



CỘNG HOÀ XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM

QCVN 01-35 : 2010/BNNPTNT

**QUY CHUẨN KỸ THUẬT QUỐC GIA
VỀ QUY TRÌNH GIÁM ĐỊNH TUYỂN TRÙNG BÀO NANG
Globodera pallida (Stone, 1973) Behrens, 1975 VÀ
Globodera rostochiensis (Wollenweber, 1923) Behrens,
1975 LÀ DỊCH HẠI KIỂM DỊCH THỰC VẬT CỦA VIỆT NAM**

***National technical regulation on Procedure for identification
of cyst nematodes (*Globodera pallida* (Stone, 1973) Behrens, 1975
and *Globodera rostochiensis* (Wollenweber, 1923) Behrens, 1975)
– Plant quarantine pests of Vietnam***

Lời nói đầu

QCVN 01-35 : 2010/BNNPTNT do Ban soạn thảo *Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về quy trình giám định tuyến trùng bào nang là dịch hại kiểm dịch thực vật của Việt Nam* biên soạn, Cục bảo vệ thực vật trình duyệt, Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn ban hành tại Thông tư số 71/2010/TT-BNNPTNT ngày 10 tháng 12 năm 2010.

QCVN 01-35 : 2010/BNNPTNT được xây dựng nhằm đáp ứng yêu cầu đồng bộ và làm căn cứ áp dụng thống nhất trong công tác kiểm dịch thực vật ở Việt Nam.

**QUY CHUẨN KỸ THUẬT QUỐC GIA
VỀ QUY TRÌNH GIÁM ĐỊNH TUYẾN TRÙNG BÀO NANG
Globodera pallida (Stone, 1973) Behrens, 1975 VÀ
Globodera rostochiensis (Wollenweber, 1923) Behrens, 1975
LÀ DỊCH HẠI KIỂM DỊCH THỰC VẬT CỦA VIỆT NAM**

*National technical regulation on Procedure for identification
of cyst nematodes (*Globodera pallida* (Stone, 1973) Behrens, 1975 and
Globodera rostochiensis (Wollenweber, 1923) Behrens, 1975)
Plant quarantine pests of Vietnam*

I. QUY ĐỊNH CHUNG

1.1. Phạm vi điều chỉnh

Quy chuẩn này quy định Quy trình giám định tuyến trùng bào nang *Globodera pallida* (Stone, 1973) Behrens, 1975 và *Globodera rostochiensis* (Wollenweber, 1923) Behrens, 1975 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 mọi tổ chức, cá nhân Việt Nam hoặc nước ngoài có hoạt động liên quan đến lĩnh vực bảo vệ và kiểm dịch thực vật tại Việt Nam (viết tắt là KDTV) thực hiện giám định tuyến trùng bào nang *Globodera pallida* (Stone, 1973) Behrens, 1975 và *Globodera rostochiensis* (Wollenweber, 1923) Behrens, 1975 là dịch hại kiểm dịch thực vật (KDTV) nhóm I thuộc Danh mục dịch hại KDTV của Việt Nam ban hành kèm theo Quyết định số 73/2005/QĐ-BNN ngày 14/11/2005 của Bộ trưởng Bộ Nông nghiệp và PTNT.

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: 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: 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. Tuyến trùng ký sinh thực vật (*phytonematoda*): Là những loài tuyến trùng chủ yếu sống trong đất và có quan hệ chặt chẽ với thực vật đang phát triển. Chúng sống và ký sinh ở tất cả các phần của thực vật bao gồm: rễ, củ, thân, lá và hoa của các thực vật đang phát triển.

1.3.4. Tuyến trùng bào nang: Là loài tuyến trùng ký sinh thuộc họ phụ Heteroderinae, Họ Heteroderidae, Bộ: Tylenchida. Trong quá trình phát triển, tuyến trùng cái phình to dần thành hình cầu, hình quả lê hoặc hình hạt chanh.

Để trứng ngay trong cơ thể, đến thời điểm nhất định, tuyến trùng cái chết trở thành bào nang bảo vệ trứng trước tác động bất lợi của điều kiện ngoại cảnh.

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

1.3.6. Mẫu ban đầu: Là khối lượng mẫu thực vật, sản phẩm thực vật, tàn dư của sản phẩm thực vật hoặc đất được lấy ra từ một vị trí trong lô vật thể.

1.3.7. Mẫu chung: Là mẫu gộp các mẫu ban đầu.

1.3.8. Mẫu trung bình: Là khối lượng thực vật, sản phẩm thực vật, tàn dư của sản phẩm thực vật hoặc đất được lấy từ mẫu chung theo một qui tắc nhất định, dùng làm mẫu lưu và mẫu phân tích.

1.3.9. Mẫu phân tích: Là khối lượng thực vật, sản phẩm thực vật, tàn dư của sản phẩm thực vật hoặc đất được dùng để phân tích, giám định dịch hại trong phòng thí nghiệm.

1.3.10. Tiêu bản: 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.

II. QUY ĐỊNH KỸ THUẬT

2.1. Phương pháp thu thập và bảo quản mẫu

2.1.1. Thu thập mẫu

- Đối với hàng hoá xuất, nhập khẩu, quá cảnh hoặc vận chuyển, bảo quản trong nước: Tiến hành lấy mẫu theo tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 4731-89, Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia QCVN 01-21:2010/BNNPTNT, QCVN 01-22:2010/BNNPTNT, QCVN 01-23:2010/BNNPTNT.

- Đối với cây trồng ngoài đồng ruộng: Lấy mẫu theo phương pháp của qui chuẩn kỹ thuật quốc gia về phương pháp điều tra phát hiện sinh vật hại cây trồng.

2.1.2. Bảo quản mẫu

Mẫu được lưu giữ và bảo quản như sau:

- Các bộ phận tươi có triệu chứng nghi là tuyến trùng (củ và rễ) được để trong các túi ni-lông có lỗ thông khí, có dính nhãn và bảo quản trong tủ lạnh ở nhiệt độ khoảng 5°C.

- Mẫu đất được cho vào túi ni-lông, có lỗ thông khí, có dính nhãn và để khô tự nhiên ở điều kiện nhiệt độ phòng hoặc sấy ở nhiệt độ 35– 40°C cho đến khi đất khô để bào nang dễ dàng tách rời khỏi đất.

- Dung dịch có tuyến trùng được tách ra từ bộ phận bị hại để trong các lọ kín có dán nhãn và bảo quản trong tủ lạnh ở nhiệt độ 5 – 10°C.

- Tiêu bản lam phải có nhãn ký hiệu mẫu, để trong hộp chuyên dụng đựng tiêu bản lam và được bảo quản ở nhiệt độ phòng.

2.2. Thiết bị, dụng cụ, hoá chất dùng làm tiêu bản và giám định

- Kính lúp soi nổi có độ phóng đại 10 – 40 lần (10x – 40x), kính hiển vi có độ phóng đại 40 – 1.000 lần (40x – 1000x).

- Chậu thuỷ tinh có dung tích 4 lít, cốc thuỷ tinh 100ml, chén thuỷ tinh 4ml, đĩa thuỷ tinh, khay men, giấy lọc.
- Kim gắp tuyến trùng, đĩa đồng hồ, kim đâm mẫu, đĩa petri, lam, lamén.
- Rây lọc tuyến trùng có đường kính mắt rây là: 25 m, 75 m, 150 m, 250 m, 700 m, 1.000 m, lưới lọc có đường kính mắt lưới 2mm.
- Máy ly tâm, tủ định ôn, bình hút ẩm
- Dung dịch $ZnSO_4$ hoặc $MgSO_4$ hoặc đường sacarosa (tỷ trọng 1,18), formaldehyde (40%), glycerol (tinh khiết), triethanolamine (tinh khiết), nước cất.

2.3. Phương pháp tách lọc tuyến trùng

2.3.1. Phương pháp tách tuyến trùng bào nang từ các bộ phận của cây

Rửa các bộ phận của cây (rễ, củ) dưới vòi nước thu phần nước rửa và lọc qua rây có đường kính mắt lỗ 0,05-0,1mm. hong khô rây và đưa lên kính lúp soi nổi có độ phóng đại từ 40-70 lần để quan sát và đếm bào nang.

Cắt rễ đã rửa, ngâm trong đĩa Petri có chứa nước. Sau 2-4 giờ, đưa đĩa Petri lên kính lúp soi nổi có độ phóng đại 40 – 70 lần để quan sát bào nang tuyến trùng.

2.3.2. Phương pháp tách tuyến trùng bào nang từ đất

2.3.2.1. Phương pháp giấy lọc Burh: khối lượng mẫu đất từ 5-10gam.

Cho đất vào cốc chứa 0,5 lít nước, cho thêm vào 3-5 giọt dung dịch kiềm bão hoà (NaOH hoặc KOH), khuấy đều.

Đổ hỗn hợp dịch qua rây có đường kính mắt lỗ 2mm để lọc đá, rác.

Lấy giấy lọc cuộn xung quanh mặt trong của cốc thuỷ tinh sao cho 2 mép giấy chồng lên nhau 1cm, đổ dịch lọc vào, khuấy đều theo một chiều trong 3 phút sau đó dừng lại cho bào nang bám vào mép trên giấy lọc.

Lấy nhẹ giấy lọc ra, quan sát trực tiếp bằng kính lúp cầm tay có độ phóng đại 10 lần, để phát hiện những bào nang nổi dính bám vào phần đường thẳng của vòng giấy tiếp giáp giữa giấy lọc với mặt nước hoặc rửa giấy lọc vào một cốc nước sạch, đổ nước đó lên rây có đường kính mắt lỗ 0,05-0,1mm, quan sát bằng kính lúp cầm tay có độ phóng đại 10 lần .

2.3.2.2. Phương pháp dung dịch NaCl

Khối lượng mẫu đất từ 10-100gam.

Pha dung dịch NaCl ở nồng độ 20%.

Cho đất vào dung dịch NaCl trên, khuấy đều cho bào nang nổi lên.

Đổ hỗn hợp dịch nói trên qua rây có đường kính mắt lỗ 2mm để lọc đá, rác.

Đổ hỗn hợp dịch trên qua rây có đường kính mắt lỗ 0,05-0,1mm để giữ lại bào nang.

Quan sát bào nang thu được bằng kính lúp cầm tay có độ phóng đại 10 lần

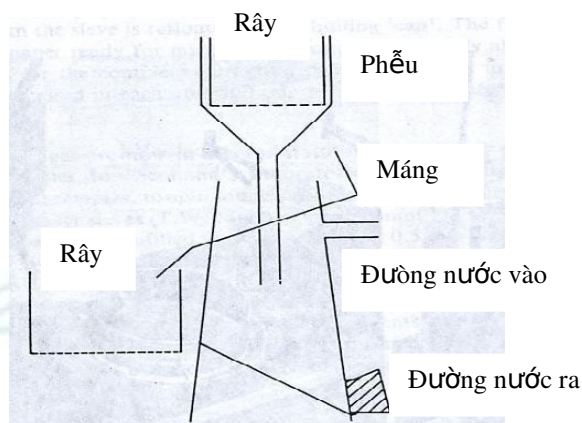
2.3.2.3. Phương pháp bình lọc Fenwick (hình 1)

Khối lượng mẫu đất từ 100-200 gam.

Đổ đất vào rây có đường kính mắt lỗ 2mm, xối nước trực tiếp vào đất để đất tan vào bình cho đến khi lượng nước gần đầy bình, loại bỏ phần cặn trên rây.

Mở vòi bình lọc với tốc độ chảy vừa phải sao cho các hạt đất tiếp tục chìm xuống còn bào nang nổi lên trên mặt nước và tràn qua miệng bình theo một máng dẫn xuống rây thu bào nang có đường kính mắt lỗ 0,05-0,1mm phía dưới.

Hong khô rây ở nhiệt độ phòng, thu bào nang quan sát và đếm.



Hình 1. Bình Fenwick để tách bào nang trong đất

2.4. Phương pháp làm tiêu bản tuyến trùng

2.4.1. Dung dịch bảo quản tuyến trùng

Tuyến trùng ký sinh thực vật thu được từ một trong các phương pháp tách lọc nêu trên được đưa vào một trong ba loại dung dịch dưới đây để **bảo quản** tuyến trùng.

* Chú ý: để tiêu bản tuyến trùng giữ được hình dáng đặc trưng, trước khi cho vào **dung dịch bảo quản** nên xử lý nhiệt tuyến trùng bằng nước ở nhiệt độ 70–80°C trong 5 phút.

- Dung dịch 1: Formalin

Dung dịch Formadehyde 4%.

- Dung dịch 2: Formalin - glycerol (FG)

Formalin (40%) Formaldehyde): 10ml

Glycerol: 01ml

Nước cất: 89ml

- Dung dịch 3: TAF

Triethanolamine: 02ml

Formalin (40% formaldehyde): 07ml

Nước cất: 91ml

2.4.2. Phương pháp xử lý và làm tiêu bản tuyến trùng

2.4.2.1. Phương pháp xử lý tuyến trùng

- Dung dịch xử lý:

Dung dịch 1:	Cồn (96%)	20ml
	Glycerol	01ml
	Nước cất	79ml
Dung dịch 2:	Cồn (96%)	95ml
	Glycerol	05ml

- Cách tiến hành:

Gấp tuyến trùng từ dung dịch bảo quản vào chén thuỷ tinh có chứa 0,5ml dung dịch xử lý (dung dịch 1). Đặt chén này trong bình hút ẩm đầy kín có chứa 1/10 thể tích cồn 96°. Bình hút ẩm được đặt trong tủ ẩm ở điều kiện nhiệt độ 40°C với thời gian tối thiểu là 12 giờ.

Lấy chén thuỷ tinh ra khỏi bình hút ẩm, thêm dung dịch 2. Đây nắp một phần miệng chén để cồn bay hơi từ từ. Chén thuỷ tinh có chứa tuyến trùng tiếp tục giữ trong tủ ẩm ở 40°C. Sau 2-3 giờ bổ sung thêm dung dịch 2 vào chén thuỷ tinh cho gần đầy, làm lại 2 – 3 lần. Sau khi tuyến trùng chỉ còn lại trong Glycerol có thể sử dụng làm tiêu bản được.

Hoặc đặt chén thuỷ tinh chứa tuyến trùng trong glycerol nguyên chất trên trong bình hút ẩm có chứa vôi. Bảo quản lâu dài để làm tiêu bản cố định.

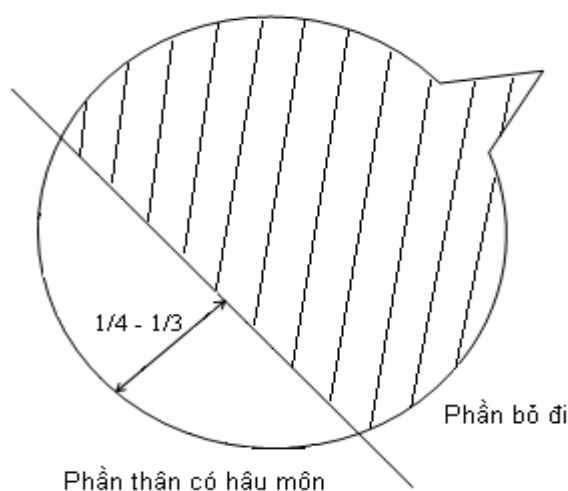
2.4.2.2. Phương pháp làm tiêu bản

Lấy lam kính sạch và làm vòng parapin hoặc sáp ong (đường kính khoảng 1cm) trên lam kính. Cho 1 giọt glycerol nguyên chất vào giữa vòng parapin hoặc sáp ong. Dùng kim gấp, gấp tuyến trùng (đã xử lý trong dung dịch cố định) đặt vào giữa giọt glycerol, chỉnh cho các cá thể tuyến trùng nằm cùng một hướng. Đây lamen và đặt lam kính trên bàn nhiệt cho parapin hoặc sáp ong tan chảy. Nhấc nhanh lam kính và đặt ra chỗ mát. Gắn keo bảo vệ.

2.4.2.3. Phương pháp làm tiêu bản phần sau bào nang (lỗ sinh dục và lỗ hậu môn)

Ngâm tuyến trùng bào nang đã tách lọc trong nước 24 giờ.

Vớt ra, quan sát dưới kính lúp soi nổi có độ phóng đại từ 40 – 70 lần và dùng dao lam cắt lấy phần thân có hậu môn (xem hình 2)



Hình 2. Cách cắt tiêu bản phần thân có hậu môn