

**TCVN 8549:2011**

Xuất bản lần 1

**CỦ GIỐNG KHOAI TÂY –  
PHƯƠNG PHÁP KIỂM NGHIỆM**

*Tuber seed potato – Testing methods*

**HÀ NỘI – 2011**

## Mục lục

Trang

Lời nói đầu.....	4
1 Phạm vi áp dụng.....	5
2 Thuật ngữ và định nghĩa.....	5
3 Phương pháp lấy mẫu và lập mẫu.....	6
3.1 Nguyên tắc.....	6
3.2 Thiết bị, dụng cụ.....	6
3.3 Yêu cầu đối với lô củ giống.....	7
3.4 Số lượng mẫu điểm.....	7
3.5 Lấy mẫu điểm.....	8
3.6 Lập mẫu hỗn hợp.....	8
3.7 Lập mẫu gửi.....	8
3.8 Bảo quản mẫu.....	9
4 Phương pháp xác định rệp sáp ( <i>Pseudococcus citri</i> Russo).....	9
4.1 Mẫu phân tích.....	9
4.2 Thiết bị, dụng cụ.....	10
4.3 Cách tiến hành.....	10
4.4 Biểu thị kết quả.....	10
5 Phương pháp xác định kích thước củ.....	10
5.1 Mẫu phân tích.....	10
5.2 Thiết bị, dụng cụ.....	10
5.3 Cách tiến hành.....	10
5.4 Biểu thị kết quả.....	10
6 Phương pháp xác định tỉ lệ củ bị xây xát, dị dạng.....	10
6.1 Mẫu phân tích.....	10
6.2 Thiết bị, dụng cụ.....	10
6.3 Cách tiến hành.....	11
6.4 Biểu thị kết quả.....	11
7 Phương pháp xác định tỉ lệ củ khác giống.....	11
7.1 Mẫu phân tích.....	11
7.2 Thiết bị, dụng cụ.....	11
7.3 Cách tiến hành.....	11
7.4 Biểu thị kết quả.....	12
8 Phương pháp xác định củ bị bệnh.....	12
8.1 Mẫu phân tích.....	12
8.2 Thiết bị, dụng cụ.....	12
8.3 Cách tiến hành.....	13
8.4 Biểu thị kết quả.....	13
9 Phương pháp xác định vi rút bằng kỹ thuật ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).....	13
9.1 Mẫu phân tích.....	13
9.2 Thiết bị, dụng cụ.....	13
9.3 Thuốc thử.....	14
9.4 Chuẩn bị mẫu.....	14
9.5 Cách tiến hành.....	14
9.6 Tính và biểu thị kết quả.....	15
Phụ lục A (tham khảo) Đặc điểm một số sâu, bệnh hại chính thường gặp ở củ giống khoai tây.....	16
Phụ lục B (quy định) Thành phần và chuẩn bị một số dung dịch thuốc thử.....	20

**Lời nói đầu**

TCVN 8549:2011 được chuyển đổi từ 10 TCN 1007:2006 thành tiêu chuẩn quốc gia theo quy định tại khoản 1 Điều 69 của Luật Tiêu chuẩn và Quy chuẩn kỹ thuật và điểm a khoản 1 Điều 7 Nghị định số 127/2007/NĐ-CP ngày 01/8/2007 của Chính phủ quy định chi tiết thi hành một số điều của Luật Tiêu chuẩn và Quy chuẩn kỹ thuật;

TCVN 8549:2011 do Cục Trồng trọt 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.

## Củ giống khoai tây – Phương pháp kiểm nghiệm

*Tuber seed potato – Testing methods*

### 1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định các phương pháp kiểm nghiệm các chỉ tiêu chất lượng của các lô củ giống khoai tây được nhân bằng phương pháp vô tính.

### 2 Thuật ngữ và định nghĩa

Trong tiêu chuẩn này sử dụng các thuật ngữ và định nghĩa sau:

#### 2.1

##### **Lô củ giống** (Seed lot)

Lượng củ giống cụ thể, có cùng nguồn gốc và mức chất lượng, được sản xuất, thu hoạch, bảo quản cùng một quy trình, có thể nhận biết được một cách dễ dàng và duy nhất.

#### 2.2

##### **Mẫu điểm** (Primary sample)

Một phần của lô củ giống được lấy ra từ một điểm trong lô củ giống. Các mẫu điểm phải có số lượng củ tương đương nhau.

#### 2.3

##### **Mẫu hỗn hợp** (Composite sample)

Mẫu được tạo thành bằng cách gộp và trộn tất cả các mẫu điểm được lấy ra từ lô củ giống.

#### 2.4

##### **Mẫu gửi** (Submitted sample)

Mẫu được gửi đến phòng kiểm nghiệm để phân tích các chỉ tiêu chất lượng. Mẫu gửi phải đủ số lượng củ tối thiểu như quy định và có thể bao gồm toàn bộ hoặc một phần của mẫu hỗn hợp.

**2.5**

**Mẫu kiểm nghiệm (Working sample)**

Toàn bộ mẫu gửi hoặc một phần mẫu gửi được lấy ra ngẫu nhiên để thực hiện một trong các phép thử được quy định trong tiêu chuẩn này và phải có khối lượng tối thiểu bằng khối lượng quy định đối với phép thử đó.

**2.6**

**Củ xây xát (Damage tuber)**

Củ xây xát là những củ có một trong các đặc điểm sau: bị xây xước đến phần thịt củ; củ có tất cả mầm bị gãy và không có khả năng hồi phục.

**2.7**

**Củ dị dạng (Abnormalities tuber)**

Củ dị dạng là những củ có một trong các đặc điểm sau: bị teo quắt, không thể mọc mầm được; củ có hình dạng và mầm không bình thường (mầm tằm, mầm chổi, củ bi mọc trên mầm).

**2.8**

**Củ khác giống (Other tuber)**

Củ của giống khác, có những đặc điểm đặc trưng về hình thái, màu sắc khác biệt rõ ràng với củ của giống được yêu cầu kiểm tra.

**2.9**

**Củ bị thối (Necrosis tuber)**

**a) Củ bị bệnh thối khô:** Củ bị nhiễm nấm *Fusarium* spp. hoặc nấm *Phytophthora infestans*. Vết bệnh khô, lõm hẳn xuống, có màu nâu hoặc xám, thịt củ trở nên xốp, có màu xám tro hay phớt hồng do nấm phát triển tạo thành.

**b) Củ bị bệnh thối ướt:** Củ bị nhiễm nấm hoặc vi khuẩn. Vết bệnh ướt, có mùi khó chịu (mùi thối). Củ bị bệnh do vi khuẩn thường có mùi nặng hơn, củ bị bệnh do nấm có mùi nhẹ hơn. Những củ bị bệnh do vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* gây ra, khi bở đôi củ thấy vết bệnh có một vòng nâu sẫm hoặc nâu đen ở phần mạch dẫn sát ngoài bì.

**3 Phương pháp lấy mẫu và lập mẫu**

**3.1 Nguyên tắc**

Mẫu phải được lấy ngẫu nhiên, xác suất có mặt của các thành phần trong mẫu là đại diện cho lô củ giống. Sau khi lấy mẫu và lập mẫu, mẫu phải có khối lượng phù hợp để thực hiện các phép thử cần thiết.

**3.2 Thiết bị, dụng cụ**

- Thẻ mẫu giống, dụng cụ niêm phong;
- Túi hoặc bao đựng mẫu thoáng khí và có thể niêm phong được.

### 3.3 Yêu cầu đối với lô củ giống

#### 3.3.1 Khối lượng của lô củ giống

Khối lượng của lô củ giống không được vượt quá 30 tấn. Khi lô củ giống có khối lượng vượt quá quy định thì phải chia thành các lô nhỏ, mỗi lô có mã hiệu riêng.

#### 3.3.2 Gắn nhãn và niêm phong các vật chứa

Nếu lô củ giống đã được đeo thẻ/gắn nhãn và niêm phong trước khi lấy mẫu thì người lấy mẫu phải kiểm tra việc đeo thẻ/gắn nhãn và dấu niêm phong ở từng vật chứa.

Nếu lô củ giống chưa được đeo thẻ/gắn nhãn và niêm phong thì người lấy mẫu phải trực tiếp giám sát quá trình đeo thẻ/gắn nhãn và niêm phong trước khi rời khỏi lô giống.

#### 3.3.3 Tính đồng nhất của lô củ giống

Lô củ giống phải đảm bảo đồng nhất về nguồn gốc, quy trình sản xuất, thu hoạch, chế biến và bảo quản. Nếu phát hiện lô củ giống không đồng nhất thì dừng việc lấy mẫu và yêu cầu lập lại lô giống theo đúng quy định về tính đồng nhất của lô củ giống.

#### 3.3.4 Sắp xếp lô củ giống

Lô củ giống phải được sắp xếp thuận lợi để có thể đi vào lấy mẫu ở từng vật chứa hoặc các vị trí khác nhau. Nếu không đáp ứng quy định này thì người lấy mẫu yêu cầu phải sắp xếp lại lô củ giống.

### 3.4 Số lượng mẫu điểm

Đối với những lô củ giống trong các vật chứa hoặc bao chứa từ 10 kg đến 50 kg, số lượng mẫu điểm tối thiểu cần lấy theo quy định tại Bảng 1.

**Bảng 1 – Số lượng mẫu điểm tối thiểu cần lấy đối với lô củ giống trong vật chứa hoặc bao chứa từ 10 kg đến 50 kg**

Số vật chứa hoặc bao chứa	Số lượng mẫu điểm tối thiểu cần lấy
Từ 1 đến 10	Mỗi bao lấy ít nhất 30 củ, nhưng tổng số không ít hơn 250 củ.
Từ 11 đến 60	Lấy tổng số 15 mẫu điểm, mỗi bao lấy ít nhất 20 củ
Từ 61 đến 400	Lấy tổng số 20 mẫu điểm, mỗi bao lấy ít nhất 15 củ
Lớn hơn 400	Lấy tổng số 30 mẫu điểm, mỗi bao lấy ít nhất 10 củ

## TCVN 8549:2011

Đối với lô củ giống chứa trong các vật chứa hoặc bao chứa nhỏ hơn 10 kg, các bao chứa được gộp thành các đơn vị không lớn hơn 50 kg. Mỗi đơn vị này được coi là một bao chứa và số lượng mẫu điểm tối thiểu cần lấy theo quy định tại Bảng 1.

Khi lấy mẫu ở các vật chứa hoặc bao chứa lớn hơn 50 kg hoặc đổ rời, số lượng mẫu điểm tối thiểu cần lấy theo quy định tại Bảng 2.

**Bảng 2 – Số lượng mẫu điểm tối thiểu cần lấy đối với lô củ giống trong vật chứa hoặc bao chứa lớn hơn 50 kg hoặc đổ rời**

Khối lượng vật chứa hoặc bao chứa	Số lượng mẫu điểm tối thiểu cần lấy
Nhỏ hơn 500 kg	Lấy 10 mẫu điểm, mỗi mẫu điểm lấy ít nhất 30 củ
Từ 501 kg đến 3 000 kg	Lấy 15 mẫu điểm, mỗi mẫu điểm lấy ít nhất 20 củ
Từ 3 001 kg đến 20 000 kg	Lấy 20 mẫu điểm, mỗi mẫu điểm lấy ít nhất 15 củ
Lớn hơn 20 000 kg	Lấy 30 mẫu điểm, mỗi mẫu điểm lấy ít nhất 10 củ

### 3.5 Lấy mẫu điểm

Lấy ngẫu nhiên bằng tay một số lượng củ bằng nhau ở các vị trí khác nhau trong lô củ giống.

Khi lô củ giống được chứa trong bao hoặc vật chứa nhỏ thì bao hoặc vật chứa được chọn để lấy mẫu một cách ngẫu nhiên đều khắp cả lô. Số lượng củ phải lấy tại các bao hoặc vật chứa phải đạt tối thiểu theo yêu cầu (xem 3.4).

Khi lô củ giống được chứa trong thùng chứa hoặc vật chứa lớn hoặc đổ rời, các mẫu điểm sẽ được lấy ở các vị trí ngẫu nhiên để có một số lượng củ tối thiểu (xem 3.4).

### 3.6 Lập mẫu hỗn hợp

Các mẫu điểm được gộp lại để tạo thành mẫu hỗn hợp.

### 3.7 Lập mẫu gửi

#### 3.7.1 Khối lượng mẫu gửi

Khối lượng tối thiểu của các mẫu gửi quy định như sau:

- Mẫu kiểm tra các chỉ tiêu chất lượng lô củ giống (không kiểm tra vi rút): 250 củ.
- Mẫu kiểm tra vi rút: 120 củ, được đựng trong túi nilon, mỗi củ trong một túi.

Trong trường hợp mẫu gửi có số củ nhỏ hơn quy định, thì việc phân tích sẽ không được tiến hành cho đến khi nhận được một mẫu gửi khác.

### 3.7.2 Cách lập mẫu gửi

Nếu mẫu hỗn hợp có số lượng củ vừa đủ thì có thể được coi là mẫu gửi mà không cần phải giảm mẫu.

Mẫu gửi phải ghi rõ mã hiệu của lô củ giống, các thông tin liên quan đến lô giống, kể cả tên của hóa chất xử lý củ giống và phải được niêm phong.

Các mẫu gửi phải được đóng gói cẩn thận để tránh bị hư hỏng trong quá trình vận chuyển. Các mẫu gửi chỉ được đóng gói trong túi nilon ẩm đối với mẫu kiểm tra vi rút để tránh lây nhiễm.

Mẫu bổ sung do chủ lô giống yêu cầu tại thời điểm lấy mẫu, nếu được chấp nhận, cũng được lập như mẫu gửi và được ghi là “mẫu thứ hai”.

### 3.7.3 Gửi mẫu

Các mẫu gửi phải được gửi đến phòng kiểm nghiệm càng sớm càng tốt ngay sau khi lấy mẫu. Nếu quá 3 ngày sau khi lấy mẫu, mẫu vẫn chưa được gửi đến phòng kiểm nghiệm thì tiến hành lấy mẫu lại.

Người lấy mẫu phải trực tiếp gửi, không được gửi qua chủ lô giống, người đề nghị kiểm tra hoặc những người không được ủy quyền lấy mẫu.

## 3.8 Bảo quản mẫu

### 3.8.1 Trước khi kiểm nghiệm

Cần phải tiến hành kiểm nghiệm mẫu ngay trong ngày tiếp nhận. Nếu phải để chậm lại thì mẫu phải được bảo quản trong những điều kiện thích hợp (nhưng không quá 2 ngày) để không làm thay đổi chất lượng của mẫu.

### 3.8.2 Sau khi kiểm nghiệm

Toàn bộ mẫu sau khi kiểm nghiệm sẽ được bảo quản tối thiểu 2 ngày ở nhiệt độ dưới 25 °C để giải quyết các trường hợp khiếu nại liên quan đến kết quả kiểm nghiệm.

## 4 Phương pháp xác định rệp sáp (*Pseudococcus citri* Russo)

### 4.1 Mẫu phân tích

Toàn bộ mẫu gửi được sử dụng làm mẫu phân tích.

## **TCVN 8549:2011**

### **4.2 Thiết bị, dụng cụ**

- Kính lúp;
- Hộp, khay đựng mẫu.

### **4.3 Cách tiến hành**

Kiểm tra kỹ từng củ, nhặt và đếm những cá thể rệp sáp còn sống tìm thấy trong mẫu phân tích.

### **4.4 Biểu thị kết quả**

Kết quả được biểu thị theo số lượng rệp sáp tìm thấy trên 100 củ, lấy tròn đến số nguyên gần nhất.

## **5 Phương pháp xác định kích thước củ**

### **5.1 Mẫu phân tích**

Lấy ngẫu nhiên 200 củ từ mẫu gửi để phân tích.

### **5.2 Thiết bị, dụng cụ**

Thước đục lỗ hình tròn có đường kính 25mm hoặc hình vuông có các cạnh 25mm.

### **5.3 Cách tiến hành**

Đo kích thước toàn bộ củ trong mẫu phân tích bằng thước đục lỗ. Đưa nhẹ củ qua lỗ theo chiều có đường kính nhỏ nhất. Những củ lọt qua lỗ của thước là những củ có kích thước nhỏ. Đếm số lượng củ lọt qua lỗ.

### **5.4 Biểu thị kết quả**

Kết quả được biểu thị theo tỉ lệ phần trăm củ có kích thước nhỏ trên tổng số củ kiểm tra.

## **6 Phương pháp xác định tỉ lệ củ bị xây xát, dị dạng**

### **6.1 Mẫu phân tích**

Lấy ngẫu nhiên 200 củ từ mẫu gửi hoặc tiếp tục sử dụng mẫu sau khi xác định kích thước củ.

### **6.2 Thiết bị, dụng cụ**

- Kính lúp;
- Hộp, khay đựng mẫu;

– Kính phóng đại.

### 6.3 Cách tiến hành

Kiểm tra kỹ từng củ, nhặt ra những củ xây xát, dị dạng.

### 6.4 Biểu thị kết quả

Kết quả được biểu thị theo tỉ lệ phần trăm số củ xây xát, dị dạng trong tổng số củ kiểm tra.

## 7 Phương pháp xác định tỉ lệ củ khác giống

### 7.1 Mẫu phân tích

Lấy ngẫu nhiên 200 củ từ mẫu gửi hoặc tiếp tục sử dụng mẫu sau khi xác định kích thước củ và củ xây xát dị dạng.

### 7.2 Thiết bị, dụng cụ

- Kính lúp;
- Dao cắt;
- Hộp chứa, khay đựng mẫu;
- Bản mô tả giống hoặc hình vẽ, tranh ảnh của các giống.

### 7.3 Cách tiến hành

Kiểm tra kỹ từng củ và dựa vào các đặc điểm sau đây để phân biệt các củ khác giống:

a) Các đặc điểm của củ giống:

- Hình dạng đặc trưng của củ giống (tròn, thuôn, dài);
- Độ nhẵn của vỏ củ (nhẵn, nhăn rạn, xù xì);
- Màu của vỏ củ (trắng, vàng, vàng đậm, hồng, đỏ, tím);
- Độ sâu của mắt củ (nông, trung bình, sâu);
- Màu của mắt củ (vàng, đỏ, tím);
- Màu của thịt củ (trắng, trắng vàng, vàng nhạt, vàng, vàng đậm);
- Kích thước của mầm (nhỏ, trung bình, to);

## **TCVN 8549:2011**

– Hình dạng của mầm (hình tròn, hình trứng, hình tháp, hình trụ, hình trụ dài);

Có thể rửa sạch củ để nhặt ra những củ khác giống hoặc dùng dao mỏng và sắc cắt đôi ngang qua củ để quan sát ngay các đặc điểm của thịt củ.

b) Trong trường hợp cần thiết phải quan sát thêm các đặc điểm của cây mầm để đánh giá như:

– Sắc tố antoxian ở thân mầm (rất nhạt, nhạt, trung bình, đậm, rất đậm);

– Sắc tố antoxian ở đỉnh mầm (rất nhạt, nhạt, trung bình, đậm, rất đậm);

– Lông ở gốc mầm (rất ít, ít, trung bình, nhiều, rất nhiều);

– Dạng đỉnh mầm (đóng, trung bình, mở);

– Lông ở đỉnh mầm (không có hoặc rất ít, ít, trung bình, nhiều, rất nhiều);

– Số lượng rễ mầm (ít, trung bình, nhiều);

– Sự lồi lên của lỗ bì (ít, trung bình, nhiều);

– Độ dài của mầm bên (ngắn, trung bình, dài).

c) Kiểm tra lại các củ nghi ngờ bằng cách so sánh với bản mô tả giống, hoặc hình vẽ, tranh ảnh của củ giống chuẩn để quyết định.

### **7.4 Biểu thị kết quả**

Kết quả được biểu thị theo tỉ lệ phần trăm củ khác giống trên tổng số củ kiểm tra.

## **8 Phương pháp xác định củ bị bệnh**

### **8.1 Mẫu phân tích**

Lấy ngẫu nhiên 200 củ từ mẫu gửi để phân tích hoặc tiếp tục sử dụng mẫu sau khi xác định kích thước củ, củ xây xát dị dạng và củ khác giống.

### **8.2 Thiết bị, dụng cụ**

– Kính lúp;

– Dao;

– Panh gấp;

– khay, hộp petri...

### 8.3 Cách tiến hành

Kiểm tra kỹ từng củ và quan sát các triệu chứng bị bệnh ở củ để nhận ra những củ bị bệnh, bất kể vết bệnh là nhiều hay ít, tình trạng nhiễm bệnh của củ giống là nặng hay nhẹ. Có thể phải cắt đôi củ để quan sát các triệu chứng bệnh.

Cần lưu ý phân biệt các triệu chứng của bệnh như mô tả trong Phụ lục A để xác định số củ bị bệnh trong mẫu phân tích.

### 8.4 Biểu thị kết quả

Kết quả được biểu thị theo tỉ lệ phần trăm củ bị bệnh trên tổng số củ kiểm tra.

## 9 Phương pháp xác định vi rút bằng kỹ thuật ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

### 9.1 Mẫu phân tích

Mẫu kiểm tra vi rút được lấy ra từ mẫu gửi kiểm tra vi rút, bảo quản ở nhiệt độ từ 25 °C đến 30 °C cho đến khi củ nảy mầm.

Lấy ngẫu nhiên 100 củ đã mọc mầm từ mẫu gửi để kiểm tra vi rút.

Trường hợp kiểm tra vi rút trên mẫu lá: Lấy tối thiểu 120 mẫu trên một lô giống, mỗi cây lấy một mẫu, mỗi mẫu được đựng riêng trong túi nilon sạch để tránh lây nhiễm.

### 9.2 Thiết bị, dụng cụ

- Thiết bị nghiền mẫu hoặc dụng cụ nghiền mẫu thủ công;
- Cân phân tích, có thể cân chính xác đến 0,1 mg;
- Tủ ấm;
- Máy đọc ELISA (ELISA reader);
- Máy rửa hoặc dụng cụ rửa bảng ELISA;
- Tủ lạnh;
- Pipet tự động 1 đầu côn, dung tích từ 0,5 µl đến 10 µl; từ 10 µl đến 20 µl; từ 20 µl đến 100 µl; từ 100 µl đến 1000 µl; 5000 µl;
- Pipet tự động 8 đầu côn;
- Bảng ELISA 96 giếng;

## **TCVN 8549:2011**

- Hộp nhựa có nắp đậy kín để đựng bảng ELISA;
- Ống đong, dung tích từ 10 ml đến 1000 ml;
- Bình, lọ thủy tinh, dung tích từ 50 ml đến 1000 ml;
- Túi nilon đựng mẫu.

### **9.3 Thuốc thử**

- Chất kháng thể (capture antibody) hoặc  $\gamma$ -globulin (IgG) chẩn đoán vi rút, được bảo quản ở nhiệt độ 4 °C hoặc -20 °C.
- Enzym liên kết (alkaline phosphatase enzyme conjugate), được bảo quản ở nhiệt độ thích hợp.
- 4-nitrophenyl phosphat (NPP);
- Các dung dịch đệm và dung dịch rửa (xem Phụ lục B).

### **9.4 Chuẩn bị mẫu**

Cắt mẫu bằng dao hoặc kéo đã được khử trùng bằng cồn 70<sup>0</sup>. Mỗi mẫu được cho vào túi ni lon riêng, tránh sự tiếp xúc giữa các mẫu với nhau.

### **9.5 Cách tiến hành**

Chẩn đoán vi rút bằng phương pháp DAS - ELISA (Double Antibody Sandwich – ELISA)

a) Bước 1: Cố định kháng thể (coating antibody)

Lập sơ đồ các giếng chứa phản ứng chẩn đoán của từng mẫu.

Hòa tan kháng thể trong dung dịch đệm coating, cho vào mỗi giếng 100  $\mu$ l.

Đặt bản ELISA trong hộp ẩm và giữ trong tủ lạnh ở nhiệt độ 4 °C qua một đêm hoặc có thể ủ ở nhiệt độ 37 °C từ 2 h đến 4 h.

Sau khi ủ, rửa bản ELISA bằng dung dịch rửa (PBS-T) ba lần, mỗi lần 3 phút.

b) Bước 2: Cố định dịch kháng nguyên vào bản ELISA

Nghiền mẫu trong dung dịch đệm nghiền mẫu với tỉ lệ 1 g mẫu trong 10 ml dung dịch đệm.

Dùng pipet hút 100  $\mu$ l dịch mẫu nhỏ vào giếng đã cố định kháng thể.

Cho mẫu đối chứng vào giếng sau cùng, mẫu đối chứng bao gồm dịch chiết mẫu, đối chứng có bệnh và đối chứng sạch bệnh. Mỗi loại đối chứng cho vào 2 giếng.

Đặt bảng ELISA vào hộp ẩm và giữ trong tủ lạnh ở nhiệt độ 4 °C qua một đêm hoặc có thể ủ ở nhiệt độ 37 °C từ 2 h đến 4 h. Trong quá trình này sẽ xảy ra phản ứng liên kết giữa kháng thể (IgG) và kháng nguyên nếu mẫu có vi rút.

Sau khi ủ, rửa bản ELISA như ở bước 1.

#### c) Bước 3: Cố định enzym liên kết

Hòa enzym liên kết trong dung dịch đệm liên kết theo tỉ lệ do nhà sản xuất hướng dẫn và vào nhỏ 100 µl/giếng vào các giếng đã thực hiện bước 1 và bước 2. Ủ bản ELISA ở nhiệt độ 37 °C từ 2 h đến 4 h và rửa như bước 1.

#### d) Bước 4: Cố định chất nền vào bản ELISA

Hòa tan chất nền NPP vào dung dịch đệm chất nền (substrate) theo tỉ lệ từ 0,25 mg/ml đến 0,5 mg/ml. Sau đó dùng pipet nhỏ vào mỗi giếng 100 µl. Đặt bản ELISA vào hộp ẩm và ủ ở nhiệt độ bình thường của phòng thí nghiệm trong 1 h. Các giếng có màu vàng là giếng có phản ứng dương tính, giếng không màu là không có phản ứng. Dùng máy đọc ELISA (ELISA reader) để đọc chính xác các kết quả ở bước sóng 405 nm.

Để cố định màu của bảng ELISA khi cần xem lại thì nhỏ vào mỗi giếng ELISA từ 25 µl đến 30 µl dung dịch NaOH 3 M, bảo quản trong tủ lạnh ở nhiệt độ 4 °C.

**LƯU Ý: Trong quá trình thực hiện các phản ứng chẩn đoán vi rút bằng phương pháp ELISA, phải đeo găng tay để tránh lây nhiễm gây ra phản ứng không đặc hiệu.**

CHÚ THÍCH: Nếu sử dụng kit mua sẵn để chẩn đoán vi rút thì tiến hành theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

### 9.6 Tính và biểu thị kết quả

Ngưỡng xác định nhiễm vi rút,  $S_n$ , được tính theo công thức sau:

$$S_n = OD_S / OD_n$$

Trong đó:  $OD_S$  là giá trị OD của mẫu kiểm tra;

$OD_n$  là giá trị OD của mẫu đối chứng.

Nếu  $S_n \geq 2$  thì mẫu bị nhiễm vi rút.

Kết quả được biểu thị tỉ lệ phần trăm số mẫu thử có nhiễm vi rút trên tổng số mẫu thử được kiểm tra.

## Phụ lục A

(tham khảo)

### Đặc điểm một số sâu, bệnh hại chính thường gặp ở củ giống khoai tây

#### A.1 Rệp sáp trắng

Tên khoa học *Pseudococcus citri* Russo, thuộc họ Rệp (Aphidae).

Cơ thể rệp sáp trắng có hình bầu dục, thuôn dài, kích thước từ 1 mm đến 2 mm. Rệp non có màu hồng, rệp trưởng thành có một lớp sáp trắng như vôi phủ kín quanh mình. Rệp cái không có cánh, rệp đực có cánh, trứng rệp cũng có lớp lông sáp phủ kín.

Rệp sáp thường xuất hiện vào thời kỳ cây sinh trưởng mạnh (từ 30 ngày tuổi đến 60 ngày tuổi), tụ tập ở phần ngọn, ở các nách lá, ở mặt dưới của lá. Khi gần thu hoạch, rệp sống chủ yếu ở gốc cây khoai tây, bám vào mắt củ và theo củ vào kho bảo quản. Trong kho bảo quản, rệp sáp thường sống tập trung ở mắt củ, xung quanh mầm để chích hút dịch của mầm khoai tây làm cho mầm bị teo khô, củ giống khoai tây bị khô cứng lại, khi trồng không mọc được. Rệp sáp trắng là côn trùng hại chủ yếu đối với củ giống khoai tây trong quá trình bảo quản.

#### A.2 Bệnh thối khô củ

Bệnh thối khô củ do nấm *Fusarium* spp. gây ra.

Triệu chứng bệnh ở củ: Vết bệnh xuất hiện ở trên bề mặt củ lúc đầu có màu nâu hoặc xám, hơi lõm xuống, sau lan rộng ra thành các vòng đồng tâm rất dễ phân biệt. Thịt củ bị thối ở bên trong, trở nên xốp và có màu xám tro hay phớt hồng do hệ sợi của nấm *Fusarium* phát triển tạo thành tùy theo từng loài nấm *Fusarium*. Củ giống khoai tây dần dần trở nên khô và cứng, không có khả năng mọc thành cây.

Nấm *Fusarium* chủ yếu lan truyền qua đất. Triệu chứng gây bệnh ở cây là những lá ở gần gốc bị héo vàng nên còn gọi là bệnh héo vàng, tuy không gây thành dịch nghiêm trọng nhưng khi gặp thời tiết nóng ẩm, nấm sẽ phát triển mạnh, làm cho cây phát triển yếu ớt hoặc bị thối và chết. Nấm có thể xâm nhập vào củ thông qua những vết xây xước ở trên bề mặt củ trong quá trình thu hoạch và gây bệnh thối khô củ trong quá trình bảo quản.

#### A.3 Bệnh thối ướt củ

Bệnh thối ướt củ là tên gọi chung các củ giống khoai tây bị bệnh do các loài nấm hoặc vi khuẩn gây ra.

Bệnh thối ướt củ có thể do nhiễm các loài nấm bệnh, chẳng hạn như nấm *Sclerotinia sclerotianum* gây bệnh mốc trắng, nấm *Sclerotium rolfii* gây bệnh thối thân ở cây khoai tây... Bệnh cũng có thể do nhiễm các loài vi khuẩn, chẳng hạn như vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* gây bệnh héo xanh, vi khuẩn *Erwinia* spp. gây bệnh thối nhũn hoặc vi khuẩn *Corynebacterium* spp. gây bệnh thối vòng ở khoai tây...

Bệnh thối ướt củ giống khoai tây do nấm hoặc vi khuẩn gây ra có đặc điểm chung là vết bệnh ở củ bị thối và ướt, có mùi khó ngửi. Tuy nhiên, củ bị bệnh thối ướt do nấm có mùi nhẹ hơn, thịt củ thường có màu nâu vàng do sợi nấm phát triển mạnh tạo thành, củ hơi nhũn và bị nát dần. Củ bị bệnh thối ướt do vi khuẩn thường có mùi khó ngửi nặng hơn, vỏ củ biến thành một cái bọc đầy nước, thịt củ bị thối nhũn và có nước dịch chảy ra, có màu đen như nước cống.

#### A.4 Bệnh héo xanh

Bệnh héo xanh còn gọi là bệnh chết xanh hoặc héo rũ do vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* gây ra. Đây là bệnh nghiêm trọng và phổ biến ở các nước nhiệt đới, làm giảm năng suất của khoai tây.

Triệu chứng bệnh ở cây: Cây đang xanh, tự nhiên bị héo rũ nhưng vẫn giữ được màu xanh. Bệnh có thể làm chết cả cây hoặc chết dần từng nhánh, gốc cây bị thối nhũn.

Triệu chứng bệnh ở củ: Củ bị bệnh ở phần cuối củ hay mắt củ có dịch hơi nhầy màu trắng, sau chuyển thành màu trắng ngà, đục như sữa. Nếu bị nặng thì củ sẽ thối nhũn, bóp nhẹ sẽ thấy sủi bọt ở rốn củ hay mắt củ, chất dịch có mùi thối khắm. Khi bở đôi củ thấy có một vòng nâu sẫm hoặc nâu đen ở ngoại bì.

#### A.5 Bệnh mốc sương

Bệnh mốc sương do nấm *Phytophthora infestans* gây ra. Bệnh mốc sương thường gặp ở các vùng trồng khoai tây khi nhiệt độ xuống thấp từ 18 °C đến 22 °C, độ ẩm không khí cao. Bệnh gây hại nghiêm trọng và làm giảm năng suất khoai tây.

Triệu chứng bệnh ở cây: Bệnh có thể gây hại ở lá, thân và củ. Vết bệnh thường xuất hiện ở mép lá và mặt dưới của lá, sau lan lên mặt trên lá, lên ngọn cây và thân cây. Vết bệnh lúc đầu có màu xanh tái, đọng nước, sau vài ngày chuyển thành màu nâu khi gặp trời khô và màu đen khi trời ẩm ướt. Xung quanh vết bệnh thường có viền màu vàng nhạt. Vết bệnh ở thân và cuống lá có màu nâu đen và toàn bộ cây có thể bị chết sau vài ngày.

Triệu chứng bệnh ở củ: Vết bệnh ở trên củ lúc đầu hơi lõm, có màu nâu nhạt. Bở đôi củ có thể thấy các mô củ bị thối, có màu nâu nhưng rất khó phân biệt với các mô khỏe mạnh. Về sau, các vi sinh vật gây thối phát triển mạnh ở bên trong các mô làm cho vết thối lan rộng ra. Quan sát bên ngoài thấy phần củ bị bệnh sẽ chai cứng lại và có màu hơi nâu xám.

## **A.6 Bệnh nấm hạch**

Bệnh nấm hạch còn gọi là bệnh lở cổ rễ do nấm *Rhizoctonia solani* gây ra, tuy không gây thành dịch bệnh nghiêm trọng ở khoai tây nhưng có thể làm chết cây trong quá trình sinh trưởng.

Triệu chứng bệnh ở cây: Triệu chứng bệnh ở cây rất khác nhau. Vết bệnh thường có màu nâu, hơi lõm, có kích thước và hình dạng khác nhau. Mầm bị bệnh sẽ làm cây ngừng hoặc chậm sinh trưởng. Khi bệnh phát triển mạnh, các vết bệnh sẽ lan xuống thân và gốc làm cho cây bị thối gốc, héo rũ và chết. Những cây bị bệnh thường ra củ khí sinh ở ngay nách lá hoặc không có củ, sau ít lâu thì cây sẽ bị chết.

Triệu chứng bệnh ở củ: Vết bệnh ở trên củ có màu nâu sẫm, cứng, có kích thước và hình dạng rất khác nhau. Khi nấm phát triển mạnh có thể biến thành hạch nấm có màu nâu đậm và rất dễ rụng.

## **A.7 Bệnh thối vòng**

Bệnh thối vòng do vi khuẩn *Corynebacterium* spp. gây ra, thường gặp ở các giống khoai tây nhập từ các nước ôn đới và thuộc loại bệnh truyền qua hạt hoặc củ giống.

Triệu chứng bệnh ở cây: Vết bệnh thường xuất hiện ở phần thân sát gốc và làm cho cây bị héo dần từ gốc lên. Các lá ở phía dưới bị biến vàng ở phần thịt lá nằm giữa các gân chính, các mép lá phía trên bị cuộn lại và lá sẽ bị chết.

Triệu chứng bệnh ở củ: Bỏ đôi củ thấy có một vòng màu nâu, khi dùng tay bóp nhẹ thì có dịch vi khuẩn rỉ ra. Nếu củ bị bệnh nặng, vòng này bị thối nhũn và chuyển thành màu xám, vàng hoặc nâu đỏ.

## **A.8 Bệnh thối nhũn**

Bệnh thối nhũn do các loài vi khuẩn *Erwinia* spp. gây ra. Bệnh thường gặp ở các vùng trồng khoai tây có điều kiện khí hậu nóng, ẩm.

Triệu chứng bệnh ở cây: Vết bệnh có màu đen và nhớt, thường xuất hiện ở phần gốc của cây do mầm của củ mẹ bị bệnh phát triển lan ra toàn thân. Cây non thường bị còi cọc và phồng lên, lá bị úa vàng, uốn cong, cuối cùng bị thối và chết. Nhổ cây lên nếu có củ thì thấy củ thường bị thối ở phần cuối, có mùi khó ngửi.

Triệu chứng bệnh: Trên củ có những vùng bị thối, hơi lõm xuống và có hình tròn, từ đó bệnh sẽ lan dần ra. Bỏ đôi củ thấy có những vùng mô bị ướt, mềm, có màu kem hoặc nâu vàng rất dễ phân biệt với các mô khỏe mạnh. Nếu củ bị bệnh nặng, các vùng thối sẽ phát triển rộng và toàn bộ củ bị thối nhũn.

## **A.9 Bệnh vi rút**

Bệnh vi rút có nhiều dạng, do cây bị nhiễm các loại vi rút gây ra. Tác nhân truyền bệnh vi rút khoai tây chủ yếu là do rệp chích hút nhựa cây và truyền vi rút từ cây bị bệnh sang các cây khỏe mạnh. Bệnh vi rút truyền theo mạch dẫn, do vậy cây bị bệnh thì củ cũng sẽ bị bệnh, nếu đem trồng thì cả khóm khoai tây sẽ bị bệnh và lây nhiễm sang những cây xung quanh và làm giảm năng suất khoai tây.

Bệnh vi rút hại khoai tây được chia thành 2 nhóm:

- Nhóm bệnh vi rút gây hại nặng là bệnh cuốn lá và bệnh xoắn lá;
- Nhóm bệnh vi rút gây hại nhẹ là bệnh khảm lá.

Các bệnh do vi rút chủ yếu phân biệt dựa vào triệu chứng bệnh ở trên cây ngoài đồng ruộng. Các cây bị nhiễm bệnh vi rút thường còi cọc, lá bị mất diệp lục, biến màu và có kích thước nhỏ. Để xác định các loại vi rút gây bệnh ở khoai tây phải dùng các phương pháp chẩn đoán bằng kháng huyết thanh miễn dịch (ELISA) hoặc các phương pháp xác định riêng. Các củ bị nhiễm bệnh vi rút thường bé, đa số là củ bi và dị dạng. Bệnh vi rút cũng có thể ở dạng ẩn.

#### **A.10 Các loài sâu bệnh hại khoai tây thuộc đối tượng kiểm dịch thực vật**

- Bệnh ung thư khoai tây: *Synchytrium endobioticum* Perc.
- Bệnh ghè bột khoai tây: *Spongospora subterranea* (Wall) Lag
- Sâu cánh cứng hại khoai tây: *Leptinotarsa decemlineata* Say
- Ngài hại khoai tây: *Phthorimaca operculella* Zeller
- Tuyến trùng gây thối củ khoai tây: *Ditylenchus destructor* Thorne
- Tuyến trùng bào nang khoai tây: *Globodera pallida* (Stone) Mulvey et Stone
- Tuyến trùng bào nang ánh vàng khoai tây: *Globodera rostochiensis* (Wollenweber).

**Phụ lục B**

(quy định)

**Thành phần và chuẩn bị một số dung dịch thuốc thử****B.1 Đệm kháng thể (coating buffer)**

Natri carbonat	1,59 g
Natri bicarbonat	2,93 g
Natri azit (nếu bảo quản lâu)	0,2 g

Hòa tan trong 1000 ml nước cất, chỉnh pH đến 9,6 và giữ ở nhiệt độ 4 °C.

**B.2 Đệm rửa (PBST buffer)**

Natri clorua	8,0 g
Natri phosphat, dibasic (dạng khan)	1,15 g
Kali phosphat, monobasic (dạng khan)	0,2 g
Kali clorua	0,2 g
Tween-20	0,5 g

Hòa tan trong 1000 ml nước cất, chỉnh pH đến 7,4 và giữ ở nhiệt độ 4 °C.

**B.3 Đệm nghiền mẫu (extraction buffer)**

Có thể dùng đệm coating hoặc dùng đệm với các thành phần sau:

Natri sunfit (dạng khan)	1,3 g
Polyvinylpyrrolidone (PVP) MW 24-40,000	20,0 g
Albumin trứng gà, loại II	2,0 g
Tween-20	20,0 g
Natri azit (nếu bảo quản lâu)	0,2 g

Hòa tan trong 1000 ml PBST, chỉnh pH đến 7,4 và giữ ở nhiệt độ 4 °C.

**B.4 Đệm liên kết (ECI buffer)**

Ovabumin hoặc albumin huyết thanh bò (BSA)	2,0 g
Polivinylypyrrolidone (PVP) MW 24-40,000	20,0 g
Natri azit (nếu bảo quản lâu)	0,2 g

Hòa tan trong 1000 ml PBST, chỉnh pH đến 7,4 và giữ ở nhiệt độ 4 °C.

**B.5 Đệm chất nền (substrate buffer)**

Magie clorua ngậm sáu phân tử nước	0,1 g
Dietanolamin	97,0 ml
Natri azit (nếu bảo quản lâu)	0,2 g

Hòa tan trong 800 ml nước cất, chỉnh pH đến 9,8 rồi thêm nước cất cho đủ 1000 ml. Giữ ở nhiệt độ 4 °C.

---