Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam 2026, 24(6): 809-819 https://doi.org/10.31817/tckhnnvn.2026.24.06.08
vie.vjas.vn

NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG PHƯƠNG PHÁP LÂY NHIỄM NHÂN TẠO NẤM *Fusarium solani* TRÊN LÁ CÀ CHUA TÁCH RỜI

Vũ Hiền Anh, Nguyễn Xuân Cảnh, Đặng Thị Thanh Tâm*

Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

**Tác giả liên hệ: thanhtam@vnua.edu.vn*

Ngày nhận bài: 23.10.2025 Ngày chấp nhận đăng: 05.05.2026

TÓM TẮT

Fusarium solani là một loài nấm gây bệnh hại nghiêm trọng trên cây cà chua. Chúng tôi tiến hành xây dựng phương pháp lây nhiễm nhân tạo *F. solani* trên lá cà chua tách rời nhằm tạo mô hình thử nghiệm thuận lợi cho các nghiên cứu về bệnh hại thực vật. Bào tử nấm *F. solani* thu từ đĩa môi trường Potato Dextrose Agar (PDA) sau khi nuôi cấy ở 28°C trong 7 ngày được sử dụng cho các thí nghiệm. Các yếu tố thử nghiệm bao gồm môi trường pha loãng bào tử nấm, mật độ bào tử nấm, vật liệu lá và thể tích giọt dung dịch lây nhiễm. Quy trình lây nhiễm bao gồm kỹ thuật nhuộm trypan blue cho phép phát hiện mô bị lây nhiễm ở giai đoạn đầu. Kết quả cho thấy quá trình xâm nhiễm của nấm diễn ra thuận lợi khi sử dụng môi trường pha loãng 1/2 PDB với mật độ 10^6 bào tử/ml, thể tích giọt lây nhiễm là 20-30µl, sử dụng lá thứ 4 tính từ ngọn của cây cà chua 6 tuần tuổi. Quy trình được áp dụng hiệu quả trong thí nghiệm lây nhiễm nấm *F. solani* để đánh giá hoạt tính kháng nấm của dịch nuôi vi khuẩn. Quy trình này có thể áp dụng trong các thí nghiệm lây nhiễm nấm *F. solani* ở cây cà chua hoặc tham khảo có điều chỉnh để lây nhiễm trên các cây trồng khác.

Từ khóa: *Fusarium solani*, mô lá tách rời, lây nhiễm nhân tạo.

Development of an Artificial Inoculation Method for *Fusarium solani* on Detached Tomato Leaves

ABSTRACT

Fusarium solani is a serious pathogen of tomato plants, causing severe reductions in yield and fruit quality. In this study, we developed and optimized an artificial inoculation method for *F. solani* on detached tomato leaves to establish a convenient experimental model for studying plant diseases. Spores of *F. solani* obtained from Potato Dextrose Agar (PDA) plates incubated at 28°C for 7 days were used in the experiments. Several factors were assessed for their impact on *F. solani* infection, including the medium for spore suspension, spore concentration, leaf material, and inoculum droplet volume. The inoculation procedure included trypan blue staining, which enabled early detection of infected tissues under microscopy. The optimal conditions for fungal infection were obtained using 1/2 PDB as the dilution medium with a spore concentration of 10^6 spores/ml, a droplet volume of 20-30µl, and the fourth leaf from the top of six-week-old tomato plants. The established method was effectively applied to *F. solani* infection assays for evaluating the antifungal activity of bacterial culture filtrates. This protocol provides a practical tool for *in vivo* inoculation of *F. solani* on tomato plants and can be adapted for other crop species.

Keywords: *Fusarium solani*, detached leaf, artificial inoculation.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cà chua (*Solanum lycopersicum*) là một trong những cây rau màu có giá trị kinh tế cao nhất trên thế giới, với sản lượng toàn cầu hàng năm lên tới 159 triệu tấn (Akbar & cs., 2018). Tuy nhiên, cây cà chua cũng là đối tượng tấn công của hơn 200 loài bệnh hại, đặc biệt là các nấm gây bệnh trong đất như *Fusarium*, *Pseudopyrenochaeta*, *Phytophthora*,

Colletotrichum, *Verticillium* và *Pythium* (Ma & cs., 2023). Trong số đó, nấm *Fusarium solani* là một trong những tác nhân gây bệnh nghiêm trọng có khả năng tấn công cây cà chua ở nhiều giai đoạn sinh trưởng khác nhau khiến cây chết non, thối rễ, thối quả cùng các biểu hiện héo, xoăn hoặc hoại tử trên thân và lá (Coleman, 2016). Với nhiệt độ sinh trưởng tối ưu khoảng 25-30°C, nấm *F. solani* xuất hiện phổ biến ở các vùng trồng trọt tại khu vực nhiệt đới và cận nhiệt đới (Ajmal & cs., 2023). Nấm *F. solani* sản sinh nhiều loại bào tử khác nhau, trong đó các bào tử vô tính bao gồm đại bào tử, tiểu bào tử và bào tử hậu đóng vai trò quan trọng trong khả năng lây nhiễm và phát tán của loài nấm bệnh này (Ajmal & cs., 2023).

Trong nghiên cứu về lĩnh vực bệnh cây, lây nhiễm nhân tạo trên mô lá tách rời là một phương pháp được ứng dụng rộng rãi trong nhiều nội dung nghiên cứu như đánh giá khả năng gây bệnh của các chủng nấm (Kumar & cs., 2011; Akbar & cs., 2018), sàng lọc mức độ kháng nấm của các giống cây trồng (Foolad & cs., 2015), hoặc kiểm tra hoạt tính kháng nấm *in vivo* của dịch nuôi vi khuẩn (Kefi & cs., 2015). Phương pháp lây nhiễm này có thể thực hiện trong không gian nhỏ, cho phép kiểm soát tốt điều kiện thí nghiệm, giảm yêu cầu về thiết bị nghiên cứu và hạn chế sự thất thoát nguồn bệnh ra môi trường (Foolad & cs., 2015). Một số nghiên cứu nhận định rằng phương pháp lây nhiễm trên mô lá tách rời là một công cụ hiệu quả và đáng tin cậy giúp bổ trợ hoặc thay thế cho các thử nghiệm lây nhiễm trên toàn bộ cây trồng (Kumar & cs., 2011; Foolad & cs., 2015). Đáng chú ý, việc lây nhiễm nấm bệnh trên mô lá có thể kết hợp hiệu quả với kỹ thuật nhuộm trypan blue giúp đánh giá về cơ chế gây bệnh và quan sát các diễn biến trong quá trình xâm nhiễm dưới kính hiển vi (Zhang & cs., 2020).

Đối với nấm *F. solani*, số lượng các nghiên cứu thực hiện lây nhiễm trên mô lá cà chua tách rời vẫn còn hạn chế và chưa có công bố nào đề cập đến yếu tố ảnh hưởng của các nhân tố trong quá trình lây nhiễm. Xuất phát từ thực tế đó, chúng tôi tiến hành nghiên cứu về điều kiện ảnh hưởng đến quá trình lây nhiễm nấm *F. solani* trên lá cà chua tách rời. Bên cạnh đó, quy trình áp dụng phương pháp nhuộm hệ sợi nấm bằng trypan blue nhằm cho phép xác định sự xâm nhiễm của nấm ở giai đoạn đầu lây nhiễm. Quy trình đề xuất sẽ là tài liệu tham khảo có giá trị cho các nghiên cứu liên quan đến nấm *F. solani* và cây cà chua cũng như các cây trồng là vật chủ của loài nấm này.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Chủng nấm *F. solani* HT39 phân lập từ đất trồng rau màu, đã được định danh bằng phân tích vùng gen ITS và xác định có hoạt tính xâm nhiễm. Chủng nấm được bảo quản trong môi trường thạch nghiêng PDA ở 4°C tại khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

Cây cà chua 6 tuần tuổi thuộc giống cà chua bán hữu hạn VIP 1 (VA.83) và có khả năng chịu nhiệt (VietAseeds). Cây được trồng trên giá thể bao gồm đất Tribat và xơ dừa (tỷ lệ thể tích 1:1) ở nhiệt độ khoảng 20-28°C.

Chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. VN06 được phân lập từ đất vùng rễ cây cà chua và có khả năng đối kháng với một số nấm gây bệnh. Chủng vi khuẩn được giữ giống trong glycerol 30% ở -20°C tại Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp chuẩn bị dung dịch bào tử nấm

Dịch bào tử nấm *F. solani* được chuẩn bị theo phương pháp của Akbar & cs. (2018) với một số điều chỉnh. Nấm *F. solani* được nuôi cấy trên môi trường Potato Dextrose Agar (PDA) ở 28°C, trong 7 ngày. Sau đó, bào tử nấm được thu bằng cách bổ sung 15ml nước cất khử trùng vào đĩa nuôi cấy, gạt nhẹ bề mặt tản nấm bằng que cấy thủy tinh vô trùng. Dịch bào tử được hút và lọc qua hai lớp vải mỏng để loại bỏ hệ sợi nấm. Tiếp đến, dịch lọc chứa bào tử được chuyển vào các ống eppendorf, ly tâm 6.500 vòng/phút trong 10 phút ở 20°C. Sau đó dịch nổi phía trên được loại bỏ, phần cặn chứa bào tử nấm được

hòa vào 1ml nước cất vô trùng. Ống mẫu được tiến hành ly tâm lần 2 ở cùng điều kiện. Cuối cùng, cặn bào tử nấm *F. solani* được tái huyền phù trong các môi trường dinh dưỡng tương ứng ở từng thí nghiệm cụ thể. Mật độ bào tử nấm được xác định bằng cách sử dụng buồng đếm hồng cầu.

2.2.2. Phương pháp nhuộm mô lá sau lây nhiễm bằng chất nhuộm trypan blue

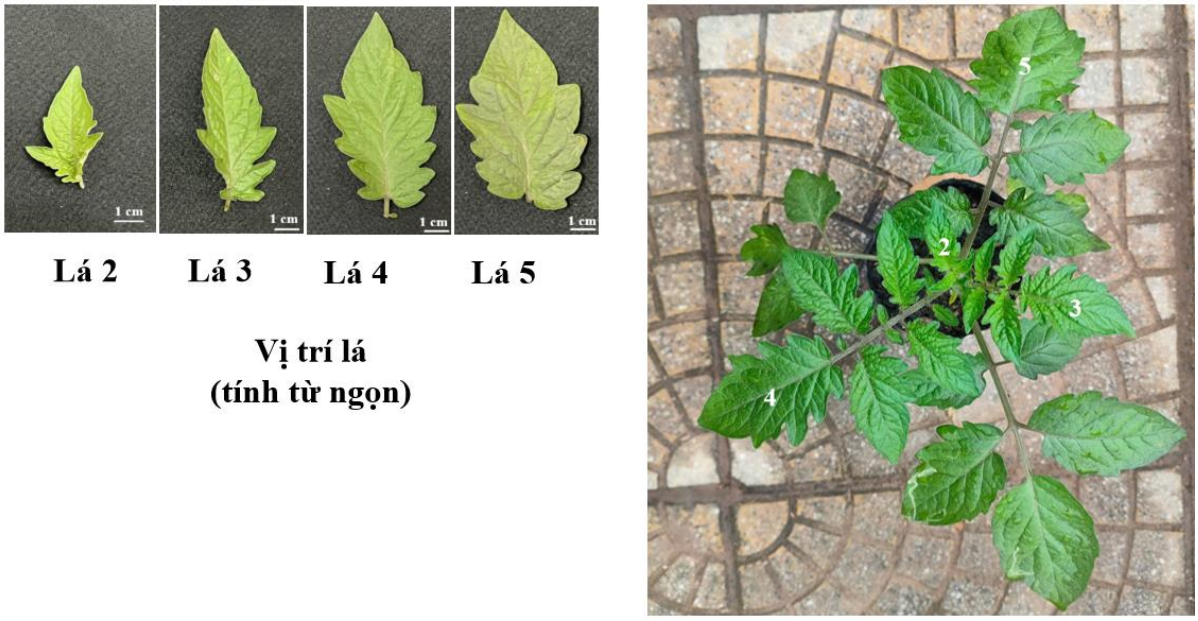
Mô lá được nhuộm trypan blue theo phương pháp của Fernández-Bautista & cs. (2016). Dung dịch thuốc nhuộm trypan blue (Bomei, Trung Quốc) bao gồm các thành phần với tỷ lệ như sau: 10ml axit lactic, 10ml phenol, 10ml glycerol, 10ml nước cất và 40mg trypan blue. Mẫu lá sau lây nhiễm được ngâm trong dung dịch thuốc nhuộm trong 45 phút. Để loại bỏ chất diệp lục, mô lá được tiếp tục ngâm trong cồn 98°. Các mẫu lá được bảo quản trong cồn 90° và ngâm vào dung dịch glycerol 60% trước khi quan sát bằng kính hiển vi.

2.2.3. Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng pha loãng bào tử và thời gian lây nhiễm đến khả năng xâm nhiễm của nấm F. solani trên lá cà chua tách rời

Bào tử nấm được pha loãng trong môi trường Potato Dextrose Broth (PDB) ở các nồng độ khác nhau, bao gồm 1/16 PDB, 1/8 PDB, 1/4 PDB, 1/2 PDB và 100% PDB. Ở công thức đối chứng không bổ sung dinh dưỡng, bào tử nấm được pha loãng trong nước cất. Mật độ bào tử nấm trong các dung dịch lây nhiễm là 10^6 bào tử nấm/ml. Thí nghiệm sử dụng lá cà chua ở vị trí thứ 4 tính từ ngọn xuống ở cây cà chua 6 tuần tuổi. Lá được đặt trong hộp lót giấy ẩm và lây nhiễm bởi các giọt dung dịch bào tử nấm có thể tích 20µl. Sau 1-3 ngày lây nhiễm, các mẫu lá được đánh giá vết bệnh bằng mắt thường và nhuộm trypan blue để quan sát sớm các dấu hiệu xâm nhiễm dưới kính hiển vi.

2.2.4. Ảnh hưởng của mật độ bào tử nấm đến khả năng xâm nhiễm của nấm F. solani trên lá cà chua tách rời

Nghiên cứu được tiến hành với các mật độ 10^4, 10^5, 10^6 và 10^7 bào tử nấm/ml trong dung dịch 1/2 PDB. Sau 3 ngày lây nhiễm, mô lá được quan sát bằng mắt thường, sau đó nhuộm trypan blue và phân tích dưới kính hiển vi nhằm đánh giá khả năng xâm nhiễm của nấm. Từ thí nghiệm này trở đi, quy trình quan sát và đánh giá mô lá nêu trên được áp dụng thống nhất ở tất cả các thí nghiệm trong nghiên cứu.



Hình 1. Hình thái mô lá và vị trí lá lây nhiễm ở cây cà chua 6 tuần tuổi

2.2.5. Xác định mô lá phù hợp cho quá trình lây nhiễm nhân tạo nấm F. solani ở cây cà chua

Các vị trí lá được sử dụng cho thí nghiệm là lá đỉnh của các lá thứ 2-5 tính từ ngọn ở cây cà chua 6 tuần tuổi (Hình 1). Dung dịch bào tử nấm mật độ 10^6 bào tử/ml được tái huyền phù trong môi trường 1/2 PDB.

2.2.6. Ảnh hưởng của thể tích giọt bào tử nấm F. solani đến sự xâm nhiễm của nấm trên lá cà chua

Các mức thể tích khác nhau của giọt dung dịch lây nhiễm được khảo sát bao gồm: 10µl, 20µl, 30µl và 40µl. Thí nghiệm được thực hiện trên mô lá cà chua thứ 4 tính từ ngọn xuống, dung dịch bào tử nấm lây nhiễm có mật độ 10^6 bào tử/ml trong môi trường 1/2 PDB.

2.2.7. Xác định hoạt tính kháng nấm F. solani của dịch ngoại bào vi khuẩn

Vi khuẩn *Bacillus* sp. được nuôi lắc 180 vòng/phút trong môi trường PDB ở 30°C trong 3 ngày. Dịch vi khuẩn được ly tâm ở điều kiện 10.000 vòng/phút trong 10 phút ở 10°C để loại bỏ cặn tế bào. Dung dịch tiếp tục được lọc qua màng Syringe Filter (0,22µm) nhằm loại bỏ hoàn toàn tế bào vi khuẩn, từ đó thu được dịch ngoại bào. Công thức đối chứng được bố trí với dịch bào tử lây nhiễm có mật độ 10^6 bào tử/ml trong môi trường 1/2 PDB. Công thức thí nghiệm được bố trí với mật độ bào tử tương tự trong môi trường 1/2 PDB cùng dịch ngoại bào vi khuẩn. Trên mỗi lá cà chua, hai giọt dung dịch lây nhiễm tương ứng với hai công thức (đối chứng và thí nghiệm) được nhỏ tại các vị trí đối xứng với nhau qua gân lá.

2.2.8. Bố trí thí nghiệm và xử lý dữ liệu

Mỗi công thức thí nghiệm được thực hiện trên 21 mẫu lá. Các mẫu lá được đặt trong hộp nhựa kích thước 41 × 26 × 17cm, ở nhiệt độ 25-30°C, phân bổ theo phương pháp khối ngẫu nhiên hoàn chỉnh. Diện tích vết bệnh (mm^2) được đo trên vùng hệ sợi nấm bắt màu nhuộm trypan blue bằng phần mềm ImageJ, dựa trên hình ảnh chụp dưới kính hiển vi Olympus SZ51. Số liệu được xử lý thống kê bởi phần mềm GraphPad Prism 10.3.0.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng pha loãng bào tử và thời gian lây nhiễm đến khả năng xâm nhiễm của nấm *F. solani* trên lá cà chua tách rời

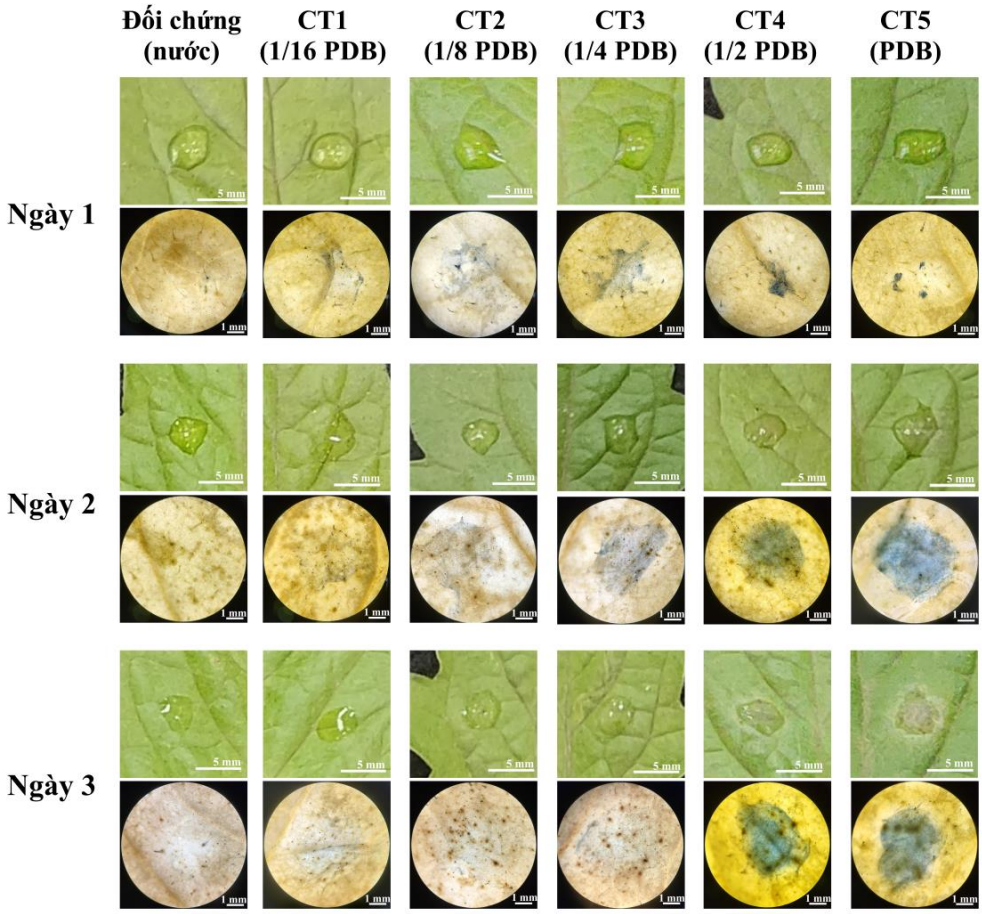
Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng đến sự xâm nhiễm của nấm *F. solani* trên mô lá cà chua được thể hiện ở hình 2 và bảng 1. Sau 2 ngày lây nhiễm, vị trí lây nhiễm ở tất cả các công thức không có biểu hiện lây nhiễm. Đến ngày thứ 3, không có sự khác biệt rõ ràng giữa đối chứng và các công thức 1-3 (Hình 2). Trong khi đó, ở công thức 4 và 5, giọt dung dịch lây nhiễm trở nên đục hơn, đồng thời xuất hiện đường viền trắng bao quanh, cho thấy bào tử *F. solani* nảy mầm và sinh trưởng tốt tại các vị trí lây nhiễm. Tuy nhiên, vết bệnh chưa rõ ràng và khó xác định mức độ xâm nhiễm.

Ở các mô lá được nhuộm trypan blue, chất nhuộm sẽ đổi màu bào tử và hệ sợi của nấm với màu xanh đặc trưng. Ở công thức đối chứng, vết bệnh có diện tích rất nhỏ, mờ nhạt, khó quan sát ngay cả ở độ phóng đại 30 lần và không ghi nhận được các dấu hiệu tổn thương trên mô lá (Bảng 1, Hình 2). Ở tất cả các công thức còn lại với sự bổ sung của môi trường dinh dưỡng, nấm *F. solani* đều thể hiện sự xâm nhiễm rõ ràng hơn so với đối chứng (Bảng 1, Hình 2). Quan sát mô lá dưới kính hiển vi còn ghi nhận các vết đốm nâu sậm màu là mô lá bị tổn thương, được kích hoạt quá trình chết của phản ứng tế bào thực vật (Zhang & cs., 2020) (Hình 2). Sự chuyển màu nâu sậm của vùng tế bào này được cho là do sự tích lũy của các sản phẩm miễn dịch thực vật, như các hợp chất ROS, giúp mô lá chống lại tác nhân gây bệnh (You & cs., 2023). Sự xuất hiện của các đốm nâu là bằng chứng cho thấy nấm bệnh đã xâm nhiễm vào bên trong mô lá cà chua và kích hoạt phản ứng miễn dịch thực vật. Các đốm nâu xuất hiện ở tất cả các công thức có bổ sung dinh dưỡng và tăng mật độ khi nấm phát triển mạnh (Hình 2). Điều này cho thấy bào tử nấm *F. solani* chỉ có thể nảy

mầm và xâm nhiễm thuận lợi trong môi trường có chứa dinh dưỡng.

Diện tích vết bệnh tăng dần theo thời gian, đồng thời màu nhuộm cũng trở nên rõ nét hơn (Bảng 1, Hình 2). Đến ngày thứ 3, vết bệnh ở công thức 4 (1/2 PDB) và công thức 5 (PDB) có màu xanh đậm rõ rệt hơn so với các công thức khác (Hình 2), cho thấy mật độ sợi nấm dày đặc hơn tại vị trí lây nhiễm của hai công thức này. Kết quả cũng cho thấy công thức 4 và 5 có diện tích vết bệnh lớn hơn so với các công thức còn lại, với giá trị trung bình lần lượt là 17,80 ± 4,44mm^2 và 18,01 ± 4,52mm^2 (Bảng 1).

Dựa vào các phân tích nêu trên, môi trường 1/2 PDB (công thức 4) và PDB (công thức 5) được xác định là phù hợp để pha loãng bào tử nấm *F. solani*. Trong môi trường giàu dinh dưỡng như PDB, tốc độ lây nhiễm được đẩy nhanh có thể gây khó khăn trong việc phân biệt mức độ mẫn cảm của các cây vật chủ hoặc mức độ gây bệnh của các chủng nấm (You & cs., 2023). Trong khi đó, các môi trường giảm dinh dưỡng, như 1/2 PDB, được đánh giá là phù hợp hơn cho thí nghiệm lây nhiễm nhân tạo do vừa thúc đẩy quá trình sản sinh bào tử nấm, vừa duy trì được tốc độ lây nhiễm phù hợp (You & cs., 2023; Ajmal & cs., 2022). Bên cạnh đó, chúng tôi cũng nhận thấy môi trường 1/2 PDB (tỷ lệ thể tích 1 PDB : 1 nước cất) thuận lợi để sử dụng trong các thí nghiệm về khả năng kháng nấm của các loại dung dịch, khi dễ dàng thay thế thể tích nước cất bằng dung dịch cần đánh giá. Do vậy, chúng tôi lựa chọn 1/2 PDB là điều kiện tối ưu để pha loãng dịch bào tử nấm *F. solani*. Bên cạnh đó, thời điểm phù hợp và cho kết quả ổn định để đánh giá hiệu quả lây nhiễm là sau 3 ngày lây nhiễm. Việc nhuộm trypan blue mô lá giúp đánh giá mức độ xâm nhiễm chính xác hơn.

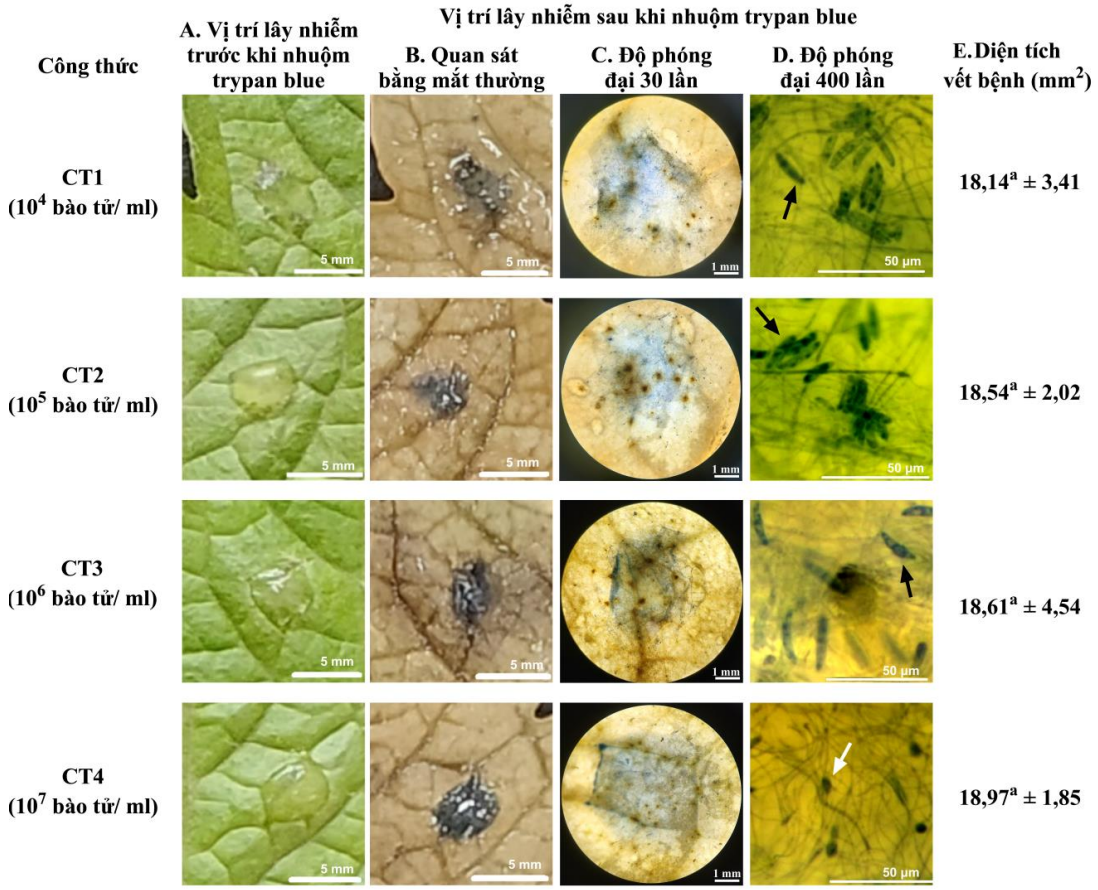


Hình 2. Hình thái vết bệnh sau lây nhiễm nấm *F. solani* ở các công thức môi trường dinh dưỡng khác nhau trước và sau khi nhuộm trypan blue

Bảng 1. Tác động của môi trường dinh dưỡng đến diện tích vết bệnh do nấm *F. solani* ở trên mô lá cà chua tách rời

Công thức	Diện tích vết bệnh sau lây nhiễm (mm^2)		
	1 ngày	2 ngày	3 ngày
Đối chứng (nước)	$0,39^c \pm 0,41$	$0,87^c \pm 1,69$	$2,16^c \pm 2,38$
CT1 (1/16 PDB)	$6,97^b \pm 3,15$	$6,83^b \pm 2,34$	$8,96^b \pm 3,51$
CT2 (1/8 PDB)	$10,74^a \pm 2,82$	$9,41^{ab} \pm 4,42$	$14,55^a \pm 4,73$
CT3 (1/4 PDB)	$8,45^b \pm 1,94$	$13,20^a \pm 1,76$	$14,53^a \pm 3,92$
CT4 (1/2 PDB)	$1,37^c \pm 1,70$	$6,80^b \pm 5,85$	$17,80^a \pm 4,44$
CT5 (PDB)	$0,63^c \pm 0,42$	$13,16^a \pm 8,13$	$18,01^a \pm 4,52$

Ghi chú: Những chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các công thức trong cùng 1 cột.

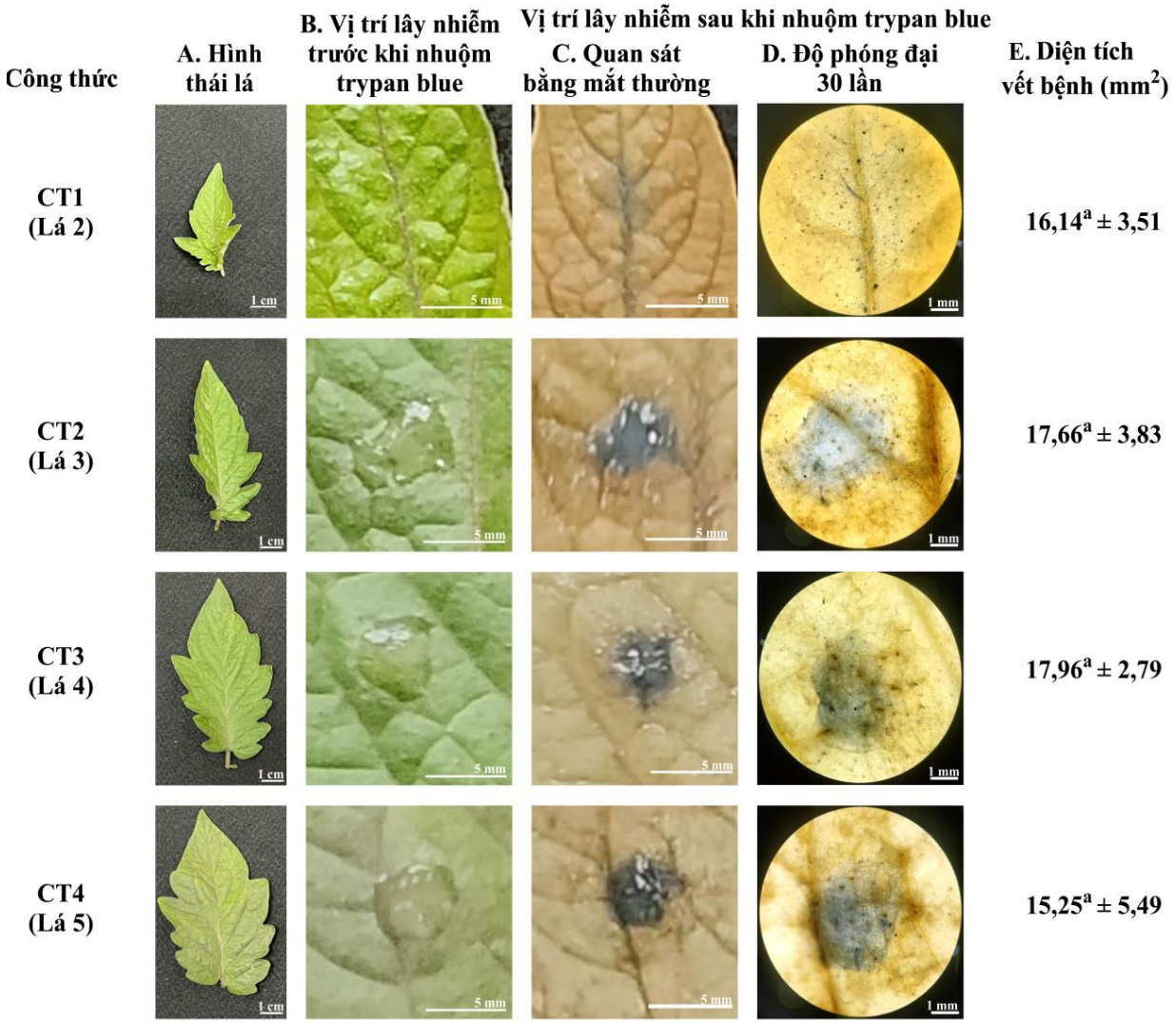


Hình 3. Mô lá cà chua lây nhiễm nấm *F. solani* với các mật độ bào tử nấm khác nhau
(Mũi tên đen: đại bào tử, mũi tên trắng: tiểu bào tử)

3.2. Ảnh hưởng của mật độ bào tử nấm *F. solani* đến khả năng xâm nhiễm trên lá cà chua tách rời

Kết quả lây nhiễm của nấm *F. solani* với các mật độ bào tử khác nhau được thể hiện tại hình 3. Sau 3 ngày, các dấu hiệu xâm nhiễm của nấm *F. solani* trên lá cà chua tách rời không có sự khác biệt rõ rệt giữa các công thức, đều chưa quan sát được vết bệnh bằng mắt thường (Hình

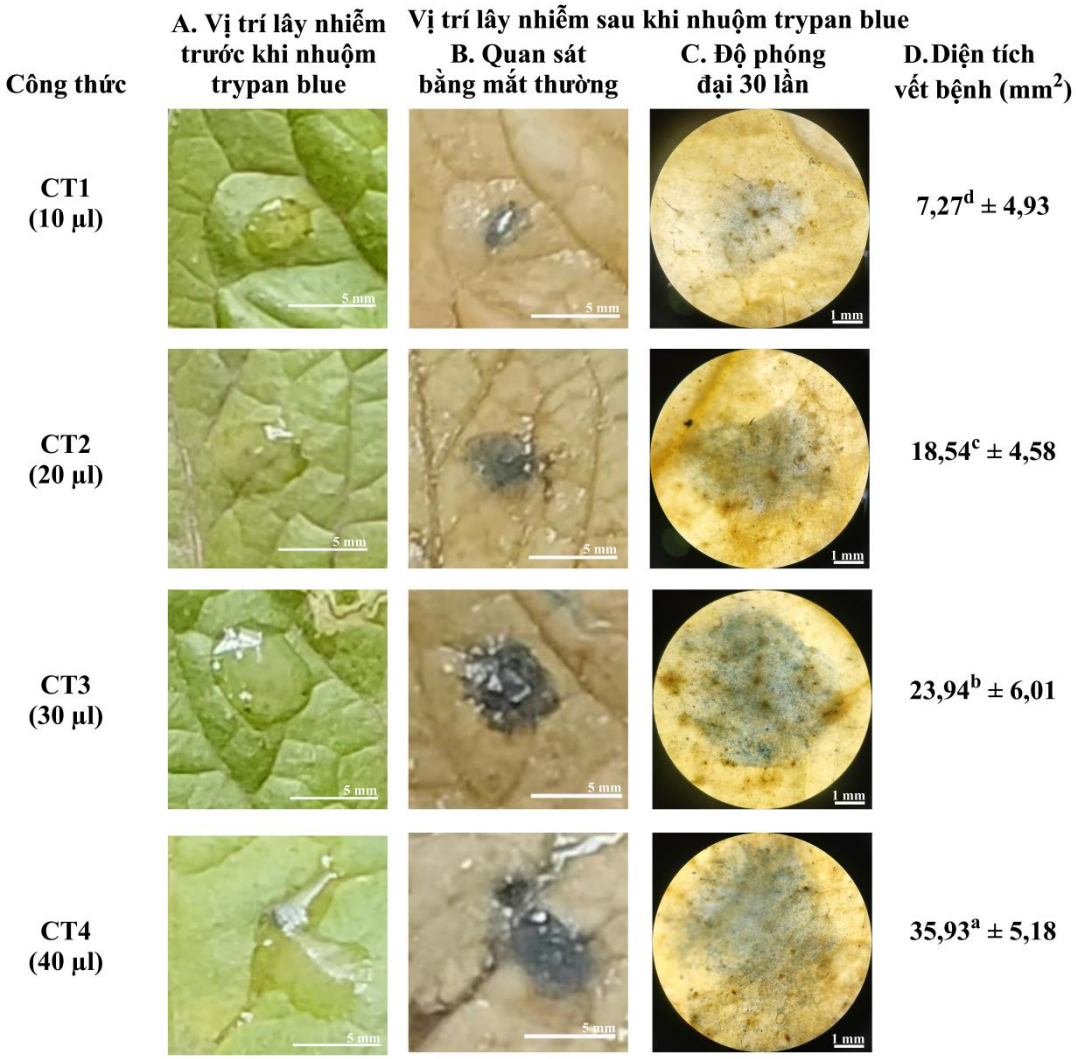
3A). Sau khi nhuộm trypan blue, các công thức đều ghi nhận sự xuất hiện của tản nấm tròn đều, rõ nét tại vị trí lây nhiễm và không có sự khác biệt đáng kể về diện tích vết bệnh (Hình 3B-3C, 3E). Tuy nhiên, thí nghiệm cũng ghi nhận sự khác biệt đáng lưu ý về hình dạng bào tử nấm *F. solani* giữa công thức 4 với các công thức còn lại. Ở công thức 4 (10^7 bào tử/ml), phần lớn bào tử nấm *F. solani* có kích thước nhỏ, ít hoặc không chia vách ngăn, hình dạng tròn hoặc elip (Hình 3D). Trong khi đó, ở các công thức còn lại, phần lớn bào tử nấm có kích thước lớn hơn, phân thành nhiều vách ngăn và có hình lưỡi liềm đặc trưng, giúp dễ dàng nhận diện khi quan sát dưới kính hiển vi (Hình 3D). Như vậy, kết quả cho thấy dung dịch bào tử nấm *F. solani* ở các mật độ từ 10^4 đến 10^7 bào tử/ml đều có khả năng xâm nhiễm hiệu quả trên lá cà chua tách rời. Tuy nhiên, các mật độ 10^4 đến 10^6 bào tử/ml được cho là phù hợp hơn do tạo điều kiện hình thành được các bào tử nấm *F. solani* có kích thước lớn và hình dạng đặc trưng, thuận lợi cho việc quan sát và phân tích. Trong nghiên cứu về khả năng gây bệnh của nấm *Fusarium* (gồm 2 chủng *F. solani*) trên lá cà chua tách rời, Akbar & cs. (2018) đã tiến hành lây nhiễm với mật độ bào tử nấm 10^6 bào tử/ml. Dựa trên kết quả thực nghiệm và tham khảo phương pháp nghiên cứu của Akbar & cs. (2018), chúng tôi lựa chọn mật độ 10^6 bào tử nấm/ml là điều kiện tối ưu để xây dựng quy trình lây nhiễm nấm *F. solani* trên lá cà chua tách rời.



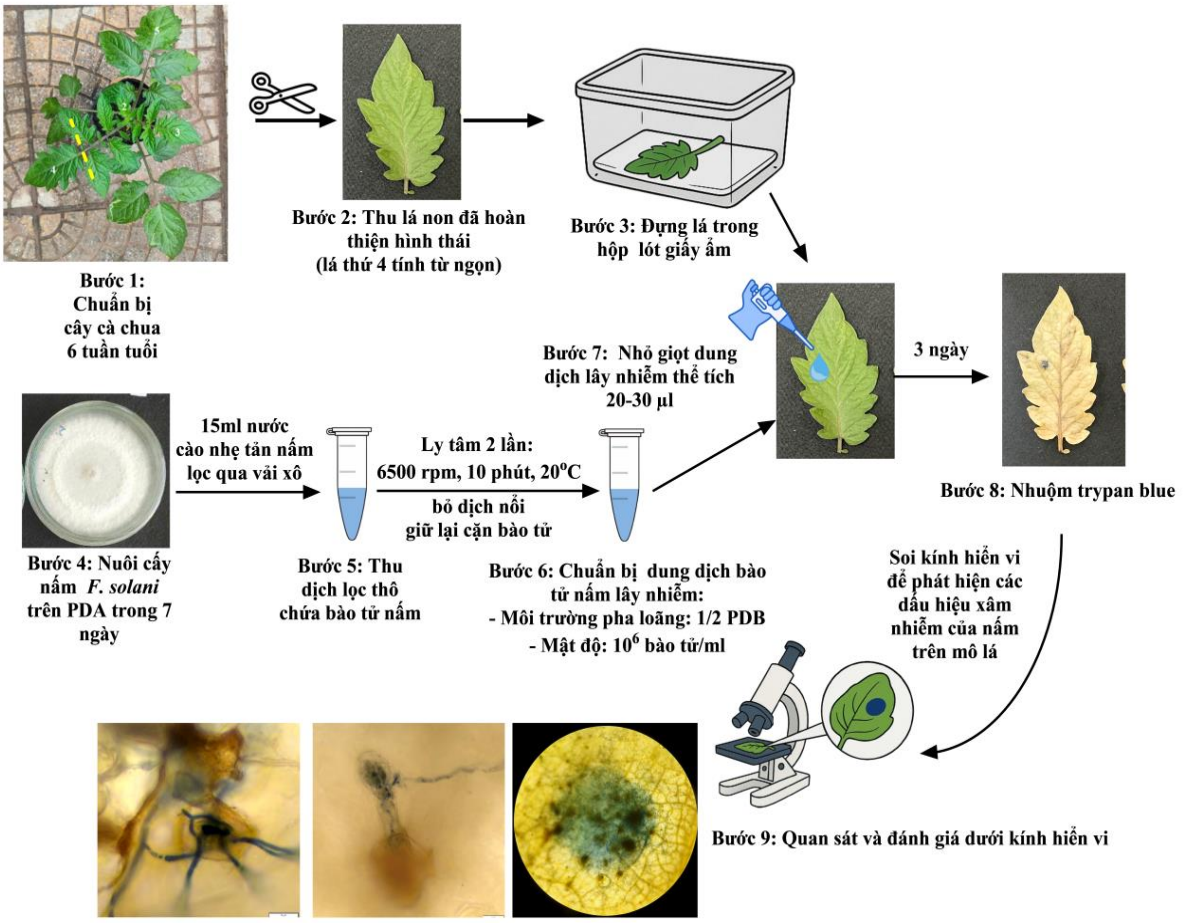
Hình 4. Mô lá cà chua lây nhiễm nấm *F. solani* ở các vị trí lá khác nhau

3.3. Ảnh hưởng của các mô lá cà chua khác nhau đến khả năng xâm nhiễm của nấm *F. solani*

Đặc điểm sinh lý và hình dạng của mẫu lá có khả năng ảnh hưởng lớn đến quá trình thao tác thí nghiệm và kết quả lây nhiễm. Kết quả cho thấy không có sự khác biệt về diện tích vết bệnh khi tiến hành lây nhiễm ở các vị trí lá khác nhau (Hình 4E). Tuy nhiên, lá thứ 2 với đặc điểm phiến lá nhỏ và kém bằng phẳng đã khiến giọt dung dịch lây nhiễm bị chảy loang (Hình 4A-4B). Vết nhiễm tại vị trí lá thứ 2 cũng bắt màu thuốc nhuộm kém do mật độ sợi nấm thấp (Hình 4C-4D). Ở các công thức còn lại, các vết nhiễm đều có hình dạng tròn đều, bắt màu nhuộm trypan blue rõ ràng và không có sự khác biệt đáng kể về đặc điểm vết bệnh giữa các công thức này (Hình 4B-4D). Lá thứ 4 được lựa chọn làm vật liệu phù hợp cho thí nghiệm này do có kích thước lớn, phiến lá rộng và bằng phẳng hơn so với lá thứ 3 (Hình 4A), giúp dễ dàng thao tác khi nhỏ dung dịch lây nhiễm; đồng thời có độ tuổi sinh lý non hơn so với lá thứ 5, tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình xâm nhiễm của nấm. Kết quả này tương tự với nghiên cứu của Trần Ngọc Hùng & cs. (2020) khi lây nhiễm nấm gây bệnh sương mai ở cây cà chua cũng cho thấy lá thật thứ 4 là vật liệu phù hợp.



Hình 5. Mô lá cà chua lây nhiễm nấm *F. solani* với các giọt dung dịch có thể tích khác nhau



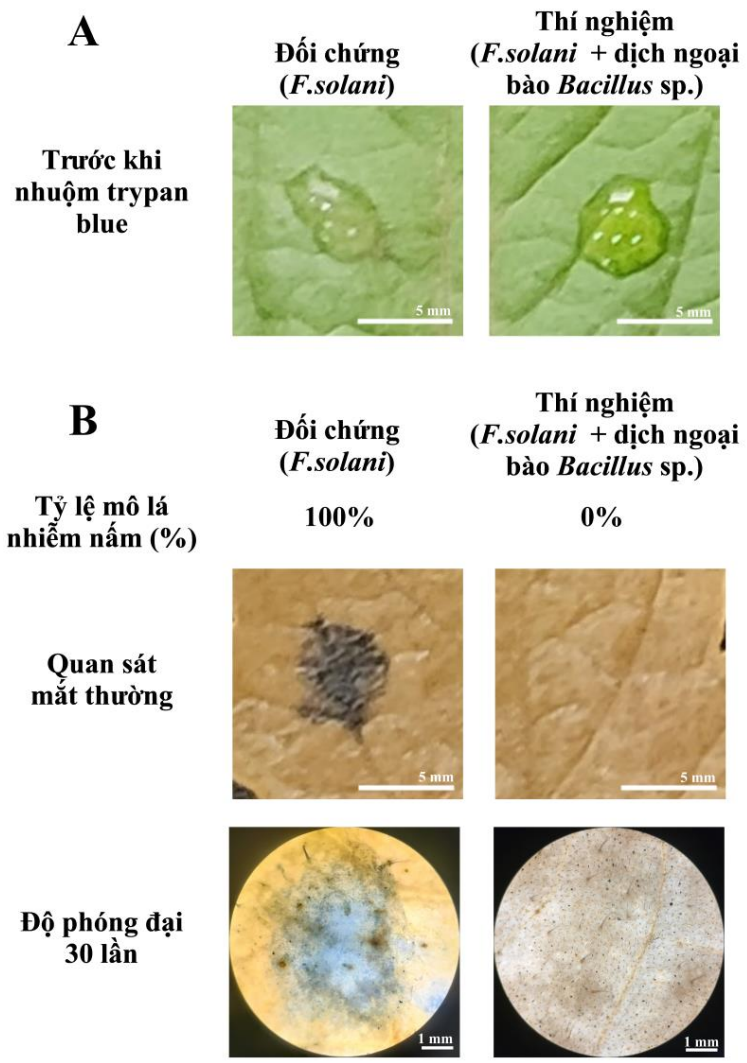
Hình 6. Minh họa quy trình lây nhiễm nấm *F. solani* trên lá cà chua tách rời

3.4. Ảnh hưởng của thể tích giọt bào tử lây nhiễm đến sự xâm nhiễm nấm *F. solani*

Kết quả tại hình 5 cho thấy các giọt dung dịch bào tử nấm ở cả 4 công thức đều có độ bám tốt trên bề mặt lá. Sau 3 ngày, giọt dung dịch lây nhiễm ở công thức 4 (40µl) dễ bị vỡ và loang theo gân lá nên không phù hợp để áp dụng trong thí nghiệm lây nhiễm nhân tạo (Hình 5A). Các công thức còn lại đều cho vết nhiễm hình tròn và phát triển đều các hướng (Hình 5A-5C). Vết bệnh ở công thức 1 (10µl) có diện tích nhỏ nhất và có màu xanh mờ (Hình 5B-5D). Trong khi đó, công thức 2 và 3 (20-30µl) cho các vết bệnh diện tích lớn hơn giúp dễ dàng quan sát, đồng thời đảm bảo tản nấm xâm nhiễm bắt màu xanh rõ rệt (Hình 5B-5D). Do vậy, chúng tôi kết luận rằng với mật độ bào tử nấm lây nhiễm là 10^6 bào tử/ml trong môi trường 1/2 PDB thì thể tích lây nhiễm phù hợp là 20-30µl.

3.5. Quy trình lây nhiễm nấm *F. solani* trên lá cà chua tách rời

Từ các kết quả như trên, chúng tôi đề xuất quy trình lây nhiễm nấm *F. solani* trên lá cà chua tách rời với 9 bước thể hiện trong hình 6. Quy trình lây nhiễm này về cơ bản tương đồng với phương pháp lây nhiễm nhân tạo nấm *Fusarium* trên lá tách rời được thực hiện trong nghiên cứu của Akbar & cs. (2018) nhưng có một số điều chỉnh quan trọng. Khác với Akbar & cs. (2018), chúng tôi không tạo vết thương nhân tạo trên bề mặt lá. Sự khác biệt này làm giảm tốc độ phát triển của vết bệnh, nhưng đồng thời cho phép nấm thể hiện khả năng xâm nhiễm tự nhiên trên mô lá. Một điểm khác biệt đáng chú ý khác nằm ở phương pháp đánh giá hiệu quả lây nhiễm.



Hình 7. Khả năng ức chế nấm *F. solani* của dịch nuôi vi khuẩn *Bacillus* sp. trên mô lá cà chua

Nghiên cứu của Akbar & cs. (2018) sử dụng kích thước vết bệnh sau 7 ngày lây nhiễm làm chỉ số đánh giá. Đây là phương pháp phổ biến, đã được áp dụng rộng rãi trong nhiều nghiên cứu trước đó (Akbar & cs., 2018; Kumar & cs., 2011) với ưu điểm là kết quả trực quan và dễ quan sát bằng mắt thường. Trong nghiên cứu này, chúng tôi kết hợp với kỹ thuật nhuộm trypan blue và rút ngắn thời gian theo dõi còn 3 ngày. Cách tiếp cận này giúp quy trình có thể đánh giá được mức độ xâm nhiễm tự nhiên của nấm trên mô lá trong thời gian ngắn, khi mà vết bệnh còn chưa quan sát được bằng mắt thường. Quy trình này có thể được sử dụng để kiểm tra tính kháng nấm của dung dịch tiềm năng, hoặc đóng vai trò như bước sàng lọc ban đầu nhằm xác định khả năng xâm nhập của nấm vào mô lá.

3.6. Thử nghiệm quy trình lây nhiễm nấm *F. solani* để đánh giá hoạt tính kháng nấm của dịch nuôi vi khuẩn

Áp dụng quy trình được xây dựng, chúng tôi tiến hành đánh giá hoạt tính kháng nấm *F. solani* của dịch nuôi chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. tiềm năng thông qua thí nghiệm lây nhiễm trên lá cà chua tách rời. Sau 3 ngày lây nhiễm, các công thức đều chưa quan sát được vết bệnh bằng mắt thường (Hình 7A). Kết quả sau khi nhuộm trypan blue cho thấy có sự khác biệt rõ

rệt về mức độ xâm nhiễm của nấm bệnh giữa các công thức (Hình 7B). Ở công thức đối chứng, quan sát thấy tản nấm cũng như ghi nhận được các dấu hiệu xâm nhiễm trên 100% mô lá. Trong khi đó, ở công thức bổ sung dịch ngoại bào vi khuẩn, không quan sát thấy sự xuất hiện tản nấm tại vị trí lây nhiễm. Điều này cho thấy dịch nuôi vi khuẩn *Bacillus* sp. có khả năng ức chế sự nảy mầm của bào tử nấm, từ đó ngăn chặn sự xâm nhiễm của nấm *F. solani* trên mô lá cà chua một cách hiệu quả.. Thông qua thí nghiệm này, có thể thấy đây là một quy trình lây nhiễm phù hợp để đánh giá hoạt tính của dung dịch kháng nấm. Việc sử dụng môi trường 1/2 PDB để pha loãng bào tử nấm *F. solani* không chỉ đảm bảo hiệu quả xâm nhiễm mà còn thuận lợi cho việc phối hợp với các loại dung dịch có tiềm năng kháng nấm cần đánh giá.

4. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã thử nghiệm một số yếu tố có ảnh hưởng đến hiệu quả lây nhiễm nhân tạo của nấm *F. solani*, từ đó góp phần hoàn thiện quy trình lây nhiễm nhân tạo nấm *F. solani* trên lá cà chua tách rời. Kết hợp với kỹ thuật nhuộm trypan blue, quy trình lây nhiễm này cho phép phát hiện sớm các dấu hiệu xâm nhiễm của nấm trên mô lá cà chua ngay từ ngày thứ 3 sau khi lây nhiễm, khi các vết bệnh vẫn chưa biểu hiện rõ rệt dưới quan sát bằng mắt thường. Quy trình này hiệu quả để kiểm tra hoạt tính kháng nấm của các loại dung dịch và cũng có thể áp dụng như một bước sàng lọc ban đầu nhằm đánh giá khả năng xâm nhiễm của các chủng *F. solani* hoặc tính mẫn cảm của các giống cà chua. Ngoài ra, quy trình này có thể được tham khảo và điều chỉnh cho thí nghiệm lây nhiễm nhân tạo nấm bệnh trên mô lá tách rời ở các loại cây trồng khác.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Ajmal M., Hussain A., Ali A., Chen H. & Lin H. (2022). Strategies for Controlling the Sporulation in *Fusarium* spp. Journal of Fungi. 9(1): 10.

Akbar A., Hussain S., Ullah K., Fahim M. & Ali G.S. (2018). Detection, virulence and genetic diversity of *Fusarium* species infecting tomato in Northern Pakistan. Plos one. 13(9): e0203613.

Coleman J.J. (2016). The *Fusarium solani* species complex: ubiquitous pathogens of agricultural importance. Molecular plant pathology. 17(2): 146-158.

Fernández-Bautista N., Domínguez-Núñez J.A., Moreno M.M.C. & Berrocal-Lobo M. (2016). Plant tisssue trypan blue staining during phytopathogen infection. Bio-protocol. 6(24): e2078-e2078.

Foolad M.R., Sullenberger M.T. & Ashrafi H. (2015). Detached-leaflet evaluation of tomato germplasm for late blight resistance and its correspondence to field and greenhouse screenings. Plant disease. 99(5): 718-722.

Kefi A., Slimene I.B., Karkouch I., Rihouey C., Azaeiz S., Bejaoui M., Belaid R., Cosette P., Jouenne T. & Limam F. (2015). Characterization of endophytic *Bacillus* strains from tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) displaying antifungal activity against *Botrytis cinerea* Pers. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 31(12): 1967-1976.

Kumar K., Xi K., TurkingtonT. K., Tekauz A., Helm J.H. & Tewari J.P. (2011). Evaluation of a detached leaf assay to measure *Fusarium* head blight resistance components in barley. Canadian Journal of Plant Pathology. 33(3): 364-374.

Ma M., Taylor P.W., Chen D., Vaghefi N. & He J.Z. (2023). Major soilborne pathogens of field processing tomatoes and management strategies. Microorganisms. 11(2): 263.

Trần Ngọc Hùng, Đặng Thị Mai & Phạm Thị Xuân (2020). Ứng dụng chỉ thị phân tử trong lai tạo giống cà chua (*Solanum lycopersicum*) chống chịu bệnh sương mai (*Phytophthora infestans*) và một số bệnh hại khác. Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam. 9 (118).

You Y., Astudillo-Estévez I., Essenstam B., Qin S. & van Kan J.A. (2023). Leaf resistance to *Botrytis cinerea* in wild tomato *Solanum habrochaites* depends on inoculum composition. Frontiers in Plant Science. 14: 1156804.

Zhang D., Bao Y., Sun Y., Yang H., Zhao T., Li H., Du C., Jiang J., Li J., Xie L. & Xu X. (2020). Comparative transcriptome analysis reveals the response mechanism of Cf-16-mediated resistance to *Cladosporium fulvum* infection in tomato. BMC plant biology. 20(1): 33.