

**TCVN**

**TIÊU CHUẨN QUỐC GIA**

**TCVN 12371-2-2:2018**

Xuất bản lần 1

**QUY TRÌNH GIÁM ĐỊNH VI KHUẨN, VIRUS, PHYTOPLASMA  
GÂY BỆNH THỰC VẬT  
PHẦN 2-2: YÊU CẦU CỤ THỂ ĐỐI VỚI VI KHUẨN *Xylella  
fastidiosa* Wells et al.**

*Procedure for identification of plant disease caused by bacteria, virus, phytoplasma*

*Part 2-2: Particular requirements for *Xylella fastidiosa* Wells et al. bacteria*

HÀ NỘI – 2018

## Lời nói đầu

TCVN 12371-2-2:2018 do Trung tâm Giám định Kiểm dịch thực vật - Cục Bảo vệ thực vật biên soạn, Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn đề nghị, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Bộ TCVN 12371 Quy trình giám định vi khuẩn, virus, phytoplasma gây bệnh thực vật gồm các phần sau đây:

- Phần 2-1: Yêu cầu cụ thể đối với *Plum pox virus*
- Phần 2-2 : Yêu cầu cụ thể đối với vi khuẩn *Xylella fastidiosa* Wells et al.

## Quy trình giám định vi khuẩn, virus, phytoplasma gây bệnh thực vật

### Phần 2-2: yêu cầu cụ thể đối với vi khuẩn *Xylella fastidiosa* Wells et al.

*Procedure for identification of plant disease caused by bacteria, virus, phytoplasma*

*Part 2-2: Particular requirements for Xylella fastidiosa Wells et al.*

#### 1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định quy trình giám định vi khuẩn *Xylella fastidiosa* Wells et al. gây bệnh thực vật.

#### 2 Tài liệu viện dẫn

Tài liệu viện dẫn sau là rất cần thiết cho việc áp dụng tiêu chuẩn. Đối với các tài liệu viện dẫn ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản được nêu. Đối với các tài liệu viện dẫn không ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản mới nhất, bao gồm cả các sửa đổi, bổ sung (nếu có).

TCVN 8597: 2010, *Kiểm dịch thực vật - Phương pháp luận về việc lấy mẫu chuyên hàng.*

#### 3 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ thông thường của phòng thử nghiệm và các thiết bị sau:

- 3.1 Túi lấy mẫu: sạch
- 3.2 Tủ lạnh: có khả năng duy trì nhiệt độ từ 4 °C đến 8 °C
- 3.3 Giấy bàn
- 3.4 Kẹp ép mẫu thực vật: gồm 2 cặp mắt cáo (thường là bằng gỗ), dây buộc
- 3.5 Lọ đựng mẫu: kín khí, bằng chất liệu thủy tinh hoặc nhựa
- 3.6 Tủ lưu trữ mẫu: có khả năng duy trì nhiệt độ và ẩm độ thấp
- 3.7 Hộp lưu trữ mẫu
- 3.8 Lúp cầm tay
- 3.9 Kim cấy vi khuẩn
- 3.10 Lam kính
- 3.11 Lamen
- 3.12 Kính hiển vi

## TCVN 12371-2-2:2018

3.13 **Dụng cụ để ươm:**hộp thủy tinh, nhựa; túi nilon, hộp petri kín khí. Nếu sử dụng túi ni lon nên sử dụng túi mới hoặc hộp petri đã hấp sấy vô trùng.

3.14 **Giấy lọc kích thước lỗ lọc 20 µm đến 25 µm**

3.15 **Lưới nhựa**

3.16 **Dao cắt mẫu:**lưỡi dao bằng inox

3.17 **Kính lúp soi nổi:**có độ phóng đại 0,75x đến 13,5x

3.18 **Đèn cồn**

3.19 **Bàn gia nhiệt**

3.20 **Chày, cối sứ**

3.21 **Chày nhựa**

3.22 **Ống nhựa 1,5ml:** bằng nhựa, có nắp chặt

3.23 **Máy chu trình nhiệt (PCR)**

3.24 **Máy ly tâm:** có khả năng ly tâm với tốc độ 10.000 vòng/phút đến 12.000 vòng/phút

## 4 Hóa chất

Chỉ sử dụng các hóa chất loại tinh khiết phân tích, trừ khi có quy định khác.

4.1 **Hóa chất điều chế môi trường:** BCYE

4.2 **Natri hypoclorit (NaOCl) 2 %**

4.3 **Cồn 70 %, cồn 90 %**

4.4 **Nước cất 1 lần, nước cất vô trùng**

4.5 **Silicagel**

4.6 **Parafin**

4.7 **Glycerol**

4.8 **Hóa chất PCR:** Natri clorit (NaCl) khan, Kali clorit (KCl), Natri hydro phosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), Kali dihydro phosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), Tris- HCl 1M, EDTA 0,5M, Natri clorit (NaCl) 5M, PVP 40, 2 mercaptoethanol, phenol: chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1), iso propanol, dry milk solution, SDS, ammonium acetate 7,5M, PCR Buffer 10x, dNTPs 2.0nM, Primers, Taq polymerase, agarose, loading dye.

## 5 Phương pháp thu thập và bảo quản mẫu

5.1 **Lấy mẫu**

5.1.1 **Đối với hàng hoá xuất, nhập khẩu, quá cảnh hoặc vận chuyển, bảo quản trong nước**

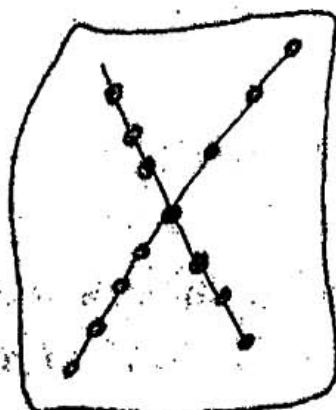
Lấy mẫu theo TCVN 8597:2010

5.1.2 **Đối với cây trồng ngoài đồng ruộng**

- Diện tích điều tra: phụ thuộc vào loại cây trồng, điều kiện cụ thể tại vùng điều tra và mục đích điều tra.

- Chọn điểm điều tra: Có thể chọn điểm điều tra theo một trong số các phương pháp sau

+ Chọn điểm theo đường chéo góc (hình 1)

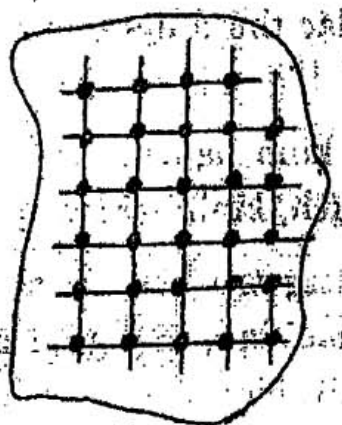


5

Hình 1- Điểm điều tra lấy theo đường chéo góc

(NGUỒN: Viện Bảo vệ thực vật, 1997)

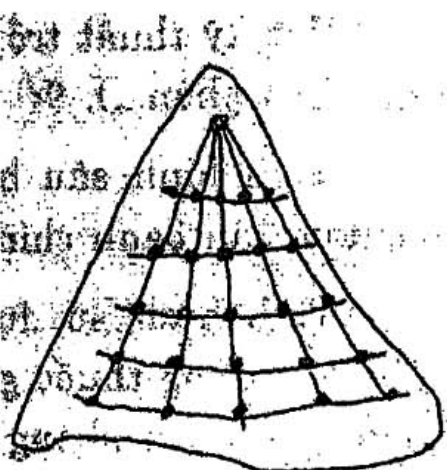
+ Chọn điểm theo ô bàn cờ (hình 2)



Hình 2- Điểm điều tra lấy theo ô bàn cờ

(NGUỒN: Viện Bảo vệ thực vật, 1997)

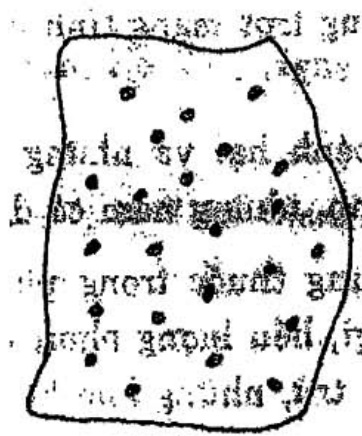
+ Chọn theo điểm hình rổ quạt (hình 3)



Hình 3- Điểm điều tra lấy theo hình rổ quạt

(NGUỒN: Viện Bảo vệ thực vật, 1997)

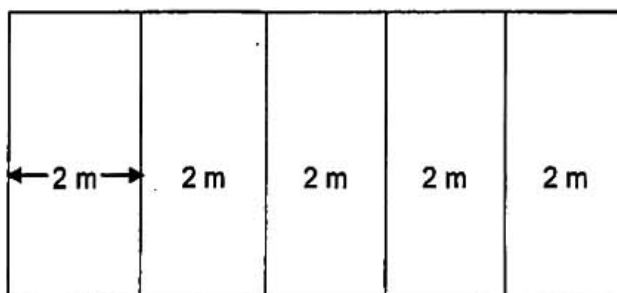
+ Chọn điểm ngẫu nhiên (hình 4)



Hình 4 - Điểm điều tra lấy theo ngẫu nhiên

(NGUỒN: Viện Bảo vệ thực vật, 1997)

+ Điều tra toàn bộ ruộng theo băng (hình 5). Tại ruộng điều tra, điều tra toàn bộ ruộng theo phương pháp cuốn chiếu theo băng. Mỗi ruộng được chia ra làm các băng nhỏ, mỗi băng có chiều rộng 2 m, điều tra lần lượt từ đầu tới cuối băng và kiểm tra toàn bộ cây trồng trong mỗi băng điều tra.



Hình 5 - Điều tra toàn bộ ruộng theo băng

- Số lượng mẫu: số lượng mẫu phụ thuộc vào mục đích điều tra và phương pháp lấy mẫu.
- + Cây ăn quả, cây lâu năm, cây công nghiệp: số lượng cây điều tra tại một điểm tối thiểu từ 3 cây đến 5 cây.
- + Cây hàng năm, rau màu, cây ngắn ngày: mỗi điểm có diện tích tối thiểu là 1 m<sup>2</sup>.

Thu toàn bộ các bộ phận có triệu chứng nghi bị nhiễm *Xylella fastidiosa* Wells et al..

## 5.2 Bảo quản mẫu

Các bộ phận tươi khi thu được chứa trong các túi lấy mẫu (3.1) và bảo quản trong tủ lạnh (3.2) ở nhiệt độ từ 4 °C đến 5 °C.

Các mẫu tươi sau khi giám định hoặc gửi đi giám định có thể xử lý bằng phương pháp:

### 5.2.1 Ép khô

Bộ phận nhiễm bệnh (cành hoặc lá) được ép khô bằng cách đặt giữa các lớp giấy bản (3.3) thường là từ 4 đến 5 tờ.

Các lớp giấy bản (có chứa mẫu) được đặt giữa 2 miếng bìa các tông và đặt vào kẹp ép mẫu thực vật (3.4) sau đó nén chặt bằng dây hoặc vật nặng.

Trong quá trình làm khô mẫu giấy bản nên thay thường xuyên khoảng 1 lần/ngày.

Kẹp ép mẫu thực vật (có chứa mẫu) có thể phơi nắng, để trong phòng có điều hòa hoặc máy sưởi để tăng hiệu quả làm khô mẫu.

Thời gian làm khô mẫu hoàn toàn thông thường là từ 5 đến 10 ngày.

Mẫu đạt tiêu chuẩn là các mẫu không bị mốc, khô hoàn toàn, không bị gập gãy hoặc nhăn nheo.

Các mẫu vật sau khi ép khô được đặt trong các túi lấy mẫu vô trùng, bên ngoài đề rõ các thông tin liên quan như: ngày, tháng lấy mẫu; thông tin kí chủ; thông tin bệnh hại (hoặc nghi ngờ loại bệnh hại); địa điểm (hoặc lô hàng lấy mẫu).

Các túi chứa mẫu bằng giấy được lưu trữ trong các tủ lưu trữ mẫu (3.6) (hoặc các hộp lưu trữ mẫu (3.7)) có độ ẩm thấp (có thể sử dụng các vật liệu chống ẩm như silicagel...)

### 5.2.2 Ngâm mẫu

Bộ phận nhiễm bệnh (cành, lá, quả tươi) được rửa nhẹ dưới vòi nước chảy sau đó rửa lại bằng nước cất vô trùng.

Mẫu được để chỗ thoáng để bề mặt khô hoàn toàn.

Có thể ngâm mẫu vào dung dịch  $H_2SO_4$  10 % bổ sung thêm glycerol 0,01 % và cồn 90 % 0,01 % trong vòng 24 giờ.

Vớt mẫu vật ra, rửa trong nước lạnh.

Chuyển mẫu vào dung dịch bảo quản (Xem phụ lục C) và đậy chặt nắp.

Thay dung dịch bảo quản khi thấy hiện tượng dung dịch bị vẩn đục (hoặc 6 tháng 1 lần) cho đến khi dung dịch bảo quản không bị vẩn đục nữa thì gắn chặt lọ mẫu bằng parafilm.

Dán nhãn bên ngoài lọ đựng mẫu (3.5) ghi rõ các thông tin liên quan như: ngày, tháng lấy mẫu; thông tin kí chủ; thông tin bệnh hại (hoặc nghi ngờ loại bệnh hại); địa điểm (hoặc lô hàng lấy mẫu).

Ảnh chụp của mẫu vật (ảnh mẫu vật, khuẩn lạc nuôi cấy...) được ghi rõ các thông tin và lưu lại trong máy tính hoặc ảnh rửa.

## 6 Phát hiện bệnh

Bệnh được phát hiện dựa trên các triệu chứng biểu hiện trên cây. Trên mỗi loại cây trồng khác nhau vi khuẩn lại thể hiện các loại hình triệu chứng khác nhau.

### 6.1 Triệu chứng trên cây nho (*Vitis vinifera*)

Triệu chứng tiêu biểu trên nho là hiện tượng cháy lá. Vết bệnh đầu tiên là những vết khô trên lá sau đó chuyển màu nâu, các mô xung quanh vết bệnh chuyển sang đỏ hoặc vàng. Vết bệnh dần lan ra toàn bộ lá làm lá co lại và rụng, cuống lá thường không rụng theo.

Vết bệnh trên thân là những vết sọc dài có dạng bất hình màu nâu hoặc xanh.

Các cây nhiễm bệnh lâu thường có lá nhỏ, biến dạng gân lá sáng màu, kích thước lông đốt thường ngắn. Chùm quả thường bị héo.

Các cây nhiễm bệnh bật lộc muộn hơn các cây khỏe, các lộc này cũng ngắn và sáng màu hơn.

Bệnh ảnh hưởng tới sức sống của cây và có thể gây chết cây. Các cây non bị ảnh hưởng nặng hơn các cây đã trưởng thành.

### 6.2 Triệu chứng lùn cây cỏ linh lăng (*Medicago sativa*)

Trên cỏ linh lăng sau cắt tỉa cây thường bị còi và cằn. Lá chết của những cây nhiễm bệnh thường nhỏ hơn và có thể có màu sậm hơn những cây không nhiễm bệnh. Các lá nhiễm bệnh không biến dạng, cong lại có các vết khảm hay có màu vàng rõ rệt. Các rễ không bị biến dạng nhưng phần gỗ bên trong biến vàng có những sọc màu nâu (đây là các mô gỗ bị chết) nằm rải rác trong phần mô rễ. Các cây mới nhiễm bệnh thì mô gỗ ở phần sát vỏ bị biến vàng phần lõi phía trong vẫn trắng bình thường. Bệnh diễn biến nặng hơn sau 1 năm đến 2 năm sau khi phát hiện triệu chứng bệnh đầu tiên các cây bệnh nặng có thể chết.

### **6.3 Triệu chứng cháy lá hạnh nhân (*Prunus dulcis*)**

Triệu chứng điển hình nhất trên cây hạnh nhân là cháy lá sau đó giảm năng suất cũng như cây kém phát triển. Trên lá thường xuất hiện các dải nhỏ màu vàng xen kẽ với các đốm chết hoại cũng như các mô còn xanh trên lá. Trong điều kiện nóng thì các vết màu vàng có thể không xuất hiện.

Trên cành triệu chứng là hiện tượng chết ngọn cành, ngọn cây

### **6.4 Triệu chứng trên cây có múi (*Citrus spp.*)**

Triệu chứng đầu tiên xuất hiện là các đốm biến màu trên mặt trên của lá ở mặt dưới của lá có những đốm nâu hơi xỉ mũ. Triệu chứng thể hiện rõ ràng nhất trên các lá vẫn đang trong giai đoạn phát triển.

Cây bị nhiễm bệnh còi cọc, tán thưa hơn các cây bình thường. Cây bị bệnh ra hoa, đậu quả cùng thời điểm với cây khỏe nhưng quả cây bệnh thường nhỏ và chín sớm hơn.

Cây nhiễm bệnh có thể không bị chết nhưng năng suất và chất lượng quả giảm rõ rệt. Trên một số giống quả có thể ra thành chùm 4 đến 10 quả. Các cây nhiễm bệnh lớn rất chậm

### **6.5 Triệu chứng trên chi cà phê (*Coffea spp.*)**

Triệu chứng trên lá là các đốm cháy trên các lá đang phát triển. Lá nhiễm bệnh thường bị rụng, ngọn non còi cọc hoặc bị chết.

### **6.6 Triệu chứng trên cây olive (*Olea europaea*)**

Triệu chứng ban đầu là các vết cháy trên lá, các vết cháy và khô trên cành. Triệu chứng thường xuất hiện sớm trên phần ngọn của cây sau đó lan dần xuống dưới.

Khi điều tra phát hiện các triệu chứng của bệnh cần chú ý:

**Trên lá:** Lá cây biến màu, biến dạng, chết hoại và rụng.

**Trên quả:** Quả biến dạng, khô teo trên cây hoặc giảm kích thước.

**Trên rễ:** Rễ cây phát triển kém.

**Trên thân:** Bệnh gây chết ngọn, mất màu thân, bó mạch mất màu.

Cây có thể bị lùn và còi cọc.

Khi kiểm tra lô hàng cần chú ý các quốc gia có phân bố loài vi khuẩn này (xem phụ lục A) và các loài kí chủ mà vi khuẩn gây hại (xem phụ lục A).

## **7 Giám định bệnh**

### **7.1 Giám định bằng ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)**

#### **7.1.1.1 Phân lập và nuôi cấy làm thuần trên môi trường nhân tạo**

##### **Bước 1: Khử trùng bề mặt mẫu bệnh**

Phần mô cây nghi nhiễm bệnh (cành, thân, lá...) được rửa sạch dưới vòi nước chảy



Khử trùng bề mặt bằng cách ngâm trong dung dịch natri hypoclorit 2 % trong 5 phút sau đó ngâm trong cồn 70 % trong 2 phút, rửa lại 3 lần bằng nước cất vô trùng

#### **Bước 2: Tách chiết vi khuẩn**

Cắt khoảng 1g mô lá thêm vào 10 ml PBS (Xem phụ lục D) nghiền nhỏ bằng chày cối sứ (3.20). Lấy 100 µl dịch nghiền lá, thêm vào 900 µl PBS. Hòa loãng dịch nghiền ở bước 5 theo thang nồng độ:  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$

#### **Bước 3: Phân lập**

Lấy ở mỗi thang nồng độ hòa loãng nói trên 100 µl dịch nghiền, trang đều trên môi trường BCYE (Xem phụ lục B). Nuôi cấy ở nhiệt độ 28 °C trong 6 tuần.

#### **Bước 4: Nuôi cấy làm thuần**

Chọn các vi khuẩn có hình thái phù hợp với mô tả hình thái của khuẩn lạc vi khuẩn nhỏ (< 1 mm) không màu hoặc đục, rìa nhẵn, cấy truyền trên môi trường đặc hiệu.

### **7.1.1.2 Quy trình thực hiện ELISA**

#### **7.1.1.2.1 Tách chiết mẫu**

Tùy thuộc vào nguồn mẫu ban đầu mà cách tách chiết khác nhau:

- Trên mẫu mô cây: Nghiền nhỏ mẫu mô cây, lá bằng chày và cối sứ (3.20) trong dịch PBS có thể sử dụng ni tơ lỏng để nghiền dễ dàng hơn
- Trên mẫu khuẩn lạc nuôi cấy: Nghiền mẫu bằng chày nhựa (3.21) trong dịch PBS

#### **7.1.1.2.2 Quy trình thực hiện ELISA:**

Hiện nay có rất nhiều các loại kit thương mại khác nhau. Tùy thuộc vào điều kiện của phòng thí nghiệm có thể lựa chọn loại kit phù hợp (ví dụ của các hãng Agritest hoặc Loewe). Các bước tiến hành theo hướng dẫn của nhà sản xuất

### **7.2 Giám định bằng PCR (Polymerase Chain Reaction)**

#### **7.2.1 Phân lập và nuôi cấy làm thuần trên môi trường nhân tạo**

Thực hiện theo mục 7.1.1.1

#### **7.2.2 Tách chiết DNA**

Có nhiều phương pháp tách chiết DNA khác nhau, tùy vào điều kiện của phòng thí nghiệm có thể áp dụng cách tách chiết khác nhau. Có thể tách chiết theo một số phương pháp sau:

- Tách chiết bằng với vi khuẩn nuôi cấy trên môi trường.

Hòa tan 1 khuẩn lạc vào 1ml nước vô trùng (molecular-grade water), đặt ở nhiệt độ 100 °C trong 5 phút.

- Tách chiết bằng CTAB (với mô cây nghi nhiễm bệnh)

Bước 1: Nghiền nhỏ từ 0,5 g đến 1 g mô cây nghi nhiễm bệnh bằng cối và chày sứ (3.20) trong 5 ml CTAB(Xem phụ lục D) 2 % 2 mercaptoethanol

Bước 2: Lấy 1ml dịch nghiền vào ống nhựa 1,5 ml

Bước 3: Ủ ở 65 °C trong 30 phút.

Bước 4: Ly tâm (3.24) 10 phút tốc độ 12.000 vòng/phút.

Bước 5: Thu dịch phía trên sang ống mới đo lượng dịch

## TCVN 12371-2-2:2018

Bước 6: thêm vào ống lượng dịch chloroform( $\text{CHCl}_3$ ):isoamyl alcohol(24:1) bằng lượng dịch thu được ở bước 4, lắc đều

Bước 7: Ly tâm 10 phút tốc độ 12.000 vòng/phút.

Bước 8: Thu dịch phía trên sang ống mới, đo lượng dịch

Bước 9: Thêm vào ống lượng dịch isopropanol bằng 0,7 dịch thu được ở bước 8. Lắc nhẹ, để tủa trong vòng 20 phút (nhiệt độ âm  $20^\circ\text{C}$ )

Bước 10: Ly tâm tốc độ 12.000 vòng/phút trong 20 phút, loại bỏ phần dịch phía trên

Bước 11: Rửa kết tủa DNA 2 lần bằng cồn 70 %

Bước 12: Hòa tan kết tủa DNA bằng TE, pH 8.0 (Xem phụ lục D)

### 7.2.3 Nhân gen (PCR)

DNA thu được tiến hành nhân gen trong máy chu trình nhiệt (PCR) (3.23) với quy trình như sau:

Bước 1: Pha dung dịch nhân gen (master mix) theo hướng dẫn của nhà sản xuất

Sử dụng cặp mồi đặc hiệu (nguồn Minsavage et al.)

rst31 [5'-GCGTTAATTTTCGAAGTGATTCGATT-3']

rst33 [5'-CACCATTCGTATCCCGGTG-3']

Bước 2: nhân gen trong máy với chu trình nhiệt như sau:

95 °C trong 1 phút

95 °C trong 30 giây

55 °C trong 30 giây

72 °C trong 45 giây

72 °C trong 5 phút

Chu trình lặp lại 40 lần

### 7.2.4 Đọc kết quả

Gen sau khi nhân được nhuộm bằng chất nhuộm (thường là Loading dye) sau đó được chạy điện di trong gel agarose 2 %.

Mẫu dương tính cho kích thước đoạn gen 733 kb.

## 8 Báo cáo kết quả

Mẫu giám định được kết luận là loài *Xylella fastidiosa* Wells et al. khi:

- Phương pháp ELISA cho kết quả là dương tính.

hoặc

- Phương pháp PCR cho kết quả là dương tính.

Sau khi khẳng định kết quả giám định, người giám định hoặc cơ quan giám định trả lời kết quả bằng phiếu. Nội dung phiếu kết quả giám định gồm những thông tin sau:

- Thông tin về mẫu giám định.

- Tên loài

- Phương pháp giám định

- Người giám định/cơ quan giám định

Phiếu giám định chi tiết có thể tham khảo phụ lục E.

**Phụ lục A**  
(Tham khảo)  
**Thông tin chung**

**A.1 Tên khoa học và vị trí phân loại**

Tên tiếng Việt: Bệnh vi khuẩn rụng lá nhỏ  
 Tên khoa học: *Xylella fastidiosa* (Wells et al., 1987)  
 Vị trí phân loại  
 Ngành: Proteobacteria  
 Lớp: Gammaproteobacteria  
 Bộ: Xanthomonadales  
 Họ: Xanthomonadaceae  
 Giống: Xylella

**A.2 Phân bố**

Trong nước: Bệnh chưa có ở Việt Nam

Trên thế giới: **Châu Á:** Đài Loan, Thổ Nhĩ Kỳ; **Châu Mỹ:** Canada, Mexico, Costa Rica, Venezuela, Hoa Kỳ, Argentina, Brazil, Paraguay, Peru; **Châu Âu:** Pháp, Italy, Serbia

**A.3 Ký chủ**

**Ký chủ chính:** *Carya illinoensis*, *Citrus latifolia*, *Citrus reticulata*(quýt), *Citrus reticulata x paradisi*, *Citrus sinensis* (cam), *Medicago sativa*(cỏ linh lăng), *Morus alba* (dâu tằm), *Vitis labrusca* (nho chòn), *Vitis rupestris*, *Vitis vinifera* (nho)

**Ký chủ khác:** *Acer*, *Acer rubrum*, *Acer saccharum*, *Brachiaria*, *Coffea* (cà phê), *Coffea arabica* (cà phê arabica), *Conium maculatum*, *Cynodon*, *Cyperus*, *Digitaria*, *Echinochloa frumentacea*, *Fragaria vesca*, *Liquidambar styraciflua*, *Lolium*, *Lolium multiflorum*, *Medicago*, *Nerium oleander*, *Paspalum*, *Paspalum dilatatum* (san dệp), *Passiflora foetida*, *Persea americana* (bơ), *Platanus occidentalis*, *Poaceae*(họ hòa thảo), *Prunus angustifolia*, *Prunus dulcis*(hạnh nhân), *Prunus persica* (đào), *Prunus salicina*(mận Nhật bản), *Pyrus*(chi lê), *Quercus rubra*, *Quercus velutina*, *Rubus* (chi mâm xôi), *Sambucus*, *Taraxacum officinale complex*, *Trifolium*, *Ulmus*, *Ulmus americana*, *Olea europaea*, *Vaccinium*, *Vinca minor*...

**A.4 Đặc điểm sinh học**

Vi khuẩn chỉ nhân lên trong mạch gỗ trong rễ, thân và lá. Mạch dẫn bị bít tắc bởi các cụm vi khuẩn và các sẹo và khối nhầy tạo ra bởi cây mặc dù tác hại của bệnh không chỉ ở khía cạnh làm nghẽn nguồn cung cấp nước. Bệnh rụng lá nhỏ có thể truyền bởi côn trùng môi giới, không có giai đoạn tiềm dục và tồn tại trong cơ thể côn trùng vĩnh viễn. Trong các thí nghiệm tiến hành trong những năm 1940 tại California, USA, 75 trên 100 loài cây thí nghiệm có thể nhiễm bệnh từ côn trùng môi giới. Những nghiên cứu khác trên môi trường và công nghệ PCR đã tìm thấy các kí chủ khác không biểu hiện triệu

## **TCVN 12371-2-2:2018**

chúng. Phần lớn các kí chủ này chỉ biểu hiện sinh trưởng kém hơn một chút hoặc không có triệu chứng khi lây nhiễm.

Thời tiết vào mùa đông là nhân tố chính trong việc loại bỏ các vùng mà vi khuẩn có khả năng tồn tại từ mùa này sang mùa khác. Bệnh rụng lá nhỏ và những bệnh tương tự chỉ xuất hiện ở các vùng có mùa đông không quá lạnh vì bệnh có thể tồn dư trong các cây trồng. Thí nghiệm nhiệt độ thấp với bệnh này gợi ý rằng nhiệt độ đóng băng có thể loại trừ vi khuẩn trực tiếp trong cây. Mùa đông ẩm ướt có thể khuyến khích sự tồn tại của các môi giới truyền bệnh và làm cho bệnh lây lan mạnh khi khí hậu mùa hè khô. Ở vùng khí hậu ôn đới với khoảng thời gian đóng băng hàng năm vi khuẩn thiết lập quần thể trên cây nhỏ trong thời kì đầu của vụ và sau đó ở trạng thái bảo tồn thời gian còn lại của năm. Tại California, USA không ghi nhận thấy hiện tượng lây bệnh từ cây qua cây có thể vì khi vi khuẩn xâm nhập vào bộ lá non khả năng thiết lập quần thể lây nhiễm có khả năng qua đông là thấp. Vì lý do này môi giới có khả năng qua đông là nguồn lây lan bệnh quan trọng trong vụ tiếp theo. Do không có các môi giới tiềm năng có thể qua đông ở pha trưởng thành nên tại các vùng ôn đới như châu Âu bệnh không có khả năng lây lan tự nhiên

**Phụ lục B**

(Quy định)

**Phương pháp chuẩn bị và điều chế môi trường nhân tạo****B.1 Cách hấp, sấy khử trùng****B.1.1 Sấy khử trùng**

Dùng phương pháp này để khử trùng hộp lồng và dụng cụ thủy tinh. Dụng cụ phải được rửa sạch và gói riêng rẽ bằng giấy nhôm rồi đặt vào hộp bằng chất liệu phù hợp để có thể sấy được. Tránh không nên sử dụng giấy để gói vì sẽ làm dính kết vào dụng cụ và có thể gây cháy trong quá trình sấy. Dụng cụ thủy tinh có thể được sấy trong tủ sấy bằng không khí nóng, các đồ sấy không nên xếp quá chặt để đảm bảo không khí nóng đối lưu, khí nóng phải đảm bảo tiếp xúc đều tất cả các phần của dụng cụ để quá trình sấy đạt hiệu quả tốt.

Có thể sử dụng các nhiệt độ và cách sấy sau:

Nhiệt độ	Thời gian
120 °C	8 giờ
140 °C	3 giờ
160 °C	1 giờ
180 °C	20 phút

CHÚ THÍCH: thời gian được tính từ khi nhiệt độ lên tới nhiệt độ yêu cầu

**B.1.2 Hấp khử trùng bằng nồi hấp**

Dùng phương pháp này để khử trùng môi trường nhân tạo. Các nồi hấp vô trùng tự động (autoclave) hoặc các nồi áp suất đều có thể sử dụng để hấp vô trùng. Các môi trường nhân tạo sau khi điều chế được đựng trong các bình thủy tinh có nắp. Các bình này được đặt trong các lồng, hộp của nồi hấp vô trùng và đặt vào nồi hấp. Không nên để nghiêng hay rót môi trường quá đầy tránh làm trào môi trường trong quá trình khử trùng. Không nên xếp chồng chéo hoặc quá đầy ảnh hưởng tới luồng không khí đối lưu trong nồi hấp. Hấp khử trùng thường ở nhiệt độ 121 °C trong thời gian 30 phút.

Khi vận hành nồi hấp vô trùng cần sự giám sát cẩn thận và tuân thủ hướng dẫn sử dụng máy.

**B. 2 Phương pháp điều chế môi trường nhân tạo****Môi trường BCYE****Thành phần**

Aces Buffer (Sigma)	10 g
KOH 1M	40 ml
Yeast extract	10 g
Than hoạt tính	2 g
Agar	17 g

**TCVN 12371-2-2:2018**

Nước

940 ml

Hòa tan các thành phần, đun tới khi hòa tan hoàn toàn

**CHÚ THÍCH:** Hiện nay, trên thị trường có rất nhiều loại môi trường nhân tạo để nuôi cấy vi khuẩn có thể mua các loại môi trường này sau đó điều chế theo hướng dẫn của nhà sản xuất hoặc tự điều chế theo phương pháp nêu trên.

**Phụ lục C**

(Quy định)

**Thành phần và chuẩn bị dung dịch xử lý mẫu****C.1 Dung dịch bảo tồn**

Có thể sử dụng một trong những dung dịch bảo tồn sau:

**Dung dịch 1:**

CuSO <sub>4</sub>	85 g
H <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	28,4 ml
Nước	2.485 ml

**Dung dịch 2:**

H <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	284 ml
Nước	3.785 ml

**Dung dịch 2:**

Muối bão hòa	1.000 ml
Fomalin	500 ml
Nước	870 ml

**Dung dịch 3:**

Fomalin	450 ml
Cồn	540 ml
Nước	1.810 ml

**Cách pha dung dịch muối bão hòa:**

Hòa tan muối trong nước nóng đến mức độ bão hòa.

Để dung dịch nguội trong 3 giờ.

Lọc bỏ phần không tan hết

**Phụ lục D**  
(Quy định)  
**Các dịch chiết mẫu**

**D.1 PBS**

Thành phần

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,9 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g
Nước	1.000 ml

**D.2 CTAB**

Thành phần

CTAB	2 g
Tris HCl 1M	10 ml
EDTA 0,5M	4 ml
NaCl 5M	28 ml
PVP 40	1 g
Nước	100 ml

**D.3 TE**

Thành phần

Tris HCl 1M	1 ml
EDTA 0,5M	0,2 ml
Nước	100 ml





THƯ MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] CABI, (2017), *Crop Protection Compendium*.
  - [2] Commonwealth Mycological Institute, (1983), *Plant Pathologist's Pocketbook*.
  - [3] IPPC, (2006), *ISPM 27 Diagnostic protocols for regulated pests*.
  - [4] Hopkins, D.L. and Purcell, A.H., 2002. *Xylella fastidiosa*: cause of Pierce's disease of grapevine and other emergent diseases. *Plant disease*, 86(10), pp.1056-1066.
  - [5] Minsavage GV, Thompson CM, Hopkins DL & Leite RMVBC and Stall RE, (1994), *Development of a polymerase chain reaction protocol for detection of Xylella fastidiosa in plant tissue*, *Phytopathology* 84, 456–461.
  - [6] Simpson, A.J.G., Reinach, F.C., Arruda, P., Abreu, F.A., Acencio, M., Alvarenga, R., Alves, L.C., Araya, J.E., Baia, G.S., Baptista, C.S. and Barros, M.H., 2000. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Nature*, 406(6792), p.151.
  - [7] Viện Bảo vệ thực vật, (1997), *Tập 1: Phương pháp điều tra cơ bản dịch hại nông nghiệp và thiên địch của chúng, Phương pháp nghiên cứu bảo vệ thực vật*, NXB Nông nghiệp.
  - [8] <https://gd.eppo.int/taxon/XYLEFA/photos>.
-