

**TCVN**

**TIÊU CHUẨN QUỐC GIA**

**TCVN 12195-2-12:2020**

Xuất bản lần 1

**QUY TRÌNH GIÁM ĐỊNH NẤM GÂY BỆNH THỰC VẬT  
PHẦN 2-12: YÊU CẦU CỤ THỂ ĐỐI VỚI NẤM *Puccinia  
psidii* G. Winter**

*Procedure for identification of plant disease caused by fungi  
Part 2-12: Particular requirements for *Puccinia psidii* G. Winter*

HÀ NỘI – 2020

## Lời nói đầu

TCVN 12195-2-12:2020 do 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 12195 Quy trình giám định nấm gây bệnh thực vật gồm các phần sau:

- TCVN 12195-1:2019. Phần 1: Yêu cầu chung
- TCVN 12195-2-1:2018. Phần 2-1: Yêu cầu cụ thể đối với nấm *Guignardia bidwellii* (Ellis) Viala & Ravaz
- TCVN 12195-2-2:2018. Phần 2-2: Yêu cầu cụ thể đối với nấm *Cryphonectria parasitica* (Murrill) Barr
- TCVN 12195-2-3:2018. Phần 2-3: Yêu cầu cụ thể đối với nấm *Claviceps africana* Frederickson, Mantle & De Milliano
- TCVN 12195-2-4:2018. Phần 2-4: Yêu cầu cụ thể đối với nấm *Ciborinia camelliae* Kohn
- TCVN 12195-2-5:2018. Phần 2-5: Yêu cầu cụ thể đối với nấm *Boeremia foveata* (Foister) Aveskamp, Gruyter & Verkley
- TCVN 12195-2-6:2018. Phần 2-6: Yêu cầu cụ thể đối với *Phytophthora boehmeriae* Sawada
- TCVN 12195-2-7:2019. Phần 2-7: Yêu cầu cụ thể đối với nấm *Tilletia indica* Mitra
- TCVN 12195-2-8:2019. Phần 2-8: Yêu cầu cụ thể đối với nấm *Phoma tracheiphila* (Pertri) Kantachveli & Gikachvili
- TCVN 12195-2-9:2019. Phần 2-9: Yêu cầu cụ thể đối với nấm *Balansia oryzae - sativae* Hashioka
- TCVN 12195-2-10:2019. Phần 2-10: Yêu cầu cụ thể đối với nấm *Synchytrium endobioticum* (Schilb) Percival
- TCVN 12195-2-11:2019. Phần 2-11: Yêu cầu cụ thể đối với nấm *Microcyclus ulei* (Henn) Arx
- TCVN 12195-2-12:2020. Phần 2-12: Yêu cầu cụ thể đối với nấm *Puccinia psidii* G. Winter
- TCVN 12195-2-13:2020. Phần 2-13: Yêu cầu cụ thể đối với nấm *Polyscytalum pustulans* (M.N. Owen & Makef) M.B Ellis

## Quy trình giám định nấm gây bệnh thực vật

### Phần 2-12: Yêu cầu cụ thể đối với nấm *Puccinia psidii* G. Winter

*Procedure for identification of plant disease caused by fungi*

*Part 2-12: Particular requirements for Puccinia psidii G. Winter*

#### 1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định các yêu cầu cụ thể đối với quy trình giám định nấm *Puccinia psidii* G. Winter 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 12195-1:2019. *Quy trình giám định nấm gây bệnh thực vật - Phần 1: Yêu cầu chung.*

#### 3 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ thông thường của phòng thử nghiệm sinh học, theo TCVN 12195-1:2019 (điều 3) và các thiết bị sau:

- 3.1 Kim khâu nấm
- 3.2 Dao cắt mẫu
- 3.3 Kính hiển vi: có độ phóng đại từ 40 lần đến 1 000 lần
- 3.4 Ống effendorf 1,5 ml
- 3.5 Máy trộn dịch
- 3.6 Lọ thủy tinh đựng hóa chất: kín khí, trơ với hóa chất
- 3.7 Máy ly tâm: tốc độ từ 1 000 vòng/phút đến 18 000 vòng/phút
- 3.8 Chày nhựa
- 3.9 khay men: kích thước 20 cm x 30 cm

#### 4 Hóa chất

Chỉ sử dụng các hóa chất loại tinh khiết phân tích, trừ khi có quy định khác. Sử dụng hóa chất theo TCVN 12195-1:2019 (điều 4) và các hóa chất sau:

##### 4.1 Nitơ lỏng

## **TCVN12195-2-12:2020**

**4.2 Ethanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) 99,5 %**

**4.3 Agarose gel 1,5 %**

**4.4 Tris- HCl, pH 8,5**

**4.5 Natri clorua (NaCl)**

**4.6 EDTA (C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>)**

**4.7 SDS (Natri dodecyl sunphat)**

**4.8 Natri iodua (Nal)**

**4.9 Natri sunfit (NaSO<sub>3</sub>)**

**4.10 Nước cất**

**4.11 Kali clorua (KCl)**

**4.12 Natri hidrophosphat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)**

**4.13 Kali dihidrophosphat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)**

**4.14 Silica (SiO<sub>2</sub>)**

**4.15 Giấy lọc: đường kính lỗ lọc 11 μm**

## **5 Lấy mẫu và bảo quản mẫu**

### **5.1 Lấy mẫu**

Lấy mẫu theo điều 5.1 của TCVN 12195-1:2019.

### **5.2 Bảo quản mẫu giám định**

Bảo quản mẫu khi giám định hoặc sau khi giám định như sau:

- Thân, lá, quả bảo quản tươi, ép khô hoặc ngâm mẫu theo điều 5.2.1 và 5.2.2 của TCVN 12195-1:2019.

- Tiêu bản lam theo điều 5.2.4 của TCVN 12195-1:2019.

## **6 Phát hiện bệnh**

Nấm *Puccinia psidii* gây hại chủ yếu ở các phần non như lá, đỉnh chồi, thân non, hoa và quả. Triệu chứng bệnh khác nhau ở các bộ phận cũng như thời kì sinh trưởng của cây. Ban đầu, triệu chứng của bệnh là các đốm nhỏ hơi nổi lên. Sau đó, trên các đốm này xuất hiện một lớp bào tử hạ màu vàng đặc trưng. Bệnh nặng gây biến dạng thân, còi cọc và có thể chết cây.

Khi kiểm tra lô hàng cần chú ý các lô hàng có nguồn gốc tại các quốc gia mà nấm có phân bố (xem phụ lục A).

## **7 Giám định**

### **7.1 Giám định nấm bằng đặc điểm hình thái**

#### **7.1.1 Kiểm tra trực tiếp**

- Lát cắt ngang của mẫu bệnh nên có độ dày dưới 0,5 mm và độ dài từ 1 mm đến 2 mm để có hiệu quả quan sát tốt nhất

- Quan sát hình thái của nấm thu được bằng một trong hai cách:

+ Kiểm tra mẫu tươi: như điều 7.1.1.1 của TCVN 12195-1:2019

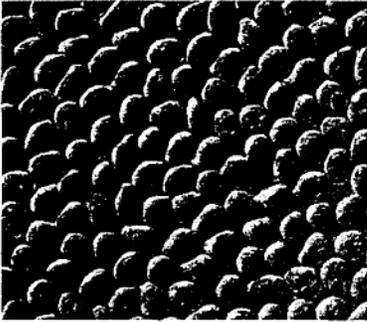
+ Cố định tiêu bản lam: Làm tiêu bản lam như điều 7.1.1.2 của TCVN 12195-1:2019

- Quan sát dưới kính hiển vi (3.3) đặc điểm hình thái nấm và so sánh với đặc điểm hình thái của nấm *Puccinia psidii* G. Winter (điều 7.1.2).

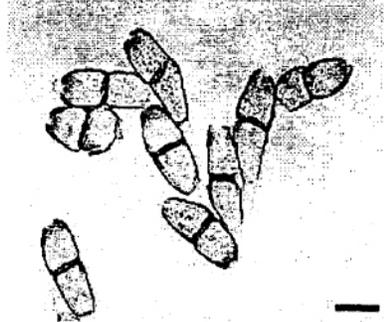
### 7.1.2 Đặc điểm hình thái định loại của nấm *Puccinia psidii* G. Winter

Ổ bào tử hạ kích thước 0,1 mm đến 0,5 mm, màu vàng khi còn non sau đó chuyển thành màu xám nhạt. Vết bệnh chủ yếu ở mặt dưới của lá. Bào tử hạ có thể hình cầu, ô van hoặc hình trứng màu vàng, kích thước (14 đến 27)  $\mu\text{m}$  x (14 đến 29)  $\mu\text{m}$ , gai nhọn đều (hình 1)

Ổ bào tử đông kích thước 0,1 mm đến 0,5 mm, màu nâu vàng. Bào tử đông kích thước (22 đến 50)  $\mu\text{m}$  x (14 đến 28)  $\mu\text{m}$ , hình ống hoặc ô van, màu nâu vàng, 2 tế bào, thắt lại ở vách ngăn, có cuống không màu (hình 2)



Hình 1- Bào tử hạ của nấm  
*Puccinia psidii* G. Winter



Hình 2- Bào tử đông của nấm  
*Puccinia psidii* G. Winter

## 7.2 Giám định bệnh bằng PCR

### 7.2.1 Tách chiết DNA

DNA của nấm có thể tách chiết bằng kit thương mại hoặc có thể tách chiết bằng phương pháp sau:

Bước 1: Dùng kim khâu nấm (3.1) thu bào tử của nấm (bào tử đông hoặc bào tử hạ) hoặc dùng dao (3.2) cắt một mẫu mô lá (kích thước 5 mm x 5mm) có chứa ổ bào tử cho vào ống effendorf 1,5 ml (3.4).

Bước 2: Nghiền nhỏ mô hoặc bào tử bằng chày nhựa (3.8) trong Nitơ lỏng (4.1).

Bước 3: Thêm 250  $\mu\text{l}$  dịch chiết nấm (xem phụ lục B.1). Ủ ở nhiệt độ 65 °C trong 1 giờ.

Bước 4: Đặt trong máy ly tâm (3.7), ly tâm tốc độ 12 000 vòng/phút trong 15 phút,

Bước 5: Chuyển 200  $\mu\text{l}$  dịch nổi thu được vào ống effendorf 1,5 ml (3.4) mới, thêm vào ống 7  $\mu\text{l}$  dung dịch Silica (xem phụ lục B.4), 800  $\mu\text{l}$  dung dịch NaI (xem phụ lục B.2). Trộn đều bằng máy trộn dịch (3.5). Ủ trên đá 15 phút, lắc đều sau mỗi 5 phút.

Bước 6: Đặt trong máy ly tâm (3.7), ly tâm 10 giây, loại bỏ phần dịch nổi, thu kết tủa. Hòa tan phần kết tủa trong 800  $\mu\text{l}$  dung dịch rửa (xem phụ lục B.3)

## TCVN12195-2-12:2020

Bước 7: Đặt trong máy ly tâm (3.7), ly tâm 10 giây, loại bỏ phần dịch nổi, thu kết tủa. Hòa tan phần kết tủa trong 800 µl trong ethanol 99,5 % (4.2)

Bước 8: Đặt trong máy ly tâm (3.7), ly tâm tốc độ 3 000 vòng/phút trong 10 giây, loại bỏ phần dịch nổi, thu kết tủa. Úp ngược ống effendorf 1,5 ml (3.4) để khô trên khay men (3.9).

Bước 9: Hòa tan kết tủa thu được ở bước 8 trong 25 µl dung dịch TE (xem phụ lục B.5). Ủ ống ở nhiệt độ 45 °C trong 10 phút.

Bước 10: Đặt trong máy ly tâm (3.7), ly tâm tốc độ 12 000 vòng/phút trong 1 phút đến 2 phút. Kết thúc, chuyển phần dịch nổi sang một ống mới (3.4).

Bước 12: Hòa loãng dịch thu được bằng TE (xem phụ lục B.5) ở tỉ lệ 1/20.

### 7.2.2 Nhân gen

Sử dụng một trong những cặp mồi đặc hiệu sau đây:

Cặp mồi 1 (Gardes and Bruns (1993)):

- ITS1-F (CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A)

- ITS4 (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC)

Cặp mồi 2 (Gardes and Bruns (1993); Kropp et al. (1995) ):

- ITS1-F (CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A)

- ITS-Rust1 (GCT TAC TGC CTT CCT CAATC)

Cặp mồi 3 (da S. Machado et al. (2015))

- Ppsi-BtubF (CTT TTG GTT CAC TCT TCA GAC C)

- Ppsi-BtubR (AGA TGA TAA AAG ACT ACT GAC TCC)

Cặp mồi 4 (da S. Machado et al. (2015))

- PPEFF (AAG GAT GCT GCT GAC ATG GGC)

- PPEFR (ATC CCG AAA TGG GGA CAA AAG G)

Chu trình nhiệt sử dụng:

Đối với cặp mồi 1, 3, 4:

Nhiệt độ	Thời gian	
94 °C	3 phút	
94 °C	30 giây	30 chu kỳ
55 °C	30 giây	
72 °C	30 giây	
72°C	10 phút	

Đối với cặp mồi 2:

Nhiệt độ	Thời gian	
94 °C	3 phút	
94 °C	30 giây	30 chu kỳ
44 °C	30 giây	

72 °C	30 giây	
72°C	10 phút	

### 7.2.3 Đọc kết quả

- Điện di bằng agarose gel 1,5 % (4.3)
- Mẫu dương tính sẽ cho đoạn gen có kích thước: 700 pb đối với cặp mồi 1; 816 bp đối với cặp mồi 2; 635 bp đối với cặp mồi 3; 1 240 pb đối với cặp mồi 4.

## 7.3 Giám định bằng phương pháp nested PCR

### 7.3.1 Tách chiết DNA

Tách chiết DNA theo điều 7.2.1

### 7.3.2 Nhân gen

Sử dụng 2 cặp mồi sau (Langrell et al. (2008)):

Cặp mồi 1

- Ppsi1 TTC TAC CTT ATT ACA TGT AGC T
- Ppsi6 GTC ATA TTG ACA GGT TAG AAG C

Và cặp mồi 2

- Ppsi2 ATA GTA ATT TGG TAT ACG TGG C
- Ppsi4 GTC AAT CCA AAT CAA AGT ATG

Chu trình nhiệt sử dụng:

Nhiệt độ	Thời gian	
94 °C	3 phút	
94 °C	30 giây	30 chu kỳ
57 °C	30 giây	
72 °C	30 giây	
72°C	10 phút	

### 7.3.3 Đọc kết quả

- Điện di bằng agarose gel 1,5 % (4.3)
- Mẫu dương tính sẽ cho đoạn gen có kích thước 379 pb

## 7.4 Giám định bằng phương pháp real-time PCR

### 7.4.1 Tách chiết DNA

Tách chiết DNA theo điều 7.2.1

### 7.4.2 Nhân gen

Các mồi sử dụng

*A. psidii* rDNA ITS1 (Baskarathevan et al. (2016)):

- PpsiITS1F (GTA GCT TTA TTG AAA CAT AGT AA)
- PpsiITS1R TGA TTT TAG ACA ATA ATA ATA AGG G

## TCVN12195-2-12:2020

- PpsiITS1P FAM-AGA TTA ATA TCT TTG CCA CGT ATA CCA-BHQ1

Host cytochrome oxidase (Weller et al. (2000))

- COX-F CGT CGC ATT CCA GAT TAT CCA

- COX-R CAA CTA CGG ATA TAT AAG AGC CAA AAC TG

- COX-P CAL Fluor Red 610-TGC TTA CGC TGG ATG GAA TGC CCT-BHQ2

Chu trình nhiệt sử dụng:

Nhiệt độ	Thời gian	
95 °C	3 phút	
95 °C	30 giây	20 chu kỳ
59 °C	30 giây	

### 7.4.3 Đọc kết quả

Chỉ số Ct của phản ứng dương tính từ 0,8 đến 1,6

### 7.5 Kết luận

Mẫu giám định được kết luận là loài *Puccinia psidii* G. Winter khi:

- Nấm có đặc điểm hình thái phù hợp với các đặc điểm đã nêu ở điều 7.1.2.

Hoặc

- Có kết quả dương tính với phương pháp giám định bằng PCR

Hoặc

- Có kết quả dương tính với phương pháp giám định bằng Nested PCR

Hoặc

- Có kết quả dương tính với phương pháp giám định bằng Real-time PCR

## 8 Báo cáo kết quả

Nội dung phiếu kết quả giám định gồm những thông tin cơ bản sau:

- Thông tin về mẫu giám định.
- Phương pháp giám định
- Người giám định/cơ quan giám định
- Kết quả giám định: Tên khoa học của loài

Phiếu giám định chi tiết tham khảo phụ lục C.

## Phụ lục A

(Tham khảo)

### Thông tin chung

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

Tên tiếng Việt: Bệnh rỉ sắt bạch đàn

Tên khoa học: *Puccinia psidii* G. Winter

Tên khác:

*Bullaria psidii* (G. Winter) Arthur & Mains

*Dicaeoma psidii* (G. Winter) Kuntze

*Uredo rangelii* J.A. Simpson, K. Thomas & C.A. Grgurinovic

*Austropuccinia psidii* (G. Winter) Beenken

Vị trí phân loại:

Lớp: Pucciniomycetes.

Bộ: Pucciniales

Họ: Sphaerophragmiaceae

#### A.2 Phân bố

Trong nước: Chưa có mặt ở Việt Nam

Trên thế giới: **Châu Á:** China, Japan, India, Taiwan, Indonesia; **Châu Mỹ:** USA, Mexico, Costa Rica, Cuba, Dominica, Dominican Republic, El Salvador, Guatemala, Panama, Puerto Rico, Trinidad and Tobago, United States Virgin Islands, Argentina, Colombia, Ecuador, Paraguay, Venezuela, Jamaica, Brazil, Uruguay, British Virgin Islands; **Châu Đại Dương:** Australia, New Caledonia, New Zealand; **Châu Phi:** Nam Phi

#### A.3 Ký chủ

*Corymbia citriodora*, *Corymbia maculata*, *Corymbia torelliana*, *Eucalyptus* (chi Bạch đàn) *Eucalyptus botryoides*, *Eucalyptus camaldulensis*, *Eucalyptus cladocalyx*, *Eucalyptus cloeziana*, *Eucalyptus deglupta*, *Eucalyptus globulus*, *Eucalyptus gomphocephala*, *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus microcorys*, *Eucalyptus nitens*, *Eucalyptus paniculata*, *Eucalyptus pellita*, *Eucalyptus pilularis*, *Eucalyptus punctata*, *Eucalyptus robusta*, *Eucalyptus saligna*, *Eucalyptus tereticornis*, *Psidium* (chi ổi), *Psidium guajava* (ổi), *Syzygium cumini*, *Syzygium jambos* (doi), *Acca*, *Agonis*, *Allosyncarpia*, *Angophora*, *Archirhodomyrtus*, *Arillastrum*, *Astartea*, *Asteromyrtus*, *Austromyrtus*, *Backhousia*, *Baeckea*, *Barongia*, *Beaufortia*, *Callistemon*, *Calycorectes*, *Calytrix*, *Campomanesia*, *Chamelaucium*, *Cloezia*

#### A.4 Đặc điểm sinh học

Bào tử hạ nảy mầm khi có sự hiện diện của giọt nước trong điều kiện không có ánh sáng và nhiệt độ từ 15 °C đến 25 °C. Sau khi nảy mầm, các ống mầm xâm nhập trực tiếp vào kí chủ và thường

## **TCVN12195-2-12:2020**

vào giữa hai tế bào biểu bì. Thời kỳ tiềm dục khoảng 5 đến 7 ngày. Các đốm rỉ sắt trưởng thành và giải phóng bào tử sau khoảng 10 đến 12 ngày.

Bệnh phát triển mạnh nhất ở điều kiện nhiệt độ thấp (khoảng 20 °C), độ ẩm cao (80 %) vào ban đêm và có nhiều bào tử trong không khí. Bào tử nấm cũng cần phải tiếp xúc được với cây trong thời kỳ sinh trưởng hay bật lộc.

Bào tử hạ cần nhiệt độ trung bình (8 °C đến 27 °C, thích hợp nhất là từ 13 °C đến 22 °C) để nảy mầm. Điều kiện ánh sáng yếu cũng thúc đẩy quá trình này. Tỷ lệ nảy mầm tăng đáng kể nếu thời gian tối là hơn 8 giờ. Sinh lý học của cây và phản ứng của chúng với khí hậu quan trọng hơn là khả năng của nấm nói riêng.

**Phụ lục B**

(Quy định)

**Dung dịch****B. 1 Dịch chiết nấm**

Tris – HCl, pH 8,5 (4.4)	200 mM
NaCl (4.5)	250 mM
EDTA (4.6)	25 mM
SDS (4.7)	0,5 %

Hòa tan hoàn toàn các thành phần vào Tris-HCl (4.4) (trừ SDS). Thêm SDS trước khi sử dụng.

**B.2 Dung dịch NaI**

NaI (4.8)	100 g
NaSO <sub>3</sub> (4.9)	1,5 g
Nước cất (4.10)	100 ml

Hòa tan hoàn toàn các thành phần vào nước, lọc dung dịch bằng giấy lọc (4.15), bảo quản trong lọ kín (3.6) ở điều kiện 4 °C.

**B.3 Đệm muối phosphat**

NaCl (4.5)	8 g
KCl (4.11)	0,2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (4.12)	1,44 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (4.13)	0,24 g

Hòa tan hoàn toàn các thành phần vào 1000 ml nước cất (4.10). Chỉnh pH đến 7,4.

**B.4 Dung dịch Silica**

Silica (4.14)	10 g
Đệm muối phosphat (B.3)	100 ml

## TCVN12195-2-12:2020

Trộn đều các thành phần, để lắng trong 2 giờ. Loại bỏ dịch nổi phía trên. Lặp lại 2 đến 3 lần.

Ly tâm tốc độ 3 000 vòng/phút trong 2 phút. Trộn đều với 10 ml dung dịch TE

### B.5 Dung dịch TE

Tris-HCl (4.4)	10 mM
EDTA (4.6)	1 mM

Hòa tan hoàn toàn các thành phần vào Tris-HCl (4.4)

### B.6 Dung dịch rửa

Tris – HCl, pH 8,5 (4.4)	10 mM
NaCl (4.5)	100 mM
EDTA (4.6)	1mM
Ethanol 99,5 % (4.2)	50 %

Hòa tan hoàn toàn các thành phần vào Tris-HCl (4.4) (trừ Ethanol 99,5 %). Thêm Ethanol 99,5 % trước khi sử dụng.



**Thư mục tài liệu tham khảo**

- [1] CABI (2018), *Crop Protection Compendium*.
  - [2] Commonwealth Mycological Institute (1983), *Plant Pathologist's Pocketbook*.
  - [3] IPPC (2006), *ISPM 27 Diagnostic protocols for regulated pests*.
  - [4] 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.
  - [5] Viện Nấm học quốc tế IMI (1994), *Kỹ thuật chẩn đoán và giám định bệnh hại cây trồng*, Lớp tập huấn 08-15/12/1994, tại Viện Bảo vệ thực vật, Hà Nội.
-