trong khi tế bào vi khuẩn Gram âm có màu đỏ). Có thể tham khảo thêm về phương pháp này ở chương 7, Giám định vi sinh vật gây hại.

Để duy trì tốt chất lượng của kính hiển vi quang học đòi hỏi phải có bảo dưỡng. Nên bảo dưỡng kính hiển vi định kỳ 6 đến 12 tháng một lần. Trong môi trường nhiệt đới ẩm, nấm có thể mọc lan vào vật kính và bề mặt các bộ phận quang, ảnh hưởng đến chất lượng kính hiển vi, bề mặt các bộ phận này có thể bị hỏng hoàn toàn nếu không kiểm tra. Trong điều kiện khí hậu nhiệt đới nên bảo quản tất cả các kính hiển vi trong phòng có điều hòa và máy hút ẩm.

Bảo quản kính hiển vi trong phòng có điều hòa mà không có máy hút ẩm thì không giảm được độ ẩm cần thiết để ngăn ngừa sự phát triển của nấm trên mặt kính. Nếu không có máy hút ẩm chuyên dụng thì có thể bảo quản kính trong tủ có hút ẩm hoặc cất vào hộp bảo quản kính nếu không sử dụng. Hộp bảo quản kính được làm bằng gỗ hoặc nhựa, đủ to để có thể chứa kính hiển vi và một bóng đèn điện 25 W. Bóng đèn có chức năng như một máy hút ẩm do tỏa nhiệt đủ nóng để làm bốc hơi nước trong hộp và giữ hộp luôn khô ráo. Cả hệ thống máy ảnh cũng nên bảo quản trong hộp như vậy.

### 4.3 CHỤP ẢNH MẪU

Nếu có thể nên chụp ảnh mẫu bệnh (dùng máy ảnh thường hoặc kỹ thuật số) khi lấy mẫu trên ruộng điều tra. Chụp ảnh trên ruộng tại thời điểm điều tra cung cấp những tư liệu ảnh về triệu chứng bệnh trong tự nhiên. Nên chụp nhiều ảnh, sau đó chọn lựa những ảnh tốt nhất và lưu vào một cuốn nhật ký có chú thích thông tin về mẫu bệnh để tránh lẫn lộn giữa ảnh này với mẫu bệnh khác xử lý tại phòng thí nghiệm.

Chụp ảnh mẫu tại phòng thí nghiệm cho phép loại bỏ được những ảnh hưởng của điều kiện môi trường đến hình ảnh. Khi chụp ảnh tại phòng thí nghiệm có thể phải dùng đến ánh sáng đèn mặc dù ánh sáng đèn thường tạo thành bóng khi chụp ảnh. Khi chụp ảnh mẫu nên dùng màu xám nhạt làm nền cho ảnh, màu đen và màu trắng có thể làm cho mẫu bệnh trong ảnh sáng quá hoặc tối quá.

Hình ảnh kỹ thuật số về triệu chứng bệnh có ưu điểm là có thể được gửi đến các đồng nghiệp một cách dễ dàng và không bị hỏng do nấm mốc hoặc giảm chất lượng do thời gian (đặc biệt là trong điều kiện khí hậu nhiệt đới) như phim ảnh. Ngoài việc sử dụng máy ảnh kỹ thuật số, hình ảnh kỹ thuật số còn có thể được tạo ra bằng cách dùng máy quét ảnh hoặc phim dương bản, thậm chí có thể quét trực tiếp mẫu bệnh.

#### 4.3.1 Cách quản lý và đặt tên file ảnh

Máy ảnh kỹ thuật số tự động đặt tên cho các file ảnh, (ví dụ IMG\_001.jpg, DSCF0001.jpg). Những tên này không có ý nghĩa gì khi chúng ta muốn tìm ảnh trên máy tính. Dùng các phần mềm quản lý hình ảnh (bên dưới) có thể khắc phục được

---

nhược điểm này nhờ tính năng đổi tên file ảnh. Nên sử dụng các tên có tính mô tả (ví dụ ‘thần thư xoài.jpg’).

Nếu số lượng ảnh nhiều, nên đánh số file ảnh để sắp xếp các ảnh thành catalog. Nên bắt đầu bằng số có chữ số không ở trước, ví dụ 001 thay cho 1 vì phần mềm máy tính khi xếp thứ tự thường để 100 trước 99. Nếu hình ảnh minh họa triệu chứng bệnh từ một mẫu tiêu bản trong phòng mẫu thì nên dùng tên truy cập tiêu bản để đặt tên file ảnh.

Không nên lưu giữ quá nhiều file trong một thư mục. Nếu có quá nhiều file thì sẽ mất nhiều thời gian để tìm kiếm hình ảnh mong muốn. Tạo các thư mục nhỏ sắp xếp theo vi sinh vật, ký chủ, địa điểm lấy mẫu hoặc thời gian lấy mẫu. Một trong những cách tốt nhất để quản lý các hình ảnh là sử dụng các phần mềm quản lý ảnh chuyên dụng. Các chương trình này cho phép sắp xếp các hình ảnh, mô tả chi tiết, hiển thị lần lượt các hình ảnh một cách tự động, chọn các ảnh mong muốn và đưa lên mạng internet cùng một lúc. Có rất nhiều phần mềm quản lý ảnh có thể sử dụng để:

- Đưa hình ảnh từ máy ảnh vào máy tính;
- Hiển thị hình ảnh;
- Catalog hóa các hình ảnh;
- Chỉnh sửa hình ảnh;
- Đưa các hình ảnh lên mạng internet.

Một số chương trình phần mềm quản lý ảnh đang lưu hành hiện nay: Ablaze Image Manager, ThumbsPlus, Cumulus, Epson’s File Factor, Piccolo, PhotoWallet, Polybytes Polyview, Thumber, PIE, ACDSee (PC và Mac), PicaView32, Image Fox, Graphic Workshop, Professional, GraphicConverter, Power Browser, IrfanView32, Photopage, Quisknailer, Compupic, Image Viewer, Photo Recall, Photo Explorer, EXIFRead, VuePrint, ImageAXS, iView Multimedia, Compupic Pro, Sony PictureGear, FlipAlbum, PictureWorks MediaCenter, JASC Media Center, Pictureshow, Qpict Media Organizer và DigiPic công sự



---

## 5 PHƯƠNG PHÁP PHÂN LẬP NẤM, VI KHUẨN VÀ TUYẾN

### TRÙNG TRONG PHÒNG THÍ NGHIỆM

Mẫu bệnh sau khi đem về phòng thí nghiệm được phân thành các nhóm chính. Nhóm ưu tiên bao gồm các mẫu bệnh phân hủy nhanh chóng, ví dụ nấm lớn có thịt dày hoặc các mẫu bệnh mà vi sinh vật hại phải được phân lập từ mô cây. Nhóm khác bao gồm các mẫu bệnh có thể để thêm một thời gian mà không ảnh hưởng gì, ví dụ gỉ sắt, than đen. Các mẫu thuộc nhóm này có thể để khô bằng cách ép báo, sau đó để vào tủ đá  $-20^{\circ}\text{C}$  trong 7 ngày, có thể giám định sau.

Mẫu virus hại thực vật có thể được bảo quản tạm thời trong các lọ làm khô như đã mô tả ở phần 3.3.1. Virus thực vật sẽ không được đề cập thêm trong chương này vì chúng không được phân lập và làm sạch (tách virus ra khỏi các bộ phận cấu thành tế bào) bằng các phương pháp thông thường trong quy trình giám định.

Nấm và vi khuẩn thường phải được phân lập và nuôi cấy trước khi có thể giám định. Các vi sinh vật có khả năng phát triển hoại sinh (vi sinh vật ký sinh không bắt buộc hoặc hoại sinh) có thể được nuôi cấy trên môi trường nhân tạo mặc dù không phải loài nào cũng được nuôi cấy dễ dàng. Phân lập nấm từ mô cây bệnh bằng cách cấy những mẫu nhỏ mô bệnh lên môi trường nhân tạo thích hợp, ví dụ môi trường agar - nước cất (water agar) được để trong các đĩa Petri đã khử trùng. Nếu vi sinh vật xuất hiện trên bề mặt mẫu bệnh, dùng que cấy lấy bào tử trực tiếp từ cấu trúc quả thể và cấy lên bề mặt môi trường.

Nhiều loài nấm hoại sinh và vi khuẩn thường phát triển thứ sinh trên mô cây bị bệnh. Vì vậy, phải hết sức cẩn thận tránh phân lập các vi sinh vật thứ sinh bằng các phương pháp khử trùng. Tiệt trùng bề mặt các mô cây bệnh có thể giúp loại trừ các vi sinh vật hoại sinh thường phát triển trên bề mặt mô bệnh.

Lấy bông hoặc giấy ăn sạch nhúng cồn ethanol 70% lau phần mô bệnh dùng để cấy sau đó để khô. Tốt nhất nên sử dụng các mẫu kính hoặc các bề mặt cứng, nhấn để cắt mẫu cây bệnh. Tiệt trùng panh và dao bằng cách nhúng chúng vào cồn ethanol 95% và hơ qua ngọn lửa đèn cồn. Không cần phải giữ dụng cụ quá lâu trên ngọn lửa vì lửa có thể làm hỏng chúng. Cồn rất dễ cháy vì vậy phải hết sức cẩn thận không để dụng cụ vừa hơ lửa quá gần lọ hoặc cốc chứa cồn. Tiệt trùng que cấy bằng cách hơ cho nóng đỏ trên lửa đèn cồn. Để que cấy nguội trước khi sử dụng.

Khử trùng bề mặt giúp loại bỏ vi sinh vật hoại sinh và tạo điều kiện cho vi sinh vật gây bệnh phát triển tự do, không bị cản trở khi mẫu bệnh được cấy lên môi trường nhân tạo. Nhúng hoặc lau bề mặt vết bệnh bằng cồn ethanol (70%) có thể khử trùng hầu hết các bề mặt mà không cần rửa lại cho hết cồn vì cồn có thể bay hơi, nếu cần có thể hơ nhanh qua lửa đèn cồn.

Natri hypochlorite cũng thường được sử dụng khá phổ biến làm dung dịch khử trùng. Thuốc tẩy trên thị trường thường chứa 10-14% Clo. Có thể pha loãng 10 % (dung dịch pha loãng chứa 1-1,4% Clo) và ngâm mẫu khoảng 1-5 phút. Bảo quản dung dịch trong tủ lạnh vì qua thời gian dung dịch sẽ giảm hiệu lực. Thay dung dịch Natri

---

hypochlorite 2-3 tuần / lần. Dung dịch hypochlorite có nhược điểm là có mùi hắc, nếu bị dấy ra quần áo thường để lại vết và làm hỏng quần áo.

Lựa chọn cách phân lập vi khuẩn và nấm nên dựa vào đặc tính của ký chủ và vi sinh vật hại.

## 5.1 PHÂN LẬP NẤM

Các bước phân lập nấm bệnh từ mô cây bệnh như sau:

1. Rửa mẫu bệnh dưới nước máy để loại bỏ đất và bụi bẩn;
2. Nếu có nhiều vi sinh vật hoại sinh trên bề mặt vết bệnh nên rửa mẫu bằng cồn ethanol 70%. Đối với mẫu cây thân gỗ nên áp dụng cách khử trùng này;
3. Cắt mô vết bệnh thành mẫu nhỏ tại điểm tiếp giáp giữa mô bệnh và mô khỏe;
4. Nhúng mô bệnh vào dung dịch natri hypochlorite 1% trong cồn ethanol 10% khoảng 1 – 5 phút (có thể thay đổi nồng độ phụ thuộc vào tính chất mô cây, ví dụ một số lá cây có bề mặt rất xốp, có thể hấp thụ dung dịch khử trùng đủ làm chết vi sinh vật hại);
5. Lấy mẫu ra khỏi dung dịch khử trùng bề mặt và rửa lại bằng nước cất, sau đó làm khô mẫu bằng cách đặt mẫu lên giấy lọc đã tiệt trùng (nếu có thể nên để trong tủ cây có hệ thống thổi lọc không khí). Cắt mẫu bệnh thành từng miếng cây nhỏ khoảng 2 x 2 mm sau đó đặt lên môi trường agar - nước cất hoặc môi trường khoai tây - đường - agar. Việc để mẫu khô trước khi cấy có tác dụng hạn chế sự phát triển của vi khuẩn lẫn tạp. Khi đặt miếng cây lên môi trường agar cần mở và đóng nắp hộp Petri cẩn thận và nhanh để tránh vi sinh vật lẫn tạp từ không khí xung quanh;
6. Sau khi cấy xong, đặt ngược đĩa Petri để tránh đọng hơi nước trên bề mặt môi trường cấy. Hầu hết các nấm bệnh thực vật đều phát triển tốt ở 25°C;
7. Để đạt được mẫu nấm thuần, không lẫn tạp có thể dùng phương pháp cấy đơn bào tử hoặc cấy đỉnh sợi nấm từ các tản nấm mọc lên từ lần phân lập đầu tiên. Phương pháp cấy đơn bào tử như sau: Chuẩn bị dung dịch bào tử trong một ống nghiệm chứa nước cất đã tiệt trùng rồi đổ dung dịch bào tử lên đĩa Petri chứa môi trường agar - nước cất (hoặc môi trường khác phù hợp) sao cho dung dịch phủ kín đĩa. Để đĩa Petri chứa dung dịch bào tử trong bóng tối ở nhiệt độ phòng khoảng 24 giờ. Đặt đĩa bào tử dưới kính lúp soi nổi, dùng que cấy cắt từng bào tử đã nảy mầm và cấy lên môi trường thích hợp;
8. Có thể thay đổi ít nhiều phương pháp trên dựa vào kinh nghiệm hoặc tuân theo tài liệu tham khảo.

### *Phân lập từ lá*

Chọn lá có vết bệnh còn trẻ vì nấm thường đang phát triển mạnh ở các mô lá này. Cẩn thận dùng kéo hoặc dao cắt mẫu lá thành từng mẫu nhỏ tại phần tiếp giáp giữa mô khỏe và mô bệnh. Khử trùng bề mặt bằng cách ngâm trong dung dịch natri hypochlorite 10% khoảng 1 – 3 phút rồi rửa qua bằng nước vô trùng. Dùng panh đã khử trùng đặt miếng cây lên môi trường agar.

---

### *Phân lập từ thân*

Trong trường hợp vết bệnh sâu hoặc nằm phía trong bó mạch của cây bệnh, có thể cắt miếng cây ở các mô bên trong để tránh phải khử trùng bề mặt. Dùng dao (hoặc dụng cụ có thể cắt thân gỗ) đã tiệt trùng qua lửa đèn cồn để chẻ dọc thân bệnh theo chiều từ phần khỏe đến phần bệnh.

Dùng dao vô trùng cẩn thận cắt miếng cây (3-5 mm) tại điểm tiếp giáp giữa mô bệnh và mô khỏe, chọn mô bệnh còn mới. Dùng panh vô trùng gấp miếng cây đặt lên đĩa Petri chứa môi trường agar - nước cất (hoặc môi trường khác thích hợp). Đối với các thân cây nhỏ, vết bệnh chủ yếu bị giới hạn bởi phần mô phía ngoài hoặc trong trường hợp không thể cắt miếng cây ở phần mô bệnh phía trong thì có thể dùng dao vô trùng cắt miếng cây ở phần tiếp giáp giữa mô khỏe và mô bệnh, sau đó khử trùng bề mặt (1-3 phút trong natri hypochlorite), rửa lại bằng nước vô trùng và cấy lên bề mặt môi trường.

### *Phân lập từ rễ*

Rửa hết phần đất bám ở bộ phận rễ, sau đó đặt rễ vào một chậu thủy tinh nhỏ hoặc đĩa Petri thủy tinh với mực nước khoảng 2-3 cm sao cho dễ dàng nhìn thấy phần rễ bệnh. Dùng panh hoặc dao xé rễ thành từng mẫu nhỏ. Dùng dao hoặc kéo vô trùng cắt mẫu rễ cây (dài khoảng 5 mm) tại điểm tiếp giáp giữa mô khỏe và mô bệnh. Có thể khử trùng qua bề mặt miếng cây, tuy vậy đối với rễ vì rất mỏng manh nên cần rửa lại kỹ bằng nước vô trùng như sau: Đặt các mẫu rễ vào rây có lỗ nhỏ rồi để dưới vòi nước sạch chảy liên tục trong 30 đến 90 phút. Dùng dao hoặc panh vô trùng đặt các miếng cây lên đĩa Petri có chứa môi trường agar - nước cất (hoặc môi trường khác phù hợp), chú ý ấn nhẹ cho miếng cây tiếp xúc sâu vào bề mặt môi trường.

#### **5.1.1 Buồng giữ ẩm**

Đôi khi triệu chứng bệnh thể hiện rất rõ nhưng phân lập vi sinh vật gây bệnh lại không đơn giản chút nào. Trong trường hợp khó phân lập vi sinh vật hại có thể để mẫu trong môi trường ẩm, chờ sự xuất hiện của các dạng quả thể và hình thành bào tử. Tuy nhiên, trong điều kiện để ẩm, vi sinh vật hoại sinh cũng rất dễ xuất hiện trên bề mặt mô bệnh. Lau nhẹ bằng cồn công nghiệp hoặc natri hypochlorite 10% có thể giúp hạn chế sự phát triển của vi sinh vật hoại sinh nhưng lại có thể phá hủy cấu trúc vi sinh vật hại trên bề mặt vết bệnh. Để khắc phục tình trạng này có thể rửa mẫu bệnh bằng nước vô trùng rồi làm khô trước khi để ẩm.

Hộp để ẩm nên giữ ở nhiệt độ dưới 25°C và tốt nhất là nên để nơi sáng, ví dụ trên bàn thí nghiệm, nhưng không nên để trực tiếp dưới ánh nắng mặt trời, nên giữ ở nhiệt độ không đổi để tránh hơi nước ngưng tụ. Mẫu cần được kiểm tra hàng ngày dưới kính lúp soi nổi với độ phóng đại thấp để quan sát sự xuất hiện của bào tử. Các cấu trúc bào tử có thể được lấy ra bằng que cấy vô trùng để kiểm tra dưới kính hiển vi có độ phóng đại lớn hơn hoặc cấy lên môi trường agar.

Đối với các mẫu bệnh nhỏ như lá hoặc cành nhỏ có thể dùng đĩa Petri bằng thủy tinh hoặc nhựa. Các mẫu bệnh lớn hơn có thể để ẩm trong các hộp nhựa và các mẫu quá lớn có thể để ẩm trong các túi nilon lớn.

---

Hộp hoặc túi dùng để ủ phải được khử trùng. Nếu không thể cho vào nồi hấp được thì phải lau sạch bằng cồn 70% rồi để khô. Túi nilon phải mới chưa sử dụng lần nào. Đặt giấy lọc (đã được hấp khử trùng) vào đĩa Petri hoặc hộp làm ẩm rồi dùng nước cất vô trùng thấm ướt giấy lọc. Khăn giấy dùng trong phòng thí nghiệm có thể được sử dụng bằng cách thấm ướt rồi để vào trong túi nilon hoặc hộp nhựa lớn. Mẫu bệnh phải được để phía trên giấy thấm nước bằng cách đặt một lưới nhựa vào hoặc bất cứ vật gì (nhúng trong cồn 70% và hơ qua ngọn lửa đèn cồn) để kê cao mẫu bệnh trong hộp, tránh tiếp xúc trực tiếp với giấy thấm.

### **5.1.2 Phương pháp pha loãng**

Nấm có thể được phân lập từ đất và bề mặt các bộ phận cây như lá, hoa bằng cách rửa và sử dụng phương pháp pha loãng lần lượt để phân lập được các tản nấm trên môi trường thích hợp, ví dụ như môi trường agar - nước máy (tap water agar) (TWA). Không nên sử dụng các môi trường giàu dinh dưỡng vì chúng sẽ kích thích sự phát triển của cơ quan sinh dưỡng thay vì việc hình thành bào tử. Có thể sử dụng kháng sinh như streptomycin sunfat trộn lẫn vào môi trường agar để hạn chế sự phát triển của vi khuẩn.

Phương pháp pha loãng lần lượt được thực hiện như sau: Nghiền nhỏ hoặc rây mịn đất hoặc các mẫu nhỏ cây bệnh, trộn thật kỹ rồi lấy một lượng nhỏ đổ vào lọ McCartney (dung tích 20 ml) chứa 10 ml nước vô trùng. Dùng pipet vô trùng để lấy 1 ml dung dịch rồi đổ vào lọ McCartney khác chứa 9 ml nước vô trùng. Dùng pipet vô trùng khác để lấy 1 ml dung dịch vừa được pha loãng rồi đổ vào lọ McCartney thứ ba chứa 9 ml nước vô trùng.

Cứ tiếp tục pha loãng lần lượt như vậy đến khi dung dịch đạt đến nồng độ mong muốn. Lấy một lượng nhỏ dung dịch pha loãng cuối cùng đổ vào bề mặt môi trường trong đĩa Petri và dùng que thủy tinh dàn đều sao cho dung dịch bao phủ hết bề mặt môi trường. Sau một thời gian các tản nấm bắt đầu xuất hiện, cần cấy truyền ngay lên môi trường phù hợp trước khi chúng mọc chồng lên nhau.

Đôi khi chỉ có một lượng rất nhỏ nấm hình thành bào tử, ví dụ: Nấm túi hoặc nấm dạng quả cảnh. Trong trường hợp này cách tốt nhất là áp dụng phương pháp sau: nhỏ một giọt nước vô trùng vào một lam kính vô trùng rồi gấp một quả thể nấm đặt vào giọt nước, đợi đến khi bào tử được giải phóng khỏi quả thể. Có thể điều chỉnh mật độ bào tử dưới kính hiển vi. Dùng que cấy đưa dịch bào tử vào thành từng vệt trên môi trường TWA. Sau 24 giờ cấy đơn bào tử từ TWA lên môi trường thích hợp.

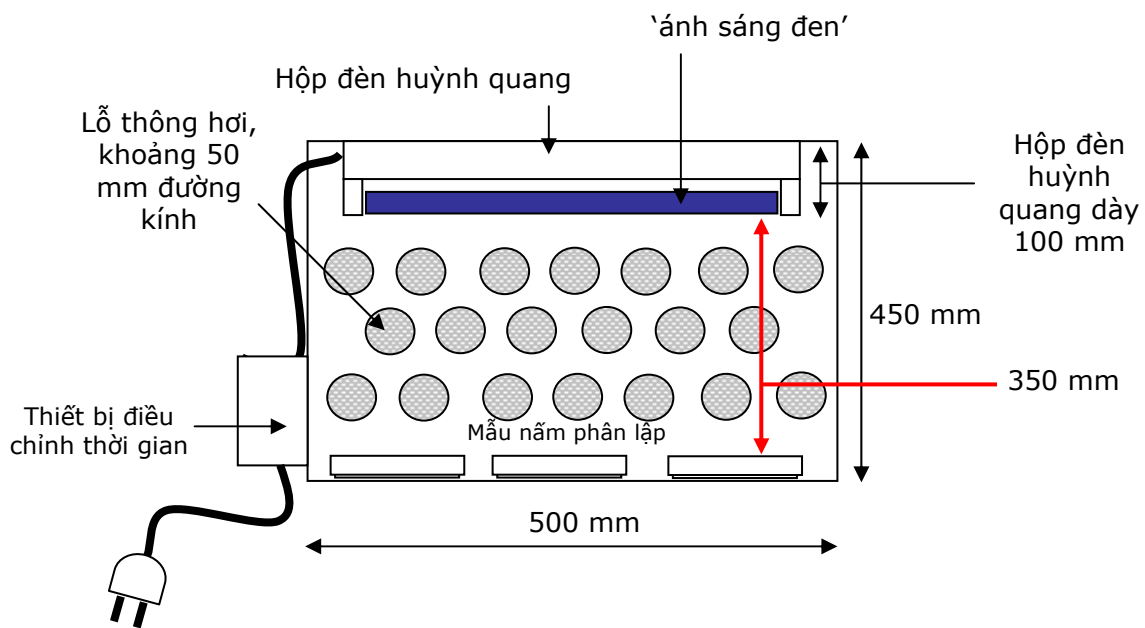
### **5.1.3 Phát triển và sản sinh bào tử**

Đối với hầu hết nấm bệnh, sản sinh bào tử là hình thức sinh sản chủ yếu, bào tử sau khi sinh ra sẽ được phát tán trong môi trường sống của chúng. Sự sản sinh bào tử phụ thuộc rất nhiều vào điều kiện môi trường nuôi cấy. Hầu hết loài nấm có thể phát triển tốt ở nhiệt độ phòng thí nghiệm. Sự sản sinh bào tử là yếu tố rất cần thiết cho việc giám định và tạo nguồn nấm để lây bệnh nhân tạo.

Điều kiện môi trường nhân tạo như: tù định ôn tối và các môi trường nuôi cấy giàu dinh dưỡng thường không có lợi cho việc sản sinh bào tử ở hầu hết nấm bệnh. Nên sử dụng lá ký chủ (đã tiệt trùng), ví dụ: cọng rơm của lúa mì, lá ngô, lá cẩm

chương... đặt vào môi trường nghèo dinh dưỡng như TWA để kích thích sự sản sinh bào tử.

Có thể kích thích sự sản sinh bào tử ở nhiều loài nấm bằng cách đặt dưới ‘ánh sáng đen’ (cực tím yếu). Mặc dù ‘ánh sáng đen’ có thể ảnh hưởng đến màu sắc tản nấm, hình thái đại thể của tản nấm, thậm chí hình thái bào tử, những biến đổi này không ảnh hưởng đến việc giám định. Gắn bóng đèn ‘ánh sáng đen’ vào phía trên giá đỡ đĩa cấy để kích thích sự sản sinh bào tử ở các loài nấm mà việc hình thành bào tử đòi hỏi môi trường ánh sáng này (Hình 8).



**Hình 8** Mặt cắt nghiêng của buồng để mẫu nấm phân lập có ‘ánh sáng đen’

Những điểm cần chú ý khi sử dụng ‘ánh sáng đen’ để kích thích sự hình thành bào tử:

- Bóng đèn huỳnh quang có ‘ánh sáng đen’ sẵn có trên thị trường với các loại 20 W, 40 W và 80 W và chiều dài khác nhau. Bóng đèn huỳnh quang với ánh sáng trắng thường phát ra một lượng tia sáng cực tím yếu, vì vậy nếu không có đèn ‘ánh sáng đen’ có thể dùng đèn huỳnh quang với ánh sáng trắng thay thế. Có thể sử dụng kết hợp các loại bóng khác nhau (ví dụ: một bóng ánh sáng đen ở giữa hai bóng ánh sáng trắng). Không nên sử dụng đèn có cường độ chiếu sáng lớn;
- Dùng thiết bị điều chỉnh thời gian để chỉnh ánh sáng liên tục sao cho cứ tiếp theo 12 giờ UV lại có 12 giờ bóng tối;
- Một số loài nấm đòi hỏi một khoảng thời gian trong bóng tối để bắt đầu sự hình thành bào tử, vì vậy buồng để mẫu nấm phân lập nên được che sáng.

- Sau khi cấy 1 đến 4 ngày, bắt đầu sử dụng ánh sáng đen cho đến khi nấm ngừng phát triển. Không bao giờ để mẫu nấm phân lập tiếp xúc với ánh sáng đen ngay sau khi cấy vào môi trường;
- Đối với một số loài nấm, ánh sáng cực tím yếu sẽ không có hiệu lực đối với sự hình thành bào tử nếu để ở nhiệt độ cao;
- ‘Ánh sáng đen’ có thể truyền hiệu quả qua đĩa Petri nhựa và các đĩa không màu. Vì vậy nên dùng đĩa nhựa để cấy nấm khi định để mẫu nấm phân lập ở ánh sáng này.

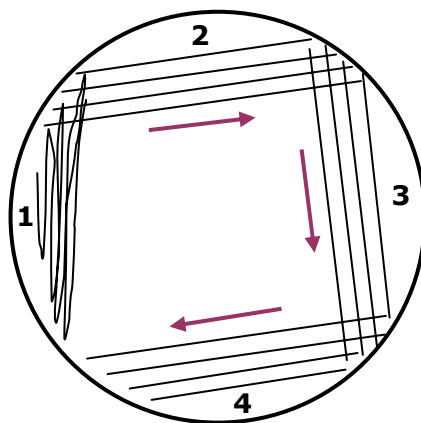
## 5.2 PHÂN LẬP VI KHUẨN

Nếu bệnh do vi khuẩn gây ra, một lượng lớn các tế bào vi khuẩn thường dễ dàng được tìm thấy khi vết bệnh trên lá hoặc trong các bó mạch bị vỡ. Phương pháp phát hiện và phân lập vi khuẩn từ mô cây bệnh như sau:

1. Rửa phần cây bị bệnh dưới vòi nước chảy để loại bỏ đất, bụi và các sinh vật lẫn tạp. Nếu mẫu bệnh ban đầu được giữ gìn cẩn thận, không bị cọ xát nhiều thì không cần thiết phải khử trùng bề mặt. Nói chung, càng hạn chế khử trùng bề mặt càng tốt, nhất là đối với các mẫu bệnh khô hoặc gần khô. Các chất có tác dụng khử trùng thường xâm nhập rất nhanh và dễ dàng diệt vi khuẩn. Nếu cần thiết phải khử trùng, chỉ nên nhúng mẫu bệnh thật nhanh vào dung dịch natri hypochlorite 10%, sau đó rửa lại bằng nước vô trùng. Nếu mẫu bệnh dày ví dụ như nụ, quả, cành hoặc nốt sưng thì có thể nhúng qua cồn etanol 70% và hơ qua lửa đèn cồn trước khi phân lập.
2. Cắt vết bệnh thành từng mẫu nhỏ ở phần giữa mô bệnh và mô khỏe, sau đó đặt mẫu lên lam kính tiệt trùng đã nhỏ sẵn một giọt nước vô trùng. Đối với những mô bệnh dày hơn nên dùng que cấy hoặc dao cấy xé nhỏ ra sau khi đặt vào giọt nước vô trùng. Dùng lamen vô trùng đặt lên trên miếng mẫu bệnh và kiểm tra ngay dưới kính hiển vi với độ phóng đại 400 lần. Có thể hạ thấp tụ quang hoặc đóng phin lọc bàn di mẫu kính hiển vi để nhìn tế bào vi khuẩn rõ hơn. Nếu vết bệnh do vi khuẩn gây nên ta có thể nhìn thấy một đám vi khuẩn chuyển động từ vết cắt. Cần chú ý để không nhầm lẫn vi khuẩn với các thành phần khác như: nhựa cây, hạt tinh bột, plastid. Khi nhìn thấy dịch vi khuẩn chuyển động ra ngoài từ vết cắt, có thể bỏ lamen ra và dùng que cấy vi khuẩn với đầu que cấy hình vòng tròn cấy dịch vi khuẩn lên môi trường agar thích hợp. Trong một số trường hợp có thể phải ngâm mô bệnh trong nước vô trùng khoảng vài giờ để đảm bảo đủ lượng vi khuẩn chuyển động ra ngoài thành dịch, sau đó mới cấy lên môi trường.
3. Cấy vi khuẩn bằng cách dùng que cấy vi khuẩn chứa dịch vi khuẩn vạch từng vạch lên bề mặt agar. Có thể vạch que cấy theo nhiều cách: Cách 1: tạo thành hình zích zắc trên một góc phần tư của đĩa cấy, bắt đầu từ mép đĩa. Các góc phần tư khác vạch thành các đường thẳng song song, một đầu trùng lên vạch của góc phần tư trước (Hình 9). Que cấy phải được khử trùng trước mỗi lần vạch lên mặt agar. Cách 2: vạch lên toàn bộ bề mặt agar từ trên xuống dưới, từ trái sang phải để phân lập được từng khuẩn lạc riêng biệt.
4. Dựa vào dự đoán nguyên nhân gây bệnh mà lựa chọn môi trường thích hợp. Môi trường phải được để khô trước khi cấy bằng cách đặt ngược nắp đĩa cấy

và để nghiêng trong 24 giờ ở buồng vô trùng hoặc mở nắp trong tủ cấy vô trùng trong 30 phút. Cần thận để tránh không cho không khí tạt lẫn vào môi trường.

5. Đĩa phân lập nên đặt ngược để tránh đọng hơi nước trên bề mặt môi trường. Hầu hết các vi khuẩn phát triển tốt ở nhiệt độ 25-28°C.
6. Có thể thay đổi một số thao tác trên theo kinh nghiệm hoặc tuân theo các bài báo.



**Hình 9** Cách vạch phân lập vi khuẩn trên mặt agar: 1. Vạch phân lập ban đầu từ dịch bào tử. 2. Dùng que cấy sau khi khử trùng vạch thành các vạch thẳng thứ nhất nối với vạch phân lập ban đầu. 3. Các vạch thẳng thứ hai. 4. Các vạch thẳng thứ ba, khuẩn lạc được tạo thành riêng rẽ trên các vạch này.

Sau khi phân lập, đặt đĩa cấy ở điều kiện nhiệt độ phòng thí nghiệm và kiểm tra hàng ngày trong 4-5 ngày, hoặc 10-14 ngày đối với các vi khuẩn phát triển chậm. Dựa vào triệu chứng có thể dự đoán vi khuẩn gây bệnh và cây truyền, kể cả trong trường hợp nhiều vi khuẩn khác nhau cùng xuất hiện trên một đĩa phân lập. Nếu chọn lựa mẫu bệnh và mẫu cấy tốt thì thông thường chỉ phân lập ra một loại vi khuẩn gây bệnh. Nếu từ hai loại vi khuẩn được phát hiện trên mẫu phân lập thì chú ý ghi chép lại mức độ phổ biến của từng loại. Không tính đến các vi khuẩn hoại sinh phổ biến, nên cấy truyền để kiểm tra các vi khuẩn xuất hiện nhiều, đặc biệt là ở các địa điểm khác nhau. Chỉ nên cấy truyền các khuẩn lạc riêng rẽ, tốt nhất lên cùng loại môi trường để trong ống nghiệm.

Có thể áp dụng phương pháp phân lập tương tự như đối với nấm. Cây trực tiếp mô bệnh lên bề mặt môi trường, vi khuẩn sẽ phát triển xung quanh miếng cấy. Nếu vi khuẩn hoại sinh có mặt trong mẫu cấy, chúng thường lấn át vi khuẩn gây bệnh đặc biệt là đối với các vi khuẩn gây bệnh phát triển chậm. Vì vậy, chỉ áp dụng phương pháp này trong trường hợp phương pháp cấy dịch vi khuẩn không phù hợp.

### 5.3 PHÂN LẬP TUYẾN TRÙNG

Tuyến trùng (giun tròn không phân đốt) là một nhóm động vật đa dạng, nhỏ, mắt thường không nhìn thấy được. Chúng phân bố ở hầu hết mọi nơi có nước tự do, thậm chí cả những nơi rất ít nước. Tuyến trùng tổng hợp chất dinh dưỡng từ nhiều nguồn khác nhau, nhiều loài có khả năng ký sinh chuyên tính cao. Đa đa số thực vật và

---

động vật là ký chủ của ít nhất một loài tuyến trùng ký sinh. Vì vậy mà rất nhiều tuyến trùng ký sinh là dịch hại quan trọng đối với kinh tế. Ngược lại, các loài tuyến trùng sử dụng vi khuẩn và nấm làm thức ăn (hay còn gọi là tuyến trùng sống tự do) lại có chức năng quan trọng về mặt sinh thái. Ví dụ, tuyến trùng sống tự do đóng vai trò quan trọng trong chu kỳ dinh dưỡng của hệ sinh thái đất.

Tuyến trùng ký sinh thực vật được phân làm hai nhóm chính: (1) nhóm di chuyển và lấy thức ăn trên bề mặt hoặc giữa các rễ cây (tuyến trùng ký sinh di chuyển) và (2) nhóm không di chuyển, kích thích cây chủ sản xuất ra các cấu trúc bảo vệ và dự trữ dinh dưỡng nuôi tuyến trùng (tuyến trùng ký sinh tại chỗ). Các loài tuyến trùng di chuyển thường có khả năng ký sinh trên nhiều ký chủ khác nhau và gây thiệt hại về kinh tế khi mật độ tuyến trùng cao trừ một số ít giống. Các loài tuyến trùng ký sinh tại chỗ có khả năng ký sinh chuyên tính cao và tác động đến ký chủ ở mức độ phân tử, tác động rất lớn đến năng suất cây trồng nhưng thường gây hại trên ít đối tượng hơn là đối với các loài tuyến trùng di chuyển.

Để giám định tuyến trùng ký sinh thực vật, nên tách tuyến trùng ra khỏi đất hoặc mẫu bệnh và bảo quản cẩn thận.

### 5.3.1 Mẫu đất

Đối với mục đích giám định và lưu giữ mẫu, nên lấy mẫu bệnh ở vùng rễ cây có biểu hiện triệu chứng. Nếu điều tra một khoảnh bị nhiễm bệnh trên một ruộng thì nên lấy mẫu ở khu vực ranh giới giữa khoảnh bị bệnh và khoảnh không bị bệnh, vì ở khu vực này tuyến trùng gây bệnh cây có thể tập trung với mật độ cao nhất. Ngoài ra, cũng nên lấy mẫu ở khu vực không bị bệnh để so sánh. Chiều sâu của điểm lấy mẫu và số lượng mẫu lấy ban đầu cũng quan trọng nhưng chúng tôi sẽ không đề cập sâu về vấn đề đó trong phần này.

Tốt nhất nên lấy mẫu đất ẩm bởi vì một số tuyến trùng ngủ nghỉ trong đất khô thường bị thương do đứt gãy. Đặt mẫu đất trong túi nilon và giữ ở nơi mát mẻ trong quá trình chuyên chở, xử lý mẫu càng sớm càng tốt. Một số tuyến trùng có thể được giữ trong tủ lạnh nhưng không phải là tất cả các loài đều có thể áp dụng cách này. Đối với đất nhẹ, bở, có thể dùng rây (kích thước lỗ rây 10mm) để loại bỏ các mảnh rác sau đó trộn kỹ. Phương pháp này không phải lúc nào cũng áp dụng được với đất nặng.

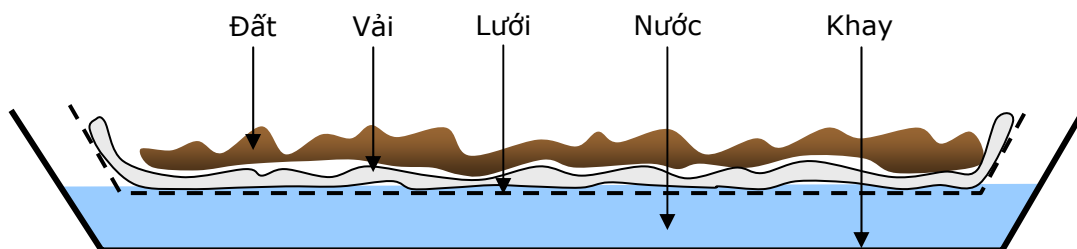
Phương pháp tách tuyến trùng ra khỏi mẫu bệnh có thể dựa vào sự di chuyển của tuyến trùng (chủ động) hoặc dựa vào kích thước và mật độ tuyến trùng (thụ động). Phương pháp chủ động đơn giản nhất là dùng khay Whitehead hoặc phễu Baermann để tách tuyến trùng đang hoạt động. Mặc dù đơn giản, quá trình này có thể kéo dài 2-4 ngày và mẫu thu được có thể rất ít, do tuyến trùng lớn di chuyển chậm. Phương pháp thụ động được tiến hành bằng cách lọc, gạn và tách với nhiều cách kết hợp khác nhau. Trong phần này, chúng tôi tập trung mô tả phương pháp rây ướt và các phương pháp ly tâm khác nhau. Phương pháp rây ướt có thể dùng để phân lập bào nang của các loài Heteroderid.

#### *Tách tuyến trùng bằng khay*

Bỏ đất vào một khay có lót một miếng lưới thô và một lớp vải hoặc giấy thấm, dàn đều đất rồi đổ nước vào sao cho chỉ vừa thấm ướt đất (Hình 10). Sau 1 - 4 ngày,



tuyến trùng đang hoạt động sẽ di chuyển xuống dưới, xuyên qua miếng vải vào trong nước dưới đáy khay. Lượng đất sử dụng phụ thuộc vào kích thước của khay; khay loại lớn (450 x 300 mm) có thể chứa một lớp 200g đất mỏng. Lớp đất càng mỏng càng có tác dụng tăng hiệu quả tách tuyến trùng và giảm thời gian tách.

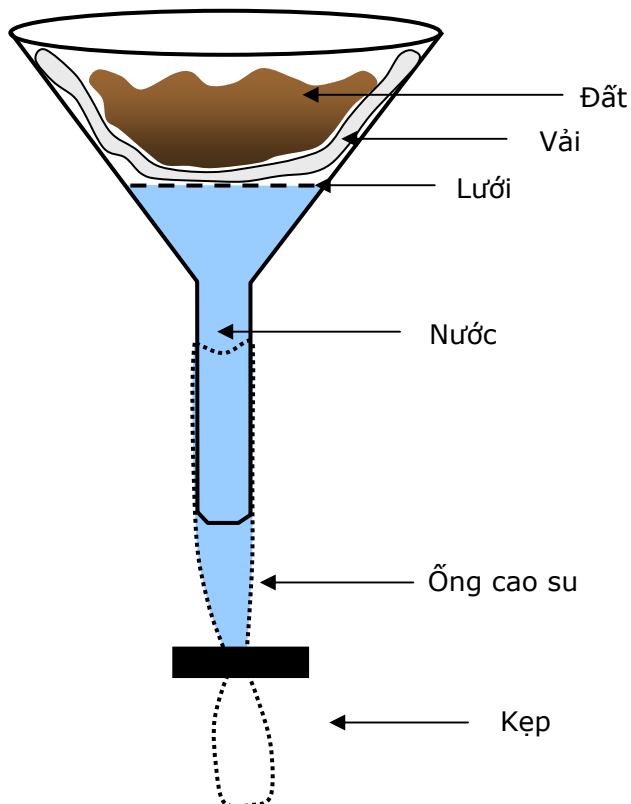


**Hình 10** Khay Whitehead dùng để tách tuyến trùng từ đất và cây

Trước khi thu thập tuyến trùng, cẩn thận nhấc phần lưới đỡ lên để hạn chế đất rơi vào phần nước phía dưới. Chuyển phần nước vào một cốc đong và để như vậy vài giờ cho tuyến trùng lắng xuống. Sau đó, tốt nhất nên dùng pipet lấy bớt nước ra chỉ giữ lại khoảng 5-20 ml, cẩn thận để không làm xáo trộn tuyến trùng đã lắng xuống ở dưới. Có thể thay thế phương pháp này bằng cách trút nước có chứa tuyến trùng ra một rây lọc với kích thước lỗ rây 20 - 38  $\mu\text{m}$ . Tuy nhiên, dùng loại rây với lỗ rây càng nhỏ thì càng đắt và khó mua. Tuyến trùng có thể lọt qua rây nhưng có thể khắc phục bằng cách bắt và lọc lại vài lần.

#### *Phễu Baermann*

Đặt đất vào phễu có lót lưới ở dưới và giấy thấm hoặc một miếng vải để trên, cổ phễu được gắn ống cao su có kẹp. Đổ nước vào miệng phễu vừa đủ để thấm ướt đất (Hình 11). Phương pháp này chỉ tiến hành được với một lượng nhỏ đất nhưng có ưu điểm là tuyến trùng tập trung ở phần ống cao su phía trên kẹp và có thể mở kẹp để lấy khoảng 5 đến 10 ml nước chứa tuyến trùng vào ống nghiệm.



**Hình 11** Dùng phễu Baermann để tách tuyến trùng từ đất và cây bệnh.

---

#### *Phương pháp lọc uớt và ly tâm*

Đổ đất vào chậu rồi đặt dưới vòi nước chảy, hòa khoảng 4 lít dung dịch đất - nước, tránh không để nước chảy tràn. Khoảng 10 giây sau, các phần tử đất lớn hơn chìm xuống đáy chậu. Phần nước còn lại được lọc qua rây (kích thước lỗ rây 38  $\mu\text{m}$ ) xuống một chậu khác. Tuyến trùng bị mắc lại ở lỗ rây sẽ được thu hồi bằng cách ly tâm với một lượng nước rất nhỏ. Tuyến trùng lọt qua rây được thu hồi bằng cách rây lại (có thể rây lại đến 3 lần). Để tăng lượng tuyến trùng thu được, nên lặp lại toàn bộ quá trình từ khâu hòa đất vào nước thêm 2 lần nữa. Tuyến trùng được thu hồi bằng cách ly tâm, cẩn thận rút phần nước phía trên ống nghiệm, chỉ để lại một lượng nước nhỏ chứa tuyến trùng. Sau đó hòa tuyến trùng thu được vào nước đường đặc (450 g/lít) rồi ly tâm lại. Loại bỏ các hợp chất hữu cơ nổi lên trên ống, nước đường cùng với tuyến trùng được rửa qua rây để thu hồi tuyến trùng. Có thể rây lại 2 lần để tận dụng tuyến trùng lọt qua lỗ rây.

Không nên để tuyến trùng quá lâu trong dung dịch đường đặc vì đường có thể kết tinh gây hại đến tuyến trùng. Có thể thay thế dung dịch đường bằng các dung dịch đặc như NaCl,  $\text{MgSO}_4$  hoặc keo silica (Ludox, DuPont de Nemours).

#### *Phương pháp tách tuyến trùng bào nang*

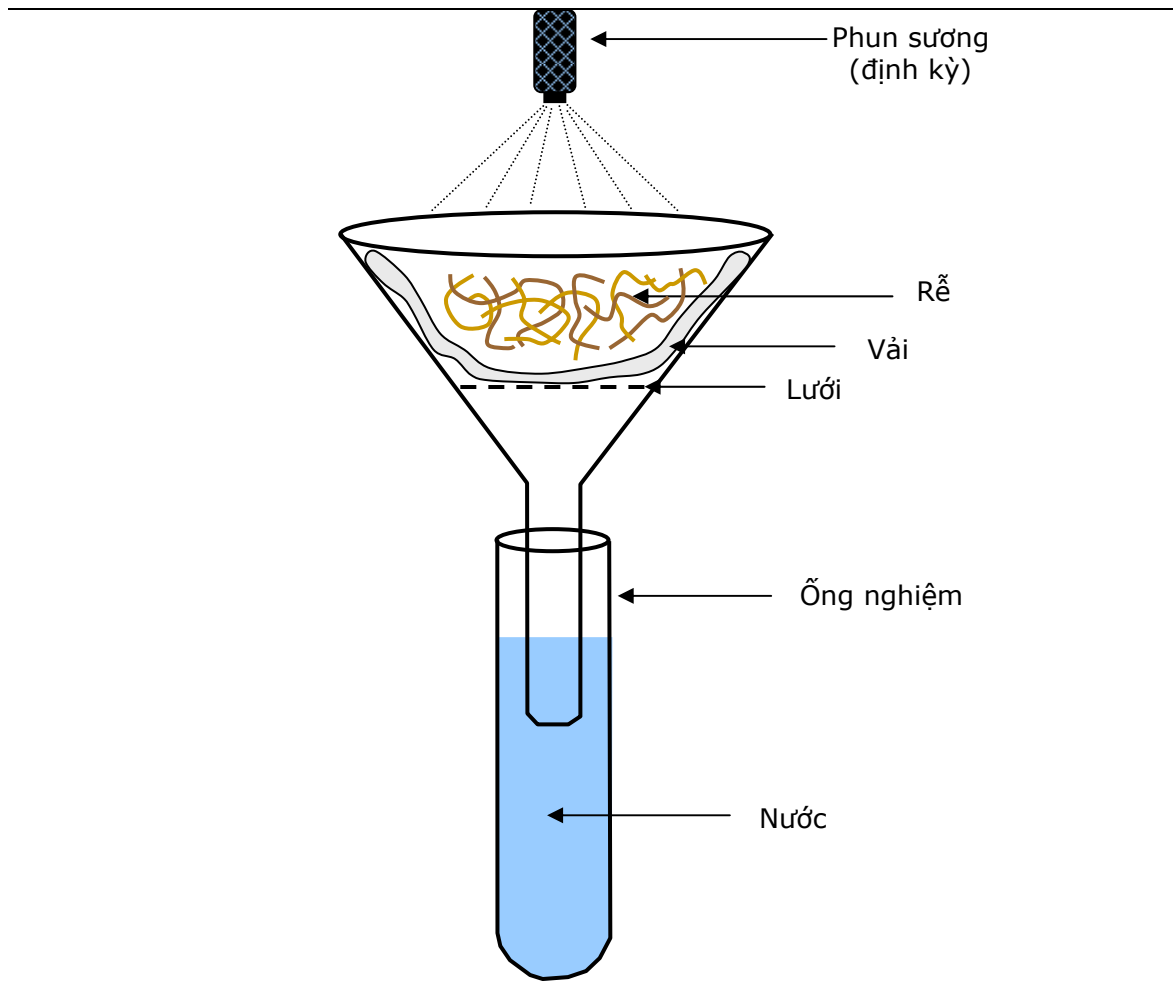
Hòa tan đất bằng 4 lít nước xả từ vòi, tránh chảy tràn. Để phần đất lắng xuống sau 10 giây, phần nước được lọc qua rây thô (710  $\mu\text{m}$ ) đặt trên một rây 250  $\mu\text{m}$ . Đất được rửa lại và lọc qua rây 2 lần nữa. Các chất hữu cơ đọng lại trên rây lỗ nhỏ được thu và để vào phễu Buchner có lót giấy lọc. Kiểm tra bào nang dưới kính lúp soi nổi. Nếu dùng phễu tam giác và hòa tan các hợp chất hữu cơ bằng cồn ethanol 70% thì bào nang sẽ nằm lại thành một vòng ở phía vành ngoài của giấy lọc.

### **5.3.2 Mẫu cây bệnh**

Tuyến trùng có thể được tìm thấy trong rễ, thân, lá và hạt của cây, vì vậy phương pháp tách cũng khác nhau tùy từng loại mẫu và các loài tuyến trùng khác nhau. Cách tốt nhất để tách tuyến trùng nội ký sinh di chuyển là dùng thiết bị phun sương, ngoài ra có thể dùng khay Whitehead hoặc phễu Baermann như đã mô tả ở trên. Đối với tuyến trùng không di chuyển có thể dùng dao cắt mô bệnh để lấy tuyến trùng ra hoặc bảo quản *in situ*. Có thể tách trứng của một số tuyến trùng cố định bằng cách rửa trong thuốc tẩy và lọc qua rây. Tuy nhiên chúng tôi không mô tả phương pháp này ở đây vì trứng tuyến trùng không có ý nghĩa nhiều về mặt phân loại. Tuyến trùng con di chuyển và tuyến trùng đực hình giun được tách bằng phương pháp phun sương.

#### *Phương pháp tách tuyến trùng bằng phun sương*

Đặt mẫu bệnh (cắt thành từng mẫu dài 10mm) vào phễu có lót lưới và một mảnh vải phía trên. Để phễu có chứa mẫu bệnh vào buồng phun sương, cứ khoảng 10 phút thì phun sương một lần (Hình 12). Nước thấm qua phễu được hứng vào 1 ống nghiệm với lượng chảy đủ chậm để tuyến trùng lắng xuống đáy ống và được lấy ra sau 2- 4 ngày. Giảm lượng nước trong ống bằng pipet (Dùng pipet để hút bớt nước trong ống nghiệm). Phun sương bảo đảm cho nước được oxy hóa tốt và loại bỏ những độc tố do các mô cây bệnh hoại sinh sản sinh ra, vì thế mà tuyến trùng được giữ ở điều kiện tốt nhất. Có thể áp dụng phương pháp khay Whitehead và phễu Baermann nhưng các phương pháp này có nhiều hạn chế khi áp dụng với mẫu cây bệnh hơn là với mẫu đất.



**Hình 12** Tách tuyến trùng từ mô bệnh bằng phương pháp phun sóng

#### *Cắt mẫu*

Đặt mẫu vào một đĩa Petri. Dùng dao cắt nhọn đầu hoặc que cấy xé mẫu mô bị bệnh tuyến trùng thành từng phần nhỏ dưới kính lúp soi nổi. Tốt nhất nên dùng kết hợp ánh sáng truyền và ánh sáng tới. Có thể quan sát tuyến trùng đã tách ra từ mô bệnh bằng ánh sáng gián tiếp phía dưới kính. Để mẫu trên đĩa Petri như vậy một thời gian có thể tạo điều kiện cho một số tuyến trùng di chuyển ra ngoài mô bệnh. Ánh sáng tới sẽ có ích cho việc quan sát giai đoạn sung của tuyến trùng cố định như bào nang (*Heterodera* spp.), nốt sung (*Meloidogyne* spp.) u lá và hạt (*Anguina* spp.).

Có thể quan sát tuyến trùng nội ký sinh bằng cách làm sạch mô bệnh bằng thuốc tẩy, sau đó nhuộm màu bằng nhiều cách khác nhau. Phương pháp này có thể có ích cho mục đích giám định những mẫu bệnh sau khi xử lý không phù hợp để bảo quản lâu dài.

### **5.3.3 Bảo quản và làm tiêu bản**

#### *Xử lý nhiệt*

Trước khi cố định mẫu tuyến trùng bằng chất bảo quản phải giết chúng để giữ nguyên vẹn cấu trúc. Ngâm tuyến trùng trong nước hoặc chất cố định ở 60°C, sau đó làm lạnh thật nhanh bằng nước lạnh hoặc chất cố định. Nếu không có bể cách thủy để duy trì nhiệt độ ở 60°C, có thể đổ nước sôi vào dung dịch chứa tuyến trùng với lượng nước sôi bằng lượng nước chứa tuyến trùng để tạo ra nhiệt độ vừa đủ giết tuyến

---

trùng. Ngoài ra, có thể đặt dung dịch chứa tuyến trùng (mực nước nông) vào tủ sấy ở nhiệt độ 55 – 60°C, kiểm tra một phút/lần cho đến khi tuyến trùng bị chết. Cần lưu ý trong quá trình xử lý nhiệt không được luộc hoặc để nhiệt độ quá cao vì sẽ phá hủy cấu trúc bên trong của tuyến trùng.

#### *Cố định mẫu*

Phương pháp cố định tuyến trùng đơn giản nhất là dùng formaldehyde. Nhỏ dung dịch formaldehyde đậm đặc vào dung dịch chứa tuyến trùng sao cho nồng độ formaldehyde cuối cùng là 2 – 5%. Mẫu được ngâm trong formaldehyde ít nhất 12 giờ, lý tưởng nhất là 2 tuần trước khi tiến hành các bước tiếp theo. Có thể bảo quản mẫu lâu dài trong dung dịch formaldehyde.

Các chất cố định khác thường được sử dụng bao gồm TAF (3% formaldehyde, 0,2 % triethanolamine trong nước cất) và FA4:1 (4% formaldehyde, 0,1% axit axetic trong nước cất). Tuy vậy, các hóa chất này không phù hợp với bảo quản lâu dài. Không sử dụng cồn ethanol để cố định mẫu cho mục đích nghiên cứu về hình thái, nhưng có thể sử dụng cồn ethanol để bảo quản cho mục đích nghiên cứu về sinh học phân tử sau này.

#### *Làm tiêu bản*

Để làm tiêu bản với mục đích bảo quản lâu dài, mẫu tuyến trùng được ngâm trong glycerol và để bay hơi chậm. Cho một lượng nhỏ dung dịch glycerol 2 - 5 % (vài ml) vào một đĩa thủy tinh nông, sau đó đặt tuyến trùng vào. Cho đĩa vào tủ sấy ở 40°C hoặc bình hút ẩm. Để làm chậm lại quá trình bay hơi nước không nên đóng kín nắp đĩa.

Quan sát dưới kính lúp soi nổi để gấp từng mẫu tuyến trùng vào một lam kính hiển vi. Sử dụng que cấy nhọn đầu có dính keo dán lông mi để gấp tuyến trùng dần dần về phía bề mặt có thể quan sát được và nhấc ra khỏi bề mặt bằng cách di chuyển que cấy. Quá trình gấp tuyến trùng ra được tiến hành từ đĩa nông nhưng nhiều khi phải thường xuyên thay đổi cự ly ống kính để tìm tuyến trùng. Muốn thành thạo thao tác này cần phải thực hành nhiều.

Gấp một vài đến 10 tuyến trùng ở các giai đoạn đại diện vào một giọt glycerol khan đặt trên một lam kính. Dùng que cấy đặt cố định mẫu ở chính giữa lam kính. Để giữ cho mẫu tuyến trùng khỏi bị nghiền nát, dùng vụn thủy tinh, lamen vỡ (Số 0) hoặc sáp đặt xung quanh mẫu tuyến trùng. Nhẹ nhàng đặt lamen (tốt nhất nên dùng loại tròn) lên trên giọt glycerol khan, không để glycerol tràn ra mép ngoài lamen. Nếu dùng sáp cạo râu hoặc vòng sáp (nấu chảy ra rồi để nguội) thì phải đặt lam kính lên bếp điện để làm sáp chảy ra. Sau đó hàn lamen lại. Trước đây glycin thường được dùng để hàn lamen nhưng hiện nay glycin không sẵn có trên thị trường vì vậy có thể thay bằng nhựa epoxy hai phần (ví dụ: 5 min. Araldite) hoặc DePeX (có ở nhiều công ty khác nhau). Mặc dù một số nơi có thể sử dụng thuốc đánh móng tay chân nhưng cách này thường không bền trong điều kiện khí hậu nóng.

## **5.4 MÔI TRƯỜNG NUÔI CÂY**

Hầu hết các môi trường nuôi cấy thường được làm từ các hóa chất cơ bản hoặc thậm chí có thể mua sẵn từ thị trường. Các môi trường bán sẵn trên thị trường có chất lượng đồng đều hơn môi trường tự chuẩn bị từ các thành phần cơ bản.

---

Hạn chế sự phát triển của vi khuẩn bằng cách cho thêm một lượng kháng sinh vào môi trường. Hầu hết các loại kháng sinh đều dễ bị biến tính ở điều kiện nhiệt độ cao, chỉ bỏ kháng sinh vào môi trường sau khi hấp khử trùng (trước khi agar kịp đông lại).

Penicillin (50 đơn vị / ml), streptomycin (50 đơn vị / ml) và tetracycline (30 đơn vị / ml) có thể sử dụng riêng hoặc kết hợp. Chloramphenicol (50 mg / l) có thể hấp khử trùng (cho thẳng vào môi trường trước khi hấp).

Lượng agar cho vào các môi trường (giới thiệu ở phần dưới) có thể khác nhau tùy thuộc vào nhãn hiệu agar và cơ sở sản xuất. Lượng agar dùng để nấu môi trường phải bảo đảm đủ cứng để có thể cấy vi khuẩn bằng phương pháp vạch que cấy lên môi trường. Nếu phát hiện trong nước máy có chứa chất bẩn hoặc độc tố thì nên sử dụng nước cất thay thế.

**Môi trường khoai tây - đường - agar (PDA):** Đây là môi trường tốt cho sự phân lập và phát triển của nấm. Rửa sạch khoai tây (không gọt vỏ). Cắt khoai tây thành từng miếng nhỏ và luộc trong khoảng 1 giờ, sau đó lọc khoai tây và nước luộc bằng rây (hoặc vải màn) rồi vớt bỏ phần bã đi. Có thể dùng máy xay sinh tố để xay nát hỗn hợp. Hòa tan đường dextrose (glucose) và agar vào 1 lít nước máy cùng với nước lọc khoai tây. Hấp khử trùng ở 121°C trong 20 phút.

#### Môi trường PDA

Khoai tây	200 g
Dextrose (glucose)	20 g
Agar	20 g
Nước máy	1 lit

Công thức này có thể được thay đổi một chút bằng cách dùng các loại rau và ngũ cốc khác thay thế khoai tây. Có thể giảm  $\frac{1}{4}$  hoặc  $\frac{1}{2}$  lượng khoai tây và lượng đường tùy thuộc yêu cầu sử dụng.

**Môi trường agar - nước máy (TWA):** Đây là môi trường phổ biến để phân lập rất nhiều loài nấm. Có thể tiệt trùng cọng lúa hoặc hạt ngũ cốc rồi đặt lên môi trường để kích thích nấm sản sinh bào tử. Trộn agar trong nước và hấp ở 121°C trong 20 phút.

#### Môi trường TWA

Agar	20 g
------	------

Nước máy	1 lit
----------	-------

**Môi trường nước quả V-8 - agar (V-8J):** Đây là môi trường tốt cho sự phát triển của nấm, đặc biệt là *Phytophthora*. Lọc qua nước V-8 trước khi sử dụng. Trộn các thành phần vào nhau và hấp khử trùng ở 121°C trong 20 phút. Nếu không có nước V-8 có thể thay thế bằng nước sinh tố cà chua, cà rốt, cần tây lớn...

#### Môi trường V-8J

Nước V-8 đã lọc	200 ml
CaCO <sub>3</sub>	3 g
Agar	20 g
Nước cất	800 ml

**Môi trường King B - agar (KBA):** Đây là môi trường tốt để phân lập vi khuẩn hại nói chung và đặc biệt là pseudomonads huỳnh quang và *Erwinia* spp. Điều chỉnh pH đến 7,2 và hấp khử trùng ở 121°C trong 25 phút.

#### Môi trường KBA

Proteose peptone	20 g
Glycerol	10 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (khan)	1,5 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,5 g
Agar	15 g
Nước cất	1 lit

**Môi trường Nutrient agar (NA):** Là môi trường thường được sử dụng để nuôi cấy vi khuẩn. Điều chỉnh pH đến 7,4 và hấp khử trùng ở 121°C trong 15 phút.

#### Môi trường NA

Chất chiết nấm men	3 g
Peptone	5 g
NaCl	5 g
Agar	15 g
Nước cất	1 lit

**Môi trường Sucrose peptone agar (SPA):** Là môi trường thích hợp cho sự phát triển của nhiều loại vi khuẩn, có thể sử dụng để phân lập vi khuẩn hại. Điều chỉnh pH 7,2 – 7,4 và hấp khử trùng ở 121°C trong 15 phút.

### Môi trường SPA

Sucrose	20 g
Peptone	5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (khan)	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,25 g
Agar	12 g
Nước cất	1 lit

**Môi trường Malt extract agar (MEA):** Là môi trường tốt để phân lập và nuôi cấy nhiều loại nấm sợi và nấm men. Có thể sử dụng lượng mạch nha khác nhau. Hấp khử trùng ở 121°C trong 20 phút.

### Môi trường MEA

Malt extract (mạch nha)	2 – 20 g
Agar	20 g
Nước cất	1 lit

**Môi trường Glycerol agar (GA):** Được sử dụng để bảo quản mẫu phân lập làm tiêu bản khô. Hấp khử trùng ở 121°C trong 20 phút. Tản nấm phát triển trên môi trường agar chưa khô hoàn toàn được đặt lên môi trường GA (đổ vào một nắp đĩa Petri). Để đĩa khô trong 2-3 ngày. Lớp môi trường GA khô mềm, dẻo hơn hầu hết các môi trường agar khác.

### Môi trường GA

Glycerol	25 ml
Agar	20 g
Nước máy	1 lit

---

## 6 CÁCH BẢO QUẢN VÀ LƯU GIỮ MẪU BỆNH

### 6.1 TIÊU BẢN MẪU BỆNH

Tiêu bản mẫu bệnh là một mẫu thực vật hoặc nấm khô được để trong một gói có dán nhãn. Tiêu bản mẫu bệnh có thể bao gồm các mẫu nấm phân lập khô, các tiêu bản lam, ảnh và hình vẽ minh họa. Gói tiêu bản có thể bao gồm cả các bản chú thích, thư từ trao đổi và các thông tin liên quan khác.

#### 6.1.1 Tiêu bản khô

Mẫu cây bệnh và nấm bệnh được ép và làm khô bằng cách đặt chúng giữa các lớp giấy thấm hoặc giấy báo. Dùng 2 tấm bìa dạng làn sóng ép các lớp giấy thấm hoặc giấy báo chứa mẫu lại với nhau. Dùng 2 tấm gỗ (hoặc 2 tấm nguyên liệu cứng) ép chặt 2 mặt của khối mẫu rồi dùng dây buộc chặt lại tạo ra lực ép lên mẫu cây bệnh. Mẫu cây bệnh phải khô nhưng không được nhăn hoặc co lại. Mẫu cây bệnh có thể đạt tiêu chuẩn sau vài ngày ép. Để làm nhanh quá trình khô (đặc biệt là trong các khu vực khí hậu ẩm như các vùng nhiệt đới) nên dùng tủ sấy hoặc quạt. Thay giấy thấm hoặc báo thường xuyên.

Tiếp tục quá trình ép đến khi mẫu bệnh khô hoàn toàn. Có thể đặt mẫu ép dưới ánh nắng mặt trời, trong phòng có máy điều hòa hoặc gần hơi nóng để thúc đẩy quá trình khô. Thời gian để mẫu khô hoàn toàn phụ thuộc vào loại mẫu cây và độ ẩm. Lấy mẫu ra khỏi lớp giấy thấm hoặc báo ép quá sớm sẽ làm mẫu bị nhăn hoặc tạo điều kiện cho các loại nấm phát triển trên bề mặt tiêu bản. Đa số các mẫu thực vật có thể khô sau 5 -10 ngày. Trước khi để mẫu vào phòng tiêu bản phải xông hơi khử trùng hoặc đặt mẫu trong tủ đá (tủ lạnh sâu) để diệt nhện và côn trùng.

Cách đơn giản nhất để bảo quản nấm Agaricales và Ascomycetes loại lớn là để chúng khô thật nhanh. Mặc dù quản lý tiêu bản khô dễ dàng hơn tiêu bản ngâm, quá trình làm khô thường ảnh hưởng đến màu sắc, hình dạng và kích thước mẫu bệnh. Nấm lớn có thể được làm khô bằng tủ lạnh sâu (tủ đá) để giữ nguyên màu sắc và hình dạng, tuy nhiên phải giữ mẫu rất cẩn thận vì bảo quản bằng cách này mẫu trở nên rất giòn và dễ vỡ. Kích thước của nấm lớn thường quá to so với các gói tiêu bản và rất dễ gãy vỡ, vì vậy để bảo quản mẫu lâu dài nên dùng các hộp carton nhỏ hoặc các túi nilon có chứa silica gel.

Nên bảo quản tiêu bản mẫu bệnh khô và các mẫu nấm phân lập khô trong các gói giấy hoặc bìa làm bằng chất liệu không có axit với kích thước tiêu chuẩn (khoảng 10-15 cm rộng × 10 cm dài). Có thể đặt mẫu vào các gói giấy không axit mỏng hơn trước khi cho vào gói tiêu bản. Lý tưởng nhất là tất cả các bản chú thích, nhãn, keo dán, mực, nhựa hoặc túi nilon dùng trong phòng tiêu bản đều làm từ chất liệu không có axit để giữ tiêu bản được lâu dài không bị ố, hỏng. Hiện nay trên thị trường có bán bút thử giấy xem có chứa axit hay không.

Mỗi gói tiêu bản phải được dán nhãn ở mặt trước (Hình 13) với các thông tin như sau:

- Số thứ tự truy cập;



- Tên khoa học của vi sinh vật hại;
- Giá thể hoặc tên khoa học của ký chủ;
- Địa điểm lấy mẫu, bao gồm: nước, tỉnh, kinh độ và vĩ độ;
- Tên người lấy mẫu và số hiệu mẫu;
- Ngày lấy mẫu;
- Tên người giám định mẫu;
- Tài liệu tham khảo trong đó có các bài báo đề cập đến tiêu bản.

QUEENSLAND DEPARTMENT OF PRIMARY INDUSTRIES  
PLANT PATHOLOGY HERBARIUM (BRIP)

**BRIP 39807** Uredinales

*Racospermyces digitatus* (G. Winter) J. Walker

Tên ký chủ: *Acacia mangium* Willd.  
 Họ ký chủ: Mimosaceae  
 Triệu chứng: Phyllode rust  
 Địa điểm: Meunga QLD Australia  
 Người lấy mẫu: Ivory, M.H.  
 Số hiệu mẫu: P9288 Ngày lấy mẫu: 23 Oct 1997  
 Người giám định: Shivas, R.G.

**Hình 13** Ví dụ một nhãn dán trên gói tiêu bản sử dụng tại phòng tiêu bản BRIP

Mỗi tiêu bản trong phòng mẫu đều được đánh số truy cập để phân biệt với các mẫu khác. Số truy cập tiêu bản được in trên nhãn của gói tiêu bản (Hình 13). Sự kết hợp của số truy cập và tên viết tắt của cơ quan lưu giữ mẫu trong cuốn *Index Herbariorum* bảo đảm rằng bất kỳ mẫu tiêu bản nào cũng có một tên duy nhất, phân biệt với tất cả các tiêu bản khác trên thế giới. Nếu một tiêu bản hàm chứa hơn một đơn vị phân loại thì có thể thêm các ký hiệu (a, b, c..v.v..) đại diện cho mỗi đơn vị phân loại vào sau số truy cập. Tiêu bản mẫu bệnh khô và mẫu vi sinh vật hại được phân lập từ mẫu tiêu bản đó phải dùng chung một số truy cập.

Chuẩn bị sẵn các gói tiêu bản giống hệt nhau trong trường hợp cần thiết phải chia tiêu bản thành nhiều gói nhỏ. Các gói này chứa cùng một lượng thông tin giống hệt nhau và có chung một số truy cập, có thể được sử dụng để gửi hoặc trao đổi tiêu bản với các phòng mẫu bệnh khác.

Tiêu bản nấm chiếm số lượng lớn trong số các mẫu tiêu bản của một bộ sưu tập bệnh cây. Có thể sắp xếp tiêu bản nấm thành nhóm theo thứ tự tiến hóa. Hầu hết tiêu bản nấm thuộc lớp nấm túi Ascomycotina hoặc nấm đảm Basidiomycotina, các tiêu bản trong mỗi nhóm này lại được sắp xếp theo vần abc của tên chi. Một số nhóm vi sinh vật hại phổ biến có thể được xếp riêng, ví dụ như gỉ sắt (Uredinales), than đen (Ustilaginomycetes) và phấn trắng (Erysiphales), các mẫu tiêu bản trong các nhóm vi

---

sinh vật này lại được sắp xếp theo vần abc tên ký chủ (vì nhiều loài gỉ sắt, than đen và phấn trắng đều ký sinh chuyên tính trên các ký chủ khác nhau).

Nấm ở giai đoạn vô tính (Deuteromycetes, Fungi Imperfecti, asexual fungi, conidial fungi) nên sử dụng tên hữu tính nếu có. Hơn nữa, một số nấm có thể có ít nhất 2 tên vô tính (synanamorphs) với cùng một tên hữu tính. Nên dùng tên hữu tính đặt cho tiêu bản thậm chí giai đoạn hữu tính của nấm đó không có mặt trong tiêu bản. Trong trường hợp này cần chú thích rõ về sự vắng mặt của giai đoạn hữu tính ở trên nhãn tiêu bản.

Đối với những tiêu bản quá lớn không đủ chỗ để xếp đúng vị trí theo thứ tự tiến hóa có thể thay vào vị trí đó bằng một miếng bìa hoặc một gói tiêu bản rộng trên đó ghi rõ vị trí đặt tiêu bản để có thể tìm được dễ dàng. Tương tự có thể dùng một miếng bìa đặt vào vị trí của các tiêu bản đang cho mượn và có chú thích rõ ràng.

### 6.1.2 Tiêu bản chuẩn

Tiêu bản chuẩn (mẫu gốc) là một tiêu bản mẫu hoặc hình minh họa duy nhất ban đầu được sử dụng để xác định tên khoa học cho một loài mới. Khi một loài nấm được mô tả và định tên, tiêu bản mẫu của loài mới đó phải được chuyển đến một phòng mẫu bệnh và được công nhận là mẫu chuẩn cho tên loài nấm đó. Tiêu bản chuẩn của nấm phải được bảo quản và làm khô vĩnh viễn. Tuy nhiên, các mẫu nấm chuẩn cũng có thể được bảo quản ở trạng thái ngủ nghỉ bằng phương pháp lạnh khô hoặc lạnh sâu.

Các mẫu chuẩn (mẫu ban đầu) thường được giữ trong các gói mẫu màu đỏ hoặc đánh dấu đỏ để có thể nhận ra chúng dễ dàng trong phòng tiêu bản. Có các loại mẫu chuẩn sau:

- Holotype - Một tiêu bản hoặc hình minh họa được tác giả dùng để định tên mới;
- Isotype - Bất cứ tiêu bản nào được nhân lên từ holotype;
- Lectotype - Một tiêu bản hoặc hình minh họa được chỉ định như mẫu ban đầu (mẫu chuẩn) nếu tại thời điểm công bố không có mẫu holotype hoặc mẫu holotype bị mất hay được phát hiện là thuộc hơn một đơn vị phân loại;
- Isolectotype - Bất cứ tiêu bản nào được nhân lên từ lectotype;
- Syntype - Bất cứ tiêu bản nào được đề cập trong lần xuất bản (công bố) đầu tiên mà trong đó không có holotype nào được xác định hoặc có thể là từ 2 tiêu bản trở lên cùng đồng thời được xác định như mẫu chuẩn;
- Paratype - Bất cứ tiêu bản nào được đề cập đến trong lần xuất bản (công bố) đầu tiên mà không phải là holotype, isotype hay một trong các syntypes;
- Neotype - Một tiêu bản hoặc hình minh họa được coi như mẫu chuẩn theo danh pháp nếu tất cả mẫu ban đầu dùng để định tên bị mất hoặc bị hỏng;
- Epitype - Một tiêu bản hoặc hình minh họa được lựa chọn như một mẫu chuẩn khi mà holotype, lectotype hay neotype được quy định trước đó,

---

hay tất cả các mẫu ban đầu được đề cập đến trong lần xuất bản (công bố) đầu tiên không đủ rõ ràng để có thể giải thích và không được xác định rõ ràng theo đơn vị phân loại;

- Topotype - Bất cứ tiêu bản mẫu nào được thu thập tại cùng địa điểm với holotype.

### 6.1.3 Mẫu vi sinh vật khô

Các đặc tính hình thái của tản nấm có ý nghĩa quan trọng trong nghiên cứu về nấm học. Mẫu tản nấm khô là cách duy nhất để bảo quản lâu dài. Các mẫu tiêu bản được phân lập từ đất, nước hoặc ký chủ động vật. Các mẫu nấm khô còn có tác dụng hỗ trợ bổ sung thông tin cho các tiêu bản cây bệnh với ít bào tử. Mẫu nấm phân lập được làm khô và bảo quản cùng với tiêu bản bệnh trong gói tiêu bản.

Mẫu nấm phân lập khô được chuẩn bị bằng cách nuôi cấy nấm trên môi trường thích hợp trong một đĩa Petri đến khi nấm phát triển tới giai đoạn mong muốn. Mẫu nấm được làm khô trong đĩa Petri cho đến khi tản nấm không dính chặt vào đĩa Petri nữa. Có thể làm khô tản nấm bằng cách để đĩa Petri trong buồng cấy 2 – 3 ngày. Sau khi tản nấm hoàn toàn khô có thể lấy ra khỏi đĩa Petri và đặt vào gói tiêu bản. Các mẫu nấm phân lập với cấu trúc nấm mỏng manh có thể được bảo quản trong các đĩa Petri mỏng.

Thông thường, mẫu nấm phân lập được làm khô như trên có thể bị cong, nứt vỡ và rất khó có thể lấy ra khỏi đĩa Petri mà không bị vỡ. Có thể khắc phục nhược điểm này bằng cách lấy mẫu nấm ra khỏi đĩa Petri trước khi khô hoàn toàn và đặt nổi trên môi trường glycerol agar (GA) nóng (xem phần môi trường nuôi cấy, chương 5) được đổ vào nắp đĩa Petri trước đó. Không đậy nắp Petri cho đến khi mẫu khô hoàn toàn. Bằng cách này mẫu nấm phân lập được làm khô mà vẫn mềm dẻo, có thể bóc dễ dàng ra khỏi đĩa Petri và đặt vào gói tiêu bản.

Phương pháp làm khô như trên không phải lúc nào cũng giết chết được nấm. Tốt nhất, nên giết chết mẫu nấm phân lập vì một số nấm sản sinh ra rất nhiều bào tử có thể phát tán ra trong không khí làm lẫn tạp các mẫu nấm khác trong phòng thí nghiệm. Giết nấm bằng cách đặt các mẫu khô trong bình làm khô chứa formalin hoặc bằng cách đặt ngược đĩa Petri chứa mẫu nấm phân lập, nhỏ khoảng 1,5 ml formalin vào nắp đĩa rồi để trong buồng thoát khí 1 – 3 ngày.

### 6.1.4 Tiêu bản lam

Tiêu bản cố định bằng axit lactic có thể được hàn bằng cách dùng thuốc đánh móng tay quét 2 – 3 lớp lên mép lamén. Cách này có thể giữ cho tiêu bản lam không bị khô trong vài năm. Dùng polyvinyl alcohol (dạng bột) hòa tan trong axit lactic để tạo ra chất keo gắn, cách này có thể giữ tiêu bản được lâu dài.

Có thể áp dụng quá trình loại nước trong trường hợp muốn giữ tiêu bản lam lâu dài. Quá trình loại nước đòi hỏi phải ngâm mẫu cây hoặc nấm liên tục trong chuỗi các dung dịch cồn với nồng độ tăng dần (ví dụ 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% và cồn nguyên chất 100%), mỗi nồng độ ngâm vài phút. Bằng cách này có thể loại bỏ toàn

bộ hàm lượng nước trong mẫu. Làm sạch mẫu bằng xylene  $C_6H_4(CH_3)_2$  và dán vào lam bằng các môi trường như bôm Canada.

Tốt nhất không nên giữ tiêu bản lam trong các gói tiêu bản mà dùng các hộp đựng tiêu bản lam chuyên dụng. Chú ý nên để các tấm bìa nhỏ ghi rõ số truy cập ở đúng vị trí và chú thích nơi để lam tiêu bản.

### 6.1.5 Đóng gói và vận chuyển tiêu bản

Tất cả các tiêu bản bệnh cây lưu giữ trong phòng tiêu bản phải được gói trong các gói giấy hoặc bìa làm bằng chất liệu không có axit (Hình 14). Những mẫu có kích thước lớn được giữ trong các hộp carton để tránh va đập. Mỗi một vật để trong gói tiêu bản, ví dụ như bản lấy mẫu, bản chú thích, hình vẽ, tiêu bản lam... đều phải được in số truy cập tiêu bản rõ ràng. Tiêu bản mẫu vi sinh vật đã phân lập được đặt lên giấy lọc và gói trong các gói giấy trong suốt, được giữ cùng với tiêu bản cây bệnh, tốt nhất nên giữ tiêu bản lam trong hộp đựng tiêu bản lam bằng bìa cứng hoặc bằng nhựa để tránh vỡ, gãy.



**Hình 14** Các gói tiêu bản ở Bảo tàng mẫu bệnh Ustilaginales Vánky (HUV) và Bảo tàng bệnh cây của QDPI&F (BRIP)

Khi vận chuyển, tiêu bản phải được giữ bên trong các gói giấy hoặc bìa. Các gói tiêu bản được bó lại thành từng bó rồi dùng giấy báo hoặc túi nilon xấp bọc lại trước khi đặt vào hộp carton lớn hơn để vận chuyển. Nên dùng bông gói mẫu vi sinh vật sống được bảo quản lạnh khô (trong các ống hút chân không) và đặt vào trong các hộp giấy hình trụ.

## 6.2 MẪU VI SINH VẬT ĐÃ PHÂN LẬP

Mẫu nấm hoặc vi khuẩn được lưu giữ với mục đích duy trì trạng thái sống của chúng mà không làm thay đổi đặc điểm hình thái, sinh lý cũng như di truyền trong một giai đoạn nhất định. Mẫu vi sinh vật hại được giữ ở trạng thái sống ít nhất là trong quá trình nghiên cứu hoặc có thể được giữ vô thời hạn, nhất là đối với các mẫu vi sinh vật chuẩn (ban đầu) hoặc các mẫu được đề cập đến trong các bài đã xuất bản. Nếu không có các mẫu vi sinh vật được giám định và lưu giữ, đặc biệt là vi khuẩn, thì không thể tiến hành so sánh, phân loại để định danh đơn vị phân loại mới.

Kể từ năm 1995, Công ước về Đa dạng sinh học được 180 nước trên Thế giới ký kết có hiệu lực đối với tất cả các mẫu vi sinh vật lưu giữ. Công ước này xác định chủ

---

quyền của các nước có xuất xứ vi sinh vật, với mục đích bảo đảm sự công bằng và phân chia lợi nhuận bình đẳng đối với những nước muốn khai thác lợi ích kinh tế từ mẫu vi sinh vật đó. Việc trao đổi mẫu vi sinh vật giữa các trung tâm mẫu bệnh với nhau thường đòi hỏi phải có văn bản thỏa thuận chuyển giao mẫu - Material Transfer Agreement (MTA). Tuy nhiên, văn bản thỏa thuận chuyển giao mẫu giữa các trung tâm mẫu bệnh là không rõ ràng. Trên thực tế ở nhiều trung tâm lưu giữ mẫu, việc thực thi công tác này vẫn còn chưa tiến triển.

Không phải tất cả các phương pháp bảo quản mô tả sau đây đều phù hợp với các loài nấm và vi khuẩn phát triển trên môi trường nhân tạo. Đôi khi phải thử nghiệm và chấp nhận rủi ro để tìm ra phương pháp tốt nhất cho việc bảo quản mẫu vô thời hạn.

### **6.2.1 Nuôi cấy trên môi trường agar**

Mẫu vi sinh vật thường được giữ trong lọ McCartney 20 ml có cổ rộng để có thể dễ dàng cấy truyền khi cần. Nên sử dụng các môi trường nuôi cấy thích hợp, ví dụ như ½ PDA đối với nấm hoặc môi trường NA đối với vi khuẩn. Một số nấm và vi khuẩn đòi hỏi phải sử dụng các môi trường đặc biệt. Môi trường thường được đổ đến xấp xỉ ½ lọ trước khi tiệt trùng. Sau đó lọ được đặt nghiêng khi môi trường còn nóng để khi đông lại môi trường tạo thành mặt phẳng nghiêng.

Cấy nấm hoặc vi khuẩn vào mặt nghiêng của môi trường, sau khi vi sinh vật đã phát triển như mong muốn, bảo quản mẫu trong môi trường sạch, không bụi bặm ở 5 – 8°C. Đối với một số nấm và vi khuẩn nhạy cảm với môi trường lạnh, nên bảo quản ở 15°C. Mẫu vi sinh vật phải được theo dõi thường xuyên vì môi trường agar có thể bị khô rất nhanh trong điều kiện độ ẩm thấp. Khi bảo quản nấm phải rất cẩn thận để tránh nhện xâm nhập. Tất cả các lọ giữ mẫu phải được hàn kín miệng bằng màng nhựa hoặc nylon siêu mỏng trong suốt quá trình bảo quản mẫu. Mẫu vi sinh vật phải được cấy truyền sang môi trường mới 6 tháng 1 lần. Phải thật cẩn thận để không làm mất các mẫu vi sinh vật có giá trị mặc dù cấy truyền nhiều lần có thể dẫn đến những thay đổi về hình thái, mất khả năng ký sinh và giảm khả năng hình thành bào tử.

### **6.2.2 Bảo quản bằng dầu khoáng**

Phương pháp này đặc biệt có ích ở các vùng nhiệt đới vì nó có thể giữ cho mẫu vi sinh vật khỏi bị khô và tránh được sự xâm nhập của nhện. Cấy mẫu vi sinh vật như trên nhưng dùng lượng agar ít hơn. Muốn sử dụng phương pháp này, tiêu chuẩn quan trọng đối với mẫu vi sinh vật là phải phát triển khỏe mạnh, đối với nấm phải sản sinh rất nhiều bào tử. Đổ dầu khoáng lên trên mẫu vi sinh vật, ngập trên đỉnh mặt agar khoảng 1 cm. Tiệt trùng dầu khoáng trước khi sử dụng bằng cách hấp 2 lần ở 121°C trong 15 phút.

Chia dầu khoáng thành nhiều lượng nhỏ để tránh lẫn tạp. Có thể dùng lọ McCartney có nắp nhựa, tuy nhiên chú ý để không làm đổ lọ vì dầu có thể chảy ra ngoài. Kỹ thuật này đơn giản, không đòi hỏi dụng cụ và hóa chất đắt tiền. Phương pháp này có thể bảo quản mẫu từ 2 - 40 năm, tuy nhiên lý tưởng nhất là nên cấy truyền sang lọ mới 5 năm 1 lần.

---

### 6.2.3 Bảo quản trong nước vô trùng

Cắt các miếng agar tại đỉnh của các tán nấm phát triển sau 1 tuần nuôi cấy rồi đặt vào nước cất vô trùng trong lọ Wheaton 5 ml hoặc lọ McCartney 20 ml. Nắp được vặn chặt và hàn bằng nhựa hoặc bọc nilon siêu mỏng. Bảo quản lọ mẫu ở nhiệt độ phòng. Phương pháp này có thể bảo quản mẫu trong vài năm, đặc biệt phù hợp với bảo quản *Pythium* spp. và *Phytophthora* spp. Phương pháp này cũng có thể áp dụng đối với vi khuẩn. Dùng que cấy vi khuẩn vô trùng lấy các khuẩn lạc mọc sau 24-48 giờ đặt vào nước cất vô trùng.

### 6.2.4 Bảo quản đông khô

Cơ chế của phương pháp này là loại bỏ hàm lượng nước trong mẫu vi sinh vật bằng cách giảm áp suất ở trạng thái đông băng, quá trình này được gọi là thăng hoa. Thăng hoa xảy ra khi một dung dịch đông băng chuyển hóa trực tiếp sang trạng thái khí, bỏ qua trạng thái lỏng.

Mẫu vi sinh vật sau khi đông khô được hàn lại và bảo quản trong các ống hoặc lọ thủy tinh nhỏ. Các nấm sản sinh nhiều bào tử là các nhóm phù hợp nhất với phương pháp bảo quản này. Phương pháp này cũng rất thích hợp với vi khuẩn. Mẫu vi sinh vật vẫn có thể sống sót sau 10 năm hoặc hơn. Tuy nhiên thiết bị làm đông khô khá đắt và việc duy trì bảo quản bằng phương pháp này cũng khá tốn kém. Đội ngũ cán bộ cũng yêu cầu phải có kinh nghiệm để chuẩn bị mẫu và vận hành hệ thống làm đông khô. Một trong những ưu điểm của phương pháp này là mẫu nấm được đông khô không cần bảo quản lạnh mà có thể bảo quản ở nhiệt độ phòng.

Sau khi làm đông khô, lấy một ống thủy tinh từ mỗi mẫu vi sinh vật mở ra và cấy truyền để kiểm tra khả năng sống sót và độ thuần vi không phải tất cả các loài đều sống sót qua quá trình này. Nhiều nấm bảo quản đông khô có thể được phục hồi bằng cách cấy một mẫu nấm khô lên một đĩa môi trường agar mới. Vi khuẩn và nấm men bảo quản đông khô cần phải có thời gian làm ấm lại trong nước cất vô trùng (khoảng 30 phút) trước khi cấy lên môi trường agar.

### 6.2.5 Bảo quản trong đất

Đất được rây mịn, đổ vào ½ các lọ McCartney 20 ml và sấy tiệt trùng bằng nhiệt (hoặc hấp 2 lần ở 121°C trong 15 phút). Dung dịch bào tử được đổ vào đất vô trùng và giữ ở 20-25°C trong khoảng 5-10 ngày. Sau đó giữ mẫu vi sinh vật trong tủ lạnh. Mẫu vi sinh vật có thể sống sót trong đất trong khoảng thời gian khá dài. Cấy lại vi sinh vật bằng cách dùng dao cấy vô trùng lấy một ít đất cấy lên môi trường thích hợp. Phương pháp này có thể sử dụng để bảo quản *Fusarium* spp., vì sau một thời gian trong môi trường agar *Fusarium* thường bị biến đổi.

### 6.2.6 Bảo quản bằng silica gel

Tạo dung dịch bào tử nấm và tế bào vi khuẩn từ sữa không béo 5% (w/v) sau đó đổ dung dịch nấm hoặc vi khuẩn lên silica gel vô trùng đã đề nguội. Dùng 6-22 lưới silica gel tinh lọc không chỉ thị đổ vào ½ lọ thủy tinh có nắp vặn và tiệt trùng trong tủ sấy. Làm khô silica gel ở nhiệt độ phòng cho đến khi các hạt tinh thể tách rời nhau sau 14 ngày. Vặn chặt nắp và giữ lọ trong tủ lạnh phía trên silica gel chỉ định với

---

nhệt độ khoảng 4- 6°C. Khi cần cấy lại, đặt một vài tinh thể silica lên môi trường phù hợp. Phương pháp này có thể duy trì sự sống của vi sinh vật tới 11 năm tùy thuộc từng loài. Phương pháp này phù hợp cho các vi sinh vật sống sót trong môi trường bảo quản đông khô, bao gồm cả các dạng sợi nấm sản sinh ra thể hạch hoặc các hạt bào tử.

### **6.2.7 Bảo quản trên giấy thấm**

Đặt một miếng giấy thấm lên 1 đĩa Petri và thấm ướt miếng giấy bằng vài giọt nước cất đã tiệt trùng. Cắt các mẫu agar từ môi trường nấm thuần đặt lên trên miếng giấy, sau đó đặt đĩa Petri vào tủ định ôn ở 25°C cho đến khi nấm phát triển bao phủ toàn bộ miếng giấy thấm. Khi miếng giấy thấm đã khô hoàn toàn (khoảng 2-4 tuần để trong tủ định ôn), dùng kéo vô trùng cắt miếng giấy thành từng mẫu rồi để vào các lọ đựng mẫu nhỏ, có nắp. Bảo quản mẫu trong tủ lạnh 4°C. Khi muốn cấy lại mẫu, gấp 1-2 mẫu giấy lọc cấy lên môi trường PDA. Sau 2 – 4 ngày có thể nhìn thấy nấm phát triển. Phương pháp này thường áp dụng để bảo quản các loài *Fusarium*.

### **6.2.8 Bảo quản lạnh sâu**

Bảo quản vi sinh vật trong tủ lạnh sâu ở nhiệt độ thấp từ -20°C tới -85°C (bảo quản lạnh sâu) là phương pháp bảo quản ưu việt đối với hầu hết loài nấm, vi khuẩn và virus. Một trong các hệ thống bảo quản lạnh phổ biến nhất và đơn giản nhất đối với nấm và vi khuẩn là việc sử dụng các hạt gồm rỗ (cryobeads) đặt vào dung dịch chất lỏng bảo quản lạnh, như glycerol, trong các lọ nhựa nhỏ. Sau khi cấy lại, dùng pipet vô trùng hút bớt các dung dịch thừa rồi đặt lọ đựng mẫu vào tủ lạnh sâu. Khi muốn cấy lại vi sinh vật, chỉ cần lấy một trong các hạt gồm rỗ và cấy lên môi trường lỏng hoặc quét lên bề mặt của môi trường rắn thích hợp.

### **6.2.9 Bảo quản bằng nitơ lỏng**

Bảo quản vi sinh vật ở nhiệt độ cực thấp từ -190°C đến -196°C trong hoặc trên nitơ lỏng (cũng là một dạng của bảo quản lạnh sâu) là phương pháp bảo quản tốt nhất đối với hầu hết các loài nấm và vi khuẩn. Xử lý mẫu vi sinh vật phân lập, dịch mô hoặc dịch bào tử vi sinh vật bằng chất bảo quản lạnh, ví dụ như glycerol 10% (trộn lẫn với dung dịch chất giàu dinh dưỡng nếu xử lý vi khuẩn), trước khi chuyển sang ống vô trùng và làm lạnh tới nhiệt độ cực thấp trong giai đoạn bay hơi nitơ lỏng. Tốc độ làm lạnh có ý nghĩa rất quan trọng trong toàn bộ quá trình, vi sinh vật đạt tỷ lệ sống sót cao nhất khi quá trình làm lạnh diễn ra chậm. Ở nhiệt độ cực thấp, quá trình trao đổi chất bị ức chế, nếu vi sinh vật sống sót sau bước làm lạnh đầu tiên thì mẫu có thể được lưu giữ vô thời hạn bằng cách này. Phương pháp này đòi hỏi phải có trang thiết bị đắt tiền và nguồn nitơ lỏng sẵn có. Đội ngũ cán bộ làm việc này cũng cần phải có kinh nghiệm để duy trì các điều kiện tối ưu cho công tác bảo quản mẫu vi sinh vật.

---

## 7 GIÁM ĐỊNH VI SINH VẬT GÂY HẠI

Nhiều loại vi sinh vật gây hại không có khóa phân loại sẵn có. Hơn nữa, các tài liệu tham khảo về vi sinh vật hại lại rất nhiều và phức tạp đến nỗi chỉ có các chuyên gia về bệnh cây mới có thể tiếp cận thường xuyên được với các thông tin về phân loại học của các nhóm vi sinh vật hại nhất định. Tuy nhiên, công tác giám định cũng bớt khó khăn hơn nếu chúng ta làm quen với các khóa phân loại, tài liệu tham khảo và phương pháp kiểm tra mẫu bệnh.

### 7.1 NẤM

Nấm là các vi sinh vật nhỏ đa bào, thường có dạng sợi và mang bào tử. Nấm không có diệp lục, thành tế bào chứa kitin hoặc cellulose hoặc cả kitin và cellulose. Tảo nấm là thể sinh dưỡng của nấm bao gồm một tập hợp nhiều sợi nấm sinh trưởng tạo thành. Sự phát triển của hệ sợi nấm xảy ra ở các đỉnh của các sợi nấm.

Nấm sinh sản bằng bào tử. Bào tử là các thể sinh sản đặc biệt bao gồm một hoặc vài tế bào. Bào tử có thể được sản sinh vô tính hoặc hữu tính. Đối với các nhóm nấm nguyên thủy, bào tử vô tính được sinh ra trong các túi gọi là bọc bào tử. Một số bào tử trong nhóm này có thể chuyển động và được gọi là du động bào tử. Các nhóm nấm khác sản sinh ra các bào tử vô tính gọi là bào tử phân sinh (conidia) từ các sợi nấm đặc biệt gọi là cành bào tử phân sinh. Ở một số nhóm nấm, bào tử vô tính (conidia) được sản sinh bên trong các cấu trúc có vách dày gọi là quả cành.

Hầu hết các nhóm nấm đều có giai đoạn sinh sản hữu tính. Trong một số trường hợp, hai tế bào (giao tử) hòa nhập vào nhau để sản sinh ra hợp tử gọi là bào tử tiếp hợp (zygospore). Trong một số trường hợp khác, hợp tử được gọi là noãn bào tử (oospore). Đối với lớp nấm túi, bào tử hữu tính được sản sinh ra trong tế bào hợp tử gọi là túi bào tử (ascus). Bào tử bên trong túi bào tử gọi là bào tử túi (ascospore). Đối với lớp nấm đảm, tế bào hợp tử được gọi là đảm (basidium) và bào tử trong đảm được gọi là bào tử đảm (basidiospore).

Khoảng hơn 250.000 loài nấm có khả năng gây bệnh cho cây. Hầu hết tất cả nấm gây bệnh cây đều sống một phần vòng đời trên cây ký chủ và một phần vòng đời trong đất hoặc tàn dư thực vật.

Các vi sinh vật truyền thống được các nhà nấm học nghiên cứu đều thuộc nhóm Nấm (Fungi) nhưng một số thuộc nhóm Động vật nguyên sinh (Protozoa) và Chromista. Protozoa bao gồm cả các loài gây mốc, nhớt. Chromista bao gồm lớp nấm trứng Oomycetes trong đó có cả nấm sương mai, *Pythium* và *Phytophthora*. Có 4 lớp nấm chính: Zygomycota, Chytridiomycota, Ascomycota and Basidiomycota.

Bệnh do nấm gây ra thường có thể nhận dạng từ bộ phận bị bệnh và dạng triệu chứng. Các bệnh phổ biến thường gặp là chết cây con, thối rễ, héo, sương mai, phấn trắng, đốm lá, cháy lá, gỉ sắt, than đen, thán thư, u sưng, chết cành và các bệnh sau thu hoạch (xem Bảng 1).



---

### 7.1.1 Nấm gây bệnh trên rễ

Nấm xâm nhiễm bộ rễ thực vật làm cản trở quá trình hút nước và trao đổi dinh dưỡng, kết quả là làm cho cây bị còi cọc, héo và lá bị vàng. Các rễ còn non rất dễ bị nhiễm nấm bệnh và các vết thương cơ giới ở phần rễ trong quá trình trồng, canh tác thường góp phần làm bệnh trầm trọng thêm. Tương tự, nếu đất nghèo dinh dưỡng (P hoặc K), muối và pH không cân bằng cũng có thể làm giảm tính đề kháng của cây đối với các bệnh về rễ.

Các bệnh thối rễ thường rất khó chẩn đoán vì nguyên nhân có thể do cả một phức hợp các loài nấm, ví dụ như *Fusarium*, *Pythium*, *Macrophomina* cùng với tuyến trùng hoặc một chuỗi nấm cùng gây hại. *Phytophthora* và *Pythium* thường phổ biến nhất trong các khu vực đất ướt. *Rhizoctonia* và *Fusarium* thì lại có mặt chủ yếu trong điều kiện ẩm hơn và trong đất với hàm lượng chất hữu cơ cao.

Mặc dù *Fusarium* và *Phytophthora* có thể gây bệnh rễ ở một số cây thân gỗ, đa số các bệnh thối rễ của các cây thân gỗ lại có nguyên nhân từ việc phá hủy hệ thống cellulose của lớp nấm Basidiomycetes như *Armillaria*, *Ganoderma*, *Rigidoporus* và *Phellinus*. Muốn tìm hiểu thêm thông tin về các bệnh do *Phytophthora* gây ra cần tham khảo thêm tài liệu của Erwin and Ribeiro (1996).

### 7.1.2 Nấm gây bệnh trên thân

#### *Héo bó mạch*

Các vi sinh vật hại gây héo thường xâm nhiễm hạn chế trong hệ thống mạch dẫn (mạch gỗ). Triệu chứng thường gặp là cây bệnh mất sức cương, lá héo, biến màu (vàng lá), trong trường hợp bệnh nặng thì cây đổ và chết. Chỉ sau khi cây bệnh chết thì nấm mới di chuyển sang các mô khác của cây và sản sinh bào tử. Bốn chi nấm thường gây bệnh héo là *Fusarium*, *Verticillium*, *Ceratocystis* and *Ophiostoma*. Tham khảo thêm thông tin về *Ceratocystis* và *Ophiostoma* trong tài liệu của Wingfield và cộng sự (1999).

*Fusarium* xâm nhiễm hệ mạch dẫn và gây héo nhiều loại rau, hoa, quả, các cây trồng lấy sợi. Hầu hết các loài gây héo nằm trong nhóm *Fusarium oxysporum* complex. Nhóm *Fusarium oxysporum* complex có rất nhiều dạng chuyên hóa (forma specialis, f. sp.) khác nhau, mỗi dạng gây hại trên một nhóm ký chủ nhất định và thường bao gồm rất nhiều chủng có khả năng gây bệnh. Để tham khảo thêm thông tin về các kỹ thuật trong nghiên cứu *Fusarium* xem Burgess và cộng sự (1994).

#### *Loét*

Các vết loét trên những cây thân thảo thường do nấm gây ra như *Colletotrichum* và *Phomopsis*, các chi nấm này cũng gây hại trên cả lá và quả. *Rhizoctonia solani* và *Corticium rolfsii* là các tác nhân quan trọng gây các vết loét ở phần gốc cây thân thảo, đặc biệt trên đậu đỗ. Thông thường có thể nhìn thấy các sợi nấm trên bề mặt cây bệnh. *Phytophthora* và *Fusarium* thường gây hại trên cây thân gỗ mặc dù triệu chứng bên ngoài rất khó phát hiện.

#### *U sùng*

---

U sưng là triệu chứng phát triển không bình thường về kích thước hoặc sưng lên của các mô thực vật do động kích thích của côn trùng, vi khuẩn, virus và nấm gây bệnh ví dụ như *Exobasidium* và *Synchytrium*.

#### *Chối rỗng*

Triệu chứng tạo thành do sự phát triển không bình thường của rất nhiều ngọn và rễ cây tạo thành các búi như chối rỗng. Ví dụ, nấm *Crinipellis perniciosa* gây bệnh chối rỗng trên ca cao.

#### *Bệnh nấm hồng*

Nấm đằm *Corticium salmonicolor* tạo ra các lớp vảy màu hồng trên cành ngọn và cành nhánh của rất nhiều thực vật thân gỗ nhiệt đới và bán nhiệt đới, gây ra bệnh mốc hồng. Nấm xâm nhập vào vỏ cây và phần gỗ làm chết cành ngọn, cành nhánh và làm lá cây co lại.

### **7.1.3 Nấm gây bệnh trên lá**

Triệu chứng trên lá có tầm quan trọng đặc biệt với việc chẩn đoán bệnh cây. Một số triệu chứng trên lá do vi sinh vật hoại sinh gây ra, một số khác do nấm bệnh ký sinh chuyên tính gây ra. Triệu chứng phổ biến trên lá thường do nhiều nấm bệnh gây ra nhưng các triệu chứng điển hình thường do một nhóm vi sinh vật chuyên hóa gây ra.

Trên lá, rất nhiều vi sinh vật có thể gây các vết đốm và các mụn hoại tử với các hình dạng khác nhau. Các đặc tính thuận lợi cho việc chẩn đoán là sự có mặt của cấu trúc quả thể nấm, tuổi lá và kích cỡ của vết bệnh.

Đốm lá thường được giới hạn trong một phạm vi nhỏ của các mô bị hoại tử. Trong một số trường hợp, mô bệnh không chết mà chỉ biến màu do sự có mặt của tác nhân gây bệnh. Rất nhiều nấm bệnh (và côn trùng hại) có thể gây triệu chứng đốm lá. Xung quanh vết đốm lá có thể có các quầng màu vàng.

Đốm vòng là triệu chứng kết hợp của rất nhiều vòng tròn đồng tâm biểu hiện bằng các viền tròn màu đậm hoặc nhạt; đốm góc cạnh do bị giới hạn bởi gân lá và đốm mắt cua thường có hình gân giống hạt đậu với một chấm đậm ở giữa. Đốm thủng là từ dùng để mô tả bệnh đốm lá trong trường hợp phần hoại tử ở giữa bị rụng ra khỏi lá. Hiện tượng này là nguyên nhân của phản ứng bảo vệ từ cây chủ nhằm hạn chế sự lây lan của bệnh.

#### *Thán thư*

Triệu chứng của bệnh thán thư là việc hình thành các vết đốm hoại tử màu đậm, lõm xuống, đường viền vết bệnh có thể nổi gờ lên. Trong nhiều trường hợp, có thể nhìn thấy đĩa cành bào tử nấm (acervular conidiomata) tập trung thành từng vòng tròn trên vết bệnh. Triệu chứng thường tập trung trên lá, thân và quả. Khi bệnh nặng có thể gây ra triệu chứng chết cành ngọn và cành nhánh. Nhiều nhà bệnh cây thường sử dụng từ “thán thư” để chỉ các bệnh (không phải tất cả) do *Colletotrichum* gây ra.

#### *Gi trắng*

Gi trắng thuộc bộ Peronosporales. Triệu chứng thể hiện điển hình bởi sự xuất hiện các chuỗi bào tử sản sinh ra từ các túi bào tử dưới biểu bì lá. Triệu chứng ban

---

đầu là các đốm nhỏ phồng rộp lên dưới biểu bì. Có thể phát hiện bào tử trứng trong mô lá. Ví dụ: gỉ trắng trên cải bắp do *Albugo candida* gây ra.

#### *Tàn lụi*

Thuật ngữ “tàn lụi” dùng để mô tả hiện tượng lá, hoa, ngọn, quả, thậm chí toàn bộ cây bệnh co lại rất nhanh và chết. Các mô cây còn non thường bị phá hủy trước. Hiện tượng tàn lụi do nhiều nấm bệnh gây ra bao gồm *Colletotrichum gloeosporioides* (tàn lụi hoa xoài) và *Phytophthora colocasiae* (tàn lụi lá khoai sọ).

#### *Bỏng*

Triệu chứng bỏng lá là hiện tượng xuất hiện các vết bệnh trên lá giống như bị dội nước nóng. Vết bệnh thường bị mất màu, một phần vết bệnh có màu sáng đục. Thường triệu chứng này không đi kèm với hiện tượng úa vàng. Ví dụ: bệnh bỏng lá lúa (*Gerlachia oryzae*) và bỏng lúa mạch (*Rhynchosporium secalis*).

#### *Cháy lá*

Cháy lá là hiện tượng tạo thành các mảng hoại sinh màu nhạt trên lá do nấm và vi khuẩn gây ra. Ngoài nguyên nhân do vi sinh vật hại, triệu chứng tương tự có thể do điều kiện thời tiết không thuận lợi, cây bị ức chế hoặc do côn trùng gây ra. Ví dụ: bệnh đạo ôn trên lúa và một số loài hòa thảo do *Pyricularia oryzae* gây ra.

#### *Sẹo*

Sẹo là triệu chứng các vết bệnh rời rạc, gồ ghề, lồi lõm trên bề mặt lá bệnh. Triệu chứng được tạo thành do hiện tượng dày lên một cách không bình thường của tầng mô ngoài, có thể xuất hiện vết bệnh trên bề mặt lớp bần (lie). Nguyên nhân gây bệnh sẹo thường là các chi nấm *Elsinoë*, *Fusicladium*, *Sphaceloma*, *Venturia* và *Cladosporium*. Sẹo cũng có thể xuất hiện trên quả và thân.

#### *Sương mai*

Do nấm thuộc bộ Sclerosporales (các loài gây bệnh trên cỏ) và Peronosporales (các loài gây bệnh trên cây hai lá mầm). Hầu hết các loài nấm di chuyển xâm nhiễm cây ký chủ thông qua nước bề mặt. Bệnh sương mai có thể phá hủy hoàn toàn cây trồng trong điều kiện độ ẩm cao. Ví dụ: bệnh sương mai kê do *Sclerospora graminicola* gây ra. Triệu chứng xuất hiện như hoa trắng ở mặt dưới lá bệnh. Có thể phân biệt các chi nấm gây bệnh khác nhau thông qua hình dạng cành bào tử phân sinh. Tham khảo thêm về bệnh sương mai trong tài liệu của Spencer (1981).

#### *Phấn trắng*

Nấm gây bệnh phấn trắng là nấm ký sinh bắt buộc thuộc họ Erysiphaceae, ví dụ *Blumeria graminis* gây bệnh phấn trắng trên ngũ cốc và cỏ. Triệu chứng bệnh phấn trắng được thể hiện bởi sự xuất hiện của hệ sợi nấm màu trắng và các bào tử trông giống bột trắng trên bề mặt lá. Có thể xuất hiện nhiều các quả thể túi nhỏ hình cầu phát triển trên bề mặt lá. Vòi hút ký sinh được hình thành trong tế bào biểu bì; cành bào tử phân sinh được hình thành từ nhánh sợi nấm và bào tử không vách ngăn được sản sinh ra ở dạng chuỗi phát triển từ ngọn đến gốc. Nhiều loài nấm phấn trắng bao gồm các dạng chuyên hóa (f. sp.) khác nhau ký sinh chuyên tính trên các loài ký chủ khác nhau. Nấm phấn trắng thích nghi với điều kiện khí hậu khô, thực tế đây là nhóm nấm ký sinh thực vật duy nhất mà bào tử có khả năng nảy mầm được trong điều kiện không có nước tự do. Có thể đọc thêm về bệnh phấn trắng trong tài liệu của Braun (1987).

---

### *Muội đen*

Muội đen do các loài trong bộ Capnodiales và Chaetothyriales gây ra. Chúng tạo thành các lớp muội đen trên bề mặt lá và thân tươi do phát triển trên các chất tiết ra từ côn trùng. Muội đen thường có mặt cùng với sự xuất hiện của côn trùng hút nhựa cây như rệp. Muội đen làm giảm đáng kể khả năng quang hợp, giảm khả năng phát triển và giảm năng suất của cây. Có thể tham khảo thêm thông tin về muội đen trong Hughes (1976).

### *Muội đen Meliolales*

Nấm muội đen thuộc bộ Meliolales thường dễ nhầm lẫn với muội đen trong 2 bộ Capnodiales và Chaetothyriales. Đây là bệnh trên lá phổ biến ở các rừng mưa nhiệt đới, chủ yếu làm mất tính thẩm mỹ của cây. Đặc điểm của triệu chứng là các sợi nấm với các túi bào tử và bào tử túi màu tối nổi lên trên bề mặt biểu bì. Tham khảo thêm thông tin về bộ Meliolales trong Hansford (1961) và Hansford (1963).

## **7.1.4 Nấm gây bệnh trên quả và hạt**

Một số vi sinh vật hại phổ biến thường là nguyên nhân của bệnh thối quả. Một trong số những loài phổ biến nhất là *Colletotrichum gloeosporioides* (giai đoạn hữu tính *Glomerella cingulata*) gây thán thư trên quả. Vết bệnh thường bị nứt sau một thời gian. Các loài *Phytophthora* cũng gây bệnh thối trên nhiều loại quả, ca cao và dứa là những ví dụ điển hình. *Phomopsis* và *Fusicoccum* cũng gây ra triệu chứng thối cuống nhiều loại quả của cây nhiệt đới.

Quả đặc biệt rất dễ bị nhiễm các bệnh sau thu hoạch. Các bệnh này phát triển trong quá trình đóng gói, bảo quản và vận chuyển. Vi sinh vật gây hại trên quả sau thu hoạch thường có mặt trên đồng ruộng từ trước nhưng không biểu hiện triệu chứng. Bệnh có thể tiếp tục phát triển ngay cả trong điều kiện bảo quản lạnh và triệu chứng có thể xuất hiện bất cứ lúc nào trong quá trình bảo quản và vận chuyển sau thu hoạch, đặc biệt khi gặp điều kiện môi trường thích hợp. Ví dụ một số bệnh sau thu hoạch: Thối (*Rhizopus stolonifer*), mốc xanh (*Penicillium expansum*), mốc xám (*Botrytis cinerea*), thối đen quả (*Aspergillus* spp.) thối cuống (*Phomopsis* spp. và *Fusicoccum* spp.). Tham khảo thêm thông tin về bệnh sau thu hoạch do nấm gây ra trong tài liệu của Pitt và Hocking (1999).

### *Nấm cựa (Ergots)*

Nguyên nhân của bệnh nấm cựa là do nấm thuộc bộ Clavicipitales, bệnh thường xảy ra trên cỏ và hầu hết các cây ngũ cốc. Bào tử phân sinh giai đoạn *Sphacelia* của nấm cựa xâm nhiễm vào nhụy hoa. Bào tử có trong mật hoa cây ký chủ (tạo thành từ phản ứng của ký chủ trước sự xâm nhiễm của nấm) được phát tán đi khắp nơi nhờ côn trùng. Hạch nấm chứa alkaloids độc lẫn tạp trong hạt ngũ cốc có hại cho sức khỏe người và động vật nếu ăn phải. Để biết thêm thông tin về nấm Clavicipitalean độc tài liệu của White và cộng sự (2003).

## **7.1.5 Nấm gỉ sắt**

Nấm gây bệnh gỉ sắt thuộc bộ Uredinales. Triệu chứng được thể hiện bằng sự xuất hiện các mụn bột trên lá và thân. Bào tử có thể màu vàng, da cam hoặc nâu trông giống như gỉ sắt. Ví dụ: gỉ sắt ngô *Puccinia polysora*, gỉ sắt lúa miến *Puccinia*

---

*purpurea* và gỉ sắt đậu tương *Phakopsora pachyrhizi*. Đọc thêm thông tin về nấm gỉ sắt trong tài liệu của Cummins và Hiratsuka (2003).

Nấm gỉ sắt là nhóm vi sinh vật gây bệnh cây có tầm quan trọng đặc biệt về kinh tế. Hơn 7.000 loài thuộc 160 chi đã được mô tả, trong đó chiếm số lượng nhiều nhất là chi *Puccinia*. Ít nhất 30 chi của nấm gỉ sắt chỉ có một loài đại diện (đơn chi đơn loài). Nấm gỉ sắt có thể có tới 5 giai đoạn bào tử trong một vòng đời. Các giai đoạn bào tử được ký hiệu bằng các chữ số La mã:

- O** Đơn bào tử (Spermatia) - sản sinh ra từ túi đơn bào (spermogonia).
- I** Bào tử xuân (Aecidiospores) - sản sinh ra từ túi bào tử xuân (aecidia).
- II** Bào tử hạ (Urediniospores) - sản sinh ra từ cụm bào tử hạ (uredinia).
- III** Bào tử đông (Teliospores) - sản sinh ra từ cụm bào tử đông (telia).
- IV** Bào tử đảm (Basidiospores) - sản sinh ra từ đảm (basidium) do bào tử đông nảy mầm tạo thành.

Nấm gỉ sắt sản sinh đủ 5 giai đoạn bào tử gọi là nấm gỉ sắt có chu trình lớn. Nhiều nấm gỉ sắt không có khả năng sản sinh ra một hoặc vài giai đoạn bào tử, ví dụ nấm gỉ sắt có chu trình nhỏ chỉ sản sinh ra giai đoạn bào tử III và IV. Nhiều nấm gỉ sắt có 2 ký chủ không liên quan trong vòng đời, sản sinh ra giai đoạn bào tử II, III và IV trên ký chủ chính và sản sinh ra giai đoạn bào tử O và I trên ký chủ trung gian. Nấm gỉ sắt có 2 ký chủ không liên quan trong vòng đời gọi là dị chủ. Nấm gỉ sắt có duy nhất một ký chủ trong vòng đời gọi là đơn chủ.

Sau đây là vòng đời của một nấm gỉ sắt dị chủ có chu trình lớn:

1. Bào tử đảm nảy mầm xâm nhiễm trên lá cây ký chủ.
2. Túi đơn bào tử (Spermogonia) được hình thành từ lá, giải phóng ra các đơn bào tử nhỏ (spermatia) dưới dạng giọt nhỏ và được phát tán bởi côn trùng. Từ một túi đơn bào tử sẽ sinh ra sợi nấm thứ sinh có khả năng tiếp nhận (thụ tinh) một đơn bào tử khác giới.
3. Túi bào tử xuân và bào tử xuân được sản sinh ra và phát tán nhờ gió hoặc côn trùng. Bào tử xuân chỉ có thể xâm nhiễm ký chủ trung gian.
4. Sau khi xâm nhiễm vào ký chủ, sợi nấm hình thành cụm bào tử hạ và bào tử hạ dưới dạng từng đám bụi nhỏ có màu da cam hoặc nâu. Bào tử hạ phát tán nhờ gió. Trong một mùa vụ cây trồng, nhiều thế hệ bào tử hạ có thể tiếp tục xâm nhiễm trên cùng một ký chủ.
5. Cụm bào tử đông cùng với bào tử đông được hình vào cuối vụ sinh trưởng của cây ký chủ. Trong một số trường hợp, bào tử đông và bào tử hạ có thể sinh ra từ cùng một ổ bào tử. Bào tử đông có chức năng ngủ nghỉ. Mỗi tế bào của bào tử đông có khả năng hình thành 1 đảm với 3 vách ngăn, từ đó bào tử đảm được sản sinh ra trên các cuống bào tử. Bào tử đảm được phát tán nhờ gió.

---

Khi kiểm tra mẫu bệnh gỉ sắt, cần chú ý các chi tiết sau:

- Cụm bào tử hạ (Uredinia) và cụm bào tử đông (telia) - xuất hiện ở mặt nào của lá (hoặc bộ phận khác của cây);
- Bào tử hạ (Urediniospores) – hình dạng và cách biểu hiện triệu chứng trên bề mặt cây bệnh;
- Sợi nấm vô tính (Paraphyses) – nếu xuất hiện có hình dạng và kích cỡ như thế nào;
- Lỗ mầm (Germ pores) - số lượng và vị trí trên bào tử hạ;
- Bào tử đông – hình dạng, số lượng vách ngăn, có cuống hay không.

### 7.1.6 Nấm than đen

Bệnh than đen do nấm than đen thuộc lớp Ustilaginomycetes gây ra. Triệu chứng điển hình của bệnh là sự xuất hiện của các khối bào tử như bột đen. Các ổ bào tử xuất hiện trong hoặc trên rễ, thân, lá, hoa, bao phấn và nhụy.

Nấm than đen là vi sinh vật hại quan trọng trên cây trồng và cây cảnh. Có khoảng 90 chi nấm than đen bao gồm 2000 loài khác nhau. Sự phân loại của nấm than đen cũng trải qua nhiều thay đổi trong những năm gần đây dựa trên những nghiên cứu ở mức độ phân tử và siêu cấu trúc (sự phân loại trước đây thường phụ thuộc chủ yếu vào phương thức nảy mầm của bào tử). Tham khảo thêm Vánky (2002).

Đặc điểm dễ nhận biết nhất của nấm than đen là sự hình thành các đám bào tử từ các ổ bào tử ở các bộ phận nhất định của cây. Khác với bào tử đông của nấm gỉ sắt, bào tử teliospore của nấm than đen không có cuống (pedicellate). Bào tử nấm gỉ sắt thường được phát tán nhờ gió.

Bào tử teliospores nảy mầm và sản sinh ra bào tử đảm basidiospores (sporidia) phát triển giống như các tản nấm men trên môi trường nuôi cấy. Trong tự nhiên, hai bào tử đảm nảy mầm tiếp hợp với nhau để hình thành sợi nấm xâm nhiễm. Thông thường nấm chỉ có thể xâm nhiễm vào những bộ phận nhất định của cây ký chủ, ví dụ: nhụy hoặc hoa.

Những thay đổi gần đây trong hệ thống phân loại nấm than đen đã dẫn đến sự thay đổi tên của nhiều loài nấm than đen. Sau đây là một số ví dụ:

- *Sporisorium* được dùng giới hạn cho nhóm Hòa thảo, bao gồm nhiều loài nấm gỉ sắt trước đây thuộc về các chi khác, ví dụ: *Sphacelotheca* và *Sorosporium*;
- *Sphacelotheca* được dùng giới hạn cho ký chủ trong họ Polygonaceae, nay được phân vào nhóm Urediniomycetes (nhóm chứa nấm gỉ sắt);
- *Sorosporium* được dùng giới hạn cho hoa của ký chủ thuộc họ Caryophyllaceae;

- 
- *Ustilago* được dùng giới hạn cho cỏ trong khi phần lớn các loài nấm than đen gây hại trên các cây ký chủ khác (chủ yếu cây 2 lá mầm) thuộc chi *Microbotryum* trong nhóm Urediniomycetes.

Khi kiểm tra mẫu bệnh than đen, cần chú ý các chi tiết sau:

- Bộ phận cây ký chủ bị nhiễm bệnh;
- Mô cây bị phình to;
- Sự có mặt của các bọc bào tử (spore balls) và các bào tử rời (loose spores);
- Hình dạng, kích thước bào tử và cách biểu hiện triệu chứng trên bề mặt;
- Sự có mặt hoặc vắng mặt của các tế bào vô tính trong đám bào tử;
- Sự có mặt hoặc vắng mặt của các cuống và vỏ bọc bào tử trong các ổ bào tử.

## 7.2 VI KHUẨN

Vi khuẩn là vi sinh vật nguyên sinh đơn bào, không có diệp lục và có khả năng sinh sản rất nhanh. Vi khuẩn có mặt ở mọi nơi và rất đa dạng về sinh lý, chúng có thể sinh sống ở rất nhiều hệ sinh thái rộng lớn. Bệnh cây do vi khuẩn gây ra cũng xuất hiện ở mọi nơi trên thế giới. Vi khuẩn thích hợp với điều kiện sống ẩm và ấm nên chúng đặc biệt gây hại nhiều ở các khu vực nhiệt đới, bán nhiệt đới và ôn đới ẩm.

Hầu hết các vi khuẩn có thể sống sót trong tàn dư cây trồng, trong đất hoặc trên hạt của cây ký chủ. Vi khuẩn xâm nhiễm thông qua các vết thương cơ giới hoặc các lỗ hở tự nhiên ví dụ như khí khổng và bì khổng. Các hạt giống và cây con bị nhiễm vi khuẩn, nước, côn trùng và máy móc trên đồng ruộng là các tác nhân cho sự lan truyền của vi khuẩn.

Không có một hệ thống phân loại chính thức nào dành cho vi khuẩn nhưng tất cả các tên của vi khuẩn đều được quy định. Khóa định danh vi khuẩn Quốc tế *International Code of Nomenclature of Bacteria (Bacteriological Code)* có các quy tắc chỉ rõ cách sử dụng tên vi khuẩn. Năm 1975, *Bacteriological Code* (bản sửa đổi năm 1975) đưa ra các khái niệm về việc dùng tên vi khuẩn trong xuất bản. Sự ra đời của bài báo về danh mục tên vi khuẩn được công nhận - *Approved Lists of Bacterial Names (International Journal of Systematic Bacteriology, 1980, 30, 225-420)* đã đặt nền móng ban đầu cho việc định danh vi khuẩn. Khóa định danh vi khuẩn Quốc tế - *International Code of Nomenclature of Bacteria* (bản sửa đổi năm 1990) là nền tảng cơ sở cho hệ thống định danh vi khuẩn. Tên của một đơn vị phân loại có hiệu lực khi được xuất bản (công bố), vì vậy nó cũng có chỗ đứng trong hệ thống định danh nếu đáp ứng một trong các tiêu chí sau:

- Tên vi khuẩn được trích dẫn trong Danh mục tên vi khuẩn đã được công nhận (*Approved Lists of Bacterial Names*);
- Tên vi khuẩn được xuất bản trong các bài báo của Tạp chí Quốc tế về phân loại học vi khuẩn *International Journal of Systematic Bacteriology*

---

(IJSB) hoặc Tạp chí Quốc tế về tiến hóa và phân loại vi sinh vật học *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (IJSEM) và đáp ứng các yêu cầu do khóa định danh vi khuẩn đề ra. Kể từ tháng 8 năm 2002, IJSEM quy định rằng tất cả các tác giả của loài mới, chủng mới đều phải chứng minh rằng mẫu vi khuẩn chuẩn (ban đầu) đã được gửi đến ít nhất hai phòng mẫu vi sinh vật hại có tên tuổi ở hai nước khác nhau;

- Tên vi khuẩn chỉ có hiệu lực xuất bản khi được công bố trong danh mục vi khuẩn được công nhận. Danh mục vi khuẩn được công nhận là danh mục các tên vi khuẩn được xuất bản trong tạp chí IJSB hoặc IJSEM hoặc được xuất bản ở nơi khác nhưng được các tạp chí này công nhận.

Danh mục tên vi khuẩn đã được xác nhận (*Approved Lists of Bacterial Names*) bao gồm 2.212 tên chi, loài hoặc phân loài và 124 tên của các đơn vị phân loại cao hơn. Cùng với việc áp dụng các phương pháp hiện đại trong phân loại vi khuẩn, đến năm 2002 trong danh mục đã có 5.806 loài vi khuẩn trong 1094 chi được xác định, trong đó có 132 loài vi khuẩn thuộc 29 chi là có khả năng gây bệnh cây. Các chi vi khuẩn hại cây chủ yếu là *Agrobacterium*, *Clavibacter*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Xanthomonas* và *Xylella*. Có tới vài trăm vi khuẩn hại nằm trong các chi này, trong đó có nhiều biến thể gây hại chuyên tính trên các loài và chi ký chủ nhất định. Ví dụ: *Pseudomonas syringae* có hơn 40 biến thể khác nhau, *Xanthomonas campestris* có tới hơn 123 biến thể.

Nhiều vi khuẩn hại thực vật có vòng đời bao gồm 2 giai đoạn: giai đoạn ký sinh ngoài cây chủ và giai đoạn ký sinh gây bệnh. Nhiều vi khuẩn hại không trực tiếp ký sinh bên trong tế bào mà được nhân lên ở khoảng không giữa các tế bào ký chủ. Vi khuẩn xâm nhiễm qua các lỗ hở tự nhiên như khí khổng, thủy khổng và các vết thương. Vi khuẩn qua quá trình tiến hóa có khả năng sản sinh ra rất nhiều độc tố khác nhau kể cả các enzym ngoại bào, hormone thực vật và polysaccharit ngoại bào.

Để chẩn đoán được vi khuẩn gây hại thực vật phải kiểm tra các triệu chứng thật cẩn thận và xem xét tất cả các yếu tố quan trọng. Khi không có dấu hiệu của côn trùng và nấm, nếu thấy dịch chảy ra từ vết cắt trên mẫu bệnh thì có thể kết luận nguyên nhân gây bệnh là do vi khuẩn.

Phương pháp pha loãng thường được sử dụng để phân lập vi khuẩn. Mục đích của phương pháp này là thu được các khuẩn lạc đơn, vì vậy mà có thể bảo đảm mẫu vi khuẩn thu được hoàn toàn thuần khiết, chỉ có một loài duy nhất. Sử dụng môi trường nuôi cấy thích hợp và bề mặt môi trường phải khô ráo trước khi cấy. Phải thu được mẫu vi khuẩn thuần khiết trước khi bắt đầu giám định vì nếu vi khuẩn không thuần, lẫn lộn các loài với nhau thì mọi cố gắng giám định chỉ là vô nghĩa. Nhiều vi khuẩn gây bệnh có thể được giám định ngay bằng một số phương pháp thử đơn giản.

Nên kiểm tra độ thuần khiết của vi khuẩn phân lập trước khi giám định. Thử độ thuần của vi khuẩn bằng cách pha loãng dịch bào tử trong nước vô trùng rồi dùng que cấy vạch dịch vi khuẩn lên môi trường agar đã để khô bề mặt. Kiểm tra thường xuyên trong vài ngày xem các khuẩn lạc có hoàn toàn giống nhau hay không. Các khuẩn lạc khi không phát triển cùng nhau trông có thể giống nhau nhưng khi phát triển gần nhau thì lại có thể nhận rõ sự khác nhau. Nếu nghi ngờ về độ thuần khiết



---

của vi khuẩn sau khi kiểm tra thì nên cấy truyền lại đến khi phân lập được vi khuẩn thuần hoàn toàn. Không bao giờ giám định trên mẫu vi khuẩn không thuần khiết.

Có thể dùng đĩa vi khuẩn kiểm tra độ thuần để quan sát hình thái khuẩn lạc. Ghi chép lại cẩn thận các đặc tính hình thái khuẩn lạc như: hình dạng, kích thước, kết cấu, dấu vết trên bề mặt khuẩn lạc, hình thái diềm khuẩn lạc, độ đồng nhất, màu sắc, độ trong, đục, tỷ lệ mọc... Nên chú ý cả các dấu hiệu về sự thay đổi màu sắc, tạo thành kết tủa hoặc kết tinh trong môi trường.

Khóa phân loại lưỡng phân (Dichotomous keys) là một trong những khóa phân loại ra đời sớm nhất áp dụng cho phân loại vi khuẩn. Có thể ví việc giám định vi khuẩn như là quá trình tiến triển từng bước một dọc theo một con đường phân nhánh ngoằn ngoèo. Mặc dù khóa phân loại không được tin cậy trong lĩnh vực phân loại vi khuẩn nói chung, chúng vẫn được các nhà giám định bệnh cây nói riêng sử dụng thành công cho việc giám định vi khuẩn gây bệnh. Cũng cần phải nhấn mạnh là khi sử dụng khóa phân loại phải hết sức cẩn thận. Cả quá trình phân loại đặc biệt là những bước thử ban đầu đều phải được tiến hành cẩn thận. Ngoài việc sử dụng khóa phân loại, có thể sử dụng các phương pháp khác như phân tích acid béo, phân loại bằng thể thực khuẩn, kháng thể đơn clone, gen thử (probes) axit nucleic.

Các đặc tính hình thái có ý nghĩa không nhiều đối với việc phân loại vi khuẩn. Kích thước khuẩn lạc, tỉ lệ mọc, màu, kết cấu và tính phản quang không cung cấp đủ các thông tin cần thiết để giám định một vi khuẩn. Vì vậy, việc giám định vi khuẩn phụ thuộc rất nhiều vào chuỗi các phương pháp thử khác nhau, thường liên quan đến sự có mặt hoặc vắng mặt của một số enzym nhất định.

### 7.3 PHYTOPLASMA

Phytoplasma, hay trước đây gọi là vi sinh vật thể Mycoplasma, là các vi sinh vật tiền nhân thuộc lớp Mollicutes. Chúng tương tự như vi khuẩn nhưng không có màng tế bào cứng và không thể sống tự do trong môi trường, cho đến nay phytoplasma chưa từng được nuôi cấy trên môi trường nhân tạo. Phytoplasmas xâm nhập vào bó mạch libe của cây, hầu hết được đưa vào thông qua môi giới là côn trùng chích hút. Phytoplasmas ký sinh bắt buộc và toàn bộ vòng đời của chúng là ký sinh trên mô ký chủ. Chúng gây bệnh trên rất nhiều cây ký chủ. Triệu chứng thường gặp là lá biến vàng, cây mọc cằn cỗi, thậm chí chết khô, lá nhỏ, có thể xuất hiện triệu chứng giống chổi rồng, hóa lá, hóa xanh và hoa không lồ.

Cho tới gần đây, phương pháp chính để phân biệt các loại bệnh phytoplasma là triệu chứng học, phạm vi ký chủ, vector chuyên tính và quan sát lớp cắt mô bệnh dưới kính hiển vi điện tử. Sự phát triển của phương pháp sinh học phân tử với các đoạn DNA mẫu sẵn có của đoạn gene 16S ribosomal RNA (rRNA) đã tăng cường khả năng phát hiện và giám định phytoplasmas.

### 7.4 VIRUS VÀ VIROID

Virus là vi sinh vật cực kỳ nhỏ bé, ký sinh bắt buộc, chỉ có thể quan sát được dưới kính hiển vi điện tử. Không giống như vi khuẩn và nấm, virus không có cấu tạo tế bào mà chỉ bao gồm các vỏ protein hay còn gọi là capsid bao quanh axit nucleic (RNA hoặc DNA). Virus chỉ có thể nhân lên trong tế bào sống của ký chủ dựa vào

---

tín hiệu của quá trình di truyền từ cây ký chủ. Vật chất của tế bào được hoàn toàn chuyển hướng sử dụng cho việc sinh sản virus. Sự xâm nhiễm của virus làm suy yếu các chức năng bình thường của cây ký chủ ví dụ như chức năng quang hợp và sinh trưởng.

Côn trùng hút nhựa cây như rệp và ve sầu thường là môi giới truyền bệnh virus. Cây trồng được nhân giống vô tính cũng là nguồn lây lan virus. Virus có thể sống sót trong ký chủ trung gian.

Viroid là các phân tử RNA có trọng lượng rất nhỏ bé, dạng vòng, không có vỏ protein bao bọc. Chúng xâm nhiễm tế bào thực vật, sao chép trực tiếp và gây bệnh. Viroid được lây lan trực tiếp qua các biện pháp cơ giới như bấm ngọn, tỉa cành, qua hạt giống và các biện pháp nhân giống vô tính như ghép cành.

#### 7.4.1 Các loài virus và thông tin lưu giữ

Các loài virus không bắt buộc phải có tiêu bản đi kèm vì chúng là các vi sinh vật gây hại ở mức độ tế bào. Các loài virus hại thực vật, theo quy định của Ủy ban về phân loại virus Quốc tế International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTV/>), phải được mô tả và xác định dựa trên sự kết hợp duy nhất của một vài đặc tính như sau:

- Loài thực vật nhiễm virus ngoài tự nhiên;
- Triệu chứng cây bệnh ngoài tự nhiên ở các giai đoạn xâm nhiễm khác nhau;
- Dạng truyền bệnh, ví dụ: tiếp xúc hay cọ xát cơ giới, qua hạt, phấn hoa, môi giới;
- Các loài dễ nhiễm bệnh trong điều kiện thí nghiệm;
- Hình dạng của virus;
- Đặc tính sinh hóa của protein và axit nucleic ở virus;
- So sánh trật tự nucleotide của gene với các virus khác;
- Huyết thanh.

Các hồ sơ về virus gây bệnh cây thường không có tiêu bản chuẩn đính kèm là do hiện nay vẫn chưa có phương pháp nào có thể bảo quản mẫu virus sống. Hầu hết virus đều không ổn định khi bảo quản kể cả bằng phương pháp đông khô. Những tiến bộ về khoa học hiện nay đã cho phép bảo quản virus lâu dài mặc dù khá phức tạp, ví dụ như phương pháp cấy bộ gen virus vào tế bào vi khuẩn.

Vì những lý do trên, hầu hết trong các hồ sơ lưu trữ virus đều không lưu giữ tiêu bản mẫu. Thay vào đó là lưu giữ các đặc tính hình thái, ví dụ: các đoạn ghi chép triệu chứng, ảnh, số liệu thí nghiệm, trật tự nucleotide của đoạn gen và phản ứng huyết thanh. Thông tin về hầu hết các loài virus gây bệnh cây có thể được tìm thấy trên hệ thống cơ sở dữ liệu trao đổi thông tin giám định virus VIDE (Virus Identification Data Exchange) (<http://image.fs.uidaho.edu/vide/refs.htm#descriptions>).

### *Virus hình gậy*

Các virus hình gậy, trong đó có virus khảm lá thuốc lá *Tobacco mosaic virus* (TMV) thường có kích thước đường kính 3 - 25 nm và chiều dài 150 - 2000 nm phụ thuộc vào chiều dài của phân tử RNA. Virus loại này có thể thẳng, cong hoặc gập lại. Cấu trúc bao gồm RNA và protein xếp theo đường xoắn ốc.

### *Virus đối xứng*

Virus đối xứng xuất hiện đơn lẻ hoặc thành từng cặp có đường kính 20 - 70 nm. Khi quan sát dưới kính hiển vi điện tử, những vi rút này có hình dạng giống như một cấu trúc hình học với 20 mặt đối xứng (12 đỉnh và 20 mặt hình tam giác). Ví dụ: virus khảm lá xúp lơ *Cauliflower mosaic virus* (CaMV).

### *Virus hình que*

Virus hình que có hình dạng tương tự vi khuẩn thuộc chi *Bacillus*. Chúng không hoặc có thể có màng bao bọc. Ví dụ: virus khảm lá cỏ linh lăng *Alfalfa mosaic virus* (AMV) và virus hình que hại mía *Sugarcane bacilliform virus* (SCBV).

Có thể áp dụng một số phương pháp giám định virus gây bệnh. Các nhà virus học thường trồng các cây chỉ thị trong nhà kính chống côn trùng để nghiên cứu sự xâm nhiễm của virus và tìm ra các cây có khả năng là ký chủ. Các cây chỉ thị thường biểu hiện triệu chứng khác nhau khi được lây nhiễm bằng các loại virus khác nhau. Tuy nhiên, chỉ quan sát triệu chứng không thôi thì không đầy đủ mà phải kết hợp sử dụng các phương pháp trong phòng thí nghiệm như: huyết thanh, dùng kính hiển vi điện tử, phân tích axit nucleic.

## **7.4.2 Triệu chứng bệnh virus thực vật**

Đối với những người làm công tác giám định có kinh nghiệm, các triệu chứng bệnh virus thường có thể được xác định khá dễ dàng. Có 2 loại triệu chứng virus phổ biến: loại triệu chứng xuất hiện do kết quả của lần xâm nhiễm đầu tiên vào tế bào ký chủ, ví dụ: vết đốm và loại triệu chứng xuất hiện do kết quả của lần xâm nhiễm thứ sinh hoặc xâm nhiễm có hệ thống, ví dụ: khảm lá. Không giống như các nấm bệnh, virus chỉ có thể xâm nhập vào tế bào thực vật thông qua các vết thương như vết gãy của lông biểu bì, lỗ thủng hoặc các vết trầy xước nhỏ trên tầng biểu bì do côn trùng chích hút gây ra.

Triệu chứng ban đầu phát triển từ điểm xâm nhiễm của virus vào tế bào thực vật được gọi là triệu chứng cục bộ và thường tạo thành từng vết bệnh có giới hạn gọi là vết đốm. Các vết đốm do virus gây ra thường có kích thước to nhỏ khác nhau, có thể mất màu (do mất diệp lục) hoặc hoại tử (nếu tế bào chết). Vết đốm thường biểu hiện rõ sau khi virus theo dòng nhựa xâm nhập vào bề mặt lá cây hoặc dạng ít phổ biến hơn là sau khi côn trùng chích hút ăn nhựa lá.

Trong một số trường hợp, do mối tương quan giữa ký chủ và ký sinh mà virus không thể lan rộng ra ngoài điểm xâm nhiễm. Lúc đó vết đốm tại điểm xâm nhiễm là triệu chứng duy nhất quan sát được. Loại phản ứng này gọi là phản ứng miễn cảm. Nếu virus không bị hạn chế bởi phản ứng của cây ký chủ, chúng sẽ lan khắp phần thịt lá. Khi nhiễm đến hệ thống mạch dẫn, virus sẽ lây lan rất nhanh tới toàn bộ các bộ phận

---

của cây ký chủ, gây hiện tượng xâm nhiễm thứ sinh hay xâm nhiễm hệ thống. Hầu hết các virus có khả năng di chuyển trong libe.

Triệu chứng xâm nhiễm thứ sinh hoặc xâm nhiễm hệ thống dẫn đến những thay đổi bên ngoài mà mắt thường có thể nhìn thấy được (ví dụ như hiện tượng biến màu và héo) và những thay đổi bên trong chỉ có thể quan sát được dưới kính hiển vi điện tử (như sự hình thành các tế bào có cấu trúc dị thường).

Triệu chứng khảm lá là hiện tượng những tế bào nhất định trong bộ phận cây bị bệnh bị nhiễm virus và biến màu trong khi các tế bào khác vẫn phát triển bình thường. Các tế bào bị nhiễm virus thường có màu xanh lá cây nhạt do lượng diệp lục bị giảm. Dạng triệu chứng khảm khác nhau tùy thuộc vào các loại cây ký chủ khác nhau. Đối với các cây một lá mầm, triệu chứng thường xuất hiện dưới dạng khảm sọc hoặc vệt. Đối với các cây hai lá mầm, các phần biến màu thường có hình tròn và xuất hiện triệu chứng như các vết vằn, lốm đốm, loang lổ, thậm chí gò ghề.

Trong một số trường hợp tương tác giữa virus và cây ký chủ, toàn bộ lá biến vàng do suy giảm quá trình sản xuất diệp lục và lục lạp bị phá hủy. Đây là triệu chứng điển hình của bệnh vàng lá virus, vàng lá củ cải đường và vàng lùn lúa mạch. Hiện tượng vàng lá bắt đầu từ sự biến vàng của phần mô xung quanh gân lá, phần mô gần hệ thống mạch dẫn có thể vẫn xanh, tương phản với các phần mô khác trên lá. Một số virus có thể gây triệu chứng vàng gân lá và trong gân lá, như trường hợp bệnh gân lớn rau diếp và bệnh khảm virus turnip (*Turnip mosaic virus*).

Đốm vòng là triệu chứng các mô bị bệnh bị giới hạn thành từng vòng các tế bào nhiễm virus. Các tế bào nhiễm virus có thể biến màu hoặc chết hoại. Các vòng có thể tập trung lại dưới dạng vòng tròn đồng tâm (Hình 15). Đốm vòng có thể xuất hiện trên thân và quả mặc dù phổ biến nhất là trên lá. Ví dụ một số virus gây đốm vòng: Virus đốm héo cà chua *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) và virus đốm vòng đu đủ *Papaya ringspot virus* (PRSV).

Tế bào hoại tử có thể tập trung thành các đốm cục bộ xung quanh điểm xâm nhiễm hoặc tập trung một cách hệ thống trong các phần được bảo vệ khác của cây bệnh như quả, hạt hoặc lá. Ví dụ: virus khảm lá turnip gây ra các đốm hoại tử ở các lớp lá cải bắp phía trong.

Hiện tượng giảm kích thước cây bệnh (lùn, còi cọc) là triệu chứng khá phổ biến do virus gây ra, thường xuất hiện cùng với các triệu chứng khác. Hiện tượng còi cọc có thể xảy ra trên toàn bộ cây bệnh hoặc chỉ giới hạn ở những bộ phận nhất định của cây như đỉnh sinh trưởng. Triệu chứng này thường khó nhận thấy, trừ khi cây bị nhiễm virus phát triển ngay bên cạnh cây khỏe.

Virus khảm lá đậu (*Bean common mosaic virus*) và virus đốm vòng dâu tây (*Strawberry latent ringspot virus*) là những ví dụ về virus gây hiện tượng cây bệnh phát triển không bình thường (lá và thân biến dạng). Sự phát triển không bình thường xảy ra do sự mất cân bằng hormon trong lá. Ngoài ra sự biến dạng và phát triển không bình thường còn biểu hiện bằng sự tăng quá nhanh số lượng tế bào, ví dụ virus sưng chồi cacao *Cacao swollen shoot virus*. Sự tăng nhanh về số lượng tế bào được gọi là hiện tượng hyperplasia; sự tăng nhanh về kích thước tế bào gọi là hiện tượng

hypoplasia. Ví dụ hiện tượng lõm trên thân cành cam quýt do virus tristeza hại cây có múi gây ra.



**Hình 15** Triệu chứng bệnh virus (từ trái qua phải): vòng biến màu, đốm vòng và khảm lá

Một số virus gây hiện tượng tăng trưởng quá nhanh tạo thành u bướu trên lá và rễ; Sự phát triển quá nhanh trên lá tạo các mấu lồi như mụn cơm ở cả mặt trên và mặt dưới của lá cây bệnh. Virus khảm biến dạng đậu *Pea enation mosaic virus* (PEMV) gây hiện tượng u lồi trên lá. Giống như hiện tượng biến dạng thân và lá, u bướu là kết quả của sự mất cân bằng về hormon, gây hiện tượng tăng nhanh đột biến của tế bào.

Hiện tượng biến màu cánh hoa tulip là một trong những bệnh virus đầu tiên được mô tả vào thế kỷ 17. Bệnh do virus khảm lá tulip gây ra, hoa tulip xuất hiện các đốm màu sắc khác nhau. Củ cây hoa tulip nhiễm virus được người trồng hoa ở Hà Lan rất quý, thậm chí bệnh vẫn được khai thác cho đến ngày nay. Virus khảm turnip và virus khảm vàng đậu có thể gây hiện tượng đột biến màu trên hoa lay ơn.

Virus có thể gây triệu chứng méo mó quả, quả ít và nhỏ. Ví dụ virus khảm lá dưa chuột (*Cucumber mosaic virus*) gây triệu chứng quả nhỏ và biến dạng. Tương tự, virus khảm lá rau diếp làm giảm quá trình tạo hạt, phấn hoa bất thụ và suy yếu.

Sự phá hủy lục lạp và tăng số lượng tế bào một cách không bình thường đã được đề cập ở phần trên. Ngoài ra virus còn gây ra những biến đổi về mô và tế bào, ví dụ thể vùi được hình thành do tác động của virus. Một số virus ký sinh trong nhân tế bào thực vật. Nhiều virus làm biến đổi lục lạp, phần lớn trong số đó làm suy giảm hệ thống sinh hóa và cấu trúc tế bào dẫn đến hiện tượng mất màu sắc và biến đổi hình dạng. Các thay đổi khác về mô bao gồm sự tăng hoặc giảm số lượng tế bào, chết hoại tế bào bên trong, sự hóa gỗ, thoái hóa và chết của tế bào libe.

Virus có thể tích lũy với số lượng lớn trong tế bào tạo thành các thể vùi. Thể vùi có thể được hình thành trong nhân nhưng phổ biến nhất là trong tế bào chất. Virus trong thể vùi được sắp xếp cạnh nhau, nối đuôi nhau hoặc chồng lên nhau theo không gian ba chiều.

Nếu cây không xuất hiện triệu chứng không có nghĩa là không nhiễm virus. Virus có khả năng xâm nhiễm những ký chủ nhất định và nhân lên trong tế bào ký chủ mà không biểu hiện triệu chứng. Xâm nhiễm tiềm tàng khá phổ biến đối với các thực vật

---

hoang dại và cỏ dại. Virus có thể tồn tại trên ký chủ trung gian và tái xâm nhiễm cây trồng sau một thời gian với sự giúp đỡ của côn trùng chích hút môi giới.

Sự phát triển của triệu chứng phụ thuộc vào virus và mức độ độc của gen. Bản thân cây ký chủ có thể kháng bệnh, dễ nhiễm bệnh hoặc dung nạp bệnh. Tương tự, tuổi cây và thời gian xâm nhiễm đóng vai trò quan trọng trong việc biểu hiện triệu chứng. Nhìn chung, cây càng non thì càng dễ nhiễm bệnh và cây càng già càng dễ dung nạp bệnh. Thời điểm xâm nhiễm càng sớm càng thiệt hại về năng suất nhiều hơn so với thời điểm xâm nhiễm muộn.

Triệu chứng bệnh virus thường phát triển chậm trong điều kiện nhiệt độ cao bởi vì ở điều kiện này virus thường sinh sản chậm. Tuy nhiên, nhiệt độ cao cũng có thể làm giảm khả năng kháng bệnh của ký chủ và vì thế, khi nhiệt độ hạ xuống, quá trình xâm nhiễm thường diễn ra rất nhanh. Cây phát triển trong điều kiện cường độ ánh sáng lớn thường ít mắc cảm với bệnh hơn là trong điều kiện ánh sáng yếu. Cây trồng trên đất giàu dinh dưỡng thường mắc cảm với bệnh hơn là trong môi trường nghèo dinh dưỡng. Hàm lượng nitơ cao có thể làm tăng khả năng nhiễm bệnh của cây.

Triệu chứng bệnh do virus gây ra thường giống với triệu chứng thiếu dinh dưỡng hoặc hậu quả của chất độc hóa học ví dụ như tác động của thuốc trừ cỏ. Có hai cách để loại trừ sự rối loạn dinh dưỡng và mất cân bằng hóa học:

- Quan sát sự phân bố của cây bệnh. Thông thường trong trường hợp rối loạn dinh dưỡng, sự phân bố của cây bệnh sẽ có liên quan với loại đất hoặc vị trí áp dụng thuốc hóa học. Virus thường lan truyền nhờ môi giới nên sẽ phân bố thành từng đám cục bộ hoặc có mối liên quan với nguồn xâm nhiễm, ví dụ như cỏ dại;
- Mô tả lại quá trình lan truyền của virus và phát triển triệu chứng bằng cách ghép hoặc chuyển nhựa cơ giới từ cây bệnh sang cây khỏe dưới điều kiện thí nghiệm. Đây là bước đầu tiên trong việc áp dụng quy tắc Koch để xác định nguyên nhân gây bệnh.

## 7.5 TUYẾN TRÙNG

Phương pháp giám định tuyến trùng vẫn được dùng phổ biến từ trước đến giờ là phương pháp so sánh đặc tính hình thái của mẫu tuyến trùng với các tài liệu mô tả đã xuất bản, cùng với sự trợ giúp của khóa phân loại. Mẫu tuyến trùng được bảo quản và cố định để quan sát và đo kích thước dưới kính hiển vi có cường độ ánh sáng cao. Đối với nhiều loài tuyến trùng, sử dụng khoảng 5 – 10 tuyến trùng cái và được để giám định vì một số đặc tính đặc trưng mang tính định lượng và sự sai khác trong phạm vi loài là khá phổ biến.

Trong nhiều trường hợp, phân loại tuyến trùng thực vật ở mức độ chi có thể thực hiện với một số đặc tính hình thái chung, kết hợp với những hiểu biết về cây ký chủ và quần thể tuyến trùng tại điểm lấy mẫu. Trong một số trường hợp, có thể dựa vào các thông tin này để phân loại tuyến trùng ở mức độ loài.

Tuy nhiên, một số loài tuyến trùng rất khó xác định kể cả khi đã có các thông số về hình thái và số đo hình thể chính xác. Vì vậy mà xu hướng giám định tuyến trùng hiện nay là áp dụng các phương pháp hóa sinh và sinh học phân tử. Đối với một số

---

chi tuyến trùng, việc mô tả loài mới đòi hỏi phải có số liệu về trật tự nucleotide của một đoạn DNA nhất định. Những nghiên cứu về phân loại dựa trên đặc tính hóa học đã giúp cho việc tìm ra sự có mặt của các loài ẩn mà việc sử dụng các đặc điểm hình thái không thể phân biệt được. Tuy vậy, việc tìm ra những sai khác về đặc điểm hình thái cũng bổ sung cho các đặc tính về hóa học.

### **7.5.1 Những yêu cầu về giám định**

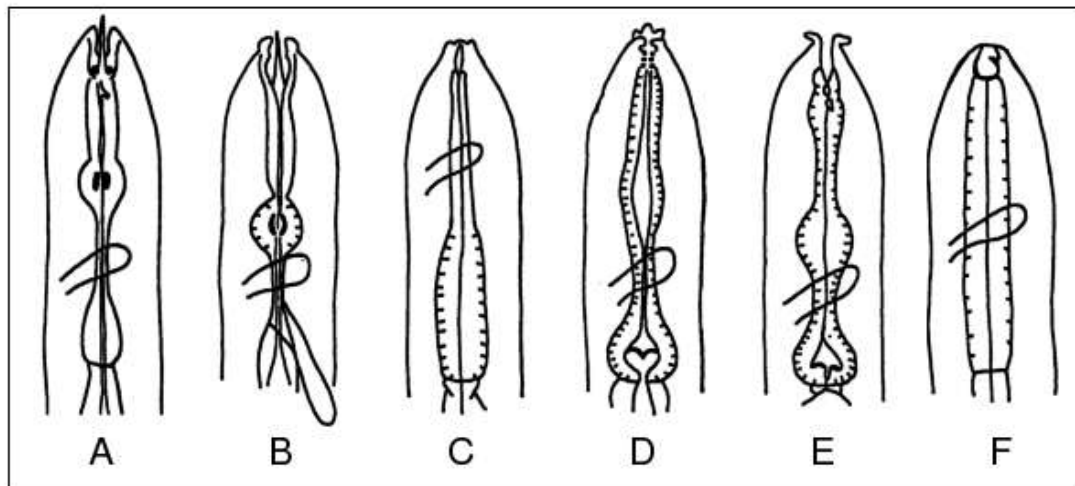
Sự tiếp cận cũng như các kỹ năng chuyên môn cần thiết trong phân loại tuyến trùng phụ thuộc vào mục đích giám định. Các mẫu tuyến trùng lưu giữ trong các bộ sưu tập mẫu Quốc gia và Quốc tế phải được xác định cẩn thận hoặc ít nhất là phải được một chuyên gia về phân loại tuyến trùng khẳng định lại. Tuy nhiên, đối với những đơn vị phân loại khó, các chuyên gia về phân loại tuyến trùng có thể đưa ra các kết luận khác nhau và trong một số trường hợp chỉ dựa vào đặc điểm hình thái cũng không thể giúp gì được.

Đối với mục đích điều tra, những người làm công tác giám định tuyến trùng có thể tự kết luận, chỉ cần tham khảo ý kiến chuyên gia về phân loại đối với những loài mới chưa được mô tả trước đó. Nếu xuất hiện loài mới mẫu tuyến trùng phải được chuyển đến các phòng mẫu bệnh Quốc gia để được kiểm tra lại trong trường hợp cần thiết. Nếu không thể vận chuyển mẫu vì lý do về kiểm dịch hoặc về thương mại, cũng nên có chuyên gia kiểm tra lại trước khi xuất bản (công bố).

Đối với công tác quản lý hoặc nghiên cứu về sinh thái, việc chẩn đoán cũng chỉ cần dừng lại ở phạm vi giám định trên mẫu tuyến trùng sống kết hợp với các thông tin liên quan hệ động vật và ký chủ tại điểm nghiên cứu. Tuy nhiên, để kết quả có thể tin cậy hơn, nên chọn một số mẫu đại diện để các chuyên gia khẳng định lại. Thường đối với mục đích này chỉ cần giám định đến chi là đủ.

### **7.5.2 Nhận dạng tuyến trùng ký sinh thực vật**

Trong thực tế sản xuất, điều quan trọng cần thiết đầu tiên là phải phân biệt được tuyến trùng ký sinh thực vật với tuyến trùng ký sinh trên các giá thể khác. Tuyến trùng sử dụng thức ăn thực vật có các kim hút (bộ phận hút thức ăn rỗng, có thể thò ra thụt vào) trong khoang miệng. Nếu kiểm tra dưới kính lúp soi nổi chất lượng tốt có thể xếp tuyến trùng đang sống thành các nhóm dinh dưỡng theo phỏng đoán. Hình 16 minh họa những biến đổi về hình thái phía trước của tuyến trùng liên quan đến thói quen ăn uống.



**Hình 16** Hình thái mặt trước của một số nhóm tuyến trùng. A, B, C – tylenchid, aphelenchid, dorylaimid – tuyến trùng có kim hút, hút dinh dưỡng từ thực vật, nấm và tảo, một số có khả năng hút dinh dưỡng từ động vật; D, E – rhabditid, cephalobid – dùng thức ăn vi khuẩn; và F – mononchid – loài ăn thịt.

Ngoài các loài tuyến trùng có khả năng hút dinh dưỡng thực vật, một số loài có cấu tạo kim hút có thể hút dinh dưỡng từ nấm, tảo, địa y, một số khác có khả năng ký sinh các động vật nhỏ trong đất. Vì vậy, cần chú ý đến hình thái học và sự tương hỗ với ký chủ để có thể nhận dạng nhóm tuyến trùng ký sinh cây trồng một cách tự tin.

### 7.5.3 Giám định đến loài

#### *Giám định hình thái*

Tuyến trùng được giám định dựa vào hình thái và cấu trúc giải phẫu bao gồm cả hệ sinh sản và số đo kích thước, tỉ lệ số đo kích thước. Khóa phân loại và các tài liệu về mô tả hình thái đều chỉ rõ các đặc tính giúp cho việc giám định đến chi và loài. Hiện nay đã có các khóa phân loại điện tử (dùng phần mềm máy tính). Có thể tham khảo hai khóa phân loại dùng hai chương trình khác nhau sau: Các chi tuyến trùng hại thực vật (xem [www.lucidcentral.org](http://www.lucidcentral.org)) và Tuyến trùng Australia (xem [www.ento.csiro.au](http://www.ento.csiro.au)).

#### *Giám định bằng sinh học phân tử và hóa sinh*

Hiện nay, các phương pháp DNA dựa trên phân tích trình tự chuỗi nucleotide, đầu dò, đoạn cắt DNA đã phát triển và đạt được nhiều tiến bộ để giải quyết những khó khăn trong công tác giám định và phân loại. Một số phương pháp dựa trên việc tách và nhân đoạn DNA từ các cá thể tuyến trùng. Một số phương pháp khác có thể nhận biết định lượng một số loài tuyến trùng đặc biệt trong các mẫu đất. Một hạn chế đáng lưu ý là việc phân loại có thể hạn chế trong phạm vi một loài hoặc một nhóm loài nhỏ mà số lượng mẫu lấy có thể không đại diện cho các biến đổi trong phạm vi loài. Tuy nhiên, việc áp dụng các công nghệ tiên bộ này chắc chắn sẽ phát triển nhanh chóng.

Các phương pháp phân loại dựa trên đặc tính hóa học cũng khá phát triển, bao gồm phân tích isozyme, protein, huyết thanh nhưng không được áp dụng phổ biến. Nhận dạng các loài tuyến trùng nốt sưng bằng phương pháp phân tích isozyme khá thực tế bởi vì việc giám định dựa trên hình thái nhiều khi không chính xác. Việc áp dụng các



---

phương pháp DNA và hóa học trong giám định tuyến trùng đòi hỏi phải có trang thiết bị hiện đại nhưng mặt khác lại giám sự cần thiết phải có các nhà phân loại có kỹ năng trong giám định tuyến trùng hàng ngày.

## 7.6 CÁC KỸ THUẬT PHÂN LOẠI

### 7.6.1 Kính hiển vi điện tử quét (Scanning electron microscopy - SEM)

Không giống như kính hiển vi quang học sử dụng ánh sáng để quan sát mẫu, kính hiển vi điện tử quét (SEM) dùng các điện tử để tạo hình ảnh của mẫu vật. SEM có độ phân giải lớn hơn rất nhiều lần so với kính hiển vi quang học do các điện tử có bước sóng nhỏ hơn 100.000 lần so với bước sóng ánh sáng. SEM cũng rất có ích trong việc nghiên cứu cấu trúc bên ngoài của các bào tử nấm.

Độ phân giải tốt nhất của một kính hiển vi quang học là 0,2  $\mu\text{m}$  hay 200 nm. Độ phân giải của SEM có thể đạt tới 3 - 6 nm, tốt hơn 100 lần so với kính hiển vi quang học. Kính hiển vi điện tử quét cung cấp các hình ảnh bề mặt chi tiết, rõ nét và có chiều sâu hơn kính hiển vi quang học, điều đó cũng có nghĩa là cùng một lúc có thể quan sát được nhiều mẫu hơn.

SEM dùng một chùm điện tử để quét bề mặt mẫu vật, tạo ra các hình ảnh không gian ba chiều của mẫu vật. Các điện tử có kích thước rất nhỏ và dễ dàng đi lệch hướng do sự tác động của các phân tử khí trong không khí. Vì vậy, để các điện tử có thể tiếp cận mẫu vật, hệ thống ống dẫn điện tử và buồng mẫu vật đều được bảo quản trong môi trường chân không.

Để giữ nguyên vẹn cấu trúc của mẫu sinh học trong điều kiện chân không, phải làm khô mẫu cẩn thận bằng carbon dioxide ( $\text{CO}_2$ ) lỏng trong hệ thống máy gọi là máy làm khô tới hạn (critical point dryer). Thông thường, mẫu được cố định trên một mẫu kim loại (thanh gá mẫu) dùng băng dính 2 mặt đặc biệt, sau đó tiêu bản được mạ một lớp kim loại mỏng, ví dụ như vàng để kích thích tính dẫn điện. Bào tử nấm gi sắt và than đen có thành dày không cần phải làm khô tới hạn và có thể được mạ kim loại ngay sau khi mẫu được cố định trên thanh gá mẫu.

### 7.6.2 Kỹ thuật hóa sinh và phân tử

Nếu không thấy triệu chứng bệnh xuất hiện trên cây không có nghĩa là cây đó hoàn toàn sạch bệnh. Trong trường hợp đó, các nhà bệnh cây nên sử dụng các biện pháp kỹ thuật phân tử và hóa sinh để phát hiện vi sinh vật. *Indexing* là khái niệm dùng để chỉ bất cứ quy trình nào được sử dụng để kiểm tra sự có mặt của vi sinh vật đã được biết đến, đặc biệt là virus ký sinh trong thực vật. *Indexing* giúp thực hiện nhanh các biện pháp phòng trừ và hạn chế khả năng phát dịch. *Indexing* cũng rất quan trọng trong việc thực hiện kiểm dịch để hạn chế sự xâm nhập của bệnh ngoại lai và hệ thống chứng chỉ trong sản xuất cây giống và nhân giống cây sạch bệnh.

### 7.6.3 Huyết thanh (miễn dịch)

Trong kỹ thuật huyết thanh, các kháng thể đặc hiệu được tạo ra (nhờ sự có mặt của kháng nguyên sản sinh từ vi sinh vật hại) được khai thác cho mục đích chẩn đoán.

---

Các kháng thể bao gồm kháng thể đa dòng polyclonal (hỗn hợp các kháng thể được sản xuất ra từ hệ miễn dịch của động vật sau khi tiêm chất tiết vi sinh vật vào máu động vật) hoặc kháng thể đơn dòng (tế bào tủy spleen sản sinh ra một loại kháng thể duy nhất từ hệ miễn dịch động vật được nhân vô tính bằng nuôi cấy mô tế bào).

Một trong những phương pháp chẩn đoán bằng huyết thanh phổ biến nhất là kỹ thuật miễn dịch liên kết men (enzyme linked immunosorbent assay - ELISA). Kháng thể được đặt vào các giếng trên đĩa microtitre. Dung dịch kiểm tra được nhỏ vào các giếng, nếu kháng nguyên có mặt thì chúng sẽ tương tác với kháng thể. Rửa sạch giếng, đặt enzyme tiếp hợp kháng thể vào giếng và rửa lại lần nữa, sau đó cho giá thể enzyme vào. Nếu kháng nguyên có trong mẫu, sự tổ hợp kháng thể - enzyme sẽ làm biến đổi màu giá thể.

Chẩn đoán bệnh bằng phương pháp huyết thanh có rất nhiều ưu điểm. Mặc dù sản xuất ra kháng thể đòi hỏi thời gian vài tuần nhưng nếu bảo quản đúng phương pháp kháng thể có thể duy trì được trạng thái ổn định trong một thời gian dài và cho kết quả nhanh chóng. Phương pháp huyết thanh có thể được áp dụng cả trong phòng thí nghiệm và ngoài đồng ruộng.

#### **7.6.4 Kỹ thuật nucleic axit**

Các vi sinh vật chúng có cùng nhiều kiểu gen nhưng nhìn chung, các gen có cùng chức năng ở các đơn vị phân loại (taxon) khác nhau sẽ có trình tự chuỗi sắp xếp chuỗi DNA khác nhau. Sự sai khác này có thể được khai thác trong giám định bằng các kỹ thuật phân tử như: lai nucleic axit và phản ứng trùng hợp chuỗi (PCR). Các kỹ thuật phân tử hiện đại để phân tích nucleic axit nhạy cảm đến mức mà trong những điều kiện lý tưởng, lượng DNA có thể được phát hiện đến picogram.

Một chuỗi phản ứng PCR điển hình liên quan đến quá trình làm nóng DNA, enzyme DNA polymerase, đoạn mồi (DNA primers) và dNTP trong một dung dịch đệm tới nhiệt độ 90°C để làm biến tính DNA, sau đó làm lạnh tới khoảng 50-60°C để gắn các đoạn mồi (primers) vào các chuỗi DNA đơn sau đó tăng nhiệt độ lên 72°C, nhiệt độ tối thích cho phản ứng trùng hợp gắn các chuỗi DNA bổ sung vào nhau, bắt đầu từ vị trí đoạn mồi. Cứ sau mỗi vòng biến tính, gắn mồi và trùng hợp, lượng DNA lại được nhân đôi. Sau 30 vòng được nhân lên theo cấp số mũ, lượng DNA tăng nhiều đến mức có thể nhìn thấy được trong agarose sau khi nhuộm bằng ethidium bromide.

Kỹ thuật nucleic acid áp dụng cho giám định có lợi thế là nhanh và nhạy vượt xa phương pháp huyết thanh. Nhược điểm của phương pháp này là phải có trang thiết bị, hóa chất đắt tiền, không tiến hành được với nhiều mẫu một lúc như phương pháp huyết thanh và sự quá nhạy cảm cũng đồng nghĩa với việc là nếu mẫu bị tạp thì kết quả sẽ bị sai nghiêm trọng.

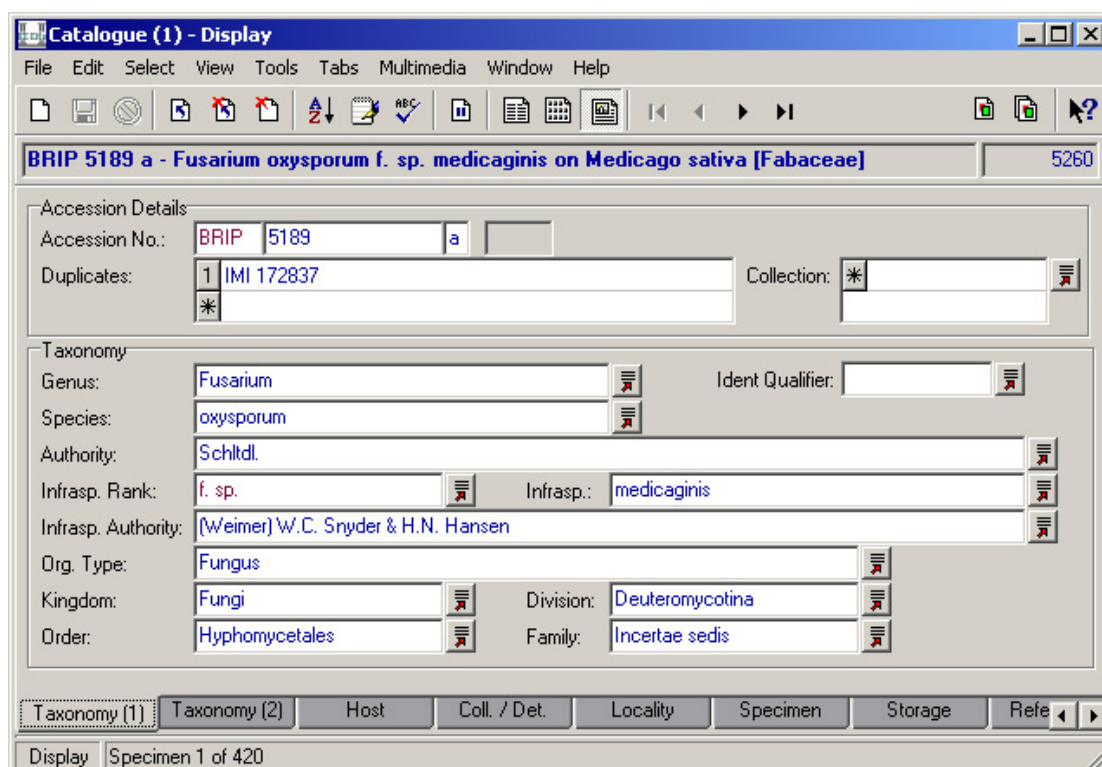
## 8 QUẢN LÝ HỒ SƠ MẪU BỆNH

### 8.1 HỆ THỐNG CƠ SỞ DỮ LIỆU (DATABASE)

Việc nhập thông tin về hồ sơ bệnh cây vào hệ thống cơ sở dữ liệu (database) điện tử là rất quan trọng bởi vì nhờ có hệ thống này, các cán bộ của phòng mẫu có thể tiếp cận thông tin một cách nhanh nhất mà không cần phải lục tìm trong cả đồng tài liệu. Số liệu được sắp xếp có hệ thống nên có thể dễ dàng tìm kiếm, khôi phục, xử lý và cập nhật khi cần thiết.

Thông tin lưu giữ trong database có thể được sử dụng để tạo bản đồ phân bố vi sinh vật hại, vì thế rất quan trọng trong công tác kiểm dịch và đánh giá nguy cơ dịch hại. Một database có thể chỉ đơn giản như một bảng biểu xây dựng từ phần mềm Microsoft Excel, hoặc có thể là các chương trình cơ sở dữ liệu phức tạp hơn như Microsoft Access, Oracle, BioLink hoặc KE EMU. Những chương trình này cho phép quản lý các hình ảnh kỹ thuật số và đồng thời có các công cụ cho phép việc trao đổi thông tin một cách nhanh chóng.

Hệ thống Database như KE EMU (Hình 17) có thể nói là vô giá vì nó cho phép người sử dụng tìm kiếm các thay đổi. Điều này đặc biệt có ích khi người sử dụng muốn thay đổi ngay lập tức các thông số tìm kiếm như tên của vi sinh vật hại và tên ký chủ.

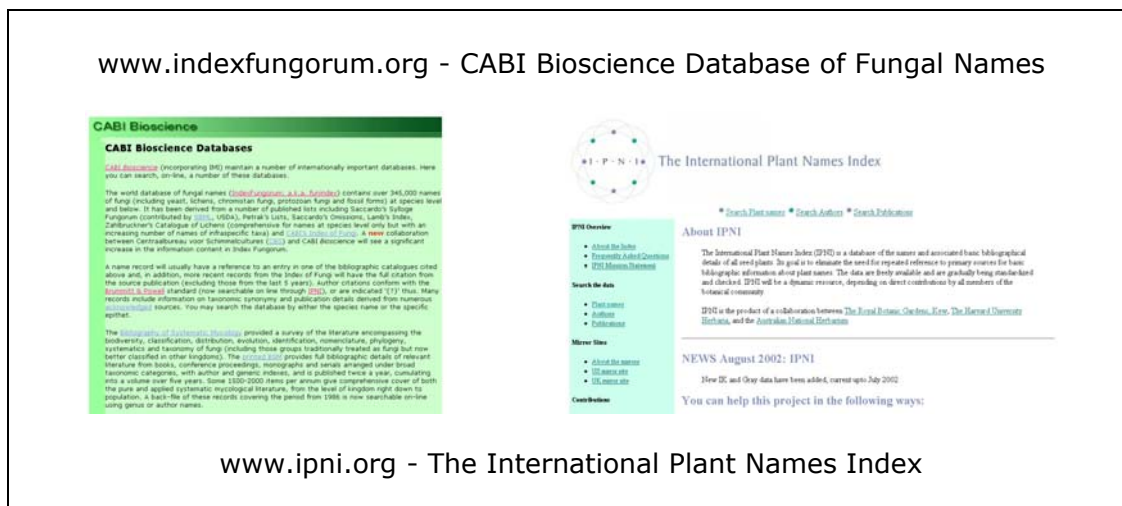


Hình 17 Môđun Catalogue của KE EMU database

Database không chỉ lưu giữ các hình ảnh kỹ thuật số mà cả các phương tiện khác như: file văn bản, file PDF, html và phim video. Ngoài ra, database còn cho phép lưu giữ các thông tin chi tiết về người lấy mẫu, người giám định, người trồng cây, ví dụ

như địa chỉ, số điện thoại, số fax, email, tiểu sử, tài liệu tham khảo. Database còn có thể giúp các nhân viên phòng mẫu lên lịch, đặt giờ cho một số công việc nhất định.

Người nhập thông tin vào database phải bảo đảm rằng các thông tin lưu giữ trong database là hết sức chính xác. Hiện nay có khá nhiều database về phân loại sẵn có trên mạng Internet (Hình 18).



Hình 18 Địa chỉ Internet và trang chủ của hai database phân loại tin cậy

Trong phạm vi một Quốc gia, các database của các phòng mẫu bệnh phân bố rải rác ở các địa điểm khác nhau có thể được kết nối với nhau qua một hệ thống mạng để tạo thành một bảo tàng mẫu ảo. Ví dụ: Database về dịch hại thực vật Australia - Australian Plant Pest Database (APPD, <http://appd.cmis.csiro.au/>) là một hệ thống cơ sở dữ liệu dịch hại cây trồng ảo, mang tính Quốc gia. APPD hợp nhất hồ sơ mẫu dịch hại từ hơn 9 điểm nút khác nhau phân bố trên toàn lãnh thổ Australia, tạo điều kiện cho việc tìm vị trí mẫu dịch hại một cách nhanh chóng và tìm kiếm thông tin một cách hiệu quả.

Trên phạm vi toàn cầu, Nguồn thông tin đa dạng sinh học toàn cầu - Global Biodiversity Information Facility (GBIF, <http://www.gbif.org/>) có một hệ thống database được xây dựng với mục đích đưa các thông tin chủ yếu về đa dạng sinh học trên thế giới lên mạng internet cho tất cả mọi người. GBIF sử dụng cổng chính của nó để truy cập vào một số databases về vi sinh vật hại và các vấn đề có liên quan đến đa dạng sinh học trên toàn cầu.

---

## 9 QUẢN LÝ BỘ SƯU TẬP MẪU

### 9.1 ĐIỀU KIỆN PHÒNG MẪU

Một phòng mẫu bệnh phải có một vị trí an toàn và vĩnh cửu để lưu giữ mẫu. Phòng để mẫu phải có khả năng chống côn trùng, chống cháy và chống mưa dột. Một phòng mẫu bệnh thực vật lớn vừa phải (lưu giữ khoảng 50.000 mẫu) cần sử dụng một diện tích tối thiểu 9 m<sup>2</sup>, đặc biệt nếu sử dụng tủ nhiều ngăn để sắp xếp mẫu tiêu bản. Giá và tủ để tiêu bản bằng kim loại có khả năng chống côn trùng hơn là làm bằng gỗ.

Phòng giữ mẫu nên có hệ thống điều khiển nhiệt độ (20-23°C) và độ ẩm (40-60%) không khí. Trong điều kiện nhiệt độ và độ ẩm như vậy có thể hạn chế được sự phá hủy của côn trùng hại, đặc biệt khi kết hợp với biện pháp đặt mẫu mới vào tủ đá trước khi lưu giữ trong phòng mẫu. Nên sử dụng máy điều hòa không khí để điều khiển nhiệt độ và dùng máy hút ẩm để giảm độ ẩm. Luôn luôn đóng cửa ra vào và cửa sổ để ngăn ngừa côn trùng xâm nhập. Dùng rèm che cửa sổ để tránh ánh nắng mặt trời.

### 9.2 PHÒNG TRỪ BỘ CÁNH CỨNG HẠI TIÊU BẢN MẪU

Ở các khu vực nhiệt đới, nhiệt độ và ẩm độ cao rất phù hợp với sự phát triển của côn trùng phá hại. Một số côn trùng, đặc biệt là bộ cánh cứng, thường ăn mẫu tiêu bản khô và nhanh chóng phá hủy bộ sưu tập mẫu. Để khắc phục tình trạng này nên đặt mẫu bệnh vào tủ lạnh sâu -20°C hoặc thấp hơn trong 7 ngày để diệt hết nguồn sâu hại. Các mẫu đã bảo quản trong phòng cũng nên luân phiên đặt vào tủ lạnh sâu trong một khoảng thời gian nhất định.

Trước khi mẫu được đưa vào tủ lạnh sâu, nên gói mẫu trong túi nilon hoặc hộp xốp đậy nắp chặt để tránh đọng hơi nước trên mẫu. Sau khi lấy ra từ tủ lạnh sâu, để mẫu ở trong phòng có điều hòa một thời gian cho đến khi mẫu đạt đến nhiệt độ phòng bảo quản mẫu.

Mẫu bệnh còn tươi thường được chuyển đến phòng mẫu để giám định. Không nên giữ các mẫu tươi này gần phòng bảo quản mẫu mà nên kiểm tra mẫu ở khu vực xa phòng bảo quản mẫu. Tất cả các mẫu bệnh khi đã lấy ra cho mượn hoặc để kiểm tra đều phải để vào tủ lạnh sâu trong 7 ngày trước khi đặt trở lại vào vị trí cũ trong phòng mẫu.

Nhiều phòng mẫu bệnh có người chuyên trách việc xông hơi phòng mẫu một năm một lần bằng các hóa chất khử trùng được phép lưu hành, ví dụ như methyl bromide, carbon bisulphide, carbon tetrachloride, ethylene dichloride, hydrocyanic gas, lindane, dichlorvos strips hoặc paradichlorobenzene. Phải chú ý khi làm việc với các chất khử trùng này vì chúng có hại cho sức khỏe con người và thường dễ cháy. Tuy nhiên, nếu chỉ khử trùng xông hơi không thôi thì chưa đủ để phòng trừ côn trùng vì biện pháp này thường không hiệu quả đối với trứng côn trùng và nhện.

---

### 9.3 PHÒNG TRỪ NHỆN HẠI MẪU VI SINH VẬT

Vấn đề nhện ăn nấm đã phân lập trên môi trường nhân tạo là vấn đề khá phổ biến và nguy hiểm ở các phòng mẫu vi sinh vật. Nhện xâm nhập vào phòng thí nghiệm thông qua mẫu bệnh tươi, giày dép, quần áo, côn trùng và các mẫu vi sinh vật phân lập từ các phòng thí nghiệm khác. Chúng phát triển mạnh trong điều kiện nhiệt đới. Không chỉ ăn mẫu vi sinh vật phân lập, nhện còn mang bào tử nấm và vi khuẩn trong ruột, trên cơ thể rồi lây nhiễm sang các mẫu khác.

Nếu không được phát hiện sớm, nhện có thể gây họa lớn trong phòng thí nghiệm do chúng có khả năng phát triển rất nhanh, di chuyển từ đĩa cây này sang đĩa cây khác trong tủ hoặc trên bàn để mẫu cây. Nếu nhìn kỹ đĩa cây bằng mắt thường, có thể phát hiện nhện dưới dạng các chấm trắng nhỏ trên bề mặt môi trường. Thông thường, nhện được phát hiện qua các vết bò chúng để lại trên môi trường nấm và vi khuẩn hoặc qua các vết bò chúng để lại trên các giọt nước đọng ở nắp đĩa Petri (Hình 19). Khi có thể phát hiện nhện bằng mắt thường cũng là khi nhện đã bùng phát.

Chú ý ngăn ngừa sự xuất hiện của nhện, không nên để đến khi nhện bùng phát mới tìm cách diệt trừ. Có thể phòng nhện như sau:

- Kiểm tra tất cả các mẫu vi sinh vật chuyển đến phòng thí nghiệm xem có nhện hay không. Nếu muốn giữ mẫu vi sinh vật, nên cây truyền và bỏ mẫu ban đầu vào nồi hấp diệt trùng để diệt hết nguồn nhện tiềm tàng;
- Đặt đĩa cây thuận và đĩa cây phân lập ban đầu vào hai tủ hoặc giá để khác nhau;
- Hấp diệt trùng các mẫu phân lập cũ và các mẫu cây bệnh sau khi sử dụng càng sớm càng tốt;
- Thường xuyên lau mặt bàn phòng mẫu bằng cồn 70% và lau bàn thí nghiệm cũng như mặt trong của tủ để mẫu cây bằng thuốc diệt côn trùng không gây hại cho nấm;
- Bọc đĩa cây bằng parafin hoặc nilon siêu mỏng, tuy nhiên cách này chỉ hạn chế phần nào vì cuối cùng nhện vẫn có thể xâm nhập vào đĩa cây đã bọc;
- Loại bỏ tất cả các mẫu vi sinh vật đã bị nhiễm nhện bằng cách hấp diệt trùng. Nếu mẫu vi sinh vật rất có giá trị và không có mẫu thay thế thì có thể để mẫu vào tủ lạnh sâu trong 24 giờ để diệt hết nhện trưởng thành và trứng. Sau đó cấy truyền vi sinh vật lên môi trường mới và hủy bỏ mẫu cũ. Một số loài nấm không thể sống sót sau khi để lạnh.



**Hình 19** Vết bò của nhện trong các giọt nước đọng trên nắp đĩa Petri

#### **9.4 CHO MƯỢN MẪU**

Các mẫu bệnh lưu giữ có thể được cho mượn trong thời gian ngắn cho mục đích nghiên cứu khoa học. Tuy nhiên, cần phải đề ra các quy định đối với người mượn để bảo đảm sự an toàn của mẫu bệnh. Tốt nhất chỉ cho các phòng mẫu bệnh khác mượn mẫu với điều kiện họ phải bảo đảm an toàn cho mẫu khi vận chuyển cũng như khi làm việc với mẫu. Người lưu giữ mẫu có quyền quyết định không cho mượn mẫu nếu xem xét thấy việc sử dụng mẫu là không cần thiết, không phù hợp với mục đích nghiên cứu hoặc cảm thấy mẫu có thể bị sử dụng không đúng chỗ hay bị hỏng.

Mẫu chuyển ra nước ngoài trong một số trường hợp phải qua xử lý kiểm dịch khi đến nơi. Phương pháp xử lý có thể là bằng nhiệt, xông hơi hoặc xử lý bằng tia phóng xạ gamma. Các phương pháp xử lý này có thể làm hỏng mẫu hoặc tác động đến cấu trúc DNA của vi sinh vật. Vì vậy, người lưu giữ bộ mẫu phải có trách nhiệm áp dụng mọi biện pháp để bảo đảm rằng mẫu cho mượn luôn được giữ trong điều kiện tốt. Nếu nghi ngờ về cách xử lý mẫu hay hậu quả của việc xử lý mẫu thì không nên cho mượn mẫu.

Thời gian cho mượn mẫu thường là 6 - 12 tháng, có thể kéo dài thời gian cho mượn tùy thuộc vào yêu cầu của người mượn. Người cho mượn nên yêu cầu người mượn trả mẫu lại ngay sau khi hoàn thành công việc nghiên cứu. Người mượn có thể trả lại một phần mẫu (không phải toàn bộ mẫu) nhưng phải thỏa thuận trước với người chịu trách nhiệm trông giữ bộ mẫu.

Một trong những điều kiện khi cho mượn mẫu là mẫu phải được bảo quản trong điều kiện an toàn. Không nên gập, bẻ hoặc đè bẹp gói mẫu vì sẽ làm hỏng mẫu. Luôn luôn giữ mẫu trong gói mẫu những lúc không dùng đến. Tất cả các mẫu đều phải được gói cẩn thận trong quá trình bảo quản và phải giữ nguyên trong gói mẫu ban đầu khi trả về phòng mẫu cũ.

Các mẫu cho mượn chỉ được sử dụng cho mục đích nghiên cứu như kiểm tra mẫu tiêu bản và quan sát hình thái vi sinh vật hại dưới kính hiển vi. Người mượn mẫu không được phép lấy mẫu để lưu giữ riêng dưới bất kỳ hình thức nào hay chuyển mẫu cho một tổ chức thứ ba mà không có văn bản cho phép của người phụ trách

---

phòng mẫu cho mượn. Có thể tách một phần tiêu bản bệnh hoặc tách DNA cho một số mục đích nghiên cứu cụ thể. Tuy vậy, phải hết sức cẩn thận khi tách mẫu tiêu bản và chỉ tách bộ phận tiêu bản cần thiết trong điều kiện vẫn còn đủ tiêu bản để giữ lại trong phòng mẫu ban đầu. Đặc biệt, phải hết sức cẩn thận khi cắt tiêu bản gốc (tiêu bản chuẩn).

Các bản chú thích phải được sử dụng để ghi chép những thông tin liên quan đến mẫu bệnh, bao gồm cả những thông tin về danh pháp và phân loại. Bản chú thích phải được làm từ giấy lưu trữ chất lượng cao.

Dưới đây là tất cả các thông tin cần thiết khi ghi giấy cho mượn. Nên chuẩn bị 2 bản giấy cho mượn, một bản gửi cho người mượn cùng với mẫu còn người phụ trách phòng mẫu giữ bản sao:

1. Số cho mượn (1 số duy nhất cho mỗi mẫu cho mượn để không bị lẫn).
2. Tên và thông tin liên lạc của người mượn mẫu.
3. Mục đích mượn mẫu (phạm vi nghiên cứu về phân loại và danh pháp).
4. Ngày mượn và ngày trả mẫu.
5. Mẫu vật cho mượn (một danh mục tất cả các tiêu bản và mẫu cho mượn).

Tất cả các mẫu cho mượn phải được người quản lý phòng mẫu chứng nhận, ký vào và ghi ngày cụ thể trước khi chuyển đến cho người mượn mẫu.

## **9.5 BẢO ĐẢM AN TOÀN CHO MẪU BỆNH**

Giữ an toàn cho bộ mẫu dưới hai dạng. Thứ nhất là đảm bảo an toàn cơ học cho mẫu và thứ hai là trách nhiệm hợp pháp và đạo đức nghề nghiệp của người quản lý bộ mẫu.

### *An toàn cơ học*

Để bảo đảm an toàn cơ học cho bộ mẫu bệnh, không nên để mẫu ở nơi mà ai cũng có thể vào được. Bộ mẫu nên được bảo quản ở một nơi an toàn, không chịu ảnh hưởng của thời tiết, tốt nhất nên ở khu vực có khóa an toàn và có bảo vệ cả ngày lẫn đêm.

Nên bảo quản tiêu bản mẫu bệnh trên giá hoặc trong tủ làm bằng kim loại. Nên có hệ thống chữa cháy tự động tốt nhất là dùng khí (vì nước có thể làm hỏng mẫu tiêu bản khô). Nên đặt bình cứu hỏa cá nhân rải rác trong khu nhà và đội ngũ cán bộ phải được huấn luyện để sử dụng hệ thống chữa cháy này.

Đảm bảo an toàn cho thông tin lưu giữ cũng hết sức quan trọng. Nên thường xuyên copy các file máy tính cập nhật vào đĩa (có thể một ngày một lần). Những cán bộ sử dụng các chương trình quản lý dữ liệu phức tạp như EMu (đã được thảo luận chi tiết ở chương 8) cần phải có kỹ năng cơ bản về máy tính để có thể xem thông tin và hiệu đính hồ sơ mẫu.

### *Trách nhiệm hợp pháp và đạo đức nghề nghiệp*

Bất cứ cơ quan nào lưu giữ mẫu bệnh có giá trị đối với khoa học đều phải có trách nhiệm hợp pháp và đạo đức nghề nghiệp để bảo đảm rằng bộ mẫu luôn được quan



---

tâm bảo vệ và bảo quản trong điều kiện tốt nhất. Vì vậy, cơ quan lưu giữ mẫu phải hạn chế tối đa việc sử dụng các biện pháp kỹ thuật không có cơ sở khoa học, các điều kiện môi trường không thích hợp để bảo vệ tiêu bản cho mục đích sử dụng hiện tại và tương lai.

Cơ quan lưu giữ nên đề ra các chính sách và quy định bằng văn bản về việc quản lý, chăm sóc và sử dụng mẫu bệnh. Cơ quan lưu giữ mẫu phải bảo đảm mọi điều kiện tốt nhất về cơ sở vật chất, cán bộ có chuyên môn cho việc lưu giữ lâu dài mẫu bệnh và hồ sơ có liên quan. Chính phủ một số nơi đã nhận ra giá trị của bộ sưu tập mẫu bệnh và thông qua một số luật về bảo vệ mẫu sưu tập. Ví dụ, phòng mẫu DAR được bảo vệ theo luật về mẫu khoa học nông nghiệp Agricultural Scientific Collections Trust Act 1983 (NSW).

---

## 10 TÀI LIỆU THAM KHẢO CHỌN LỌC

### Tài liệu chung

- Crop Protection Compendium*. 2004. CAB International, Wallingford, UK.
- Disease Compendium Series*. American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA.
- Greuter, W., McNeill, J., Barrie, F.R., Burdet, H.M., Demoulin, V., Filgueiras, T.S., Nicolson, D.H., Silva, P.C., Skog, J.E., Trehane, P., Turland, N.J. and Hawksworth, D.L. 2000. *International Code of Botanical Nomenclature (Saint Louis Code)*. *Regnum Vegetabile*, **138**. Koeltz Scientific Books, Germany.
- Holiday, P. 2001. *A Dictionary of Plant Pathology*. 2<sup>nd</sup> Edition. Cambridge University Press, UK.
- Holmgren, P.K., Holmgren, N.H. and Barnett, L.C. (eds) 1990. *Index Herbariorum. Part 1: The Herbaria of the World*. 8<sup>th</sup> Edition. *Regnum Vegetabile*, **120**. New York Botanical Garden.
- Ploetz, R.C. 2003. *Diseases of Tropical Fruit Crops*. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Walker, J. 1975. Mutual responsibilities of taxonomic mycology and plant pathology. *Annual Review of Phytopathology*, **13**: 335 – 355.
- Waller, J.M., Lenné, J.M. and Waller, S.J. (eds) 2002. *Plant Pathologist's Pocketbook*. 3<sup>rd</sup> Edition. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Waller, J.M., Ritchie, B.J. and Holderness, M. 1998. *Plant Clinic Handbook*. IMI Technical Handbook No. 3. CAB International, Wallingford, UK.

### Vi khuẩn

- Bradbury, J.F. and Sadler, G.S. 1997. *Guide to Plant Pathogenic Bacteria*. 2<sup>nd</sup> Edition. CAB International Mycological Institute, Surrey, UK.
- Fahy, P.C. and Persley, G.J. 1983. *Plant Bacterial Diseases. A Diagnostic Guide*. Academic Press, Sydney.
- Goto, M. 1992. *Fundamentals of Bacterial Plant Pathology*. Academic Press, San Diego, USA.
- Schaad, N.W., Jones, J.B. and Chun, W. 2001. *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. 3<sup>rd</sup> Edition. APS Press, St Paul, Minnesota, USA.
- Swings, J.G. and Civerolo, E.L. 1993. *Xanthomonas*. Chapman & Hall, London, UK.

---

## Nám

- Agrios, G.N. 2005. *Plant Pathology*. 5<sup>th</sup> Edition. Elsevier Academic Press, USA.
- Ainsworth, G.C., Sparrow, F.K. and Sussman, A.S. 1973. *The Fungi. An Advanced Treatise*. Vols. IVA, IVB. Academic Press, New York.
- Arx, J.A. von. 1981. *The Genera of Fungi Sporulating in Pure Culture*. 3<sup>rd</sup> Edition. J. Cramer, Lehre.
- Barnett, H.L. and Hunter, B.B. 1998. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. 4<sup>th</sup> Edition. APS Press, St Paul, Minnesota, USA.
- Barron, G.L. 1968. *The Genera of Hyphomycetes from Soil*. The Williams & Wilkins Company, Baltimore, USA.
- Boerema, G.H., de Gruyter, J., Noordeloos, M.E. and Hamers, M.E.C. 2004. *Phoma Identification Manual*. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Braun, U. 1987. A monograph of the Erysiphales (powdery mildews). *Nova Hedwigia* **89**.
- Braun, U. 1995. *A Monograph of Cercospora, Ramularia and Allied Genera (Phytopathogenic Hyphomycetes)*. Vol. 1. IHW-Verlag, München, Germany.
- Braun, U. 1998. *A Monograph of Cercospora, Ramularia and Allied Genera (Phytopathogenic Hyphomycetes)*. Vol. 2. IHW-Verlag, München, Germany.
- Burgess, L.W., Summerell, B.A., Bullock, S., Gott, K.P. and Backhouse, D. 1994. *Laboratory Manual for Fusarium Research*. 3<sup>rd</sup> Edition. Fusarium Research Laboratory, Department of Crop Sciences, University of Sydney.
- Carmichael, J.W., Kendrick, W.B., Connors, I.L. and Sigler, L. 1980. *Genera of Hyphomycetes*. University of Alberta Press, Edmonton, Canada.
- Crous, P.W. and Braun, U. 2003. *Mycosphaerella and its anamorphs: 1. Names published in Cercospora and Passalora*. *CBS Biodiversity Series 1*. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands.
- Cummins, G.B. and Hiratsuka, Y. 2003. *Illustrated Genera of Rust Fungi*. 3<sup>rd</sup> Edition. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.
- Domsch, K.H., Gams, W. and Anderson, T.-H. 1993. *Compendium of Soil Fungi*. Vols. I, II. Academic Press, New York.
- Ellis, M.B. 1971. *Dematiaceous Hyphomycetes*. CMI, Kew, UK.
- Ellis, M.B. 1976. *More Dematiaceous Hyphomycetes*. CMI, Kew, UK.
- Ellis, M.B. and Ellis, J.P. 1997. *Microfungi on Land Plants*. Richmond, London, UK.
- Erwin, D.C. and Ribeiro, O.K. 1996. *Phytophthora Diseases Worldwide*. APS Press, St. Paul, Minnesota.
- Hansford, C.G. 1961. The Meliolineae. *Sydowia*, Beih. **2**:1-806.

- 
- Hansford, C.G. 1963. Iconographia meliolinearum. *Sydowia*, Beih. **5**: pls. I-CCLXXXV.
- Hawksworth, D.L. 1974. *Mycologist's Handbook*. Commonwealth Agricultural Bureaux, UK.
- Hughes, S.J. 1976. Sooty moulds. *Mycologia* **68**:693-820.
- Index of Fungi*. CAB International Mycological Institute, Surrey, UK.
- Kirk, P.M., Cannon, P.F., David, J.C. and Stalpers, J.A. (eds) 2001. *Dictionary of the Fungi*. 9<sup>th</sup> Edition. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- McLaughlin, D.J., McLaughlin, E.G. and Lemke, P.A. 2001. *The Mycota*. Vol. VII. Systematics and Evolution. Springer-Verlag, Berlin.
- Mueller, G.M., Bills, G.F. and Foster, M.S. (eds) 2004. *Biodiversity of Fungi. Inventory and Monitoring Methods*. Elsevier Academic Press, USA.
- Nag Raj, T.R. 1993. *Coelomycetous Anamorphs with Appendage-Bearing Conidia*. Mycologue Publications, Waterloo, Canada.
- Pitt, J.I. and Hocking, A.D. 1999. *Fungi and Food Spoilage*. Aspen Publishers, Gaithersburg, Maryland, USA.
- Rossman, A.Y., Palm, M.E. and Spielman, L.J. 1987. *A Literature Guide for the Identification of Plant Pathogenic Fungi*. The American Phytopathological Society, St Paul, Minnesota, USA.
- Sivanesan, A. 1984. *The Bitunicate Ascomycetes and their Anamorphs*. J. Cramer, Vaduz, Liechtenstein.
- Spencer, D.M. 1981. *The Downy Mildews*. Academic Press, London.
- Sutton, B.C. 1980. *The Coelomycetes*. CMI, Kew, UK.
- Smith, D. and Onions, A.H.S. 1994. *The Preservation and Maintenance of Living Fungi*. 2<sup>nd</sup> Edition. IMI Technical Handbook No. 1. CAB International, Wallingford, UK.
- Ványkó, K. 2002. *Illustrated Genera of Smut Fungi*. 2<sup>nd</sup> Edition. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.
- White, J.F., Bacon, C.W., Hywel-Jones, N.L. and Spatafora, J.W. 2003. Clavicipitalean Fungi: Evolutionary Biology, Chemistry, Biocontrol, and Cultural Impacts. *Mycology Series 19*. Marcel Dekker, New York.
- Wingfield, M.J., Seifert, K.A. and Webber, J.F. 1999. *Ceratocystis and Ophiostoma: Taxonomy, Ecology and Pathogenicity*. APS Press, St. Paul, Minnesota.

---

## Tuyển trùng

- Anon. 2005. *Interactive diagnostic key to plant parasitic, freeliving and predaceous nematodes*. University of Nebraska - Lincoln Nematology Laboratory, <http://nematode.unl.edu/key/nemakey.htm>
- Bell, M. 2004. *Plant Parasitic Nematodes: Lucid key to 30 genera of plant parasitic nematodes*. <http://www.lucidcentral.com/keys/nematodes/>
- Eisenback, J.D. 2002. *Identification guides for the most common genera of plant-parasitic nematodes*. Mactode Publications, Blacksburg USA.
- Hodda, M. 2005. *Key to the nematodes of Australia*. <http://www.ento.csiro.au/science/nematode.html>
- Hunt, D.J. 1993. *Aphelenchida, Longidoridae and Trichodoridae : their systematics and bionomic* *ong s* CAB International, Wallingford, UK.
- Nickle, W.R. 1991. *Manual of agricultural nematology*. M. Dekker, New York.
- Nobbs, J.M. 2004. *Plant parasitic nematodes of Australia* [CD]. South Australian Research and Development Institute, Adelaide. (available from [nobbs.jackie@saugov.sa.gov.au](mailto:nobbs.jackie@saugov.sa.gov.au))
- Shurtleff, M.C and Averre, C.W. 2000. *Diagnosing plant diseases caused by nematodes*. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.
- Siddiqi, M.R. 2000. *Tylenchida: parasites of plants and insects*. CABI Publications, Wallingford, UK.
- Stirling, G.R., Nicol. J. and Reay, F. 1999. *Advisory services for nematode pests: operational guidelines*. Rural Industries Research and Development Corporation, Barton, A.C.T. viii, 111 p. (<http://www.rirdc.gov.au/reports/Ras/99-41.pdf>)

## Phytoplasma

- Whitcomb, R.F. and Tully, J.G. (Eds). 1989. *The Mycoplasmas*. Vol. 5. Academic Press, New York.

## Virus

- Brunt, A., Crabtree, K., Dallwitz, M., Gibbs, A. and Watson, L. 1996. *Viruses of Plants: Descriptions and Lists from the VIDE Database*. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Hull, R. 2002. *Matthews' Plant Virology*. Academic Press, London, UK.