

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG NGHIỆP I - HÀ NỘI

Chủ biên : GS.TS. VŨ TRIỆU MÂN



GIÁO TRÌNH
BỆNH CÂY ĐẠI CƯƠNG

(Chuyên ngành Bảo vệ thực vật)

HÀ NỘI - 2007

Lời nói đầu

Bệnh cây đại cương là phần trang bị những kiến thức cơ bản, các khái niệm, định nghĩa, các nội dung chủ yếu của khoa học bệnh cây, là môn học cơ sở cho phần bệnh cây chuyên khoa của môn học bệnh cây (Phytopathology). Môn học giúp sinh viên nắm vững các đặc điểm sinh vật học và sinh thái học của các nguyên nhân gây bệnh và những hướng phòng trừ, hạn chế bệnh hại. Nội dung chủ yếu của môn học gồm:

1. Khái niệm chung về bệnh cây.
2. Sinh thái bệnh cây.
3. Phòng trừ bệnh cây.
4. Bệnh cây do môi trường.
5. Nấm gây bệnh cây.
6. Vi khuẩn gây bệnh cây.
7. Virus gây bệnh cây.
8. Phytoplasma gây bệnh cây.
9. Viroide gây bệnh cây.
10. Tuyến trùng gây bệnh cây.
11. Protozoa gây bệnh cây.
12. Thực vật thượng đẳng gây bệnh cây.

Tham gia viết giáo trình này gồm các tác giả:

1. GS.TS. Vũ Triệu Dân: chương I, chương II, chương III, chương IV, chương VII, chương VIII, chương IX.
2. PGS.TS Lê Lương Tề: phần phân loại nấm - chương V, phần triệu chứng bệnh cây - chương I, phần nhưng thay đổi của cây sau khi bị bệnh - chương I.
3. PGS.TS Nguyễn Kim Vân: chương V.
4. TS. Đỗ Tấn Dũng: chương VI, chương XII.
5. TS. Nguyễn Ngọc Châu: chương X.
6. TS. Ngô Thị Xuyên: chương XI.
7. TS. Nguyễn Văn Viên: phần biện pháp hoá học - chương III.
8. GS.TS Vũ Hữu Yên: phần bệnh do thiếu dinh dưỡng - chương IV.
9. PGS.TS Ngô Bích Hảo: phần phân loại và phòng trừ - chương VII.

Giáo trình này chủ yếu dùng cho sinh viên năm thứ 3 ngành Bảo vệ thực vật. Giáo trình đã được soạn thảo với việc bổ sung nhiều tư liệu mới vì vậy có thể làm tài liệu tham khảo cho các kỹ sư đã ra trường và những cán bộ kỹ thuật quan tâm tới môn học bệnh lý thực vật.

CÁC TÁC GIẢ

CHƯƠNG I

KHÁI NIỆM CHUNG VỀ BỆNH CÂY

I. BỆNH CÂY VÀ SẢN XUẤT NÔNG NGHIỆP

1.1. Lịch sử khoa học bệnh cây

Khoa học bệnh cây được hình thành từ nhu cầu của sản xuất nông nghiệp. Thời thượng cổ, với đời sống hái lượm sau đó tiến bộ hơn là du canh, du cư. Con người không phát hiện được sự phá hoại của bệnh cây mà luôn cho rằng việc cây bị héo, bị chết, sản xuất nông nghiệp bị tàn phá là do trời, v.v... không phát hiện được nguyên nhân gây bệnh. Từ thế kỷ thứ 3 trước công nguyên vào thời cổ Hy Lạp, Theophraste đã mô tả bệnh gỉ sắt hại cây và hiện tượng nấm kí sinh ở gốc cây. Đến thế kỷ 16 chế độ phong kiến tập quyền phát triển mạnh, các vùng sản xuất chuyên canh với hàng ngàn héc-ta xuất hiện. Bệnh cây ngày càng gây nhiều tác hại lớn cho sản xuất và nhận thức về bệnh ngày càng rõ rệt hơn. Tới thế kỷ 18, kinh tế thế giới đã chuyển từ các công trường thủ công sang nửa cơ khí và cơ khí hoá. Các quốc gia tư bản hình thành khoa học kỹ thuật phát triển mạnh. Bước đầu đã có những biện pháp đơn giản phòng trừ bệnh cây được thực hiện: M. Tillet (1775) và B. Prevost (1807) là những người đầu tiên nghiên cứu về bệnh than đen lúa mì. Tài liệu nghiên cứu về bệnh cây của Anton de Bary (1853) được xuất bản đã tạo nền móng cho sự phát triển của khoa học bệnh cây sau này. Hallier (1875) phát hiện vi khuẩn gây thối củ khoai tây. A. Mayer (1886), D. Ivanovski (1892), M. Bayerinck (1898) tìm ra virus khảm thuốc lá. Nocard và Roux (1898) phát hiện Mycoplasma ở động vật.

Schulrt và Folsom (1917 - 1921) tìm thấy bệnh củ khoai tây có hình thoi nhưng không xác định rõ nguyên nhân. Nhưng phải tới những năm 30 của thế kỷ 20 khi khoa học thế giới phát triển nhiều nước tư bản công nghiệp ra đời, nền công nghiệp cơ khí hoá chuyển sang điện khí hoá nhanh chóng cho đến những năm 80 của thế kỷ 20 tin học, điện tử, tự động hoá đã phát triển mạnh, các công trình nghiên cứu bệnh cây đã chuyển sang một bước phát triển vượt bậc. Năm 1895 - 1980, E.F. Smith đã nghiên cứu một các hệ thống về vi khuẩn gây bệnh cây. Rất nhiều nhà vi khuẩn học đã có các công trình nghiên cứu của Branes J.A Wdrey L.V.A, Bosh S.E, Boucher C.A., Chang M.L, Cook D., N.W. Schaad, J.B. Jones và W. Chun về vi khuẩn học những năm đầu thế kỷ 20 các nhà khoa học Hà Lan, Pháp, Anh, Nhật Bản đã có nhiều công trình nghiên cứu. Cuốn "Bệnh virus hại thực vật" (Plant virology) của R.E.F Mathew là tài liệu cơ bản được xuất bản nhiều lần; cuốn "Phân loại virus" (Virus Taxonomy) của nhiều tác giả là một tài liệu rất chi tiết và hiện đại về virus học bệnh cây và virus nói chung.

Dienier và W. Raymer (1966) đã xác định được viroide là nguyên nhân gây ra bệnh khoai tây có củ hình thoi ở Mỹ.

J. Doi và cộng tác viên (1967) lần đầu tiên đã xác định bệnh Phytoplasma hại thực vật ở Nhật Bản. Tài liệu "Bệnh cây nhiệt đới" của H. David và Thurston; "Bệnh cây" (Plant pathology) của George N. Agrios được xuất bản nhiều lần là những tài liệu có giá trị cho việc phát triển và nghiên cứu bệnh cây. Đặc biệt, môn sinh học phân tử phát triển đã mang lại sự phát triển vượt bậc của khoa học bệnh cây cuối thế kỷ 20 - đầu thế kỷ 21. Các hội bệnh lý thực vật của các nước thành lập từ rất lâu trên thế giới như: ở Hà Lan (1891), Mỹ (1908), Nhật Bản (1916), Canada (1930), Ấn Độ (1947).

Hội nghị nghiên cứu bệnh cây lần thứ nhất đã tập hợp rất nhiều nhà nghiên cứu bệnh cây tại Luân Đôn (Anh) vào 8/1968 mở đầu cho các hoạt động rất đa dạng và phong phú sau này của Hiệp hội các nhà nghiên cứu bệnh cây thế giới.

Ở Việt Nam từ thời Lê Quý Đôn, trong cuốn "Vân Đài loại ngữ" ông đã mô tả nhiều phương pháp chăm sóc cây khỏe, dùng vôi tro bón ruộng - hun khói bếp để bảo quản hành tỏi, ngô - đặc biệt là đã biết chọn và tuyển lựa các giống lúa tốt, ít bị sâu bệnh.

Tình hình bệnh cây Việt Nam đầu thế kỷ 20 đã được ghi nhận bằng các công trình nghiên cứu của các tác giả người Pháp F. Vincens (1921) về phát hiện bệnh đạo ôn do nấm *Pyricularia* hại lúa tại các tỉnh Bạc Liêu, Cần Thơ, Sóc Trăng. Bougnicourt (1943) phát hiện bệnh lúa von ở Việt Nam. Roger (1951) phát hiện bệnh đạo ôn ở miền Bắc Việt Nam. Trong cuốn "Bệnh cây nhiệt đới" (Phytopathologie des pays chaud) của tác giả Roger (1954) xuất bản tại Paris rất nhiều bệnh hại cây ở vùng nhiệt đới đặc biệt là ở Việt Nam đã được đề cập, mô tả tỉ mỉ.

Sau cách mạng tháng Tám, cuộc kháng chiến chống Pháp xảy ra ác liệt, kéo dài 9 năm. Mãi tới mùa thu 1955, lần đầu tiên Tổ Bệnh cây thuộc Viện Khảo cứu trồng trọt đã được thành lập từ đó ngành bệnh cây Việt Nam đã phát triển mạnh mẽ, tới nay đã hình thành một hệ thống nghiên cứu, giảng dạy và quản lý công tác kiểm dịch và phòng trừ bệnh hại rộng lớn với Cục Bảo vệ thực vật, Viện Bảo vệ thực vật (BVTV), các bộ môn BVTV ở các trường đại học và các chi cục với hàng ngàn cán bộ có trình độ từ cao đẳng đến đại học và trên đại học. Rất nhiều cuốn sách về bệnh cây gồm sách dịch, tài liệu dịch và sách hướng dẫn phương pháp nghiên cứu, giáo trình bệnh cây, sách chuyên khảo, sách phổ biến kỹ thuật của các tác giả Vũ Minh, Đường Hồng Dật, Hà Minh Trung, Vũ Khắc Nhượng, Lê Lương Tề, Vũ Triệu Mân, Nguyễn Văn Tuất, Phạm Văn Kim, Nguyễn Thơ, Bùi Chí Bửu, Phạm Văn Dư, Nguyễn Thị Thu Hồng, và rất nhiều tác giả khác.

Từ tháng 9/2001 Hội Sinh học phân tử bệnh lý thực vật Việt Nam đã được thành lập tập hợp hầu hết các nhà nghiên cứu bệnh cây Việt Nam. Hội đã có nhiều mối quan hệ quốc gia và quốc tế, phát triển sự hợp tác nghiên cứu khoa học của các nhà nghiên cứu bệnh cây Việt Nam. Hội đã tổ chức 5 cuộc hội thảo khoa học 6/2002, 10/2003, 6/2004, 10/2004, 10/2006 và đặc biệt năm 2005 đã xuất bản cuốn sách "Những thành tựu 50 năm nghiên cứu bệnh cây Việt Nam (1955 - 2005)" giới thiệu các công trình nghiên cứu khoa học bệnh cây của Việt Nam trong suốt 50 năm qua.

1.2. Những thiệt hại kinh tế do bệnh cây

Từ cuối thế kỷ 20 đến nay, nông nghiệp thế giới đã đạt được những thành tựu to lớn, sản lượng và năng suất cây trồng không ngừng ổn định và ngày một nâng cao. Tuy vậy, do những tác động của sự thay đổi khí hậu sự biến động của dịch hại đã dẫn đến những thiệt hại đáng kể về năng suất và phẩm chất cây trồng ở nhiều vùng trên thế giới.

Theo tài liệu của Tổ chức Lương thực và Nông nghiệp Liên hợp quốc (FAO), thiệt hại về bệnh cây trong những năm 90 thế kỷ 20 ước tính 11,6%. Trong đó, bệnh hại do nấm có tới hàng chục ngàn loài, hơn 1000 loài virus, 600 loài vi khuẩn,.....tuyến trùng và rất nhiều bệnh hại khác do viroide và phytoplasma, protozoa gây ra.

Trên thế giới, trong lịch sử đã có rất nhiều trận dịch bệnh lớn được ghi nhận như trận dịch do bệnh mốc sương do nấm *Phytophthora infestans* gây ra ở Aixơlen vào năm 1845 - 1847 làm 1 triệu người chết và hơn 2 triệu người phải di cư đi nơi khác. Trận dịch bệnh rỉ sắt cà phê ở Sorilanca đã gây thiệt hại hơn 150 triệu frăng Pháp gây mất mùa đói kém.

Những trận dịch do bệnh Greening và Tristeza gây ra hiện tượng tàn lụi cây cam ở nhiều vùng thuộc Bắc Phi, Trung Mỹ và Đông Nam Á.

Ở Việt Nam, bệnh hại thực vật đã gây nên nhiều trận dịch nghiêm trọng gây thiệt hại rất lớn cho sản xuất: năm 1955 - 1956 bệnh đạo ôn đã hại trên 2000 ngàn mẫu Bắc bộ tại Hà Đông (cũ). Bệnh lúa von đã phá hại đến hàng trăm mẫu Bắc bộ ở các tỉnh đồng bằng sông Hồng. Bệnh lúa vàng lụi xuất hiện từ 1910 ở Yên Châu, Tây Bắc tới những năm 40, 50; bệnh xuất hiện cả ở đồng bằng Bắc bộ nhưng tập trung phá hoại nặng nhất từ 1963 - 1965 trên diện tích rộng hàng trăm ngàn ha ở đồng bằng Bắc bộ. Chỉ tính riêng các tỉnh Thanh Hoá, Thái Bình, Nam Định, Hà Đông và Hà Nam trong năm 1964 đã có 57.500 ha lúa bị bệnh vàng lụi tàn phá hoàn toàn và hàng trăm ngàn ha bị nhiễm bệnh.

Bệnh đạo ôn phá hại thường xuyên ở vùng đồng bằng Bắc bộ, Bắc và Nam trung bộ, miền Nam. Từ năm 1981 đến năm 1986 đã thường xuyên phá hại trên 10.000 ha, có lúc tới 160.000 ha bị nhiễm đạo ôn (1985) với mức thiệt hại nặng, nhẹ khác nhau.

Cây khoai tây, cà chua, ớt, cây cam, chanh bị virus, cây hồ tiêu, cà phê, thuốc lá bị tuyến trùng. Các cây họ cà bị héo xanh vi khuẩn và vô số bệnh hại rau, cây ăn quả, cây công nghiệp, cây làm thuốc, hoa cây cảnh gây thiệt hại to lớn. Trong điều kiện nhiệt đới khí mùa ẩm và mưa nhiều quanh năm ở nước ta.

Thiệt hại của bệnh cây thể hiện rõ rệt ở những mặt sau:

- Bệnh làm giảm năng suất của cây trồng: do cây bị chết, do một bộ phận thân, cành lá, củ, quả bị huỷ hoại. Cây bị bệnh sinh trưởng kém, còi cọc...dẫn đến năng suất giảm. Nếu dịch bệnh bùng phát có thể làm giảm sản lượng trên diện tích rộng gây thiệt hại kinh tế lớn.

- Bệnh làm giảm phẩm chất nông sản khi thu hoạch và cất trữ: giảm giá trị dinh dưỡng như giảm hàm lượng đạm, chất béo, đường, các vitamin, các chất khoáng, v.v ở rau quả.

- Chè, thuốc lá, cà phê bị nát vụn hay mất hương vị khi chế biến, mía giảm hàm lượng đường, bông và đay sợi ngắn và giảm độ bền, dễ đứt, sợi bông bị hoen ố khi vi khuẩn phá hoại. Nhựa cao su kém đàn hồi khi cây bị bệnh. Vì vậy, bệnh làm giảm phẩm chất các vật liệu dành cho công nghiệp thực phẩm, công nghiệp nhẹ.

- Bệnh làm giảm giá trị thẩm mỹ của hàng hoá: bệnh loét cam gây ra những vết lở, loét trên quả. Bệnh sẹo chanh gây ra các u lồi dạng chóp nón trên quả chanh. Bệnh thán thư xoài tạo ra những vết đốm đen trên mặt quả các sản phẩm này khi bảo quản sẽ bị thối hỏng.

- Bệnh làm giảm sức sống hoặc gây chết hom giống, mắt ghép, gốc ghép, cành ghép, các sản phẩm nuôi cấy mô tế bào..., trong nhân giống vô tính và giảm sức nảy mầm gây chết cây con khi bệnh nhiễm trên hạt giống.

- Vi sinh vật trong khi gây bệnh cây còn tiết ra những chất độc ảnh hưởng trực tiếp đến cây bị bệnh, gây độc cho người và gia súc. Nấm mốc vàng (*Aspergillus flavus*) hại lạc, đậu tương, hạt sen tiết ra Aflatoxin gây ung thư gan ở người và động vật.

- Nấm gây bệnh than đen ở lúa mì tiết ra độc tố gây độc cho người và gia súc. Nấm gây bệnh mốc hồng ngô *Fusarium* cũng tiết ra độc tố ở liều cao có thể gây tử vong cho người.

- Nấm gây bệnh đốm vòng xu hào, bắp cải *Alternaria brassicae* tiết ra độc tố Alternarin.

- Bệnh cây còn gây ô nhiễm đất trồng trọt, vi sinh vật gây bệnh nằm trong tàn dư rơi xuống đất và tuyến trùng trong đất đã làm đất trở thành một nơi nhiễm bệnh rất nguy hiểm cho vụ trồng trọt sau. Hoá chất phòng trừ bệnh tích tụ lại trong đất ức chế vi sinh vật có ích, làm ô nhiễm môi trường.....

1.3. Đối tượng nghiên cứu của khoa học bệnh cây

Khoa học bệnh cây là môn khoa học nghiên cứu về các cây bị bệnh. Trong đó ký sinh gây bệnh và môi trường luôn là những điều kiện sinh thái quan trọng để vi sinh vật gây bệnh có thể phát triển thuận lợi hoặc bị ức chế không phát triển và gây hại. Đồng thời tính độc cao hay thấp của vi sinh vật gây bệnh đã ảnh hưởng rõ đến mức độ nhiễm bệnh của cây. Chính vì vậy đối tượng nghiên cứu cụ thể của môn bệnh cây là bản chất nguyên nhân gây ra bệnh cây, các ảnh hưởng của môi trường tới sự phát triển của bệnh, các biện pháp phòng trừ có hiệu quả kinh tế nhất và bảo vệ môi trường.

Chi tiết của các nội dung trên bao gồm:

- Các đặc điểm triệu chứng và quá trình bệnh lý.
- Đặc điểm nguyên nhân gây bệnh và các phương pháp chẩn đoán xác định bệnh.
- Tác hại, tính phổ biến, quy luật phát sinh và dự tính bệnh theo các vùng sinh thái.
- Nghiên cứu tính miễn dịch, kháng bệnh, chịu bệnh và bản chất các hiện tượng này để ứng dụng trong nghiên cứu tạo giống kháng bệnh.

- Đưa ra các biện pháp phòng trừ có hiệu quả và kinh tế nhất và bảo vệ môi trường.

1.4. Những biến đổi của cây sau khi bị bệnh

a. Những biến đổi về cường độ quang hợp

Cây bị bệnh nói chung cường độ quang hợp đều giảm. Quá trình quang hợp giảm là do diện tích lá của cây giảm sút rõ rệt hoặc do lá bị biến vàng, hàm lượng diệp lục. Nhiều cây bị bệnh lá rụng hoặc cây thấp lùn, lá nhỏ, lá biến dạng xoắn cuộn, cây còi cọc ít lá....trong mọi trường hợp cường độ quang hợp đều giảm.

b. Những biến đổi về cường độ hô hấp

Sự thay đổi cường độ hô hấp của cây bệnh chủ yếu phụ thuộc vào đặc tính của ký sinh vật gây bệnh, đặc điểm giống nhiễm hay chống bệnh hoặc đặc điểm vùng mô tế bào bị nhiễm bệnh.

Đa số các trường hợp cường độ hô hấp tăng cao ở giai đoạn đầu nhiễm bệnh rồi sau đó giảm sút dần hoặc giảm đi nhanh chóng tùy theo các đặc điểm kháng hay nhiễm bệnh của cây ký chủ.

Khi cường độ hô hấp tăng chính là lúc các men oxy hoá tăng hoạt tính đột ngột (men catalase, peroxydase, polyphenoloxylase...). Quá trình này đã tạo các sản phẩm oxy hoá như quinon. Quinon tăng nồng độ đột ngột có thể gây chết mô cây do các sản phẩm này ức chế hoạt động của các men khử (dehydrase) nhất là ở các giống có tính kháng cao. Hiện tượng biến đổi này là do sự hoạt động của cây khi có các ký sinh gây bệnh tấn công và được coi như phản ứng tự vệ tích cực của cây chống bệnh.

c. Phá huỷ quá trình trao đổi chất

Khi bị bệnh quá trình trao đổi chất ở các cá thể, ở một giống cây, loài cây nhiễm bệnh có thể có những thay đổi khác nhau. Tuy nhiên, quy luật chung là đạm tổng số và glucit tổng số giảm đi do quá trình phân huỷ mạnh hơn. Tỷ số các dạng protein/phi protein giảm xuống. Protein của cây bị men protease của ký sinh phân huỷ tạo ra một lượng lớn axit amin tự do, nhiều axit amin tự do lại phân giải và cuối cùng tạo thành NH_3 , cây bị mất một lượng đạm lớn. Đường đa cũng thay đổi, các dạng đường đa phân giải thành dạng đường đơn. Các dạng glucit dự trữ phân giải làm thay đổi số lượng và chất lượng của glucit trong mô cây bệnh (như trường hợp bệnh mốc sương khoai tây, bệnh virus thực vật).

Ở các cây bị bệnh có hiện tượng sự vận chuyển, phân bố, điều hoà các chất đạm, glucit bị phá vỡ.

d. Sự biến đổi chế độ nước

Nước là môi trường quan trọng để thực hiện các cơ chế của sự sống trong cơ thể. Nước quyết định sự hoạt động của men và các phản ứng của sự sống nhưng khi cây bị bệnh luôn luôn xảy ra tình trạng mất nước của cây bị bệnh.

Cường độ thoát hơi nước tăng mạnh làm cây mất nước. Sở dĩ xảy ra hiện tượng này là do ký sinh đã phá huỷ hệ rễ và mạch dẫn nước ở cây. Một số ký sinh phá vỡ thân cây chảy nhựa và nước từ các bó mạch ra ngoài (hiện tượng xì mủ cao su).

Ký sinh có thể tác động tới độ thẩm thấu của màng tế bào, phá vỡ mô bảo vệ bề mặt lá, cành, v.v... làm tê liệt khả năng đóng mở của khí khổng và thuỷ khổng.

Ký sinh gây hại ở bó mạch dẫn thường làm bó mạch bị vít tắc, các chất gôm, các sản phẩm phân giải pectin, hoặc tạo các khối u làm tắc bó mạch (bệnh sùi cành chè). Bệnh có thể gây héo vàng (các loại nấm *Fusarium*) hay gây héo xanh (vi khuẩn *Ralstonia solanacearum*).

e. Biến đổi cấu tạo của tế bào

Khi nhiễm bệnh, độ thẩm thấu của màng nguyên sinh thay đổi, phá vỡ tính bán thẩm thấu của màng tế bào, phá huỷ áp lực thẩm thấu và tính trương của tế bào.

Độ keo nhớt của chất nguyên sinh giảm sút. Thay đổi về số lượng và độ lớn của lập thể, ty thể, nhân tế bào... và nhiều thành phần khác của tế bào. Những biến đổi trên đây dẫn đến sự thay đổi hình thái tế bào và mô thực vật: Đó là sự sưng tế bào, tăng kích thước tế bào bất bình thường (như bệnh phồng lá chè) tạo khối u so tế bào sinh sản quá độ (như bệnh sưng rễ bắp cải, sùi cành chè) gây chết mô và đám chết trên như các bệnh hại lá, thân, cành, củ quả.

Những tác hại về sự hao hụt một lượng lớn các chất dinh dưỡng của cây bị bệnh, phá vỡ hoạt động sinh lý bình thường. Quá trình tổng hợp và trao đổi chất của cây như: trao đổi đạm, glucit, chất khoáng, chất điều hoà sinh trưởng cũng bị rối loạn và phá vỡ.

Phá huỷ chế độ nước làm ảnh hưởng tới quá trình đồng hoá, sự sinh trưởng, phát triển và tích lũy vật chất của cây. Làm thay đổi chức năng sinh lý - thay đổi cấu tạo của tế bào và mô. Cuối cùng trong những trường hợp bệnh nặng có thể dẫn đến cây chết.

1.5. Định nghĩa bệnh cây

Để hiểu rõ như thế nào là cây bị bệnh, trước hết chúng ta cần có khái niệm về một cây khoẻ. Với quan điểm sinh thái học và di truyền học - chúng ta có thể nêu lên một khái niệm về cây khoẻ như sau:

Cây trồng được trồng trọt trong điều kiện sinh thái khí hậu đất đai và nguồn dinh dưỡng, chế độ nước không thay đổi giống như cây bố mẹ của chúng và luôn luôn biểu hiện rõ các đặc điểm đặc trưng về loài và giống của chúng thì cây đó được coi là một cây khoẻ.

Có rất nhiều định nghĩa bệnh cây, dựa vào định nghĩa của các nhà khoa học chúng ta có thể đưa ra một định nghĩa khái quát như sau:

Định nghĩa:

1. Bệnh cây là một động thái phức tạp, đặc trưng của một quá trình bệnh lý.

2. Do những ký sinh vật hay do môi trường không thuận lợi gây nên.
3. Dẫn đến phá vỡ các chức năng sinh lý bình thường.
4. Làm biến đổi cấu tạo của tế bào và mô thực vật.
5. Làm giảm năng suất và phẩm chất của cây trồng.
6. Quá trình đó phụ thuộc vào bản chất của ký chủ, ký sinh và môi trường sống.

Định nghĩa này đã giải thích khá đầy đủ các đặc điểm của bệnh cây.

- Ý thứ nhất: Động thái phức tạp đặc trưng của một quá trình bệnh lý: ý muốn giải thích rõ: Bệnh cây do vi sinh vật gây nên đều phải có một quá trình nhiễm bệnh, phát triển của bệnh có thời gian ủ bệnh (thời kỳ tiềm dục) hay do môi trường phải có một giai đoạn khủng hoảng ban đầu mới dẫn đến hiện tượng bệnh lý rõ rệt, không thể xảy ra một cách đột ngột.

- Ý thứ 2: ý này đã phân ra hai loại bệnh là bệnh truyền nhiễm (do các ký sinh vật) và bệnh không truyền nhiễm (do môi trường).

- Ý thứ 3: đã giải thích trong phần bài viết về những thay đổi ở cây sau khi bị bệnh về quang hợp, hô hấp, trao đổi chất, trao đổi chất, trao đổi nước....đó là thay đổi tất yếu xảy ra khi bị bệnh.

- Ý thứ 4: làm thay đổi tế bào và mô là hậu quả của sự thay đổi hoạt động sinh lý của cây.

- Ý thứ 5: làm giảm năng suất và phẩm chất của cây. Ý này nói lên quan điểm kinh tế và sử dụng của nhà nghiên cứu bệnh cây. Nếu bệnh cây không làm giảm năng suất, phẩm chất thì bệnh có thể không cần phải phòng trừ.

- Ý thứ 6: Quá trình này phụ thuộc vào ký chủ thuộc nhóm giống kháng bệnh, chịu bệnh hay nhiễm bệnh, phụ thuộc độ độc của ký sinh và diễn biến bệnh nặng hay nhẹ phụ thuộc môi trường sống trong đó điều kiện thời tiết khí hậu, đất đai và sinh trưởng, dinh dưỡng của cây chủ là những điều kiện ảnh hưởng rõ nhất.

1.6. Các triệu chứng do bệnh cây gây nên

Triệu chứng bệnh là sự biến đổi mô bệnh biểu hiện ra bên ngoài mà ta có thể quan sát, nhận biết được.

Số lượng bệnh cây rất nhiều, tùy theo tính chất khác nhau của các loại bệnh (bệnh toàn bộ hoặc bệnh cục bộ) mà triệu chứng thể hiện ra rất khác nhau, nhưng có thể phân chia thành các nhóm loại hình triệu chứng cơ bản thường gặp như sau:

- **Vết đốm:** Hiện tượng chết từng đám mô thực vật, tạo ra các vết bệnh cục bộ, hình dạng to, nhỏ, tròn, bầu dục, hoặc bất định hình, màu sắc vết bệnh khác nhau (đen, trắng, nâu, đỏ,...) gọi chung là bệnh đốm lá, quả.

- **Thối hồng:** Hiện tượng mô tế bào (củ, rễ, quả, thân chứa nhiều nước và chất dự trữ), mảnh gian bào bị phân huỷ, cấu trúc mô bị phá vỡ trở thành một khối mềm nhũn, nát, nhão hoặc khô teo, có màu sắc khác nhau (đen, nâu sẫm, xám trắng...), có mùi.

- **Chảy gôm (nhựa):** Hiện tượng chảy nhựa ở gốc, thân, cành cây, các tế bào hoá gỗ do bệnh phá hoại (bệnh chảy gôm cam, chanh).

- **Héo rũ:** Hiện tượng cây héo chết, cành lá héo xanh, vàng, rũ xuống. Các bó mạch dẫn có thể bị phá huỷ, thâm đen hoặc rễ bị thối chết dẫn đến tình trạng thiếu hụt nước, tế bào mất sức trương.

- **Biến màu:** Bộ phận cây bị bệnh mất màu xanh do sự phá huỷ cấu tạo và chức năng của diệp lục, hàm lượng diệp lục giảm, gây ra hiện tượng biến màu lá với nhiều hình thức khác nhau: loang lổ (bệnh khảm lá), vàng lá, bạch tạng (trắng lợt), v.v...

- **Biến dạng:** Bộ phận cây bị bệnh dị hình: Lá xoắn, dãn dúm, cuốn lá, cong queo, lùn thấp, cao vống, búi cành (chối thân), chun ngọn...

- **U sưng:** Khối lượng tế bào tăng lên quá độ, sinh sản tế bào rối loạn tạo ra các u sưng trên các bộ phận bị bệnh (rễ, cành, củ) như bệnh tuyến trùng nốt sưng (*Meloidogyne* sp.), bệnh sưng rễ cải bắp (*Plasmodiophora brassicae*), bệnh u sưng cây lâu năm (như *Agrobacterium tumefaciens*).

- **Lở loét:** Bộ phận bị bệnh (quả, thân, cành, gốc) nứt vỡ, loét, lõm như các bệnh loét cam, ghẻ sao khoai tây.

- **Lớp phấn, mốc:** Trên bề mặt bộ phận bị bệnh (lá, quả...) bao phủ kín toàn bộ hoặc từng chòm một lớp sợi nấm và cơ quan sinh sản bào tử rất mỏng, xốp, mịn như lớp bột phấn màu trắng hoặc đen (bệnh phấn trắng, bệnh muội đen).

- **Ổ nấm:** Vết bệnh là một ổ bào tử nấm nổi lên, lộ ra trên bề mặt lá do lớp biểu bì nứt vỡ. Loại triệu chứng này chỉ đặc trưng cho một số bệnh như các bệnh gỉ sắt hại cây, bệnh đốm vòng do nấm.

- **Mumi:** Hiện tượng quả, hạt, bông cờ bị phá huỷ toàn bộ bên trong chứa đầy khối sợi nấm và bào tử như bột đen gọi là bệnh than đen (bệnh hoa cúc lú, phấn đen ngô).

Trong các dạng triệu chứng trên nấm thường gây ra các hiện tượng: vết đốm, thối hồng, chảy gôm, héo rũ dạng héo vàng, u sưng, lở loét, lớp phấn mốc, ổ nấm, mumi.

Vì khuẩn phổ biến gây ra các dạng: vết đốm, thối hồng, héo rũ dạng héo xanh u sưng, lở loét.

Virus thường gây ra các dạng: biến màu, biến dạng, thỉnh thoảng có vết đốm.

Phytoplasma, viroide, tuyến trùng thường gây ra biến màu, biến dạng, u sưng.

Vì vậy, triệu chứng bệnh cây có thể dễ bị nhầm lẫn và làm cho bệnh cây khi chẩn đoán phải dùng nhiều phương pháp phối hợp với nhau mới xác định được nguyên nhân gây bệnh chính xác đặc biệt là dùng phương pháp lây bệnh nhân tạo.

II. ĐẶC TÍNH CỦA KÝ CHỦ VÀ KÝ SINH GÂY BỆNH CÂY

Cây thường bị nhiễm bệnh sau một quá trình xâm nhiễm và gây bệnh của một loại ký sinh vật hay do sự tác động một thời gian tương đối dài của một yếu tố môi trường. Bệnh do môi trường hay còn gọi là bệnh không truyền nhiễm, bệnh sinh lý là do yếu tố môi trường gây ra sẽ được xem xét trong một phần sau trong giáo trình này.

Bệnh truyền nhiễm là nhóm bệnh chúng ta đề cập đến trong phần này là những bệnh do ký sinh vật gây ra. Đó là những bệnh do vi sinh vật hay do những động vật bậc thấp gây hại. Ví dụ: bệnh do virus, vi khuẩn, nấm, Phytoplasma, Viroide, tuyến trùng, Protozoa, thực vật thượng đẳng ký sinh gây ra.

2.1. Sự tác động của vi sinh vật gây bệnh vào cây

Nói chung, vi sinh vật gây bệnh khi tấn công vào cây thường gây ra những hiện tượng sau:

- Sử dụng vật chất dinh dưỡng của cây để nuôi sống cơ thể chúng.
- Phá huỷ quá trình vận chuyển và tích lũy chất dinh dưỡng ở cây làm hỏng bó mạch, huỷ hoại bộ rễ cây.

- Trong khi ký sinh trên mô bệnh, chúng thường sinh ra các hoạt chất sinh học, thực chất là các chất độc và men đầu độc, phân giải tế bào cây và làm rối loạn, phá vỡ quá trình trao đổi chất ở cây.

Chúng ta có thể định nghĩa:

- Vi sinh vật gây bệnh: là những sinh vật dị dưỡng bằng cách lấy dinh dưỡng của cây ký chủ để sống phát triển và sinh sản.

- Cây ký chủ: là cây mà ở đó ký sinh sống, phát triển và là nguồn cung cấp dinh dưỡng cho ký sinh.

- Vì vậy, thực chất mối quan hệ ký sinh là sự thiết lập quan hệ ký sinh và ký chủ sẽ xảy ra khi ký sinh xâm nhập và gây bệnh được trên cây ký chủ - ký sinh thắng được mọi sự đề kháng của ký chủ để thiết lập mối quan hệ ký sinh.

Kết thúc của mối quan hệ này, chúng ta có cây bệnh bị nhiễm bệnh.

2.2. Phân chia tính ký sinh

Tuỳ theo tính chất và phương thức ký sinh, chúng ta chia các vi sinh vật ký sinh một cách đơn giản thành các nhóm như sau:

a. Nhóm vi sinh vật ký sinh chuyên tính

Ký sinh chuyên tính (ký sinh bắt buộc) là nhóm ký sinh chỉ có khả năng sử dụng các vật chất hữu cơ sẵn có trong mô cây sống và đang phát triển. Chúng không sử dụng hay không phát triển trên các mô cây đã chết (tàn dư cây trồng).

Ví dụ: Các loài nấm sương mai, gỉ sắt, nấm phấn trắng hại cây, trong nhóm ký sinh chuyên tính còn có thể kể đến các virus, phytoplasma, viroide, nhưng có những quan niệm cho rằng 3 ký sinh vật này có mức độ ký sinh cao hơn có thể gọi là ký sinh tuyệt đối ở mức độ tế bào, khi tế bào đang phát triển mạnh, khi tế bào chết thì chúng mới bị tiêu diệt.

b. Nhóm vi sinh vật bán ký sinh (hoại sinh tự do có điều kiện)

Là các ký sinh vật chủ yếu sống trên các mô cây đang sống (thường ở bộ phận lá bánh tẻ, lá già), sinh trưởng và sinh sản bằng cách nhân vô tính (nấm) nhưng trong điều kiện nhất định nào đó trong quá trình phát triển cá thể (hữu tính) hoặc khi không có cây ký chủ trên đồng ruộng thì vẫn có khả năng sống và tồn tại trên tàn dư cây trồng, trên các mô cắt rời hoặc một số bộ phận cây đã chết hẳn. Các loại nấm lúa von, tiêm lửa thuộc lớp nấm túi và nhiều loài nấm khác là những loài thuộc nhóm bán ký sinh điển hình.

c. Nhóm vi sinh vật bán hoại sinh (ký sinh tự do có điều kiện)

Nhóm này gồm các vi sinh vật gây bệnh trên các phần của cây đã già, suy yếu như trên lá già, gốc thân, củ hay cây con suy yếu, chúng có thể tồn tại trên các mô đã chết, trên tàn dư cây trồng trong đất, trên hạt, quả, củ, v.v... Điển hình của nhóm này có thể kể đến một số loài nấm mốc như *Aspegillus niger* gây bệnh héo rũ gốc mốc đen ở cây lạc; hay nấm gây bệnh trên bắp cải *Botrytris cinerea* và nhiều loài nấm mốc khác. Các nấm này còn có khả năng gây hại cả trong bảo quản nông sản ở các kho thô sơ trong nhiệt độ bình thường.

d. Nhóm vi sinh vật hoại sinh

Nhóm này gồm các vi sinh vật chỉ sống trên các vật chất hữu cơ ở mô cây đã chết, trên các tàn dư cây trồng, trong đất và nước,... Nhóm vi sinh vật này không có khả năng sống ký sinh trên các cây đang sống, kể cả các mô cây đã suy yếu.

Nhóm sinh vật hoại sinh này có ý nghĩa rất quan trọng trong việc phân huỷ chất hữu cơ giải phóng CO₂ bổ xung vào bầu khí quyển của trái đất. Chúng giúp phân huỷ chất hữu cơ và tạo mùn cho đất, trong số đó có rất nhiều loài vi sinh vật đối kháng sống ở đất đã được sử dụng để thực hiện biện pháp sinh học phòng chống bệnh cây. Trước đây, nhóm này được coi như hoàn toàn không gây hại cho cây trồng, nhưng ngày nay một số vi khuẩn và nấm hoại sinh cũng có thể phá hại trong kho như nấm mốc *Mucor*, *Penicillium* và một số loài vi khuẩn.

Sự phân chia bốn mức độ của 4 nhóm vi sinh vật ký sinh chỉ mang tính tương đối, khi điều kiện sinh thái môi trường thay đổi có thể một vi sinh vật ở nhóm này sẽ mang đặc tính của một nhóm khác và sự phân chia 4 nhóm trên chỉ là 4 nhóm chủ yếu mà thôi.

2.3. Quá trình tiến hoá của tính ký sinh

Ngày nay, tất cả những vi sinh vật ký sinh đã được sắp xếp theo nhóm và phân loại tương đối đầy đủ kể cả sử dụng đến kỹ thuật sinh học phân tử để sắp xếp các phân nhóm và đơn vị phân loại nhỏ hơn. Tuy vậy các nhà nghiên cứu cổ sinh học, bệnh lý thực vật, di truyền học và rất nhiều ngành khoa học có liên quan đã thấy rõ nguồn gốc của các vi sinh

vật trái đất hiện nay chủ yếu bắt nguồn từ đất. Vi sinh vật đất (nhóm hoại sinh) có hệ thống men rất phong phú và có nhiều chất độc để có thể tìm thức ăn và tự bảo vệ cơ thể của chúng khi sống trong môi trường thiên nhiên. Khi tiếp xúc với tế bào cây suy yếu như lá già, rễ cây, gốc thân chúng đã hút được thức ăn dễ dàng hơn và trở thành nhóm bán hoại sinh, lúc này số lượng men và độc tố bắt đầu giảm đi. Khi các loại bán hoại sinh tấn công vào cây qua vết thương và các mô suy yếu, phát triển lên các lá bánh tẻ, chúng dần trở thành vi sinh vật bán ký sinh - một lần nữa thức ăn đã được thay đổi với số lượng dinh dưỡng dồi dào hơn, các men và độc tố không cần dùng đến lại giảm đi đến khi trở thành ký sinh chuyên tính luôn phá hại trên các bộ phận cây non và đang phát triển mạnh, vi sinh vật ký sinh chuyên tính đã xâm nhập vào cây một cách nhẹ nhàng hơn thậm chí bảo vệ mô xanh tươi cho đến lúc ký sinh đã bắt đầu sinh sản số lượng lớn cá thể cây mới tàn lụi. Nhóm vi sinh vật này có rất ít men và độc tố. Đặc biệt các vi sinh vật như Virus, Viroide và Phytoplasma hầu như không có men và độc tố, chỉ có virus giết vi khuẩn (Bacteriophage) mới có hệ thống men để tấn công tế bào vi khuẩn.

Tóm lại sự tiến hoá của tính ký sinh là:

Hoại sinh chuyên tính → Bán hoại sinh → Bán ký sinh → Ký sinh chuyên tính.

Do những đặc điểm trên, các vi sinh vật ký sinh chuyên tính thường phát sinh mạnh trên cây được chăm sóc tốt, điều kiện thâm canh cao, đặc biệt là những cây được bón thừa đạm, lân và lượng phân quá cao mất cân đối hay trên các giống ít chịu phân có hiện tượng lốp, v.v.... Trái lại các nấm, vi khuẩn bán hoại sinh và bán ký sinh thường phá hại trên các cây được chăm sóc kém, cây kém phát triển hay ở các bộ phận suy yếu của cây.

2.4. Khả năng gây bệnh của vi sinh vật gây bệnh cây

Khả năng gây bệnh của vi sinh vật gây bệnh: thường gọi là cao hay thấp.

Vi sinh vật gây bệnh có khả năng gây bệnh hay không phụ thuộc vào khả năng gây bệnh của kí sinh, khả năng này được xác định bằng tính xâm lược, tính gây bệnh và tính độc.

a. Tính xâm lược: là khả năng vi sinh vật xâm nhập vào bên trong của cây, vượt qua sự phản ứng tự vệ của cây để thực hiện bước đầu của quá trình thiết lập mối quan hệ kí sinh.

b. Tính gây bệnh: là khả năng của vi sinh vật sau khi xâm nhập gây ra những tác động bên trong cây để thực sự thiết lập mối quan hệ kí sinh, biểu hiện rõ rệt của tính gây bệnh là triệu chứng bệnh đặc trưng của cây kí chủ sau khi bị nhiễm bệnh.

c. Tính độc: Tính độc (Virulence) là khái niệm bao quát cả hai khái niệm về tính xâm lược và tính gây bệnh, biểu hiện ở mức độ lây nhiễm nặng hay nhẹ, mức độ gây hại nặng hay nhẹ. Tính độc có nhiều biến động phân hoá tùy theo đặc điểm di truyền của các giống khác nhau thuộc loài cây nhiễm bệnh. Hiện tượng này có thể giải thích khi một giống cây bị một chủng độc của một kí sinh nào đó gây hại rất nặng trong khi một giống khác cùng loài hầu như không bị chủng này gây hại.

Bình thường, nếu tính xâm lược, tính gây bệnh cao thì cũng có tính độc cao, nhưng trong một số trường hợp không hoàn toàn như vậy. Sự khác nhau về tính độc luôn thể hiện theo chủng sinh lý và nội sinh học khác nhau của vi sinh vật gây bệnh.

2.5. Phạm vi gây bệnh của vi sinh vật gây bệnh cây (Tính chuyên hoá, chuyên hoá cơ quan, chuyên hoá giai đoạn, phạm vi ký chủ)

Tính chuyên hoá của vi sinh vật gây bệnh (thường gọi là rộng hay hẹp).

Tính kí sinh của vi sinh vật thường thể hiện sự chọn lọc, một chủng hay nội kí sinh, hay một loài kí sinh chỉ có thể kí sinh trên một loài cây hoặc nhiều loài cây. Khả năng kí sinh này được gọi là phạm vi kí chủ “rộng” hay “hẹp”.

a. Tính chuyên hoá rộng

Ví dụ: nấm khô vằn lúa *Rhizoctonia* có phạm vi kí chủ trên 180 loài cây.

Virus khảm lá thuốc lá (Tabacco mosaic virus) có phạm vi kí chủ tới 230 loài cây.

b. Tính chuyên hoá hẹp

Thể hiện kí sinh chỉ có thể gây bệnh trên một loài hay một số ít loài cây như: nấm sương mai, nấm than đen, nấm gỉ sắt cà phê, một số vi khuẩn *Xanthomonas*.... Trong một loài kí sinh như nấm *Pyricularia oryzae* gây bệnh đạo ôn lúa hoặc nấm gỉ sắt lúa mì *Puccinia graminis* có thể hình thành nhiều “dạng chuyên hoá”, “chủng sinh lý”, “nội sinh học” khác nhau về tính gây bệnh, tính chuyên hoá, tính độc khác nhau biểu hiện trên các giống khác nhau của cây.

Tính chuyên hoá còn thể hiện ở tính “chuyên hoá mô”, “chuyên hoá cơ quan”, “chuyên hoá bộ phận”: có kí sinh chỉ hại ở gốc thân, có kí sinh chỉ phá ở rễ, có kí sinh lại tập trung phá ở hoa và quả hay ở lá....

Một số kí sinh lại thể hiện sự phá hoại mang “tính chuyên hoá giai đoạn” hay tính “chuyên hoá tuổi sinh lý”. Bệnh chỉ phá hoại ở cây non hay cây già...

2.6. Những khái niệm về ký chủ

Cây ký chủ: như đã định nghĩa cây ký chủ là cây mà ở đó kí sinh lấy chất dinh dưỡng để sống, phát triển và sinh sản. Cây ký chủ thường được gọi tên theo các khái niệm khác nhau: cây ký chủ chính, cây ký chủ phụ, cây ký chủ trung gian và cây ký chủ đại.

Ví dụ: Bệnh bạc lá lúa có thể hại trên lúa và một vài cây cỏ, nhưng lúa được coi là cây ký chủ chính và gọi tên là một bệnh lúa vì lúa là cây có ý nghĩa kinh tế cao nhất trong số các cây bị bệnh. Cây cỏ được coi là cây ký chủ đại. Bệnh gỉ sắt ngô sinh ra nhiều dạng bào tử và các bào tử thường buộc phải sống trên các cây khác nhau. Giai đoạn bào tử hạ và bào tử đông sống trên cây ngô, giai đoạn bào tử xuân sống trên cây chua me đất (*Oxalis* sp.). Cây chua me đất được coi là cây ký chủ trung gian.

Kỹ chủ phụ thường dùng để chỉ những cây trồng có giá trị kinh tế thấp hơn như bệnh hại cây lúa mì có thể có trên cây cao lương thì cao lương có thể được coi là kỹ chủ phụ.

III. CHẨN ĐOÁN BỆNH CÂY

3.1. Mục đích

Chẩn đoán bệnh cây nhằm xác định nguyên nhân gây bệnh và các biểu hiện bên ngoài của bệnh, phân biệt rõ với các hiện tượng bệnh do ký sinh khác và do môi trường gây nên, từ đó có biện pháp phòng trừ đúng đắn.

3.2. Các điều kiện cần thiết để chẩn đoán bệnh cây

a) Người làm công tác chẩn đoán: Để chẩn đoán được bệnh cây người làm công tác chẩn đoán phải là người được đào tạo chính quy môn bệnh cây và ít nhất có 3-5 năm tham gia các hoạt động điều tra, nghiên cứu bệnh cây.

b) Thông tin về cây và khu vực cần chẩn đoán: phải biết rõ chất đất, chế độ chăm sóc, đặc điểm giống cây, giai đoạn sinh trưởng, điều kiện khí hậu thời tiết, mùa vụ, các biện pháp phòng trừ đã thực hiện, các cây trồng vụ trước...

c) Cần có những trang thiết bị và tài liệu tối thiểu để chẩn đoán bệnh chính xác như: kính hiển vi quang học, các trang thiết bị khác để nuôi cấy vi sinh vật. Tối thiểu có Kit ELISA để xác định (nếu là bệnh virus) có các hoá chất cần thiết giúp cho chẩn đoán nhanh và chính xác.

3.3. Khái quát về các bước chẩn đoán bệnh cây

Bước 1: Quan sát bao quát đồng ruộng để đánh giá mức độ phổ biến của bệnh và giống bị hại chủ yếu, mức độ hại và thời gian xuất hiện bệnh.

Bước 2: Phân biệt triệu chứng bệnh đặc biệt khác với các bệnh do ký sinh khác và môi trường gây ra. Tìm ra được những điểm đặc thù của bộ phận bị hại.

Bước 3: Xác định được vi sinh vật gây bệnh và đặc điểm của chúng để đi đến khả năng phòng trừ có hiệu quả và kinh tế nhất.

Chẩn đoán bệnh khá phức tạp, lý do chủ yếu là vì cây bệnh buộc phải tồn tại và phát triển trong điều kiện sinh thái môi trường luôn biến động. Tình trạng bệnh lý lại phụ thuộc loài, giống, tuổi cây và bản chất vi sinh vật gây bệnh. Do đó, cần có tác phong linh hoạt và đặc biệt không bỏ qua các chi tiết đặc biệt thu được hiệu quả cao.

3.4. Các phương pháp chẩn đoán bệnh cây

a. Phương pháp chẩn đoán bằng triệu chứng bên ngoài

Dù chẩn đoán bằng phương pháp nào đi nữa, thì cuối cùng kết luận về triệu chứng bên ngoài vẫn là một phương pháp rất quan trọng trong chẩn đoán bệnh cây. Thông qua các biểu hiện bằng triệu chứng bên ngoài, chúng ta có thể hiểu biết ít nhiều về nguyên nhân gây bệnh bên trong và ngược lại. Điều quan trọng nhất trong chẩn đoán triệu chứng

là phải tìm ra đặc điểm riêng biệt của từng loại nhóm bệnh và từng loại nguyên nhân gây bệnh để có thể so sánh chúng với nhau, tránh mắc phải những nhầm lẫn.

Luôn luôn phải lưu ý một hiện tượng: một nguyên nhân gây bệnh có thể gây ra nhiều dạng triệu chứng khác nhau và ngược lại - một triệu chứng có thể do nhiều nguyên nhân khác nhau gây ra.

Triệu chứng bệnh còn phụ thuộc vào mức độ nặng nhẹ khi bệnh gây ra trên một cây - phụ thuộc vào giống cây khác nhau, chăm sóc khác nhau và điều kiện sinh thái và khí hậu khác nhau vào bản chất của nguyên nhân gây bệnh khác nhau đặc biệt là tính độc của vi sinh vật khác nhau.

Chẩn đoán bằng triệu chứng luôn rất quan trọng, rất kinh tế và mang lại hiệu quả cao. Tuy nhiên, trong chẩn đoán bệnh cây nếu chỉ sử dụng một phương pháp có thể còn phiến diện nên người ta thường dùng nhiều phương pháp phối hợp nhau để kết luận nguyên nhân gây bệnh một cách chính xác.

b. Phương pháp chẩn đoán bằng kính hiển vi quang học thông thường

Những vi sinh vật có thể kiểm tra bằng kính hiển vi bao gồm nấm, xạ khuẩn, vi khuẩn... Virus, phytoplasma, viroide không thể sử dụng kính hiển vi thường mà phải dùng kính hiển vi điện tử phóng đại hàng vạn đến hàng chục vạn lần để quan sát vì chúng rất nhỏ bé. Muốn chẩn đoán vi sinh vật bằng kính hiển vi thường phải có một số điều kiện sau:

- Phải nắm vững phương pháp sử dụng kính hiển vi quang học
- Thu mẫu nấm, vi khuẩn ở ngoài đồng phải là mẫu có vết bệnh đang phát triển hoặc mới hình thành. Nếu lấy vết bệnh đã cũ dễ nhầm nguyên nhân gây bệnh với các vi sinh vật hoại sinh, phụ sinh rơi ngẫu nhiên và mọc tạp trên bề mặt vết bệnh.
- Nếu vết bệnh mới chưa có bào tử hay dịch bào tử thì cần để mẫu lá bệnh (thân, cành, quả) vào hộp ươm petri có lót giấy ẩm để trong điều kiện nhiệt độ phòng hay trong tủ ẩm ở nhiệt độ ẩm (30°C) hàng ngày phát hiện sợi nấm và bào tử xuất hiện trên bề mặt vết bệnh để lấy mẫu quan sát.
- Có thể quan sát trực tiếp bào tử trên vết bệnh dưới kính hiển vi: về hình dạng, màu sắc, đo kích thước của bào tử, hoặc dùng phương pháp nhuộm methylen xanh, nitrat bạc 10% từ 3-5 phút, thấm khô nhẹ rồi nhuộm tiếp vào dung dịch KOH 10%, hay nhuộm KMnO₄ 5%, hoặc Fucsin Fenol... để phát hiện thể sợi nấm hay vi khuẩn có trong mô bệnh.
- Khi quan sát vi khuẩn có thể thực hiện các kỹ thuật chẩn đoán nhanh như ngâm 1 đầu lá bệnh vào dung dịch NaCl 1% trong 15 - 30 phút và quan sát giọt dịch vi khuẩn xuất hiện ở đầu lá nhô lên mặt nước. Nhuộm gram, nhuộm lông roi, xem trên kính dầu ở độ phóng đại hơn 400 lần và mô tả hình dạng, màu sắc, đo đếm kích thước, vi khuẩn một

cách chính xác. Tế bào vi khuẩn còn có thể được quan sát rõ trên kính hiển vi huỳnh quang khi dùng phương pháp nhuộm kháng thể huỳnh quang vi khuẩn.

c. Phương pháp chẩn đoán sinh học

Với vi sinh vật chủ yếu là nấm và vi khuẩn khi cần phải phân lập trên môi trường có thể dùng một mẫu nhỏ mô cây mới nhiễm bệnh. Cắt phần lá gần vết bệnh cấy vào môi trường, dùng phương pháp pha loãng và cấy truyền để phân ly. Các loại môi trường thường dùng là: môi trường Water Agar (WA) (thường dùng 20g Agar và 1000ml nước cất). Sau đó là các môi trường phân lập nấm (mPDA, CLA, PDA, CMA...) môi trường phân lập vi khuẩn (SPA, King's B, TZC, Wakimoto, PS, PG, PGA...)

Trong các môi trường, có những môi trường gọi là môi trường tổng hợp (tất cả các chất đều biết rõ thành phần hoá học, thường là các môi trường lỏng). Môi trường bán tổng hợp là môi trường có một số chất hoặc một chất không rõ thành phần hoá học.

Ví dụ: môi trường PGA: Khoai tây : 200g - chưa rõ thành phần hoá học

Glucose : 20g

Agar : 15g - chưa rõ thành phần hoá học

Nước cất : 1000ml

Có môi trường gọi là môi trường thiên nhiên (không biết thành phần hoá học của chất tạo môi trường). Ví dụ : môi trường củ khoai tây, môi trường củ cà rốt, môi trường khoai tây - Agar.... về tính chất vật lí. Môi trường còn có thể chia thành dạng môi trường lỏng và môi trường đặc (khi dùng Agar). Nuôi cấy vi sinh vật trên môi trường lỏng do thiếu oxy thường phải dùng máy lắc để tăng lượng oxy cho môi trường.

d. Phương pháp dùng kháng huyết thanh chẩn đoán bệnh

Kháng huyết thanh để chẩn đoán bệnh hại đã được thử nghiệm dựa trên hiện tượng khi có một chất lạ (kháng nguyên) vào cơ thể, cơ thể sẽ có khả năng kháng lại bằng cách tạo đáp ứng miễn dịch hình thành kháng thể. Lúc đầu, phương pháp này sử dụng cho bệnh virus nhưng nay phổ biến cả trong chẩn đoán vi khuẩn và một số bệnh khác.

Kháng thể đa dòng (Polyclonal antibody)

Khi ta tiêm dịch virus được làm tinh khiết từ cây chỉ thị bị nhiễm bệnh vào cơ thể động vật, cơ thể động vật sẽ thực hiện đáp ứng miễn dịch. Trong trường hợp này cơ thể động vật đã tạo nên nhiều kháng thể do nhiều dòng tế bào B tạo ra. Đó chính là polyclonal antibody hay gọi là kháng thể đa dòng. Trong chẩn đoán bệnh cây kháng thể đa dòng có hiệu quả rất cao trong việc loại trừ cây bị bệnh dù chúng ở chủng nào thuộc cùng một loài vi sinh vật gây bệnh.

Kháng thể đơn dòng (Monoclonal antibody)

Là kháng thể không nhân lên trong cơ thể động vật mà nhân lên trong tế bào ung thư được nuôi cấy trên 1 bản plastic. Tóm tắt phương pháp tạo kháng thể đơn dòng của

Milstein và Kohler (1975) như sau: Tế bào lympho B có gen mã hoá Ig (tạo kháng thể) + tế bào u tuỷ Myeloma (nhân nhanh) của một động vật bị ung thư. Hai tế bào này dung hợp với nhau và được nuôi trong môi trường HAT (chứa hypoxanthin, aminopterin và thymidin) chúng tạo ra tế bào lai. Thực hiện nuôi cấy đơn bào trên bản plastic trong điều kiện vô trùng tuyệt đối ta thu được dòng 1, 2, 3, 4,... Từ đó sản xuất được kháng thể đơn dòng (monoclonal antibody). Kháng thể đơn dòng có thể phát hiện tới chủng (strain) của virus hay nòi (race) của vi khuẩn và nấm gây bệnh hại thực vật.

Kháng nguyên (virus có trong dịch lá bệnh) sẽ kết hợp với kháng thể (có trong kháng huyết thanh) đều tạo kết tủa dù là kháng thể đơn dòng hay đa dòng.

Kháng huyết thanh luôn có tính đặc hiệu cao:

- kháng nguyên A chỉ kết hợp với kháng thể A.
- kháng nguyên B chỉ kết hợp với kháng thể B.
- kháng nguyên C chỉ kết hợp với kháng thể C.

Không có hiện tượng kết tủa chéo giữa A, B, C, chính vì vậy chúng ta có thể sử dụng kháng huyết thanh để chẩn đoán xác định bệnh hại. Trong suốt những năm đầu của thế kỷ 20 (1930 - 1970) kháng huyết thanh là phương pháp chẩn đoán rất quan trọng vì phản ứng xảy ra nhanh từ 15 - 20 phút trong điều kiện nhiệt độ phòng thí nghiệm khoảng 20 - 25°C. Nhưng để quan sát phản ứng ngày một khó hơn khi ta gặp các trường hợp kết tủa quá ít khó có thể phán đoán có hay không có phản ứng (phản ứng ±). Năm 1977, Clark và Adam (Scottlen) đã dùng phương pháp thử nghiệm miễn dịch liên kết men (Enzyme linked immunosorbent assay – ELISA) lần đầu tiên trên thực vật. Phương pháp ELISA đã tạo ra một sự đổi mới trong việc sử dụng kháng huyết thanh làm tăng độ chính xác lên hàng nghìn lần. Bản chất của phương pháp vẫn là sử dụng kháng nguyên và kháng thể tạo ra sự kết hợp giữa chúng với men (enzyme) liên kết - nhưng chỉ thị của phản ứng không phải là kết tủa mà là màu vàng. Máy đọc ELISA đã khắc phục hiện tượng màu vàng nhạt dần và cung cấp cho chúng ta bảng số liệu chỉ rõ các phản ứng xảy ra ở từng giếng trong bản ELISA.

Phương pháp ELISA direct (DAS - ELISA), phương pháp indirect là những phương pháp sử dụng phổ biến trên thế giới cho đến nay, những phương pháp này vẫn dùng rộng rãi trong sản xuất và được coi là phương pháp huyết thanh chính xác nhất được sử dụng hiện nay. Chi tiết các quy trình của phương pháp ELISA như sau:

❖ **Phương pháp DAS - ELISA (Double antibody sandwich - ELISA) hay còn gọi là phương pháp ELISA trực tiếp**

Bước 1: Cố định IgG đặc hiệu của virus vào bản ELISA.

IgG hoà trong dung dịch đệm carbonate, cho vào mỗi giếng 100 µl. Đặt bản ELISA trong hộp ẩm, để vào tủ ấm ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 2 - 4h. Sau khi ủ, giếng được rửa bằng dung dịch đệm rửa (PBS - T) ba lần, mỗi lần trong 3 phút.

Bước 2: Cố định dịch cây vào bản ELISA.

Nghiền mỗi mẫu 2 g trong đệm chiết (PBS - T + 2% PVP) với độ pha loãng 1/10 và 1/20. Dịch cây được nhỏ vào bản ELISA với lượng 100µl /giếng. Sau đó đặt bản ELISA vào hộp ẩm để trong tủ lạnh ở -4°C qua một đêm hoặc có thể ủ ở 37°C trong khoảng 2 - 4h. Trong quá trình này IgG sẽ xảy ra liên kết giữa IgG và kháng nguyên (nếu mẫu là mẫu bị nhiễm bệnh). Sau khi ủ bản ELISA được rửa như bước 1.

Bước 3: Cố định IgG liên kết enzyme.

Hoà IgG liên kết enzyme (IgG - E) trong dung dịch đệm liên kết (PBS -T + 2% PVP + 0,2% Ovalbumin) theo tỷ lệ cho vào giếng với lượng 100 µl/giếng. Bản ELISA được ủ ở 37°C trong 2h và rửa như bước 1.

Bước 4: Cố định chất nền vào bản ELISA.

Hoà chất nền NPP (nitrophenol phosphate) vào dung dịch đệm substrate (theo tỷ lệ 0,25 - 0,5mg/1ml dung dịch đệm). Sau đó nhỏ vào mỗi giếng 100 µl. Bản ELISA để trong hộp ẩm được đặt ở nhiệt độ trong phòng thí nghiệm. Sau 1h các giếng có màu vàng là giếng có phản ứng dương tính, giếng không màu là không có phản ứng. Kết quả được đọc chính xác hơn trên máy đọc ELISA (ELISA reader) ở bước sóng 405 nm.

Để cố định màu sắc của bản ELISA, bảo quản trong tủ lạnh 4°C nếu cần xem lại vào khi khác có thể dùng dung dịch NaOH 3M nhỏ vào mỗi giếng 25 - 30 µl.

❖ Phương pháp Indirect ELISA hay còn gọi là phương pháp ELISA gián tiếp

Bước 1: Cố định dịch cây (nghi là bị bệnh) cần kiểm tra vào bản: cần mỗi mẫu 0,2 g lá cho vào túi nilon nghiền trong dung dịch PBS với tỷ lệ lá/dung dịch đệm là 1/20 - 1/100, nhỏ vào bản 100 µl /giếng. Sau đó để bản ELISA vào hộp ẩm và ủ qua một đêm ở nhiệt độ 4°C .

Bước 2: Chuẩn bị mẫu cây khoẻ (cây đã được kiểm tra ELISA không bị nhiễm) nghiền trong dung dịch đệm pha huyết thanh (PBS - T 1000ml + 2% PVP + 0,2% Ovalbumin) theo tỷ lệ 1/20. Lọc qua vải lọc ta thu được dịch cây khoẻ. Cho kháng huyết thanh vào dịch cây khoẻ theo nồng độ đã pha loãng tùy từng loại kháng huyết thanh khuấy đều và để 45 phút trong điều kiện 37°C .

Bước 3: Rửa bản ELISA với đệm PBS - T 3 lần trong 3 phút.

Bước 4: Cố định kháng huyết thanh vào bản ELISA, nhỏ vào mỗi giếng 100 µl kháng huyết thanh đã pha loãng trong dịch cây khoẻ. Sau đó cho bản ELISA vào trong hộp ẩm và để ở điều kiện nhiệt độ 37°C trong thời gian từ 1 - 1h 30 phút.

Bước 5: Rửa bản ELISA như ở bước 3.

Bước 6: Cố định kháng huyết thanh của kháng nguyên IgG thử (hay kháng huyết thanh B (conjugate AP) với độ pha loãng 1/1000 - 1/2000. Mỗi giếng 100 µl. Đặt bản

ELISA vào hộp và để qua một đêm ở tủ lạnh 4°C (hoặc để ở nhiệt độ 37°C trong 1h - 1h 30 phút).

Bước 7: Rửa bản ELISA như bước 3.

Bước 8: Cố định chất nền và đánh giá kết quả:

- Pha 0,25 - 0,3 mg NNP/1ml đệm substrate rồi hoà tan bằng máy khuấy từ.
- Sau đó nhỏ dung dịch trên vào bản ELISA, 100 µl/ giếng.

Đưa bản ELISA vào hộp ẩm và để trong nhiệt độ phòng thí nghiệm (khoảng 20°C) trong thời gian từ 30 - 60 phút.

Bước 9: Đọc kết quả:

Các giếng có màu vàng là các giếng có phản ứng (+). Giếng không có màu là cây không bị nhiễm bệnh. Đọc kết quả tiếp bằng cách đưa vào máy đọc ELISA ở bước sóng 405 nm. Cũng có thể dùng phản ứng bằng NaOH 3M với lượng 25 - 50 µl/giếng như phương pháp DAS - ELISA.

e. Các phương pháp chẩn đoán sinh học phân tử

Phương pháp chẩn đoán kháng huyết thanh và ELISA là những phương pháp chẩn đoán protein. Cho tới nay (2006) vẫn là phương pháp được ứng dụng rộng rãi để chẩn đoán virus ở người, động vật và thực vật đã được các hãng Agdia, Biorad (Mỹ), nhiều hãng sản xuất của Nhật, Đức, Pháp, Hà Lan...thương mại hoá và đưa ra thị trường rất nhiều sản phẩm do giá trị của các sản phẩm này rẻ và độ chính xác cao. Những phương pháp chẩn đoán sinh học phân tử là phương pháp phát hiện ARN và ADN. Từ những năm 80 khi phương pháp sinh học phân tử ra đời thì việc xác định virus thực vật bắt đầu phát triển ở mức độ phân tử. Có rất nhiều phương pháp sinh học phân tử được ứng dụng, song tới nay PCR (polymeraza chain reaction) là phương pháp được sử dụng rộng rãi và mang lại hiệu quả cao nhất. Phương pháp được thực hiện trên cơ sở khả năng tái tổ hợp của ADN, ARN invitro. Muốn thực hiện khả năng này cần có các điều kiện cơ bản sau: Tách được 1 lượng nhỏ ADN nguyên bản, trộn với một tập hợp các chất trong môi trường muối đệm gồm Taq Polymeraza, dNTPs (Deoxyribonucleotit triphosphates), MgCl₂. Một hoặc hai đoạn nucleotit làm môi (primer).

Tóm tắt các bước của phương pháp PCR gồm:

- Bước 1: Sợi ADN kép được xử lý ở 94°C trong 5 phút tạo thành 2 sợi đơn.
- Bước 2: Đoạn bổ sung sợi đơn ADN và đoạn môi ghép cặp ở 30 - 65°C trong 3 giây.
- Bước 3: Tổng hợp sợi đơn mới ADN ở 65 – 75°C trong 2 - 5 phút.
- Bước 4: Quay trở lại bước 2 sau khi ADN kép lại tách thành 2 sợi đơn ở 94°C trong 30 giây....sản phẩm PCR được điện di trên gel Agarose hoặc gel Polyacrylamide.