

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 12195-2-13:2020

Xuất bản lần 1

**QUY TRÌNH GIÁM ĐỊNH NẤM GÂY BỆNH THỰC VẬT
PHẦN 2-13: YÊU CẦU CỤ THỂ ĐỐI VỚI NẤM
Polyscytalum pustulans (M.N. Owen & Makef) M.B Ellis**

*Procedure for identification of plant disease caused by fungi
Part 2-13: Particular requirements for *Polyscytalum pustulans* (M.N. Owen & Makef)
M.B Ellis*

HÀ NỘI – 2020

Lời nói đầu

TCVN 12195-2-13:2020 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 2-13: Yêu cầu cụ thể đối với nấm *Polyscytalum pustulans* (M.N. Owen & Makef) M.B Ellis

Procedure for identification of plant disease caused by fungi

Part 2-13: Particular requirements for Polyscytalum pustulans (M.N. Owen & Makef) M.B Ellis

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định các yêu cầu cụ thể đối với quy trình giám định nấm *Polyscytalum pustulans* (M.N. Owen & Makef) M.B Ellis 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: Quy định 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 Kính hiển vi: có độ phóng đại từ 40 lần đến 1 000 lần

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).

5 Lấy mẫu và bảo quản mẫu

5.1 Lấy mẫu

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

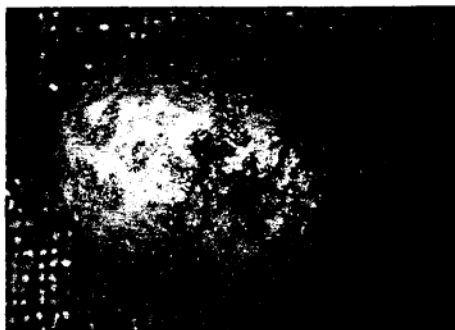
5.2 Bảo quản mẫu giám định

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

- + Củ khoai tây bảo quản tươi hoặc ép khô (phần vỏ củ) theo điều 5.2.1 của TCVN 12195-1:2019
- + Tiêu bản lam giám định theo điều 5.2.4 của TCVN 12195-1:2019

6 Phát hiện bệnh

Triệu chứng bệnh do nấm *Polyscytalum pustulans* trên củ là các đốm nhỏ màu đen hoặc tím hơi nổi lên. Các đốm này có thể riêng lẻ hay mọc thành đám. Đốm bệnh tập trung quanh mắt củ, sẹo rễ hoặc vết thương cơ giới. Các đốm có thể ăn sâu 1 đến 2 mm vào trong thịt củ. Xung quanh các vết bệnh có thể hóa bần. (Hình 1)



Hình 1- Ví dụ triệu chứng của nấm *Polyscytalum pustulans* (M.N. Owen & Makef) M.B Ellis trên củ khoai tây

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 bằng đặc điểm hình thái

7.1.1 Kiểm tra trực tiếp

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

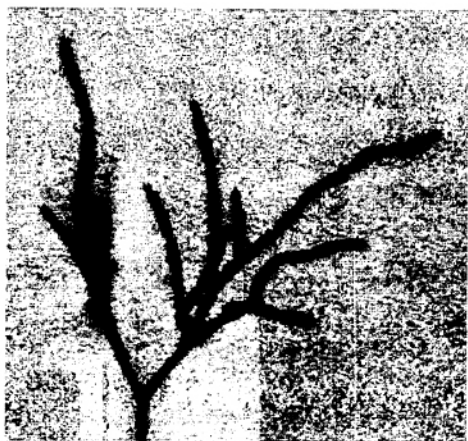
+ Kiểm tra mẫu tươi: theo điều 7.1.1.1 của TCVN 12195-1:2019

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

- Quan sát dưới kính hiển vi (3.1) đặc điểm hình thái nấm và so sánh với đặc điểm hình thái của nấm *Polyscytalum pustulans* (M.N. Owen & Makef) M.B Ellis (điều 7.1.2).

7.1.2 Đặc điểm định loại hình thái của nấm *Polyscytalum pustulans* (M.N. Owen & Makef) M.B Ellis

Tảo nấm trên môi trường màu trắng tới xám. Cành bào tử kích thước (2 đến 4) μm x 14 μm . Phần gốc cành bào tử có màu nâu nhạt, đôi khi có thể phình to. Bào tử phân sinh không màu, nhẵn, hình ống và thường không phân bào, kích thước (6 đến 8) μm x (2 đến 3) μm . Bào tử phân sinh tạo thành chuỗi dễ rời rạc (hình 2)



Hình 2- Bào tử và cành bào tử

của nấm *Polyscytalum pustulans* (M.N. Owen & Makef) M.B Ellis

7.2 Giám định bằng phương pháp real-time PCR

7.2.1 Tách chiết DNA

DNA được tách chiết theo điều 7.2.1 của TCVN 12195-1:2019

7.2.2 Nhân gen

Các môi sử dụng (Lee, 2009)

Forward primer PpustF1 AGCGCCCCACAGAAGCC

Reverse primer PpustR2 GACCGAACTTCTCCGAGAGGT

Probe PpustPr1 CGGCTCTAAACCCTACCGAAGTAGGGTAGC

Chu trình nhiệt sử dụng:

Nhiệt độ	Thời gian	
95 °C	3 phút	
95 °C	30 giây	20 chu kỳ
65 °C	30 giây	

7.2.3 Đọc kết quả

Phản ứng được nhận biết là dương tính khi xuất hiện đường cong tuyến tính thể hiện sự nhân lên của gen.

7.3 Kết luận

Mẫu giám định được kết luận là loài *Polyscytalum pustulans* (M.N. Owen & Makef) M.B Ellis 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 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 kết quả giám định chi tiết tham khảo phụ lục B.

Phụ lục A

(Tham khảo)

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

Tên tiếng Việt: Bệnh đốm củ khoai tây

Tên khoa học: *Polyscytalum pustulans* (M.N. Owen & Wakef.) M.B. EllisTên khác: *Oospora pustulans* M.N. Owen & Wakef.

Vị trí phân loại:

Ngành: Ascomycota

Giống: *Polyscytalum***A.2 Phân bố**

Trong nước: Chưa có mặt ở Việt Nam

Trên thế giới: **Châu Á:** Iran; **Châu Phi:** South Africa; **Châu Mỹ:** Canada, USA; **Châu Âu:** Estonia, Germany, Ireland, Lithuania, Norway, Romania, Russian Federation, UK; **Châu Đại Dương:** Australia, New Zealand.

A.3 Ký chủ*Solanum tuberosum* (khoai tây), *Solanum* (chi cà)**A.4 Đặc điểm sinh học**

Các củ bị nhiễm bệnh là nguồn bệnh quan trọng trong lô củ giống hoặc trong kho chứa. Nấm lây lan và sản sinh bào tử ở phần gốc thân trước, sau đó là rễ củ, các rễ gần củ cái và sau đó lan rộng ra. Các củ nhiễm bệnh thường nhiễm bệnh ở chồi hoặc mắt củ hơn là ở trên vỏ củ. Bệnh phát triển dễ dàng ở các mô bị mất biểu bì. Củ gần củ cái nhất và phần gốc thân, thường nhiễm sớm hơn các phần ở xa. Khả năng xâm nhiễm tăng lên về cuối vụ. Khả năng xâm nhiễm của bệnh trên đất nặng tốt hơn đất nhẹ. Bệnh cũng có thể lây lan khi nhiệt độ mát và ẩm ướt khi thu hoạch. Các củ nhiễm bệnh thường không biểu hiện triệu chứng khi thu hoạch. Bệnh có thể xâm nhiễm sâu hơn vào củ, đặc biệt là phần mắt củ ở trong kho bảo quản trong điều kiện ẩm. Nấm có thể tồn tại hơn 6 tháng trong đất khô trong kho chứa và có thể phát tán vào không khí. Các củ khỏe có thể bị xâm nhiễm bởi những bào tử này.

Bệnh thường phát triển sau khi bảo quản 1 đến 2 tháng mặc dù bệnh có thể biểu hiện triệu chứng trên các củ được thu hoạch muộn. Nấm có thể tìm thấy trong đất 04 năm sau khi trồng khoai tây và vẫn có thể gây bệnh cho củ khỏe. Vi hạch có thể tìm thấy ở các đĩa môi trường cấy lâu ngày và trên các mô bệnh ở phần gốc thân và các củ giống thối. Hạch nấm được hình thành từ các vòng

TCVN 12195-2-13:2020

sợi nấm và các tàn dư. Hạch vẫn có khả năng nảy mầm sau 7 năm chôn vùi trong đất và gây bệnh nghiêm trọng trên đồng ruộng.

Phụ lục B

(Tham khảo)

Mẫu phiếu kết quả giám định

Cơ quan giám định

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM

Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

..... ngày ... tháng ... năm 20....

PHIẾU KẾT QUẢ GIÁM ĐỊNH

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 TCVN 12195-2-13:2020. Quy trình giám định nấm gây bệnh thực vật – Phần 2-13: Yêu cầu cụ thể đối với nấm *Polyscytalum pustulans* (M.N. Owen & Wakef.) M.B Ellis
 13. Kết quả giám định:
- Tên tiếng Việt: Bệnh đốm củ khoai tây
- Tên khoa học: *Polyscytalum pustulans* (M.N. Owen & Wakef.) M.B. Ellis
- Tên khác: *Oospora pustulans* M.N. Owen & Wakef. Vị trí phân loại:
- Ngành: Ascomycota
- Giống: *Polyscytalum*

TRƯỞNG PHÒNG KỸ THUẬT

(hoặc người giám định)

(kỹ, ghi rõ họ và tên)

THỦ TRƯỞNG ĐƠN VỊ

(ký, ghi rõ họ và tên, đóng dấu)

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*, Lớ tập huấn 08-15/12/1994, tại Viện Bảo vệ thực vật, Hà Nội.
 - [6] <https://gd.eppo.int/taxon/PLSCPU>
 - [7] Diseases, Pests and Disorders of Potatoes: A Color Handbook, 2008, Stuart J. Wale, Harold William Platt, Nigel D. Cattlin
-