



CỘNG HOÀ XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM

QCVN 01 - 159 : 2014/BNNPTNT

**QUY CHUẨN KỸ THUẬT QUỐC GIA
VỀ QUY TRÌNH GIÁM ĐỊNH BỆNH PHẤN ĐEN LÚA MỖ
Tilletia indica Mitra LÀ DỊCH HẠI KIỂM DỊCH THỰC VẬT
CỦA VIỆT NAM**

*National technical regulation on Procedure for identification
of Karnal bunt of wheat (*Tilletia indica* Mitra) - Plant quarantine pest
of Vietnam*

HÀ NỘI - 2014

Lời nói đầu

QCVN 01 - 159 : 2014/BNNPTNT do Trung tâm Giám định Kiểm định Thực vật biên soạn, Cục Bảo vệ thực vật trường trình duyệt, Bộ Nông nghiệp & PTNT ban hành tại Thông tư số 16/2014/TT-BNNPTNT ngày 05 tháng 6 năm 2014.



**QUY CHUẨN KỸ THUẬT QUỐC GIA
VỀ QUY TRÌNH GIÁM ĐỊNH BỆNH PHẤN ĐEN LÚA MỠ
Tilletia indica Mitra LÀ DỊCH HẠI KIỂM DỊCH THỰC VẬT
CỦA VIỆT NAM**

*National technical regulation on Procedure for identification
of Karnal bunt of wheat (*Tilletia indica* Mitra) -
Plant quarantine pest of Vietnam*

I. QUY ĐỊNH CHUNG

1.1. Phạm vi điều chỉnh

Quy chuẩn này quy định quy trình giám định bệnh phấn đen lúa mỳ *Tilletia indica* Mitra - là dịch hại kiểm dịch thực vật nhóm I của Việt Nam

1.2. Đối tượng áp dụng

Quy chuẩn này áp dụng đối với các tổ chức, cá nhân Việt Nam hoặc nước ngoài có hoạt động liên quan đến lĩnh vực bảo vệ và kiểm dịch thực vật thực hiện giám định bệnh phấn đen lúa mỳ *Tilletia indica* Mitra - là dịch hại kiểm dịch thực vật (KDTV) nhóm I thuộc Danh mục dịch hại KDTV của Việt Nam.

1.3. Giải thích từ ngữ

Trong quy chuẩn này, các từ ngữ dưới đây được hiểu như sau:

1.3.1. Dịch hại kiểm dịch thực vật (plant quarantine pest):

Là loài dịch hại có nguy cơ gây hại nghiêm trọng tài nguyên thực vật trong một vùng mà ở đó loài sinh vật này chưa xuất hiện hoặc xuất hiện có phân bố hẹp và phải được kiểm soát chính thức.

1.3.2. Thực vật (plant):

Là cây và những bộ phận của cây còn sống, kể cả hạt giống và sinh chất có khả năng làm giống.

1.3.3. Mẫu (sample):

Là khối lượng thực vật, sản phẩm thực vật hoặc tàn dư của sản phẩm thực vật được lấy ra theo một qui tắc nhất định.

1.3.8. Tiêu bản (specimen):

Là mẫu vật điển hình tiêu biểu của dịch hại được xử lý để dùng cho việc định loại, nghiên cứu, giảng dạy, phổ biến kỹ thuật và trưng bày thành các bộ sưu tập.

1.3.9. Phản ứng chuỗi trùng hợp hoặc phản ứng khuếch đại gen (Polymerase Chain Reaction - PCR):

Là kỹ thuật phổ biến trong sinh học phân tử nhằm khuếch đại (tạo ra nhiều bản sao) một đoạn DNA mà không cần sử dụng các sinh vật sống.

II. QUY ĐỊNH KỸ THUẬT

2.1. Phương pháp thu thập và bảo quản mẫu

2.1.1. Thu thập mẫu

Đối với hàng xuất, nhập khẩu, quá cảnh hoặc vận chuyển, bảo quản trong nước: Tiến hành lấy mẫu theo tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 4731:89¹ "Kiểm dịch thực vật - phương pháp lấy mẫu", quy chuẩn kỹ thuật quốc gia QCVN 01-23:2010/BNNPTNT¹ "Phương pháp kiểm tra các loại hạt xuất, nhập khẩu và quá cảnh".

Đối với cây trồng ngoài đồng ruộng: Lấy mẫu theo Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia QCVN 01-38/2010/BNNPTNT¹ "Phương pháp điều tra phát hiện dịch hại cây trồng".

2.1.2. Bảo quản mẫu

Các bộ phận tươi (bông) có triệu chứng bệnh chứa trong các túi ni-lông có lỗ thông khí bảo quản trong tủ lạnh ở nhiệt độ 3 - 5°C.

Mẫu hạt được chứa trong các túi ni-lông hoặc hộp nhựa kín và bảo quản ở nhiệt độ phòng.

Các tiêu bản lam của nấm được dán nhãn, để trong hộp chuyên dụng đựng tiêu bản lam và bảo quản ở nhiệt độ phòng.

2.2. Thiết bị dụng cụ, hoá chất

Kính lúp soi nổi có độ phóng đại 10 – 40 lần, kính hiển vi có độ phóng đại 40 – 1.000 lần.

Lưới lọc (kích thước mắt lưới 53µm, 20µm), bình tam giác, máy ly tâm, máy sấy, tủ sấy, tủ định ôn, cân điện, bể ổn nhiệt, máy PCR, máy điện di, hệ thống chụp ảnh...

Bộ dao, kim giải phẫu, panh, kéo, bộ micro pipet.

Đèn cồn, đĩa petri, ống hút, lam, lamén, cốc đồng, giấy parafilm.

Cồn 70°, lactophenol, acid lactic, nước cất vô trùng, Tween 20, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, Glycerol, ethylium bromide, agarose, cycloheximide.

Kit chiết tách DNA, kit PCR

2.3. Phương pháp phát hiện và giám định bệnh

2.3.1. Phát hiện và thu thập mẫu bệnh

Cây nhiễm bệnh thấp hơn, bông ngắn, số lượng hạt trên bông giảm (hình 1, phụ lục 1). Nấm chỉ gây bệnh trên một số hạt trên bông, các hạt nhiễm bệnh thường bị lép.

Ban đầu có chấm đen nhỏ dưới phần nội nhũ và rãnh hạt.

Khi xâm nhiễm trên hạt, nấm làm cho hạt có mùi tanh (do trimethylamine) tương tự như nấm *T. tritici*, *T. foetida* và *T. controversa*. Hạt bị xâm nhiễm từ phần rốn hạt và chạy dọc theo đường rãnh hạt (không gây nhiễm nội nhũ), hạt có thể bị vỡ hoàn toàn hoặc bị nứt một phần (hình 2, phụ lục 1). Khi bệnh nặng, mô dọc theo rãnh hạt và vùng tiếp giáp nội nhũ bị thay thế bởi các bào tử. Mày hạt bị tách ra làm cho hạt bị nhiễm bệnh lộ ra ngoài, cả hạt và phần mày hạt có thể bị rụng khỏi bông.

2.3.2. Phương pháp giám định bằng đặc điểm hình thái nấm gây bệnh

2.3.2.1. Phương pháp kiểm tra trực tiếp

¹ Trường hợp các văn bản viện dẫn trong quy chuẩn này sửa đổi, bổ sung hoặc thay thế thì thực hiện theo quy định của văn bản mới.

Dùng kim khâu nấm khâu lớp bảo tử trên hạt đặt lên lam kính đã có sẵn một giọt axit lactic và đậy lamên.

Đặt lam lên kính hiển vi và quan sát đặc điểm hình thái và đo kích thước của bào tử nấm.

Đối chiếu với hình dạng và kích thước bào tử phần đen lúa mì *Tilletia indica* Mitra (phụ lục 1).

2.3.2.2. Phương pháp rửa quay ly tâm

Lấy 50g hạt lúa mì cho vào bình tam giác 250ml. Thêm vào bình 100ml dung dịch Tween-20 nồng độ 0,01%, đậy nắp bình (có thể bao kín bằng giấy parafilm). Đặt bình tam giác lên máy lắc hoặc lắc bằng tay trong vòng 3 phút để các bào tử rời ra khỏi hạt lúa mì. Chuẩn bị một bình lọc bao gồm một bình tam giác, một phễu trong đó có 1 lưới lọc kích thước 53µm. Đổ dịch và hạt lúa mì lên phễu của bình tam giác đã chuẩn bị. Dùng bình phun nước cất rửa hạt lúa mì còn ở trên lưới 3 lần (mỗi lần dùng 20-50ml nước cất). Tiếp tục rửa hạt lúa mì bằng nước cất đến khi lượng nước trong bình đạt từ 300-400ml. Bỏ lưới lọc, rửa phễu lọc 2 lần bằng nước cất mỗi lần 10-20ml nước.

Chuẩn bị bộ lọc thứ 2 bao gồm 1 bình tam giác; 1 phễu trong đó có đặt một lưới lọc 20µm (lưới lọc này có thể ngâm trong nước trước để có hiệu quả lọc tốt hơn). Rót dịch thu được ở trên qua bộ lọc đã chuẩn bị. Rửa bình chứa dịch 2 lần bằng 10ml nước cất. Nghiêng lưới lọc một góc 30-35° rửa nhẹ nhàng lưới lọc bằng nước cất sao cho phần cặn còn lại trên lưới lọc dồn sang bên cạnh của lưới lọc. Dùng công tơ hút hút dịch và cặn trên lưới lọc vào ống ly tâm. Ly tâm dịch thu được ở tốc độ 4000 vòng/phút trong 3 phút. Phần cặn thu được sau ly tâm hoà tan lại trong nước cất để đạt dung tích khoảng 50-100µl.

Hút dịch lên lam kính, đậy lamên quan sát và đo đếm đặc điểm hình thái của bào tử nấm gây bệnh trên kính hiển vi và so sánh với đặc điểm bào tử của nấm *Tilletia indica* (phụ lục 1)

Lưu ý: Trong trường hợp mẫu hạt đã qua xử lý hoá chất diệt nấm, hạt phải được ngâm trong NaOH (0,2% hoặc 1%) trong 24 giờ trước khi rửa, quay ly tâm

2.3.2. Phương pháp giám định PCR

Sử dụng phương pháp PCR để giám định đối với nấm gây bệnh phần đen lúa mì *Tilletia indica* Mitra.

Quy trình chi tiết như phụ lục 2.

III. THẨM ĐỊNH KẾT QUẢ GIÁM ĐỊNH VÀ BÁO CÁO

Sau khi khẳng định kết quả giám định bệnh phần đen lúa mì *Tilletia indica* Mitra - là dịch hại kiểm dịch thực vật của Việt Nam, đơn vị giám định phải gửi báo cáo về Cục Bảo vệ thực vật kèm theo phiếu kết quả giám định (phụ lục 3).

Tất cả các đơn vị thuộc hệ thống Bảo vệ và KDTV phải lưu giữ, quản lý và khai thác dữ liệu về kết quả điều tra, báo cáo và giám định bệnh phấn đen lúa mì *Tilletia indica* Mitra.

Đối với đơn vị lần đầu tiên giám định và phát hiện được bệnh phấn đen lúa mì *Tilletia indica* Mitra phải gửi mẫu hoặc tiêu bản về Trung tâm Giám định kiểm dịch thực vật để thẩm định.

Đơn vị giám định phải đảm bảo thời gian lưu mẫu theo quy định hiện hành.

IV. TỔ CHỨC THỰC HIỆN

Cục Bảo vệ thực vật có trách nhiệm phổ biến; tổ chức, hướng dẫn và kiểm tra việc thực hiện Quy chuẩn này trong hệ thống tổ chức chuyên ngành Bảo vệ và Kiểm dịch thực vật cũng như các tổ chức, cá nhân khác có liên quan;

Các tổ chức, cá nhân có hoạt động liên quan đến điều tra, thu thập mẫu, xử lý và bảo quản mẫu bệnh phấn đen lúa mì tại Việt Nam phải tuân theo quy định của quy chuẩn này cũng như các quy định của pháp luật có liên quan hiện hành.

Phụ lục 1.
Thông tin về dịch hại

1. Phân bố và ký chủ

1.1. Phân bố

Trong nước: Bệnh chưa có ở Việt Nam

Trên thế giới: Châu Á (*Ấn Độ, Afghanistan, Iraq, Nepal, Iran, Pakistan*), Châu Phi (*Nam Phi*), Châu Mỹ (*Kenya, Hoa Kỳ, Mexico*).

1.2. Ký chủ: Lúa Mỳ (*Triticum aestivum*) Ngoài ra trong lây nhiễm nhân tạo nấm còn kí sinh trên *Aegilops* spp., *Bromus* spp., *Lolium* spp. và *Oryzopsis*.

2. Tên khoa học và vị trí phân loại

Tên tiếng Việt : Bệnh phấn đen lúa mỳ

Tên khoa học: *Tilletia indica* Mitra

Tên khác: *Neovossia indica* (Mitra) Mundk.

Vị trí phân loại:

Lớp: Ustilaginomycetes

Bộ: Tilletiales

Họ: Tilletiaceae

3. Triệu chứng bệnh phấn đen lúa mỳ



Hình 1: bông lúa mì nhiễm bệnh
(Nguồn: CABI, 2012)



Hình 2: hạt lúa mì nhiễm bệnh
(Nguồn: CABI, 2012)

4. Đặc điểm hình thái bào tử nấm *Tilletia indica*

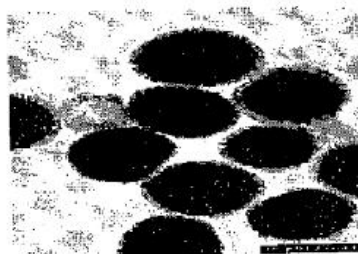
Bào tử đông (Teliospore) dạng cầu tới gần cầu, đường kính thông thường 22-47 μ m, có thể lớn hơn (35-41 μ m); Màu sắc từ vàng cam nhạt tới nâu tới nâu đậm, đỏ nâu; một số bào tử có màu đen hoặc màu đen mờ. Gai dày đầu gai nhọn hoặc tù, một số trường hợp đầu hơi cong, độ dài gai 1,5-5,0 μ m. Bề mặt gai có dạng vỏ não với những rãnh hẹp. Các gai được bao bọc bởi một màng mỏng trong suốt (hình 3 hình 4).

Tế bào bất dục: hình cầu tới gần cầu hoặc hình giọt lệ, màu vàng nâu, 10-28x48 μ m, có hoặc không có đỉnh nhỏ (gai ngắn), vách tế bào mượt dày khoảng 7 μ m và tạo phiến.

Handwritten signature



Hình 3: Bề mặt bào tử *T. indica*
(Nguồn: EPPO, 2012)

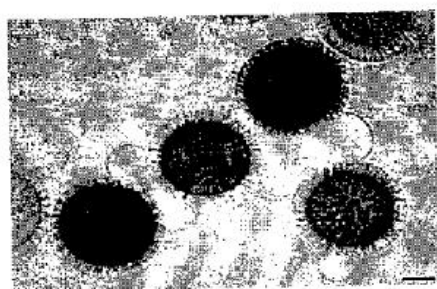


Hình 4: Bào tử *T. indica* quan sát ở
điểm giữa
(Nguồn: EPPO, 2012)

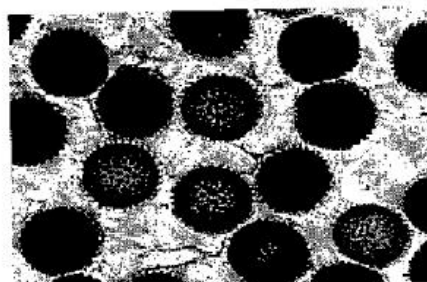
5. Phân biệt với một số nấm Tilletia khác

Bào tử đông của *T. indica* có thể bị nhầm lẫn bởi một số loài Tilletia lẫn tạp trong hạt lúa mì như: *T. walkeri* (hình 5) và *T. horrida* (hình 6) có thể phân biệt như sau.

	<i>T. horrida</i>	<i>T. walkeri</i>	<i>T. indica</i>
Kích thước bào tử to nhất (µm)	<36	36-45	45-50
Kích thước trung bình (µm)	24-28	30-31	35-41
Màu sắc bào tử đông	Vàng nhạt tới màu hạt dẻ nhạt hoặc đậm (tới đen mờ)	Vàng nhạt tới nâu đỏ (không có màu đen đục)	Màu cam nhạt nhưng chủ yếu là màu đỏ nâu đậm tới đen mờ
Hình thái và phân bố gai	Gai nhọn, nhìn bề mặt có nhiều góc cạnh; ít khi có dạng rãnh vỏ não hoặc hiếm khi có dạng bụi. Đầu gai nhọn, có thể trở thành cụt, ít khi cong	Dạng thô; dạng vân tương tự vỏ não không hoàn hảo hoặc bụi dày. Gai dạng nón tới cụt	Gai dày, có dạng vỏ não. Đầu gai nhọn hoặc gãy đầu.



Hình 5: Bào tử *T. walkeri*
(thước 10µm)
Nguồn: PaDIL, 2012



Hình 6: Bào tử *T. horrida*
(thước 10µm)
Nguồn: PaDIL, 2012

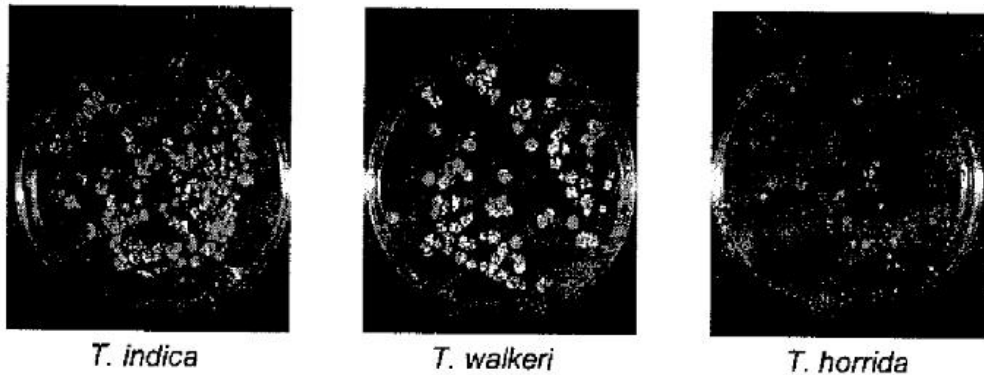
Phụ lục 2.

(qui định)

Quy trình giám định nấm *T. indica* bằng PCR**1. Nhân sinh khối.**

Rửa sạch bào tử thu được ở phương pháp rửa bằng cách rửa bằng nước cất trên lưới lọc 20 μ m. Hút dịch thu được vào ống mới thêm nước cất cho đủ 3ml ngâm qua đêm ở 21 $^{\circ}$ C. Ly tâm 4000 vòng/phút trong 3 phút. Loại bỏ dịch trong ống chỉ thu phần cặn ly tâm. Hoà tan cặn ly tâm trong nước xà phòng 10%, thay nắp mới và lắc nhẹ ống ly tâm. Ly tâm ở 4000 vòng/phút trong 1 phút loại bỏ dịch rửa. Thêm vào 1ml nước cất vô trùng để rửa cặn ly tâm (Ly tâm và rửa 2 lần). Tiếp tục ly tâm 1200g trong 5 phút loại bỏ dịch rửa. Hoà tan lại cặn ly tâm trong 1ml nước cất vô trùng. Trang 200 μ l dịch hoà tan ở bước 10 lên môi trường Agar (WA) nuôi cấy ở 21 $^{\circ}$ C chu kì ánh sáng 12giờ tối/12giờ sáng trong 5 ngày. Bọc các đĩa môi trường bằng giấy parafilm hoặc cho vào túi bóng, tiếp tục nuôi cấy trong 7-14 ngày.

Kiểm tra sự nảy mầm của bào tử. Cắt miếng thạch có bào tử nảy mầm gắn trên nắp hộp petri trong đó chứa 5ml môi trường khoai tây dextrose lỏng (potato dextrose broth), nuôi cấy ở 21 $^{\circ}$ C chu kì ánh sáng 12giờ tối/12giờ sáng trong 2-3 ngày. Kiểm tra sự hình thành bào tử đằm trên bề mặt môi trường nếu chưa thấy nuôi cấy thêm 5 ngày. (hình 7). Dùng kim khâu vô trùng lấy những màng nấm trong môi trường đặt trên các miếng giấy lọc vô trùng để loại bỏ môi trường bám dính. Đặt các màng nấm vào các ống để tách chiết DNA.



Hình 7: Tàn nấm trên môi trường PDA sau 14 ngày

Nguồn: EPPO, 2007

2. Tách chiết DNA

0,1g nấm thu được cho vào ống ly tâm 2ml. Thêm vào 1ml nước tinh khiết dùng trong công nghệ phân tử (MGW) nghiền đều bằng chày thủy tinh hoặc chày nhựa vô trùng. Ủ trong 30 giây. Tách DNA bằng kit tách chiết DNA tổng số của nấm.

3. Giám định bằng PCR

- Cặp mồi sử dụng

Mồi xuôi Tin 3 (5'-CAA TGT TGG CGT GGC GGC GC-3')

QCVN 01 - 159 : 2014/BNNPTNT

Mồi ngược Tin 4 (5'-CAA CTC CAG TGA TGG CTCCG-3').

- Master mix:

20,2 μ L of MGW

2,5 μ L of 10 X PCR buffer chứa 15 mM MgCl₂

0,25 μ L dNTPs [10 mM]

0,1 μ L AmpliTaq [5 U μ L⁻¹]

0,1 μ L of mỗi mồi [25 μ M]

1,0 μ L dịch DNA chiết tách từ nấm

- Chu trình nhiệt

94°C trong 1 phút,

25 chu kỳ :94°C trong 15 giây, 65°C trong 15 giây và 72°C trong 15

giây,

72°C trong 6 phút.

- Đọc kết quả:

- Điện di bằng agarose gel 2% Mẫu dương tính sẽ cho đoạn gen có kích thước 414kbp

Phụ lục 3.
(qui định)
Mẫu phiếu kết quả giám định

Cơ quan Bảo vệ
và Kiểm dịch thực vật

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

..... ngày ... tháng ... năm 20.....

PHIẾU KẾT QUẢ GIÁM ĐỊNH
Bệnh phấn đen lúa mì *Tilletia indica* Mitra - là dịch hại kiểm dịch thực vật của Việt Nam

1. Tên hàng hoá :
2. Nước xuất khẩu :
3. Xuất xứ :
4. Phương tiện vận chuyển : Khối lượng:
5. Địa điểm lấy mẫu :
6. Ngày lấy mẫu :
7. Người lấy mẫu :
8. Tình trạng mẫu :
9. Ký hiệu mẫu :
10. Số mẫu lưu :
11. Người giám định :
12. Phương pháp giám định: Theo quy chuẩn kỹ thuật quốc gia QCVN 01 - 159 : 2014/BNNPTNT về "Quy trình giám định bệnh phấn đen lúa mì *Tilletia indica* Mitra - là dịch hại kiểm dịch thực vật của Việt Nam".
13. Kết quả giám định :

Tên khoa học: *Tilletia indica* Mitra

Lớp: Ustilaginomycetes

Bộ: Tilletiales

Họ: Tilletiaceae

Là dịch hại kiểm dịch thực vật thuộc danh mục dịch hại kiểm dịch thực vật của Việt Nam.

TRƯỞNG PHÒNG KỸ THUẬT

(hoặc người giám định)

(ký, ghi rõ họ và tên)

THỦ TRƯỞNG ĐƠN VỊ

(ký, ghi rõ họ và tên, đóng dấu)