



CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM

QCVN 01 - 161 : 2014/BNNPTNT

**QUY CHUẨN KỸ THUẬT QUỐC GIA
VỀ QUY TRÌNH GIÁM ĐỊNH BỆNH THỐI LOÉT CÀ CHUA
Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis*
(Smith) Davis et al. LÀ DỊCH HẠI KIỂM DỊCH THỰC VẬT
CỦA VIỆT NAM**

*National technical regulation on Procedure for identification
of tomato canker (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*
(Smith) Davis et al.) – Plant Quarantine pest of Vietnam*

HÀ NỘI - 2014

Lời nói đầu

QCVN 01 - 161 : 2014/BNNPTNT do Trung tâm giám
định kiểm dịch thực vật biên soạn, Cục Bảo vệ thực vật
trình duyệt, Bộ Nông nghiệp & PTNT ban hành tại
Thông tư số 16/TT-BNNPTNT ngày 05 tháng 6
năm 2014.

QUY CHUẨN KỸ THUẬT QUỐC GIA
VỀ QUY TRÌNH GIÁM ĐỊNH BỆNH THỐI LOÉT CÀ CHUA
Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* (Smith) Davis et
 al. LÀ DỊCH HẠI KIỂM DỊCH THỰC VẬT CỦA VIỆT NAM

*National technical regulation on Procedure for identification
 of tomato canker (Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis
 (Smith) Davis et al.) – 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 thối loét cà chua (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis et al.) 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 thối loét cà chua (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis et al.) 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. Xét nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzyme ((Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay - ELISA) hay (Enzyme Immuno Assay - EIA)

Là một kỹ thuật sinh hóa để phát hiện kháng thể hay kháng nguyên trong mẫu cần phân tích.

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

Là một kỹ thuật 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 gia TCVN 4731:89¹ "Kiểm dịch thực vật - phương pháp lấy mẫu", quy chuẩn kỹ thuật quốc gia QCVN 01-21:2010/BNNPTNT¹ "Phương pháp kiểm tra củ, quả xuất nhập khẩu và quá cảnh", QCVN 01-23:2010/BNNPTNT¹ "Phương pháp kiểm tra các loại hạt xuất, nhập khẩu và quá cảnh", QCVN 01-22:2010/BNNPTNT¹ "Phương pháp kiểm tra cây 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 về phương pháp điều tra phát hiện dịch hại cây trồng

2.1.2. Bảo quản mẫu

Các bộ phận tươi có triệu chứng bệnh (cành, lá, thân, quả...) 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.

2.2. Thiết bị, dụng cụ, hoá chất

Máy ly tâm, máy lắc, tủ sấy, tủ định ôn, cân điện tử, máy ủ, máy rửa, bể ổn nhiệt, hệ thống ELISA, PCR, máy điện di, hệ thống chụp ảnh, tủ lạnh và tủ âm sâu.

Bộ dao, kim giải phẫu, panh, kéo, bộ micro pipet, túi ni-lông, bản ELISA

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

Na_2CO_3 , NaHCO_3 , NaN_3 , NaCl , KCl , $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{HN}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_2$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , Na_2HPO_4 , NaOH ,

Cồn tuyệt đối, cồn 70% nước cất vô trùng, Tween 20, glycerol, ethyllum bromide, agarose, cycloheximide. môi trường NGA (Nutrient Glucose Agar) hoặc YPGA (Yeast Peptone Glucose Agar). Kít PCR, kháng thể

2.3. Phương pháp phát hiện và giám định bệnh

2.3.1. Phát hiện và thu thập mẫu bệnh

Trên lá, vết bệnh ban đầu là những đốm màu xanh nhợt có dạng giọt dầu ở phần phiến lá giữa các gân lá. Các vết này nhanh chóng khô đi tạo ra các vết chết hoại có màu trắng hoặc màu nâu (hình 1, phụ lục 1). Khi bệnh từ phiến lá xâm nhiễm vào hệ thống mạch dẫn một số lá chết ở một phía của lá kép bị héo rũ (hình 2, phụ lục 1).

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.

Trên thân cây, triệu chứng bệnh có thể là các sọc vàng, đôi khi thân bị nứt dọc theo các đốt thân (hình 3, phụ lục 1). Bó mạch của các cây nhiễm bệnh có màu vàng sậm hoặc nâu (hình 4, phụ lục 1).

Trên quả, triệu chứng thường bắt đầu từ những đốm nhỏ hơi lồi lên, vết bệnh có viền hoặc quầng trắng. Các vết bệnh phát triển to ra và có màu nâu ở tâm vết bệnh tạo ra dạng "mắt chim" (hình 5, phụ lục 1).

Trên hạt, bệnh không biểu hiện triệu chứng.

2.3.2. Phân lập vi khuẩn

2.3.2.1. Tách chiết vi khuẩn

Tách chiết vi khuẩn từ mô cây (lá, thân, quả): Cắt một đoạn mô cây đã được khử trùng bề mặt bằng cồn 70° ngâm trong nước cất vô trùng 30 phút hoặc nghiền nhỏ mô cây trong nước cất vô trùng.

Tách chiết vi khuẩn từ hạt: Lượng mẫu tối thiểu để tách chiết là 2.000 hạt (khoảng 7g). Hạt được cho vào bình tam giác có chứa 20ml dịch chiết hạt (phụ lục 2) và lắc mạnh bằng tay trong 20-30 giây. Sau đó, đưa bình tam giác có dịch chiết hạt lên máy lắc và lắc trong 36-48 giờ với tốc độ 150 vòng/phút.

2.3.2.2. Phân lập vi khuẩn trên môi trường nhân tạo

Trải đều 1ml dịch chiết thu được từ mô cây hoặc từ hạt trên môi trường bán đặc hiệu và nuôi cấy ở 26°C trong 8 ngày. Theo dõi sự xuất hiện của khuẩn lạc. Khuẩn lạc của vi khuẩn *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* có màu vàng sáng, phồng, có dạng tròn đôi khi có dạng bất định.

Các khuẩn lạc điển hình được cấy truyền trên môi trường NGA (Nutrient Glucose Agar) hoặc YPGA (Yeast Peptone Glucose Agar)

2.3.3. Giám định bằng phương pháp ELISA (chỉ áp dụng đối với mẫu quả, cây, vi khuẩn nuôi cấy trên môi trường nhân tạo)

2.3.3.1. Chuẩn bị dịch mẫu

Mẫu mô cây (quả, thân, lá): lấy một mẫu nhỏ mô cây (quả hoặc thân hoặc lá) ngâm trong 1ml nước cất khoảng 15-20 phút. Sau đó nước chứa vi khuẩn được ly tâm 13.000 vòng/phút trong 5 phút thu tủa vi khuẩn. Hoà tan tủa vi khuẩn thu được trong 1ml dung dịch đệm chiết mẫu (phụ lục 2).

Đối với vi khuẩn nuôi cấy trên môi trường nhân tạo: Hoà tan một phần khuẩn lạc trong 1ml dung dịch đệm chiết mẫu.

2.3.3.2. Quy trình giám định bằng phương pháp ELISA

Nhỏ vào mỗi giếng ELISA 100µl dịch mẫu đã chuẩn bị. Bọc bản giếng bằng túi ni-lông ủ ở 37°C qua đêm (khoảng 4-6 giờ). Sau đó, nhỏ thêm vào mỗi giếng 200µl dung dịch đệm cố định mẫu (phụ lục 2). Bọc bản giếng bằng túi ni-lông ủ 30 phút ở nhiệt độ phòng. Rửa giếng bằng đệm rửa (phụ lục 2) ba lần sau đó loại sạch đệm rửa bằng cách vỗ nhẹ bản giếng trên giấy thấm. Thêm vào mỗi giếng 100µl kháng thể. Bọc bản giếng bằng túi ni-lông ủ 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Rửa giếng bằng đệm rửa tám lần sau đó loại sạch đệm rửa bằng cách vỗ nhẹ bản giếng trên giấy thấm. Thêm vào mỗi giếng 100µl Enzym gắn. Bọc bản giếng bằng túi ni-lông ủ 1 giờ ở nhiệt độ phòng.

Rửa giếng bằng đệm rửa tám lần sau đó loại sạch đệm rửa bằng cách vỗ nhẹ bản giếng trên giấy thấm. Thêm vào mỗi giếng 100µl đệm cơ chất (phụ lục 2). Ủ 1 giờ ở nhiệt độ phòng.

Đọc kết quả bằng mắt thường hoặc bằng máy đọc ở bước sóng 405nm.

2.3.4. Giám định bằng phương pháp PCR

2.3.4.1. Tách chiết DNA

Tách chiết DNA từ vi khuẩn đã phân lập (xem mục 2.3.2.2): Dùng que cấy vi khuẩn lấy một khuẩn lạc trên môi trường cho vào ống eppendorf đã chứa 100µl nước cất vô trùng khuấy đều để hoà tan khuẩn lạc. Tiếp theo để ống eppendorf ở nhiệt độ 95°C trong 15 phút trong bể ổn nhiệt sau đó đặt ngay lên đá lạnh. Ly tâm dịch vi khuẩn trong 5-10 giây.

Tách chiết DNA từ dịch vi khuẩn (xem mục 2.3.2.1): Cho 100µl dịch chiết vi khuẩn vào ống eppendorf và để ở nhiệt độ 95°C trong 15 phút trong bể ổn nhiệt sau đó đặt ngay lên đá lạnh. Tiếp theo, ly tâm dịch chiết trong 5-10 giây.

2.3.4.2. Quy trình giám định bằng PCR

Đoạn mồi sử dụng

PSA-4: 5'-TCA TTG GTC AAT TCT GTC TCC C -3'

PSA-R: 5'-TAC TGA GAT GTT TCA CTT CCC C -3'

Chu trình nhiệt :

94°C trong 2,5 phút	Lặp lại 30 chu kì
94°C trong 30 giây	
63°C trong 20 giây	
72°C trong 45 giây	
72°C trong 10 phút	

Đọc kết quả sản phẩm được điện di bằng gel agarose 2% trong đệm TAE, nhuộm bản gel trong dung dịch ethydium bromide và quan sát dưới đèn UV.

Mẫu dương tính cho đoạn gen kích thước 270bp.

III. THẨM ĐỊNH KẾT QUẢ GIÁM ĐỊNH VÀ BÁO CÁO

Sau khi khẳng định kết quả giám định bệnh thối loét cà chua *Clavibacter*

michiganensis subsp. *michiganensis* (Smith) Davis et al. 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).

Đối với đơn vị lần đầu tiên giám định và phát hiện được bệnh thối loét cà chua (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis et al.) phải gửi mẫu hoặc tiêu bản về Trung tâm Giám định kiểm dịch thực vật để thẩm định.

 6

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 thối loét cà chua là dịch hại kiểm dịch thực vật nhóm I của Việt Nam.

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 thối loét cà chua 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 (Israel, Thổ Nhĩ Kỳ, Armenia, Azerbaijan, Trung Quốc, Ấn độ, Indonesia, Iran; Nhật Bản, Hàn Quốc, Syria), Châu Phi (Nam Phi, Ai Cập, Kenya, Madagascar, Togo, Uganda, Zambia, Morocco, Tanzania; Tunisia; Zimbabwe), Châu Mỹ (Canada, Hoa Kỳ, Uruguay, Costa Rica, Cuba, Dominica, Dominican Republic, Grenada; Guadeloupe, Panama; Argentina, Brazil bang Pernambuco, Sao Paulo, Colombia, Peru, Chile, Ecuador), Châu Âu (Pháp, Hy Lạp, Liên bang Nga, Thụy Sĩ, Cộng hoà Séc, Lithuania, Hà Lan, Belarus, Ba Lan, Romania, Tây Ba Nha, Bulgaria, Cyprus, Đức, Hungary, Italy, Serbia, Slovenia, Ukraine, Liên bang Nam Tư...) và Châu Đại Dương (Australia, New Zealand).

1.2. Ký chủ: Ký chủ chính là cây Cà chua *Solanum lycopersicum*, ngoài ra còn gây hại trên ớt ngọt *Capsicum annuum* ký chủ đại họ cà như *Solanum douglasii*, *S. nigrum* and *S. triflorum* (Bradbury, 1986)

2. Tên khoa học và vị trí phân loại

- Tên tiếng Việt :

Bệnh thối loét cà chua

- Tên khoa học:

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* (Smith) Davis et al.

- Tên khác:

Corynebacterium michiganense pv. *michiganense* (Smith) Dye & Kemp

Corynebacterium michiganense (Smith) Jensen

- Vị trí phân loại:

Lớp: Actinobacteria.

Bộ: Actinomycetales

Họ: Microbacteriaceae

Giống: *Clavibacter*

C. michiganensis subsp. *michiganensis* là một vi khuẩn hiếu khí, hình gậy cong, không di động, gram dương.

3. Triệu chứng bệnh thối loét cà chua.

Bonif
8



Hình 1: Triệu chứng trên lá của bệnh thối loét cà chua
(Nguồn: CABI, 2012)



Hình 2: Triệu chứng héo lá một bên của bệnh thối loét cà chua
(Nguồn: CABI, 2012)



Hình 3: Triệu chứng vỡ thân của bệnh thối loét cà chua
(Nguồn: CABI, 2012)



Hình 4: Triệu chứng trên bó mạch của bệnh thối loét cà chua
(Nguồn: CABI, 2012)



Hình 5: Triệu chứng trên quả của bệnh thối loét cà chua
(Nguồn: CABI, 2012)

4. Đặc điểm vi khuẩn gây bệnh thối loét cà chua

C. michiganensis subsp. *michiganensis* là một vi khuẩn hảo khí, gram dương, hình gậy cong, không di động.

Vi khuẩn phát triển chậm trên môi trường nutrient gluco agar (NGA) hoặc yeast peptone glucose agar (YPGA), khuẩn lạc có màu vàng, tròn, sáng, mịn.

Phụ lục 2.**1. Dịch chiết hạt**

Na_2HPO_4 : 4,26 g

KH_2PO_4 : 2,72 g

Nước cất : 1000ml

pH : 7,0

Hoà tan các thành phần trên vào 1.000 ml nước cất khử trùng ở 121°C trong 15 phút. Khử trùng Tween 20 riêng rẽ để nguội tới 60°C. Thêm Tween 20 với nồng độ 0.02%.

Thêm vào 200mg cycloheximide (1.0 ml dung dịch 200 mg/ml trong 70% ethanol)

2. Dung dịch đệm chiết mẫu

Na_2CO_3 : 1,59g

NaHCO_3 : 2,93g

NaN_3 : 0,2g

Hoà tan các thành phần trên trong 1000ml nước cất, chỉnh pH 9,6 bảo quản ở 4°C.

3. Dung dịch đệm rửa

NaCl : 8,0g

Na_2HPO_4 : 1,15g

KH_2PO_4 : 0,2g

KCl : 0,2g

Tween-20 : 0,5g

Hoà tan các thành phần trên trong 1000ml nước cất, chỉnh pH 7,4

4. Dung dịch đệm cố định mẫu

Na_2HPO_4 : 1,15g

KCl : 0,2g

KH_2PO_4 : 0,2g

NaCl : 8,0g

NaN_3 : 0,2g

Hoà tan các thành phần trên trong 930ml nước cất, chỉnh pH 7,4 thêm nước cất cho đủ 1000ml. Trước khi dùng cho thêm 5g sữa khô không béo/lít đệm đã pha.

5. Dung dịch đệm cơ chất

$\text{MgCl}_2.6\text{H}_2\text{O}$: 0,1g

NaN_3 : 0,2g

$\text{HN}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_2$: 97ml

Hoà tan trong 800ml nước, chỉnh pH về 9,8. Thêm nước cất cho đủ 1000ml, bảo quản ở 4°C. Trước khi dùng thêm viên cơ chất để đạt nồng độ 1mg/ml.

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

Cơ quan Bảo vệ
và Kiểm dịch thực vật

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

..... ngày ... tháng ... năm 20.....

PHIẾU KẾT QUẢ GIÁM ĐỊNH

Bệnh thối loét cà chua *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis et al. - 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 - 161 : 2014/BNNTPTNT về "Quy trình giám định bệnh thối loét cà chua *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis et al. là dịch hại kiểm dịch thực vật của Việt Nam".
13. Kết quả giám định :
Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* (Smith) Davis et al.
Lớp: Actinobacteria.
Bộ: Actinomycetales
Họ: Microbacteriaceae
Giống: *Clavibacter*

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)