BỘ NÔNG NGHIỆPVÀ
PHÁT TRIỂN NÔNG THÔN
CỤC BẢO VỆ THỰCVẬT

Số: 73 /QĐ-BVTV

CỘNG HOÀ XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc Lập - Tự Do - Hạnh Phúc

Hà Nội, ngày 14 tháng 01 năm 2010

QUYẾT ĐỊNH

Công nhận " Quy trình chẩn đoán bệnh vi rút lùn sọc đen phương nam (*bệnh lùn sọc đen*) " là tiến bộ kỹ thuật mới

CỤC TRƯỞNG CỤC BẢO VỆ THỰC VẬT

- Căn cứ Quyết định số 17/2008/QĐ-BNN ngày 28/01/2008 của Bộ trưởng Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn qui định chức năng, nhiệm vụ quyền hạn và tổ chức bộ máy của Cục Bảo vệ thực vật;

- Căn cứ Quyết định số 86/2008/QĐ-BNN ngày 11/8/2008 của Bộ trưởng Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn về việc ban hành qui chế công nhận tiến bộ kỹ thuật và công nghệ mới của ngành nông nghiệp và phát triển nông thôn;

- Căn cứ vào biên bản của Hội đồng khoa học Công nghệ Viện KHNN Việt Nam ngày 27/12/2009 về kết quả chẩn đoán hiện tượng " Vàng lùn, lùn xoắn lá" hại lúa ở các tỉnh phía Bắc.

- Căn cứ văn bản chỉ đạo của Bộ Nông nghiệp và PTNT số 62/BNN-KHCN về việc xem xét công nhận bệnh hại lúa " Lùn sọc đen phương nam" là tiến bộ kỹ thuật

- Căn cứ văn bản số 27/CV/BVTV-KH của Viện Bảo vệ thực vật về việc đề nghị công nhận tiến bộ kỹ thuật xác định bệnh mới hại lúa ở phía Bắc.

- Theo đề nghị của Ban công nhận tiến bộ khoa học kỹ thuật mới Cục Bảo vệ thực vật,

QUYẾT ĐỊNH

Điều 1: Nay công nhận "Quy trình chẩn đoán bệnh vi rút lùn sọc đen phương nam *Southern Rice Black-Streaked Dwarf* Virus gọi tắt là ***bệnh lùn sọc đen*** (Hiện tượng vàng lùn, lùn xoắn lá gây hại lúa ở các tỉnh phía Bắc và miền Trung vụ mùa 2009 là do vi rút thuộc nhóm Fijivirus-2, họ Reoviridae. Môi giới chính truyền bệnh là rầy lưng trắng *Sogatella furcifera*)" là tiến bộ kỹ thuật (TBKT), có bản quy trình kèm theo.

Điều 2: Viện Bảo vệ thực vật và các đơn vị liên quan hướng dẫn, phổ biến TBKT trên áp dụng trong sản xuất.

Điều 3: Cục Bảo vệ thực vật, Cục Trồng trọt, Trung tâm Khuyến nông quốc gia, Sở Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, Chi cục Bảo vệ thực vật các tỉnh, thành phố trực thuộc Trung ương và thủ trưởng các đơn vị có liên quan chịu trách nhiệm thi hành quyết định này./.

Nơi nhận:
- *Như điều 2;3;*
- *Lưu VT-KH.*

KT. CỤC TRƯỞNG
PHÓ CỤC TRƯỞNG

Bùi Sĩ Doanh

QUY TRÌNH
CHẨN ĐOÁN BỆNH VI RÚT LÙN SỌC ĐEN PHƯƠNG NAM HẠI LÚA

(Ban hành kèm theo quyết định số 73/QĐ-BVTV ngày 14 tháng 01 năm 2010)

Phương pháp nghiên cứu, khảo nghiệm, thử nghiệm, nguồn gốc của tiến bộ kỹ thuật

Bệnh do vi-rút lúa lùn sọc đen phương nam (*Southern rice black-streaked dwarf virus*, SRBSDV) mới chỉ ghi nhận gây hại ở Trung Quốc và Việt nam. Tại Trung Quốc bệnh phát sinh và gây hại đầu tiên ở tỉnh Quảng Đông vào năm 2001 và ở đảo Hải Nam năm 2003. Ở các tỉnh phía nam Trung Quốc, nhất là vùng gieo cấy 2 vụ lúa/ năm tác hại của bệnh nặng hơn so với vùng chỉ cấy một vụ lúa trong năm. Cho đến cuối năm 2009 bệnh đã phát sinh và gây hại trên 10 tỉnh trồng lúa ở phía nam Trung Quốc và đe dọa trên diện tích 30 triệu ha lúa. Bệnh không chỉ gây hại trên lúa mà còn gây hại trên ngô. Tại Hải Nam, nhiều vùng sản xuất hạt lúa lai và ngô lai bị bệnh gây thiệt hại nặng trên cả dòng bố, mẹ và năng suất hạt lai giảm đáng kể.

Tại Việt Nam, bệnh ghi nhận đầu tiên tại Nghệ An vào tháng 8 năm 2009, cho đến nay đã có 20 tỉnh có lúa bị bệnh và 19 tỉnh có cây ngô bị bệnh. Bệnh gây hại nhiều vùng sinh thái và tiểu vùng khí hậu khác nhau từ duyên hải đồng bằng sông Hồng đến vùng núi cao như Lai Châu, Sơn La. Từ Móng Cái đến Quảng Nam. Như vậy sự hiện diện của bệnh đã được ghi nhận ở miền Trung và đã và đang đe doạ trực tiếp cho sản xuất lúa không chỉ tại Quảng Nam mà còn lây lan ra các tỉnh miền trung khác và Tây Nguyên, nơi gieo cấy nhiều giống lúa có nguồn gốc từ Trung Quốc.

Trước tình hình lay lan và gây hại nguy hiểm của bệnh, ngày 4 tháng 9 năm 2009, tại Nghệ An, Bộ trưởng Cao Đức Phát đã giao nhiệm vụ xác định tác nhân gây bệnh và con đường lây lan của bệnh cho Viện Bảo vệ thực vật thuộc Viện Khoa học nông nghiệp Việt Nam. Sau bốn tháng khẩn trương tiến hành phân tích và xét nghiệm theo một qui trình tiêu chuẩn xác định bệnh vi rút thực vật, với sự hợp tác của các cơ quan nghiên cứu trong và ngoài nước, ngày 27 tháng 12 năm 2009, Hội đồng Khoa học công nghệ của Viện Khoa học nông nghiệp Việt Nam đã đề nghị Bộ Nông nghiệp và PTNT công nhận kết quả xác định tác nhân gây bệnh trên lúa và ngô ở các tỉnh phía Bắc là do một loại bệnh vi rút mới có tên *" Bệnh vi rút lúa lùn sọc đen phương nam"* gây ra.

Ngày 6 tháng 1 năm 2010 đoàn khảo sát của Viện Khoa học nông nghiệp Việt Nam, Viện Bảo vệ thực vật và Cục Bảo vệ thực vật đã khảo sát tại vùng Luo Geng yang, thành phố Sanya, cực nam của đảo Hải Nam (ở 109 độ vĩ bắc, 18 độ kinh đông) vùng này có vĩ độ tương đương với tỉnh Hà Tĩnh của nước ta thấy rằng vụ lúa mùa 2009 nhiều diện tích lúa bị mất trắng. Với ngô sản xuất hạt lai đang ở giai đoạn trổ cờ có tới trên 60 % bị bệnh ở cả hai địa điểm đoàn đến khảo sát.

Tại hội thảo ngày 7 tháng 1 năm 2010 ở Sanya – Hải Nam, các nhà khoa học Trung Quốc, Việt Nam và IRRI cũng có chung một nhận định có thể các cơn bão đi qua Hải Nam đổ bộ vào nước ta đã mang theo rầy nhiễm bệnh và lân lan ở nước ta. Phía Trung Quốc cho rằng vùng lúa sát biên giới Việt Nam ở tỉnh Quảng Tây bị bệnh trong vụ mùa vừa qua có thể do rầy lưng trắng mang bệnh di trú từ Quảng Ninh của nước ta. Hội nghị cũng thống nhất để chủ động phòng chống bệnh cần có một chương trình hợp tác nghiên cứu và quản lý dịch bệnh toàn diện.

1. Triệu chứng của bệnh

" Bệnh vi rút lúa lùn sọc đen phương nam" là thành viên thuộc nhân nhóm *Fijivirus-2*, nhóm *Fijivirus,* họ *Reoviridea.* Tiểu thể vi-rút có dạng hình cầu, đường kính khoảng 80nm. Bộ gene bao gồm 10 phân tử mạch kép RNA và 5 protein.

Cây lúa bị bệnh có triệu chứng chung là thấp lùn, lá xanh đậm hơn bình thường. Lá bị bệnh có thể xoăn ở đầu lá hoặc toàn bộ lá. Gân lá ở mặt sau bị sưng lên, khi cây còn non thì gân chính trên bẹ lá cũng bị sưng phồng. Cây lúa bị bệnh có bộ rễ phát triển kém, bị thâm đen và rất dễ nhổ.

Cây lúa bị bệnh ở giai đoạn sớm thì phát triển còi cọc, lụi dần và chết. Các cây không bị chết thì cằn cỗi và không thể phát triển được. Cây lúa bị bệnh muộn hơn thì giai đoạn làm đòng và khi lá có lóng, cây thường nảy chồi trên đốt thân và mọc nhiều rễ bất định. Trên bẹ và lóng thân xuất hiện nhiều u sáp và sọc đen. Bị bệnh nặng cây lúa không trổ bông được hoặc trổ bông không thoát và hạt thường bị đen

Trên cây ngô, khi bị bệnh cây cũng thấp lùn, lá xanh đậm, mặt sau của lúa và trên bẹ gân bị sưng lên. Cây vẫn trổ cờ và có bắp nhưng không tung phấn được và bắp cũng không có hạt. Cây ngô bị bệnh cũng có bộ rễ kém phát triển và rất dễ nhổ.

2. Tác nhân gây bệnh và môi giới truyền bệnh

Chụp ảnh hiển vi điện tử tác nhân gây bệnh và sử dụng kỹ thuật công nghệ sinh học để tìm hiểu tác nhân gây bệnh, Viện Bảo vệ thực vật đã xác định một loại vi rút mới trên các mẫu bệnh thu thập tại Nghệ An, Nam Định, Thái Bình và Quảng Ninh. Vi rút này có hình cầu, đường kính từ 70 đến 85 nm. Phân tích ADN và so sánh gia phả cho thấy vi rút này giống với vi rút gây bệnh lúa lùn sọc đen phương gây hại trên lúa và ngô ở tỉnh Quảng Đông và ở đảo Hải Nam của Trung Quốc.

Thí nghiệm lây bệnh nhân tạo với các loại rầy gây hại trên lúa ở các tỉnh phía Bắc nước ta tại Viện Bảo vệ thực vật từ tháng 9 năm 2009 đến nay, kết quả mới chỉ ghi nhận được rầy lưng trắng (*Sogatella furcifera*) là môi giới chính truyền bệnh trên cả lúa và ngô. Các thí nghiệm truyền bệnh với các loại rầy khác vẫn đang được tiếp tục tiến hành. Ở Trung Quốc, người ta xác định rầy nâu nhỏ (rầy xám) có tham gia truyền bệnh nhưng hiệu quả truyền bệnh thấp.

Thí nghiệm tìm hiểu khả năng truyền bệnh qua hạt giống được tiến hành ngày 22 tháng 9 đến ngày 19 tháng 12 năm 2009 với hạt lúa được thu từ 5 loại giống bị bệnh tại Nghệ An trong vụ lúa hè thu 2009, kết quả cho thấy 88 ngày sau gieo vẫn không ghi nhận được triệu chứng của bệnh. Điều này chứng tỏ bệnh không lây truyền qua hạt giống.

Qui trình chẩn đoán bệnh vi-rút lùn sọc đen phương nam (SRBSDV) hại lúa được thực hiên theo quy trình KOCH

1. Xác định bệnh nguyên

1.1. Thu thập và duy trì nguồn bệnh

- Thu thập, chụp ảnh và mô tả triệu chứng những mẫu cây lúa nhiễm bệnh với các dạng triệu chứng điển hình cây thấp lùn, lá xanh đậm hơn bình thường. Gân lá ở mặt sau bị sưng lên, khi cây còn non thì gân chính trên bẹ lá cũng bị sưng phồng.
- Duy trì các cây lúa có dạng triệu chứng điển hình trong nhà lưới cách ly và trong lồng lưới cách ly côn trùng.

1.2. Chẩn đoán bệnh

Bước 1: Giám định bệnh bằng phương pháp hiển vi điện tử: có thể áp dụng 1 hoặc cả 2 phương pháp nghiền đồng thể (hormonizer) và bản mỏng (thin-layer).

Bước 2: Giám định bệnh bằng phương pháp PCR/RT-PCR (chi tiết: xem phụ lục 1, 2 và 3). Tiến hành tuần tự các bước sau đây:

- Giải trình tự gene sản phẩm PCR.
- Phân tích trình tự gene
    - Sử dụng chức năng BLAST trong ngân hàng gene để xác định độ tương đồng với tất cả các trình tự nucleic-acid hiện có trong ngân hàng gene.
    - Sử dụng phần mềm MEGA-4.1 để phân tích gia phả trình tự gene thu được với các trình tự gene tương ứng của các vi-rút có độ tương đồng cao nhất cũng như các vi-rút cùng nhóm hoặc cùng phân nhóm và các vi-rút thuộc nhóm hay phân nhóm khác cùng họ

2. Lây nhiễm bệnh nhân tạo

Tiến hành các thí nghiệm lây bệnh nhân tạo với rầy nâu, rầy nâu nhỏ, rầy lưng trắng theo 2 phương pháp: lây bệnh cá thể (1 rầy/1 lúa x 24h) và lây bệnh tập thể (10 rầy/10 lúa x 24h).

- **Phân lập và nhân nuôi rầy sạch**: Rầy nâu, rầy nâu nhỏ, rầy lưng trắng nhân nuôi riêng rẽ trên cây lúa sạch trong phòng nhân nuôi côn trùng của Viện BVTV tối thiểu ở đời thứ 5 đến thứ 7 sử dụng cho lây nhiễm bệnh nhân tạo
- **Lây bệnh nhân tạo:**

- Thu rầy sạch tuổi 3-4 sau đó cho tiếp xúc với cây lúa bị bệnh ít nhất 10 ngày trước khi tiến hành lây bệnh nhân tạo.

- Cây lúa TN1 sạch bệnh gieo trong khay bầu, 1 hạt/bầu, khay gieo lúa được giữ trong lồng lưới cách ly côn trùng, chăm sóc bình thường đến 10 ngày tuổi.

- Thu rầy đã tiếp xúc với cây bệnh thả vào khay có lúa sach TN1 đã chuẩn bị sẵn.

- Lây bệnh nhân tạo theo cả 2 phương pháp: Lây bệnh cá thể (1 rầy/1 lúa trong 24h) lặp lại 100 lần và lây bệnh tập thể (10 rầy/10 lúa trong 24h) lặp lại 15 lần.

- Sau 24h lây nhiễm, bắt toàn bộ rầy ra và trồng các các cây lúa đã lây bệnh vào các ô thí nghiệm có lồng lưới chống côn trùng. Chăm sóc bình thường và theo dõi diễn biến

phát triển triệu chứng. Sau đó thu các cây lúa biểu hiện triệu chứng bệnh giám định bằng phương pháp RT-PCR cũng như đọc trình tự gen

Kết quả theo dõi thí nghiệm của Viện cho đến nay mới chỉ ghi nhận rằng rầy lưng trắng là môi giới truyền bệnh vi rut lúa lùn sọc đen phương nam

3.Tái xác định nguồn bệnh trên cây được lây nhiễm nhân tạo

- Cây lúa bị bệnh có biểu hiện triệu chứng đã được phân tích RT-PCR với các cặp mồi được sử dụng để chẩn đoán bệnh. Mẫu bệnh trên cây lúa bị bệnh thu được trong thí nghiệm lây bệnh nhân tạo đều có phản ứng dương tính. Sản phẩm PCR đã được giải mã trình tự gen. Kết quả giải mã gen cho thấy trình tự gen của sản phẩm PCR hoàn toàn trùng khớp với kết quả phân tích nguồn bệnh thu được từ ngoài đồng, trước khi lây bệnh nhân tạo.

Điều kiện áp dụng

Thực hiện qui trình chẩn đoán theo nguyên tắc KOCH nêu trên hoàn toàn có thể chẩn đoán bệnh vi rút lúa lùn sọc đen phương nam (SRBSDV) trong điều kiện của Việt Nam.

Dùng cho các cơ sở nghiên cứu có phòng thí nghiệm có đủ điều kiện tiến hành phương pháp PCR, có đủ điều kiện nhà lưới chống côn trùng và nguồn nhân lực để tiến hành các thí nghiệm lây bệnh nhân tạo.

PHỤ LỤC 1

Qui trình tách chiết RNA tổng số sử dụng Trizol

- *Với mẫu lá tươi:* 0,2 g mẫu được nghiền thật kỹ bằng chày cối sứ cùng với 2 ml Trizol (*Invitrogen*). Dịch nghiền được chuyển vào 1 ống tuýp dung tích 1,5 ml , để cố định ở nhiệt độ phòng 5 phút trước khi tiến hành ly tâm 13.000 vòng/phút trong 15 phút. Sau khi ly tâm, phần dịch trong phía trên (900 µl) được chuyển sang 1 tuýp khác và thêm 400 µl Chloroform, lắc thật mạnh hoặc vortex. Để cố định tuýp ở nhiệt độ phòng 5 phút trước khi tiến hành ly tâm 13.000 vòng/phút trong 15 phút. Phần dịch trong phía trên (500 µl) lại được chuyển sang 1 tuýp khác và RNA được kết tủa bằng 250 µl ice-cold Isopropanol và 250 µl 2M NaCl. Lắc mạnh và ly tâm 12.000 vòng/phút trong 10 phút. Loại bỏ phần dịch trong và rửa phần kết tủa 3 lần với cồn 70° và 1 lần cuối bằng cồn tuyệt đối. Để khô tuýp ở nhiệt độ phòng rồi hòa tan RNA thu được bằng 130 µl Rnase-free H_2O.
- *Với mẫu lá ép khô:* Chỉ cần 0,05g lá ép khô và thực hiện các bước còn lại tương tự như với mẫu lá tươi.
- *Với cá thể rầy:* Các bước tuần tự giống như với mẫu lá lúa. Chỉ khác về lượng các hoá chất. Mỗi mẫu rầy (1 hoặc nhiều rầy) cần 500 – 1000 µl Trizol. Nghiền nát rầy bằng chày nhựa nhỏ trong ống tuýp dung tích 1,5ml. Để ở nhiệt độ phòng 5 phút và trong bể cách thủy đặt ở 65°C 5 phút rồi ly tâm 13.000 vòng/phút trong 15 phút. Sau khi ly tâm, chuyển toàn bộ phần dịch trong phía trên sang 1 tuýp mới. Thêm 200µl Chloroform, lắc thật mạnh hoặc vortex. Để ở nhiệt độ phòng 5 phút trước khi ly tâm 13.000 vòng/phút trong 15 phút. Chuyển 200 µl dịch trong phía trên sang 1 tuýp mới. Thêm 100 µl ice-cold Isopropanol và 100 µl 2M NaCl. Lắc mạnh và ly tâm 12.000 vòng/phút trong 10 phút. Loại bỏ phần dịch trong và rửa phần kết tủa 3 lần với cồn 70° và 1 lần cuối bằng cồn tuyệt đối. Để khô tuýp ở nhiệt độ phòng rồi hòa tan RNA thu được bằng 10 – 20 µl Rnase-free H_2O.

PHỤ LỤC 2

Phương pháp one-step RT-PCR

Chu trình nhiệt, thành phần và dung lượng các hóa chất phân tích sử dụng cho mỗi phản ứng one-step RT-PCR được trình bày trong bảng dưới đây.

Thành phần hoá chất		
Tên	Lượng dùng (µl)	
10x PCR buffer	5,0	2,5
25mM $MgCl_2$	5,0	2,5
10mM dNTPs	1,0	1,0
10 pM Primer up	1,0	0,5
10 pM Primer down	1,0	0,5
M-MuLV (20U/µl)(*)	0,2	0,2
Taq-DNA (5U/µl)	1,0	0,5
RNA	3,0	2,0
Rnase-free H_2O	32,8	15,3
Tổng số:	50	25

Chu trình nhiệt	
Nhiệt độ	Thời gian
1. 42°C	60: 00
2. 94°C	3:00
3. 94°C	0:30
4. 52°C	0:30
5. 72°C	1:30
6. Quay lại 3	x 30 lần
7. 72°C	10:00
8. 15°C	∞

(*) *Chúng tôi sử dụng enzym phiên mã ngược Reverse-Aid M-MuLV (Fermentas cho kết quả tốt, ổn định).*

PHỤ LỤC 3

DANH SÁCH CÁC CẶP MỒI DÙNG ĐỂ CHẨN ĐOÁN BỆNH VI-RÚT LÚA LÙN SỌC ĐEN PHƯƠNG NAM (SRBSDV)

TT	Tên cặp mồi/ nguồn gốc	Đối tượng	Số mẫu	Kết quả
1	**RBSDVS10F1/R1**(1800bp) (Cường HV và Anh TH, 2009)	SRBSDV	12	+/ phản ứng tốt
2	**RBSDV-S10F2/R2**(600bp) (Cường HV và Anh TH, 2009)	SRBSDV	91	+/ phản ứng tốt
3	**SRBSDVS10F3/R3**(525bp) (Zhou et al., 2008)	SRBSDV	12	+/ phản ứng tốt
4	**RBSDV-2S3-16/18**(529bp) (ZAAS, 2009)	SRBSDV	12	+/ phản ứng tốt
5	**RBSDV-2S7F1/R1**(673bp) (Anh TH, 2009)	SRBSDV	4	+/ phản ứng tốt