

QCVN 01 - 113 : 2012/BNN PTNT
QUY CHUẨN KỸ THUẬT QUỐC GIA

VỀ QUY TRÌNH KIỂM DỊCH CÂY QUẢ HẠCH NHẬP KHẨU TRONG KHU CÁCH LY KIỂM DỊCH
THỰC VẬT

*National technical regulation on phytosanitary procedure for imported stone fruit tree varieties in
isolated quarantine area*

Lời nói đầu

QCVN 01 - 113 : 2012/BNNPTNT do Ban Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về Kiểm dịch thực vật biên soạn, Cục Bảo vệ thực vật trình duyệt, Bộ Nông nghiệp & PTNT ban hành tại Thông tư số 63/2012/TT-BNNPTNT ngày 14 tháng 12 năm 2012.

QUY CHUẨN KỸ THUẬT QUỐC GIA

VỀ QUY TRÌNH KIỂM DỊCH CÂY QUẢ HẠCH NHẬP KHẨU TRONG KHU CÁCH LY KIỂM DỊCH
THỰC VẬT

*National technical regulation on phytosanitary procedure for imported stone fruit tree varieties
in isolated quarantine area*

I. QUY ĐỊNH CHUNG

1.1. Phạm vi điều chỉnh

Quy chuẩn này quy định quy trình kiểm tra mẫu giống cây quả hạch nhập khẩu trong công tác bảo vệ và kiểm dịch thực vật trên phạm vi cả nước.

1.2. Đối tượng áp dụng

Các tổ chức, cá nhân có hoạt động liên quan đến việc kiểm tra sinh vật hại trên giống cây quả hạch nhập khẩu vào Việt Nam được trồng trong khu cách ly kiểm dịch thực vật.

1.3. Giải thích từ ngữ

Quy chuẩn này sử dụng các thuật ngữ và định nghĩa trong Tiêu chuẩn quốc gia - Kiểm dịch thực vật. Thuật ngữ và định nghĩa -TCVN 3937:2007 và các thuật ngữ, định nghĩa sau:

1.3.1. Cây quả hạch

Là những cây thuộc chi *Prunus* như: Đào, mận, mơ, anh đào.

1.3.2. Giống cây quả hạch

Bao gồm cây, hạt, các bộ phận và các sinh chất khác của cây quả hạch được dùng làm giống hoặc có thể nhân lên về mặt số lượng.

1.3.3. Giấy phép kiểm dịch thực vật nhập khẩu

Là văn bản pháp lý cho phép nhập khẩu một lô vật thể phù hợp với các yêu cầu về kiểm dịch thực vật theo qui định.

1.3.4. KDTV: Kiểm dịch thực vật

Tất cả những hành động được thiết lập nhằm ngăn ngừa sự xâm hại và lan truyền của dịch hại kiểm dịch thực vật hoặc để kiểm soát hợp pháp dịch hại đó

1.3.5. Khu cách ly kiểm dịch

Là nơi gieo trồng thực vật, bảo quản sản phẩm thực vật được cách ly hoàn toàn với môi trường bên ngoài trong thời gian kiểm dịch.

1.3.6. Sinh vật hại tiềm ẩn

Là những sinh vật hại (những tác nhân sinh học như nấm, vi khuẩn, virus, viroid, phytoplasma...) đi theo giống nhập khẩu nhưng không thể phát hiện được bằng mắt thường hoặc trang thiết bị thô sơ.

1.3.7. Mẫu giống

Là lượng giống cây quả hạch lấy ra từ lô giống nhập khẩu theo quy định hiện hành.

1.3.8. Điều tra dịch hại

Là việc kiểm tra tình hình sinh vật gây hại trên các giống cây quả hạch nhập khẩu trong khu cách ly KDTV.

II. QUY ĐỊNH KỸ THUẬT

2. Các bước tiến hành

2.1. Ghi nhận thông tin về mẫu giống

Khi nhận mẫu giống phải ghi chép đầy đủ các thông tin về mẫu giống cây quả hạch nhập khẩu vào sổ lưu mẫu:

- Tên giống (tên Việt Nam và tên khoa học).
- Xuất xứ.
- Khối lượng và số lượng lô hàng.
- Cơ quan nhập khẩu.
- Ngày nhập khẩu.
- Cửa khẩu nhập.
- Thành phần sinh vật gây hại trên lô giống của nước xuất khẩu.
- Thành phần sinh vật gây hại đã phát hiện được trên lô giống tại cửa khẩu nhập.
- Các đối tượng Kiểm dịch có thể theo lô giống nhập khẩu vào Việt Nam hoặc căn cứ vào kết quả đánh giá nguy cơ dịch hại đối với lô giống nhập vào Việt Nam.
- Địa điểm gieo trồng.

2.2. Kiểm tra sinh vật gây hại trên mẫu giống trước gieo trồng

Tiến hành kiểm tra 100% mẫu giống cây quả hạch nhập khẩu.

2.2.1. Côn trùng và nhện

- Kiểm tra ở các nơi mà côn trùng, nhện có thể cư trú như bề mặt hạt, thân và các chỗ lồi lõm trên hạt, thân bằng phương pháp soi trực tiếp trên kính lúp soi nổi.
- Giám định chủ yếu bằng phương pháp so sánh hình thái theo các khoá định loại hiện hành.

2.2.2. Tuyến trùng

- Quan sát các triệu chứng của tuyến trùng hại trên tất cả các phần của mẫu.
- Tách tuyến trùng bằng phương pháp rây lọc tĩnh.
- Giám định chủ yếu bằng phương pháp so sánh hình thái theo các khoá định loại hiện hành.

2.2.3. Nấm bệnh

- Kiểm tra nấm gây hại bằng các phương pháp: Phương pháp để ẩm, ly tâm hạt, cấy nấm trên môi trường nhân tạo.
- Giám định dựa vào đặc điểm hình thái của cơ quan sinh sản hữu tính và vô tính của nấm, màu sắc tản nấm, quả thể, quả cành, cành bào tử phân sinh, bào tử phân sinh, kích thước bào tử nấm theo các khoá định loại hiện hành.

2.2.4. Vi khuẩn

Kiểm tra vi khuẩn bằng phương pháp ELISA hoặc phương pháp phân lập trên môi trường nhân tạo sau đó kiểm tra các Isolates thuần bằng phương pháp thử các phản ứng sinh lý, sinh hoá; ELISA hoặc PCR.

2.2.5. Virus, viroid, phytoplasma

Đối với một số bệnh do các tác nhân là: Virus, viroid, phytoplasma thì có thể sử dụng một trong các phương pháp sau:

- + Phản ứng chuỗi Polymerasa (Polymerasa chain reaction -PCR)
- + Miễn dịch liên kết men (Enzyme - Linked Immuno - Sorbent Assays - ELISA)
- + Chỉ thị sinh học (Biological Indexing)

2.3. Gieo trồng

Các mẫu giống được đưa vào khu cách ly Kiểm dịch thực vật sau nhập khẩu gieo trồng để theo dõi về tình hình sinh vật tiềm ẩn.

2.3.1. Chuẩn bị chậu vại

Chậu trồng cây gồm chậu đất nung, chậu cao su tổng hợp có kích thước: cao 30 - 40 cm, đường kính 30 - 35cm.

Chậu vại trước khi đưa vào trồng cây phải được cọ, rửa sạch, ngâm trong dung dịch Hypoclorit Natri 0,1 % hoặc nước javen 5 % trong thời gian 24 giờ, sau đó cho chậu ra khỏi dung dịch, phơi khô rồi mới sử dụng để trồng cây.

2.3.2. Chuẩn bị chất nền

Chất nền trồng cây: Mùn trâu, mùn rơm, mùn cưa (được ủ hoại mục) và xỉ than trộn theo tỷ lệ quy định và phải đảm bảo độ ẩm khoảng 25 - 30% (Phụ lục 3).

Chất nền trước khi đưa vào trồng cây phải xử lý bằng hơi nước nóng hoặc xử lý bằng Methyl bromide để diệt các sinh vật gây hại.

Xử lý hơi nước nóng: Chất nền được cho vào một thiết bị chuyên dụng và xử lý ở nhiệt độ 70°C trong 2 giờ (duy trì ở 70°C liên tục trong 2 giờ). Sau đó ủ tiếp trong 24 giờ rồi để nguội đến khi bằng nhiệt độ môi trường thì đưa vào sử dụng.

Xử lý bằng Methyl bromide: Chất nền được cho vào một thiết bị chuyên dụng và xử lý ở nồng độ 80 g/m³ trong 72 giờ. Sau đó để thông thoáng 48 giờ.

Chất nền sau khi được xử lý được đưa vào chậu trồng cây, chiều cao của chất nền trong mỗi chậu bằng 2/3 chiều cao của chậu; có thể bổ sung chất nền vào các chậu tùy thuộc vào sự phát triển của cây.

2.3.3. Kỹ thuật gieo trồng và chăm sóc

- Gieo trồng

Mỗi mẫu giống cây quả hạch gieo trồng được cắm biển (ép plastic) ghi rõ tên Việt Nam, tên khoa học, xuất xứ, đơn vị gửi mẫu, ngày gieo trồng.

Khoảng cách giữa các chậu thay đổi theo sự phát triển của cây sao cho lá cây ở các chậu không chạm vào nhau.

- Chăm sóc

Chế độ tưới nước phải bảo đảm duy trì độ ẩm chất nền khoảng 60 – 80%.

Sau khi gieo trồng được 15 -20 ngày tiến hành xới xáo, bón đợt 1 với lượng 10 gam phân NPK tổng hợp và bổ sung thêm chất nền vào các chậu.

Sau gieo trồng 60 - 70 ngày tiến hành xới xáo, bón đợt 2 với lượng 15 gam NPK tổng hợp và bổ sung thêm chất nền .

Sau 70 ngày đến khi kết thúc thời gian theo dõi duy trì cho cây phát triển bình thường, nếu thấy cần thì bổ sung phân NPK thích hợp.

2.4. Kiểm tra sinh vật gây hại

2.4.1. Điều tra, lấy mẫu

Điều tra định kỳ 7 ngày một lần và đột xuất thu mẫu sinh vật gây hại trên giống cây quả hạch trong khu cách ly; Tiến hành điều tra toàn bộ số cây đã gieo trồng trong khu cách ly KDTV.

Kiểm tra, quan sát các cây có các biểu hiện triệu chứng do nấm bệnh, virus, vi khuẩn, tuyến trùng, nhện. Đặc biệt cây còi cọc, thấp lùn, mọc phát búi, lá biến dạng, biến màu ...

Các mẫu sinh vật gây hại phân tích và giám định trong phòng thí nghiệm.

2.4.2. Giám định sinh vật gây hại

Sau khi thu thập mẫu sinh vật gây hại về phòng thí nghiệm, các mẫu nấm bệnh, vi khuẩn, virus, tuyến trùng và nhện được tiến hành kiểm tra, giám định theo mục 2.2

2.5. Thời gian kiểm tra: 1-2 năm

2.6. Kết quả kiểm tra: Sau khi kết thúc kiểm tra làm báo cáo kết quả kiểm tra như ở Phụ lục 1.

III. KẾT LUẬN

- Tình hình dịch hại: Xác định được danh sách các sinh vật gây hại phát hiện được trên các giống cây quả hạch nhập khẩu (Nhất là đối tượng Kiểm dịch thực vật và các sinh vật gây hại tiềm ẩn)

- Nếu lô giống nhiễm dịch hại thuộc diện kiểm dịch thực vật thì tiến hành huỷ và thông báo đến các cơ quan, tổ chức có liên quan.

- Nếu lô giống không nhiễm dịch hại thuộc diện kiểm dịch thực vật thì cấp giấy chứng nhận Kiểm dịch thực vật Sau nhập khẩu.

PHỤ LỤC 1.

CỤC BẢO VỆ THỰC VẬT
TRUNG TÂM KDTV SNK I

Số/ KDTV

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

....., ngày tháng năm 20..

KẾT QUẢ THEO DÕI CÂY QUẢ HẠCH NHẬP KHẨU TRONG KHU CÁCH LY KIỂM DỊCH THỰC VẬT

Tên của Tổ chức/ cá nhân nhập khẩu:.....

(Địa chỉ, số điện thoại, fax)

Thông báo số:

Nhập khẩu từ:

Cửa khẩu đến (đơn vị gửi mẫu):

Khối lượng mẫu gửi:

Số lượng mẫu gửi:

Tên cán bộ của Cơ quan kiểm dịch theo dõi và kiểm tra	Tên giống cây
Gieo trồng	Phương pháp điều tra theo dõi
Số lượng mẫu gieo trồng	Số lượng mẫu điều tra
Số lượng vật liệu bị nhiễm	
Quan sát	
Tên dịch hại, mật độ	
Tên dịch hại kiểm dịch thực vật, mật độ	
Kết luận:	
Thủ trưởng cơ quan kiểm dịch thực vật (Ký tên, đóng dấu)	

PHỤ LỤC 2.

CÁC BIỆN PHÁP KỸ THUẬT SỬ DỤNG TRONG VIỆC KIỂM TRA VÀ GIÁM ĐỊNH MỘT SỐ BỆNH ẨN

1.1. Phương pháp PCR

Phương pháp PCR (Polymerase Chain Reaction) được Kary Mullis và cộng sự (Mỹ) phát minh năm 1985 và kể từ đó đã tạo nên một tác động to lớn đối với các nghiên cứu sinh học trên toàn thế giới. Đây là phương pháp in vitro sử dụng các cặp mồi để tổng hợp số lượng lớn các bản sao từ một trình tự ADN đặc biệt dựa trên hoạt động của enzyme polymerase. Phương pháp PCR dựa trên hoạt động của ADN polymerase trong quá trình tổng hợp ADN mới từ mạch khuôn. Tất cả các ADN polymerase đều cần những mồi, là những đoạn ADN ngắn có khả năng bắt cặp bổ sung với một đầu của mạch khuôn. Đoạn mồi này sau đó sẽ được nối dài ra nhờ hoạt động của ADN polymerase để hình thành một mạch mới hoàn chỉnh.

Một phản ứng PCR là một chuỗi nhiều chu kỳ nối tiếp nhau, mỗi chu kỳ gồm ba giai đoạn:

- Giai đoạn biến tính: tách chuỗi ADN từ mạch đôi thành mạch đơn
- Giai đoạn bắt cặp: gắn cặp mồi đặc trưng theo nguyên tắc bổ sung
- Giai đoạn kéo dài chuỗi: tổng hợp chuỗi AND mới giống chuỗi AND gốc

Sau đó sản phẩm PCR đem chạy điện di để xác định tác nhân gây bệnh dựa vào trọng lượng phân tử AND so với đối chứng

Nhờ phương pháp này, chúng ta có thể xác định được tác nhân gây bệnh ngay cả khi nồng độ của chúng rất thấp.

1.2. Phương pháp ELISA

Là phương pháp thử nghiệm miễn dịch liên kết men để giám định tác nhân gây bệnh dựa vào phản ứng đặc hiệu kháng nguyên-kháng thể. Phương pháp ELISA gồm có DAS - ELISA và Indirect - ELISA. Cả hai phương pháp này đều được thực hiện trên nguyên tắc chung của phương pháp ELISA. Đó là dựa vào phản ứng đặc hiệu kháng nguyên-kháng thể có nghĩa là kháng nguyên nào thì liên kết với kháng thể ấy và quy trình bao gồm 4 bước như sau:

+ Bước 1: Phủ Bản ELISA bằng kháng nguyên (đối với Indirect – ELISA) hoặc kháng thể đặc hiệu virus (Đối với DAS - ELISA).

+ Bước 2: Cố định kháng thể đặc hiệu kháng nguyên (đối với Indirect - ELISA) hoặc kháng nguyên đặc hiệu kháng thể (DAS - ELISA) vào bản ELISA.

+ Bước 3: Gắn kháng thể đặc hiệu kháng thể (đối với Indirect - ELISA) hoặc kháng thể đặc hiệu kháng nguyên (Đối với DAS - ELISA) có liên kết Enzim

+ Bước 4: Cố định chất nền và đánh giá kết quả.

1.3 Chỉ thị sinh học

Phương pháp dùng cây chỉ thị để xác định những bệnh ẩn của cây quả hạch dựa vào những đặc điểm đặc trưng của các triệu chứng bệnh ẩn cần giám định trên các cây được dùng làm cây chỉ thị. Việc giám định này có thể dựa trực tiếp vào triệu chứng để giám định cũng như sử dụng làm một khâu trong chu trình giám định.

Một số cây chỉ thị và cách sử dụng để phát hiện một số bệnh ẩn trong nhà kính

Cây chỉ thị	Số lần nhắc lại (Cây)	Nhiệt độ trong nhà kính	Ngày theo dõi	Tác nhân gây bệnh
<i>Prunus armeniaca</i> Tilton	4	26	40	Đốm đỏ vòng mơ (Apricot ring pox), Xoắn vòng lá anh đào (Cherry twisted leaf virus)
<i>Prunus avium</i> Bing	4	18	60	Sước lá châu Âu (European rasp leaf), Sước lá Hungarian (Hungarian rasp leaf), CRLV, CLRV, đốm gỉ sắt (Rusty mottle), SLRSV, AMV, xoắn lá (Twisted leaf), ngắn thân (Short stem), Loét đen (Black canker), loét huỷ diệt (Detrimental canker), đốm lá (Mottle leaf), lá chụm hoa thị (Rosette), cựa anh đào (Spur cherry)
<i>Prunus avium</i> Sam	4	18	60	Đốm gỉ chết hoại (Necrotic rusty mottle), Nhỏ lá anh đào (Little cherry)
<i>Prunus avium</i> Canindex I	4	18	90	Nhỏ lá anh đào (Little cherry)
<i>Prunus hybrid</i> Shiro plum	4	18	40	Nhỏ lá đào (Peach little peach), bướu đào (Peach wart)
<i>Prunus persica</i> Elberta	4	18	40	PNRSV, PDV, ACLSV, SLRV, PPV
<i>Prunus serrulata</i> Kwanzan	4	18	60	Đốm vòng xanh (Green ring mottle)
<i>Prunus serrulata</i> Shirofugen	4	26	20	PNRSV, PDV, Đốm vòng xanh (Green ring mottle)
<i>Prunus tomentosa</i>	4	22	84	PNRSV, PDV, TonRSV, đốm lõm thân (stem pitting), khảm vàng chồi (yellow bud mosaic), ACLSV, PPV.

PHỤ LỤC 3.

CÁC DỤNG CỤ, HÓA CHẤT VÀ TRANG THIẾT BỊ PHÂN LẬP VÀ GIÁM ĐỊNH

- Khay, găng tay, panh, chổi, bút lông, kính lúp cầm tay, túi, hộp đựng mẫu, nhãn, dụng cụ nuôi sâu.
- Bình tam giác, cốc đong, ống nghiệm, đĩa petri, giấy thấm, giấy bản.
- Hóa chất chuyên dùng cho từng loại: công trùng, nấm bệnh, virus, vi khuẩn, tuyến trùng.
- Nguồn sáng, tủ sấy, tủ định ôn, tủ lạnh, tủ lạnh sâu; buồng phân lập nấm và vi khuẩn; dụng cụ cấy nấm, vi khuẩn; nồi hấp, máy ly tâm, máy lắc...
- Kính hiển vi, kính lúp soi nổi, thiết bị Elisa, PCR.
- Dụng cụ tách lọc tuyến trùng: rây lọc tĩnh, giấy lọc, phễu Bermann...

PHỤ LỤC 4.

CHẤT NỀN TRỒNG CÂY

* Chất nền thích hợp trồng giống cây họ cà (cà chua, cây ớt, khoai tây, thuốc lá) được dùng theo tỷ lệ trộn như sau:

- Công thức 1: 50% MR + 20% MC + 20% MT + 10% XT
- Công thức 2: 25% MR + 25% MT + 25% MC + 25% XT
- Công thức 3: 30% MR + 20% MT + 50% XT
- Công thức 4: 20% MR + 25% MT + 20% MC + 25% CV

* Chú thích: MR: mùn rơm đã ủ hoai mục

MT: mùn trấu đã ủ hoai mục

MC: mùn cưa đã ủ hoai mục

XT: xỉ than tổ ong

CV: cát vàng

* Trước khi xử lý, phơi các loại giá thể trên đảm bảo thủy phần phải chỉ còn 25 – 30%.