



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0025649

(51)⁷ G01N 21/78; G01N 21/77; G01N 1/28; (13) B
G01N 1/42

(21) 1-2016-00236

(22) 16/07/2013

(86) PCT/CN2013/079470 16/07/2013

(87) WO 2014/201744 A1 24/12/2014

(30) 201310244391.7 19/06/2013 CN

(45) 26/10/2020 391

(43) 25/03/2016 336A

(73) GUANGDONG ENTOMOLOGICAL INSTITUTE (CN)

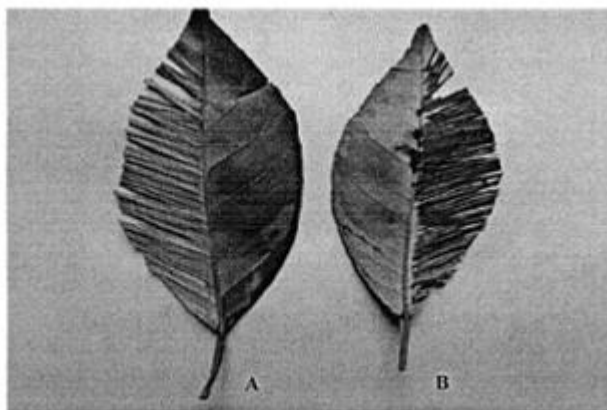
No. 105, Xingang Road West, Haizhu District, Guangzhou City, Guangdong Province, China 510260

(72) RUNQIAN MAO (CN); YUHONG ZHANG (CN); JIHUAN ZHENG (CN);
ZHIPING PAN (CN); JINCHENG QUAN (CN); MINGDU HUANG (CN).

(74) Công ty Cổ phần Tư vấn ENCO (ENCO CONSULTANCY CORP.)

(54) PHƯƠNG PHÁP CHẨN ĐOÁN NHANH BỆNH VÀNG LÁ GÂN XANH TRÊN
CÂY HỌ CAM QUÝT

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp chẩn đoán nhanh bệnh vàng lá gân xanh trên cây họ cam quýt. Theo sáng chế, độ chính xác của việc chẩn đoán bệnh vàng lá gân xanh trên cây họ cam quýt được cải thiện đáng kể theo cách thức sau: loại bỏ tác động của tinh bột còn sót lại bằng cách loại bỏ một cách có hiệu quả tinh bột còn sót lại được chứa trong lá; loại bỏ tác động của chất diệp lục bằng cách loại bỏ một cách có hiệu quả chất diệp lục; và làm hiện màu trực tiếp trên lá thay vì trộn và nghiền lá trong nước, để tránh vấn đề về độ chính xác của phản ứng hiện màu được tiến hành bằng cách trộn lá với nước có khả năng bị ảnh hưởng do tinh bột không hoàn tan được trong nước. Do đó, đạt được sự chẩn đoán nhanh bệnh vàng lá gân xanh trên cây họ cam quýt với mức độ chính xác cao, cung cấp phương tiện phát hiện hiệu quả để kiểm soát bệnh vàng lá gân xanh trên cây họ cam quýt và mang lại lợi ích cho việc kiểm soát bệnh vàng lá gân xanh trên cây họ cam quýt.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực kiểm soát bệnh trên cây họ cam quýt, và cụ thể là phương pháp chẩn đoán nhanh bệnh vàng lá gân xanh trên cây họ cam quýt.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Trung Quốc là một trong những quốc gia trồng cây họ cam quýt lớn nhất, và ngành cây họ cam quýt là bộ phận chủ lực của ngành nông nghiệp Trung Quốc, chiếm một vị trí rất quan trọng trong nền kinh tế nông nghiệp và đóng một vai trò rất quan trọng trong việc gia tăng thu nhập của nông dân, tạo công ăn việc làm và xây dựng nông thôn xã hội chủ nghĩa mới. Các loại dịch bệnh và sâu bệnh trên cây họ cam quýt là những trở ngại lớn đối với sự phát triển của ngành cây họ cam quýt, trong đó nghiêm trọng nhất là bệnh vàng lá gân xanh trên cây họ cam quýt mà được biết đến là “bệnh ung thư” của cây họ cam quýt này. Với sự phát triển nhanh của ngành cây họ cam quýt, sự xuất hiện và thiệt hại gây ra bởi bệnh vàng lá gân xanh trên cây họ cam quýt trở nên ngày càng nghiêm trọng. Bệnh này là một bệnh lây nhiễm trên thực vật với tổn hại lớn, với giai đoạn dịch bệnh kéo dài, phạm vi nhiễm bệnh rộng và tỷ lệ nhiễm bệnh cao, dẫn tới việc cây họ cam quýt ở hầu hết các khu vực của Trung Quốc có tuổi thọ ngắn, sản lượng thấp và chi phí sản xuất cao, và dẫn tới thiệt hại kinh tế hàng năm lên tới hàng tỷ đô la, hạn chế và cản trở nghiêm trọng tới sự phát triển của ngành cây họ cam quýt ở Trung Quốc và thậm chí toàn thế giới.

Các kết quả nghiên cứu đã chứng minh rằng tác nhân gây bệnh vàng lá gân xanh trên cây họ cam quýt trong vườn chủ yếu được truyền qua rầy chổng cánh hại cây họ cam quýt (*Diaphorina citri*). Vì vậy, để kiểm soát bệnh vàng lá gân xanh, vấn đề cốt lõi là kiểm soát rầy chổng cánh trên cây họ cam quýt và giảm

thiểu số lượng quần thể rầy chổng cánh trên cây họ cam quýt trong vườn. Viện Côn trùng học Quảng Đông đã thực hiện một nghiên cứu tương đối chuyên sâu về rầy chổng cánh trên cây họ cam quýt và bệnh vàng lá gân xanh trên cây họ cam quýt, và đã nộp đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế có tên “Phương pháp kiểm soát rầy chổng cánh và bệnh vàng lá gân xanh trên cây họ cam quýt trong vườn cây họ cam quýt” với số đơn CN 201310049098.6.

Tuy nhiên, vấn đề chính trong việc kiểm soát bệnh vàng lá gân xanh ở thời điểm hiện tại là yêu cầu kỹ thuật cao và các khó khăn trong việc áp dụng. Chìa khóa của vấn đề nằm ở chỗ do kỹ thuật chẩn đoán và phát hiện không thể bắt kịp, nên những người nông dân không biết rằng cây họ cam quýt của họ đã bị nhiễm bệnh vàng lá gân xanh, vì vậy họ không tiến hành các biện pháp chủ động. Do đó, để kiểm soát bệnh vàng lá gân xanh trên cây họ cam quýt, khó khăn về kỹ thuật đặt ra nhu cầu cấp thiết phải phát triển một kỹ thuật chẩn đoán và phát hiện cho kết quả nhanh và dễ thực hiện.

Gần đây, kỹ thuật chẩn đoán và phát hiện chủ yếu bao gồm chẩn đoán các dấu hiệu nhận biết và triệu chứng trong vườn thông qua cây chỉ thị, chẩn đoán thông qua việc phát hiện dưới kính hiển vi điện tử, chẩn đoán thông qua việc phát hiện về miễn dịch, chẩn đoán thông qua việc phát hiện phân tử axit nucleic và phương pháp chẩn đoán trên cơ sở phản ứng của iot với tinh bột (Zhang Liping, 2009), trong đó kỹ thuật PCR là kỹ thuật chủ đạo ở thời điểm hiện tại (Deng Xiaoling et al., 1999; Wang Zhongkang et al., 2004; Meng Xiangchun et al., 2007). Phương pháp chẩn đoán trên cơ sở phản ứng của iot với tinh bột có nguồn gốc như sau. Schneider (1968) phát hiện ra rằng lá bị nhiễm bệnh vàng lá gân xanh trên cây họ cam quýt có hàm lượng tinh bột rất cao, và vào năm 2002, bằng cách sử dụng phương pháp mô học, Masatoshi Onuki đã chứng minh rằng có một số lượng lớn các hạt tinh bột được tích tụ trong lá cây họ cam quýt bị nhiễm bệnh vàng lá gân xanh trên cây họ cam quýt. Le Thi Thu Hong và Nguyen Thi Ngoc Truc (2003) sau đó đã xây dựng kỹ thuật chẩn đoán bệnh

vàng lá gân xanh trên cây họ cam quýt thông qua phản ứng iot, với những điểm chính như sau: (1) thu thập lá có các đặc điểm của bệnh vàng lá gân xanh trên cây họ cam quýt vào buổi sáng, không thu thập các lá ở phía bên trong, lá bị cuộn, lá mềm, cành, quả và rễ; (2) lấy 1 g lá, trộn với 2 ml nước cất và nghiền; (3) nhỏ thêm 2 μL dung dịch hỗn hợp của lá và nước lên tấm màng phản ứng (NCM, màng Nitroxenluloza), và sau 5 phút nhỏ thêm 2 μL dung dịch iot lên mẫu trên màng phản ứng; và (4) quan sát sự thay đổi màu sắc của lá để thu nhận kết quả, trong đó nếu phản ứng âm tính xảy ra, màu sắc sẽ không thay đổi, nếu phản ứng dương tính xảy ra, màu sắc sẽ chuyển sang xanh da trời. Tại Nhật Bản, TAKUSHI (2007) đã đo được hàm lượng của tinh bột trong lá cây họ cam quýt nhiễm bệnh vàng lá gân xanh trên cây họ cam quýt là 400-500 mg/kg, trong khi đó hàm lượng của tinh bột trong lá bình thường là 85,6 mg/kg, và đã xây dựng một kỹ thuật chẩn đoán nhanh. Trong kỹ thuật này, các tác giả đã làm xước bề mặt của lá bằng giấy nhám 20 lần, sau đó đặt giấy nhám vào túi nhựa, và thêm 25 μL dung dịch iot vào túi này để làm hiện màu. Tại Malaysia, Lily Eng (2007) đã lặp lại phương pháp nêu trên bằng cách sử dụng loại giấy nhám khác. Tại Trung Quốc, Zhang Liping et al. (2009) đã lặp lại kỹ thuật này theo các bước sau: nghiền mẫu từ cây họ cam quýt bị nhiễm bệnh đã thu thập được; thêm vào một lượng nước tinh khiết vừa đủ; sau đó nhỏ 4 μL dung dịch hỗn hợp của lá và nước lên trên màng phản ứng, và sau 5 phút, bổ sung một lượng dung dịch iot vừa đủ và quan sát sự thay đổi màu sắc, trong đó sự đồng nhất giữa kết quả thí nghiệm và kết quả theo kỹ thuật PCR đạt 93,3%.

Qua các nghiên cứu, tác giả sáng chế nhận thấy rằng kỹ thuật thay đổi màu tinh bột không được ứng dụng rộng rãi là do các nguyên nhân sau: (1) do mẫu được thu thập vào buổi sáng, sự tác động của tinh bột có trong lá bình thường không thực sự được loại bỏ, trong khi đó đôi lúc do các nhân tố môi trường, tinh bột được tích tụ do sự quang hợp của lá bình thường không được vận chuyển vào buổi tối và do đó tinh bột bị tồn dư trong lá bình thường vào buổi sáng; (2)

do chất diệp lục không được loại bỏ bằng kỹ thuật nêu trên, sự tác động của chất diệp lục có thể xảy ra trong quá trình hiện màu và có thể ảnh hưởng đến sự chính xác của việc chẩn đoán và phát hiện; và (3) trong kỹ thuật chẩn đoán nêu trên, lá cần được trộn với nước để nghiền, nhưng tinh bột không hòa tan được trong nước, vì vậy sự chính xác của phản ứng hiện màu khi lá được trộn với nước bị ảnh hưởng.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp chẩn đoán nhanh bệnh vàng lá gân xanh trên cây họ cam quýt một cách đơn giản, nhanh và có độ chính xác cao. Phương pháp chẩn đoán nhanh bệnh vàng lá gân xanh trên cây họ cam quýt theo sáng chế bao gồm các bước:

a. xử lý trong tối: bọc lá cần phát hiện trong túi màu đen, làm kín túi và tiến hành xử lý trong tối trong 12 đến 24 giờ để thu được lá đã được xử lý trong tối; hoặc thu thập cành cây họ cam quýt cần phát hiện, đưa cành cây này vào trong nhà và ngâm cành cây trong nước, sau đó bọc lá của cành cây trong túi màu đen hoặc đặt cành cây trong phòng tối để tiến hành xử lý thiếu sáng trong 12 đến 24 giờ, và sau đó thu thập lá để thu được lá đã được xử lý thiếu sáng; hoặc trước khi mặt trời mọc, thu thập lá cây họ cam quýt đã đi qua đêm cần phát hiện làm lá đã được xử lý trong tối;

b. xử lý cấp đông lá: xén lá đã được xử lý trong tối, trong đó lá được xén ít nhất ở một bên của gân chính từ viền lá dọc theo đường gân phụ hướng tới gân chính và tới khi chạm tới gân chính, mà không cắt đứt gân chính, để xén lá thành các dải lá mảnh, và sau đó cấp đông các dải lá mảnh dưới nhiệt độ nằm trong khoảng từ -4 đến -15°C trong 12 đến 24 giờ để thu được lá đã được cấp đông; hoặc cấp đông lá đã được xử lý trong tối dưới nhiệt độ nằm trong khoảng từ -4 đến -15°C trong 12 đến 24 giờ, sau đó xén lá, trong đó lá được xén ít nhất ở một bên của gân chính từ viền lá dọc theo đường gân phụ hướng tới gân chính

và tới khi chạm tới gân chính, mà không cắt đứt gân chính, để xén lá thành các dải lá mảnh, và bằng cách đó thu được lá đã được cấp đông.

c. tẩy màu lá: đặt lá đã được cấp đông vào dung dịch tẩy màu diệp lục cho đến khi dải lá mảnh của lá chuyển sang màu trắng, và sau đó lấy dải lá mảnh ra để thu được lá đã được tẩy màu; và

d. phát hiện qua sự hiện màu: nhỏ thêm dung dịch hiện màu tinh bột lên dải lá mảnh đã được tẩy màu, và sau đó quan sát sự thay đổi màu của lá, trong đó nếu lá chuyển sang màu xanh da trời, suy ra rằng lá cây họ cam quýt cần phát hiện là lá đã bị nhiễm bệnh vàng lá gân xanh, và nếu màu của lá không thay đổi, thì lá đó là lá bình thường.

Dung dịch tẩy màu diệp lục là dung dịch có khả năng loại bỏ diệp lục, và tốt hơn là axeton, rượu etylic, benzen, metyl benzen, dimetyl benzen hoặc các dung môi hữu cơ khác, hoặc hỗn hợp của chúng.

Dung dịch hiện màu tinh bột là dung dịch cho phép hiện màu tinh bột, và tốt hơn là cồn iot, dung dịch kali iodua, hoặc polyvinylpyrrolidon-iot.

Dải lá mảnh tốt hơn là dải lá mảnh có chiều rộng 1 mm.

Theo sáng chế, thông qua việc xử lý trong tối, tinh bột tích tụ trong lá bình thường được vận chuyển, và vì vậy không còn tinh bột tích tụ trong lá. Ngược lại, đối với lá nhiễm bệnh vàng lá xanh trên cây họ cam quýt, do mạch rây bị chặn lại, vì vậy tinh bột không thể được vận chuyển và được tích tụ trong lá, sự tác động của tinh bột được chứa trong lá bình thường có thể được loại bỏ hoàn toàn qua việc xử lý trong tối và do đó độ chính xác được cải thiện.

Việc xử lý cấp đông lá chủ yếu nhằm loại bỏ chất diệp lục, trong khi trong các giải pháp kỹ thuật đã biết, chất diệp lục không được loại bỏ hoàn toàn và do đó có sự tác động của chất diệp lục đến sự hiện màu, điều này cũng ảnh hưởng đến độ chính xác của việc chẩn đoán và phát hiện. Theo sáng chế, với việc xử lý cấp đông, quá trình phá vỡ màng tế bào được đẩy nhanh do sự thay đổi nhiệt độ

đột ngột, và do đó thời gian làm tiêu và tẩy trắng chất diệp lục được rút ngắn; và hơn nữa lá được xén thành các dải lá mảnh để tăng tốc quá trình làm tiêu diệp lục, nhưng lá không bị cắt hoàn toàn để giữ hình dạng của lá, tạo điều kiện cho các bước tiếp theo. Các bước nêu trên tăng tốc quá trình làm tiêu chất diệp lục, và tạo điều kiện làm tiêu chất diệp lục hoàn toàn để loại bỏ chất diệp lục.

Quá trình tẩy màu lá được thực hiện như sau: hòa tan và chiết chất diệp lục chứa trong lá bằng dung dịch tẩy màu diệp lục cho đến khi lá chuyển sang màu trắng, để loại bỏ hoàn toàn chất diệp lục và tránh ảnh hưởng bất kỳ đến độ chính xác của việc chẩn đoán và phát hiện gây ra bởi tác động từ sự có mặt của chất diệp lục.

Việc phát hiện thông qua sự hiện màu được tiến hành bằng cách áp dụng nguyên tắc lá nhiễm bệnh vàng lá gân xanh trên cây họ cam quýt giàu tinh bột, mà chuyển thành màu sang xanh da trời khi có mặt iot, trong khi lá bình thường không chứa tinh bột và do đó màu sắc không thay đổi. Vì vậy, có thể xác định được lá cần phát hiện có phải là lá nhiễm bệnh vàng lá gân xanh trên cây họ cam quýt hay không bằng cách tiến hành chẩn đoán và phát hiện trên lá được tẩy màu nêu trên bằng dung dịch hiện màu tinh bột.

Những sự khác biệt giữa phương pháp chẩn đoán nhanh bệnh vàng lá gân xanh trên cây họ cam quýt theo sáng chế và phương pháp đã biết được thể hiện trong Bảng 1:

Bảng 1

Nội dung kỹ thuật	Kỹ thuật hiện màu đã biết	Sáng chế
Nghiền lá	Bắt buộc	Không bắt buộc
Xử lý trong tối	Không	Có
Tẩy màu (loại bỏ chất diệp lục)	Không	Có
Hình dạng lá	Ở dạng huyền phù sau	Lá được xén thành dải lá mảnh

Nội dung kỹ thuật	Kỹ thuật hiện màu đã biết	Sáng chế
	khi nghiền	nhưng gân chính ở giữa không bị cắt đứt để giữ nguyên hình dạng lá
Điều kiện hiện màu	Sự thay hiện màu được tiến hành trên một màng phản ứng	Sự hiện màu được tiến hành trực tiếp trên lá
Sự đồng nhất với kỹ thuật phát hiện PCR	93,3%	99,9%

Theo sáng chế, độ chính xác của việc chẩn đoán bệnh vàng lá gân xanh trên cây họ cam quýt được cải thiện đáng kể theo cách thức sau: loại bỏ tác động của tinh bột còn sót lại bằng cách loại bỏ một cách có hiệu quả tinh bột còn sót lại được chứa trong lá; loại bỏ tác động của chất diệp lục bằng cách loại bỏ một cách có hiệu quả chất diệp lục; và việc làm hiện màu được tiến hành trực tiếp trên lá thay vì bằng cách trộn và nghiền lá trong nước, để tránh vấn đề về độ chính xác của phản ứng hiện màu được tiến hành bằng cách trộn lá với nước có khả năng bị ảnh hưởng do tinh bột không hòa tan được trong nước. Do đó, đạt được sự chẩn đoán nhanh bệnh vàng lá gân xanh trên cây họ cam quýt với mức độ chính xác cao, mà cung cấp phương tiện phát hiện hiệu quả để kiểm soát bệnh vàng lá gân xanh trên cây họ cam quýt và mang lại lợi ích cho việc kiểm soát bệnh vàng lá gân xanh trên cây họ cam quýt.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là sơ đồ giản lược của ba trường hợp mà lá bị xén thành các dải lá mảnh, trong đó A thể hiện trường hợp lá chỉ bị xén ở một bên của gân chính, B thể hiện trường hợp lá bị xén ở cả hai bên của gân chính; và C thể hiện trường hợp một bên của lá bị loại bỏ, và bên còn lại bị cắt;

Hình 2 là sơ đồ thể hiện kết quả chẩn đoán của phương án 1;

Hình 3 là sơ đồ thể hiện kết quả chẩn đoán của phương án 2;

Hình 4 là sơ đồ thể hiện kết quả chẩn đoán của phương án 3;

Hình 5 là sơ đồ thể hiện kết quả chẩn đoán của phương án 4;

Hình 6 là sơ đồ thể hiện kết quả chẩn đoán của phương án 5;

Hình 7 là sơ đồ thể hiện kết quả chẩn đoán của phương án 6; và

Hình 8 là sơ đồ thể hiện kết quả chẩn đoán của phương án 7.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các phương án sau đây được đưa ra nhằm mục đích minh họa một cách chi tiết hơn về sáng chế, và không nhằm mục đích giới hạn phạm vi của sáng chế.

Phương án 1: chẩn đoán và phát hiện bệnh vàng lá gân xanh trên cam đường

Phương án được thực hiện tại Vườn cây họ cam quýt La Cương (Luogang) ở Quảng Châu. Việc xử lý trong tối được tiến hành lúc 10:00 ngày 12 tháng 4 năm 2013 [lá của cây cam đường cần phát hiện (lá cần phát hiện là lá đã bị nhiễm bệnh vàng lá gân xanh, đã được chẩn đoán thông qua phương pháp phát hiện bằng phân tử axit nucleic) được bọc trong túi nhựa màu đen, và sau đó túi này được làm kín bằng kẹp]. Lúc 9:30 sáng ngày 13 tháng 4, các lá đã được xử lý trong tối được thu thập, đặt vào túi nhựa màu đen và đưa vào trong nhà. Lúc 4:00 chiều, các lá này được xén thành các dải mảnh với chiều rộng 1 mm ở trong nhà (mỗi lá được xén ở một bên của gân chính từ viền lá dọc theo đường gân phụ hướng tới gân chính và tới khi chạm tới gân chính, mà không cắt đứt gân chính, để xén lá thành các dải lá mảnh với chiều rộng 1 mm như được thể hiện trên Hình 1A), và sau đó các lá được cấp đông trong ngăn cấp đông của tủ lạnh tại nhiệt độ -10°C . Lúc 8:00 sáng ngày 14 tháng 4, các lá đã được cấp đông được đưa ra ngoài và đưa vào trong các ống nghiệm, và sau đó 25 ml dung dịch tẩy màu diệp lục (axeton) được thêm vào mỗi ống nghiệm, trong đó trong quá trình thêm vào, ống được lắc 2-3 lần. Lúc 3:00 chiều ngày 14 tháng 4, các dải lá mảnh đã đổi sang màu trắng, dung dịch tẩy màu được đổ ra khỏi ống để thu được các lá đã được tẩy màu, và sau đó dung dịch hiện màu tinh bột (cồn iot) được nhỏ

trực tiếp lên trên các dải lá mảnh của lá đã được tẩy màu để tiến hành chẩn đoán bằng cách quan sát sự thay đổi màu của lá. Kết quả được thể hiện trên Hình 2, trong đó trên Hình 2, A là lá cần phát hiện trong phương án này, và B là lá bình thường không bị nhiễm bệnh vàng lá gân xanh trên cây họ cam quýt đã được chứng minh bằng các kỹ thuật đã biết. Trên Hình 2, có thể thấy rằng sau khi lá (A) cần phát hiện trong phương án này được làm hiện màu, dải lá mảnh chuyển sang màu xanh da trời, cho thấy lá (A) cần phát hiện được xác định là đã bị nhiễm bệnh vàng lá gân xanh trên cây họ cam quýt; và màu của lá bình thường (B) không thay đổi, cho thấy lá (B) được xác định là lá bình thường không bị nhiễm bệnh vàng lá gân xanh trên cây họ cam quýt. Kết quả phát hiện này đồng nhất với kết quả phát hiện thu được bằng cách chẩn đoán bằng phương pháp phát hiện thông thường bằng phân tử axit nucleic.

Phương án 2: chẩn đoán và phát hiện bệnh vàng lá gân xanh trên cam Mashui

Phương án được thực hiện tại Vườn cây Yangchun. Việc xử lý trong tối được tiến hành lúc 3:00 chiều [lá của cam Mashui cần phát hiện (lá cần phát hiện là lá đã bị nhiễm bệnh vàng lá gân xanh, đã được chẩn đoán thông qua phương pháp phát hiện bằng phân tử axit nucleic) được bọc trong túi nhựa màu đen, và sau đó túi này được làm kín bằng kẹp]. Buổi sáng hôm sau, các lá đã được xử lý trong tối được thu thập, sau đó được cấp đông trong ngăn lạnh của tủ lạnh tại nhiệt độ -15°C trong 12 giờ. Sau đó, các lá được xén thành các dải mảnh với chiều rộng 1 mm (mỗi lá được cắt ở một bên của gân chính từ viền lá dọc theo đường gân phụ hướng tới gân chính và tới khi chạm tới gân chính, mà không cắt đứt gân chính, để xén lá thành các dải lá mảnh với chiều rộng 1 mm như được thể hiện trên Hình 1A), để thu được lá đã được cấp đông. Lá đã được cấp đông được tẩy màu trong dung dịch tẩy màu diệt lục (rượu etylic) trong 6 giờ và nhờ đó các dải lá mảnh chuyển sang màu trắng. Các lá đã được tẩy màu thu được bằng cách đổ bỏ dung dịch tẩy màu và lấy lá ra. Sau đó, dung dịch hiện màu tinh bột (dung dịch kali iodua) được nhỏ lên phía trên các dải lá mảnh của

lá đã được tẩy màu để thực hiện chẩn đoán.

Kết quả được thể hiện trên Hình 3, trong đó trên Hình 3, A là lá cần phát hiện trong phương án này, và B là lá bình thường không bị nhiễm bệnh vàng lá gân xanh trên cây họ cam quýt đã được chứng minh bằng kỹ thuật đã biết. Có thể thấy trên Hình 3, sau khi lá (A) cần phát hiện trong phương án này được làm hiện màu, lá dạng dải mảnh chuyển sang màu xanh da trời cho thấy lá (A) cần phát hiện được xác định là lá bị nhiễm bệnh vàng lá gân xanh trên cây họ cam quýt; và màu của lá bình thường (B) không đổi cho thấy lá (B) được xác định là lá bình thường (B) không bị nhiễm bệnh vàng lá gân xanh trên cây họ cam quýt. Kết quả phát hiện này đồng nhất với kết quả phát hiện thu được bằng cách chẩn đoán bằng phương pháp phát hiện thông thường bằng phân tử axit nucleic.

Phương án 3: chẩn đoán và phát hiện bệnh vàng lá gân xanh trên cây họ cam quýt La Cương

Phương án được thực hiện tại Vườn cây họ cam quýt La Cương ở quận La Cương, Quảng Châu. Việc xử lý trong tối được tiến hành lúc 10:00 ngày 12 tháng 4 năm 2013 [lá của cây họ cam quýt La Cương cần phát hiện (lá cần phát hiện là lá đã bị nhiễm bệnh vàng lá gân xanh, đã được chẩn đoán thông qua phương pháp phát hiện bằng phân tử axit nucleic) được bọc trong túi nhựa màu đen, và sau đó túi này được làm kín bằng kẹp]. Lúc 9:30 sáng ngày 13 tháng 4, các lá đã được xử lý trong tối được thu thập, được đặt vào túi nhựa màu đen và đưa vào trong nhà. Lúc 4:00 chiều ngày 13 tháng 4, các lá đã được xử lý trong tối được xén ở trong nhà thành các dải mảnh với chiều rộng 1 mm (mỗi lá được xén ở một bên của gân chính từ viền lá dọc theo đường gân phụ hướng tới gân chính và tới khi chạm tới gân chính, mà không cắt đứt gân chính, để xén lá thành các dải lá mảnh với chiều rộng 1 mm như được thể hiện trên Hình 1A), và sau đó được cấp đông trong ngăn cấp đông của tủ lạnh tại nhiệt độ -4°C . Lúc 8:00 sáng ngày 14 tháng 4, các lá đã được cấp đông được đưa ra ngoài và đưa vào trong các ống nghiệm, và sau đó 25 ml dung dịch tẩy màu diệp lục (axeton)

được thêm vào mỗi ống nghiệm, trong đó trong quá trình thêm vào, ống được lắc 2-3 lần. Lúc 3:00 chiều ngày 14 tháng 4, các dải lá mảnh đổi sang màu trắng, dung dịch tẩy màu được đổ ra khỏi ống để thu được các lá đã được tẩy màu, và sau đó dung dịch hiện màu tinh bột (còn iot) được nhỏ trực tiếp lên trên các dải lá mảnh của lá đã được tẩy màu để tiến hành chẩn đoán bằng cách quan sát sự thay đổi màu của lá.

Kết quả được thể hiện trên Hình 4, trong đó trên Hình 4, B là lá cần phát hiện trong phương án này, và A là lá bình thường không bị nhiễm bệnh vàng lá gân xanh trên cây họ cam quýt đã được chứng minh bằng các kỹ thuật đã biết. Trên Hình 4, có thể thấy rằng sau khi lá (B) cần phát hiện trong phương án này được làm hiện màu, lá dạng dải mảnh chuyển sang màu xanh da trời, cho thấy lá (B) cần phát hiện được xác định là đã bị nhiễm bệnh vàng lá gân xanh trên cây họ cam quýt; và màu của lá bình thường (A) không thay đổi, cho thấy lá (A) được xác định là lá bình thường không bị nhiễm bệnh vàng lá gân xanh trên cây họ cam quýt. Kết quả phát hiện này đồng nhất với kết quả phát hiện thu được bằng cách chẩn đoán bằng phương pháp phát hiện thông thường bằng phân tử axit nucleic.

Phương án 4: chẩn đoán và phát hiện bệnh vàng lá gân xanh trên cam rón

Phương án được thực hiện tại vườn cây của Atoca Orange Limited tại Lạc Xương, Thiệu Quan từ ngày 15 đến ngày 17 tháng 5 năm 2013. Việc xử lý trong tối được tiến hành lúc 5:00 chiều ngày 15 tháng 5 (lá của cây cam rón cần phát hiện được bọc trong túi nhựa màu đen, và sau đó túi này được làm kín bằng kẹp). Lúc 6:00 sáng ngày 16 tháng 5, lá (lá cần phát hiện là lá đã bị nhiễm bệnh vàng lá gân xanh, đã được chẩn đoán thông qua phương pháp phát hiện bằng phân tử axit nucleic) đã được xử lý trong tối được thu thập, được đặt vào túi nhựa màu đen và đưa vào trong nhà (mẫu được đề cập cách khu vực trong nhà 100 m). Sau đó lá được cấp đông trong ngăn cấp đông của tủ lạnh tại nhiệt độ -4°C trong 24 giờ, sau đó được xén thành các dải mảnh với chiều rộng 1 mm (mỗi lá được xén

ở một bên của gân chính từ viền lá dọc theo đường gân phụ hướng tới gân chính và tới khi chạm tới gân chính, mà không cắt đứt gân chính, để xén lá thành các dải lá mảnh với chiều rộng 1 mm như được thể hiện trên Hình 1A) để thu được lá đã được cấp đông. Các lá đã được cấp đông được đưa vào trong các ống nghiệm, và sau đó 25 ml dung dịch tẩy màu diệp lục (metyl benzen) được thêm vào mỗi ống nghiệm, trong đó trong quá trình thêm vào, ống được lắc 2-3 lần. Sau 10 giờ, các lá dạng dải mảnh đổi sang màu trắng. Sau đó các lá đã được tẩy màu được thu thập bằng cách đổ bỏ dung dịch tẩy màu và lấy lá ra khỏi ống. Sau đó dung dịch hiện màu tinh bột (cồn iot) được nhỏ trực tiếp lên trên các dải lá mảnh của lá đã được tẩy màu để tiến hành chẩn đoán bằng cách quan sát sự thay đổi màu của lá.

Kết quả được thể hiện trên Hình 5, trong đó trên Hình 5, B và C là các lá cần phát hiện trong phương án này, và A là lá bình thường không bị nhiễm bệnh vàng lá gân xanh trên cây họ cam quýt đã được chứng minh bằng các kỹ thuật đã biết. Trên Hình 5, có thể thấy rằng sau khi các lá (B và C) cần phát hiện trong phương án này đã được làm hiện màu, các lá dạng dải mảnh chuyển sang màu xanh da trời, cho thấy các lá (B và C) cần phát hiện được xác định là đã bị nhiễm bệnh vàng lá gân xanh trên cây họ cam quýt; và màu của lá bình thường (A) không thay đổi, cho thấy lá (A) được xác định là lá bình thường không bị nhiễm bệnh vàng lá gân xanh trên cây họ cam quýt. Kết quả phát hiện này đồng nhất với kết quả phát hiện thu được bằng cách chẩn đoán bằng phương pháp phát hiện thông thường bằng phân tử axit nucleic.

Phương án 5: chẩn đoán và phát hiện bệnh vàng lá gân xanh trên cam Hồng Giang

Phương án được thực hiện tại Vườn cây Qingping tại Liêm Giang. Lúc 1:00 chiều ngày 23 tháng 5 năm 2013, cành cây cam Hồng Giang cần phát hiện được thu thập và đưa vào trong nhà. Cành cây này được ngâm trong nước và để trong phòng tối. Lúc 8:00 sáng ngày 24 tháng 5, lá đã được xử lý trong tối được

thu từ cành cây. Sau đó, lá được cấp đông trong ngăn cấp đông của tủ lạnh tại nhiệt độ -4°C trong 24 giờ, sau đó được cắt thành các dải mảnh với chiều rộng 1 mm (mỗi lá được cắt ở một bên của gân chính từ viền lá dọc theo đường gân phụ hướng tới gân chính và tới khi chạm tới gân chính, mà không cắt đứt gân chính, để xén lá thành các dải lá mảnh với chiều rộng 1 mm như được thể hiện trên Hình 1A), để thu được lá đã được cấp đông. Các lá đã được cấp đông được đưa vào trong các ống nghiệm, và sau đó 25 ml dung dịch tẩy màu diệp lục (metyl benzen) được thêm vào mỗi ống nghiệm, trong đó trong quá trình thêm vào, ống được lắc 2-3 lần. Sau 6 giờ, các lá dạng dải mảnh đổi sang màu trắng. Sau đó, dung dịch tẩy màu được đổ bỏ, và dung dịch hiện màu tinh bột (cồn iot) được nhỏ vào để tiến hành chẩn đoán bằng cách quan sát sự thay đổi màu của lá.

Kết quả được thể hiện trên Hình 6, trong đó trên Hình 6, A là lá cần phát hiện trong phương án này, và B là lá bình thường không bị nhiễm bệnh vàng lá gân xanh trên cây họ cam quýt đã được chứng minh bằng các kỹ thuật đã biết. Trên Hình 6, có thể thấy rằng sau khi lá (A) cần phát hiện trong phương án này được làm hiện màu, các lá dạng dải mảnh chuyển sang màu xanh da trời, cho thấy lá (A) cần phát hiện được xác định là đã bị nhiễm bệnh vàng lá gân xanh trên cây họ cam quýt; và màu của lá bình thường (B) không thay đổi, cho thấy lá được xác định là lá bình thường không bị nhiễm bệnh vàng lá gân xanh trên cây họ cam quýt. Kết quả phát hiện này đồng nhất với kết quả phát hiện thu được bằng cách chẩn đoán bằng phương pháp phát hiện thông thường bằng phân tử axit nucleic.

Phương án 6: chẩn đoán và phát hiện bệnh vàng lá gân xanh trên cam hạ (summer orange)

Các mẫu được thu thập từ vườn cam hạ ở Bắc Hải. Việc xử lý trong tối được thực hiện vào buổi chiều ngày 25 tháng 5 năm 2013 (lá của cây cam hạ cần phát hiện được bọc trong túi nhựa màu đen, và sau đó túi này được làm kín bằng kẹp). Lúc 7:00 sáng ngày 26 tháng 5, lá đã được xử lý trong tối (lá cần phát hiện là lá đã bị nhiễm bệnh vàng lá gân xanh, đã được chẩn đoán thông qua phương

pháp phát hiện bằng phân tử axit nucleic) được thu thập. Sau đó lá được cấp đông trong ngăn cấp đông của tủ lạnh tại nhiệt độ -12°C . Lá được lấy ra lúc 6:00 sáng ngày 27 tháng 5 và được cắt thành các dải mảnh với chiều rộng 1 mm (mỗi lá được xén ở một bên của gân chính từ viền lá dọc theo đường gân phụ hướng tới gân chính và tới khi chạm tới gân chính, mà không cắt đứt gân chính, để xén lá thành các dải lá mảnh với chiều rộng 1 mm như được thể hiện trên Hình 1A) để thu được lá đã được cấp đông. Các lá đã được cấp đông được đưa vào trong các ống nghiệm, và sau đó 25 ml dung dịch tẩy màu diệp lục (metyl benzen) được thêm vào mỗi ống nghiệm, trong đó trong quá trình thêm vào, ống được lắc 2-3 lần. Lúc 12 giờ trưa, các lá dạng dải mảnh đổi sang màu trắng. Sau đó dung dịch hiện màu tinh bột (cồn iot) được nhỏ trực tiếp lên trên các dải lá mảnh của lá đã được tẩy màu để tiến hành chẩn đoán bằng cách quan sát sự thay đổi màu của lá.

Kết quả được thể hiện trên Hình 7, trong đó trên Hình 7, A là lá cần phát hiện trong phương án này, và B là lá bình thường không bị nhiễm bệnh vàng lá gân xanh trên cây họ cam quýt đã được chứng minh bằng các kỹ thuật đã biết. Trên Hình 7, có thể thấy rằng sau khi lá (A) cần phát hiện trong phương án này được làm hiện màu, các lá dạng dải mảnh chuyển sang màu xanh da trời, cho thấy lá cần phát hiện được xác định là đã bị nhiễm bệnh vàng lá gân xanh trên cây họ cam quýt; và màu của lá bình thường (B) không thay đổi, cho thấy lá được xác định là lá bình thường không bị nhiễm bệnh vàng lá gân xanh trên cây họ cam quýt. Kết quả phát hiện này đồng nhất với kết quả phát hiện thu được bằng cách chẩn đoán bằng phương pháp phát hiện thông thường bằng phân tử axit nucleic.

Phương án 7: chẩn đoán và phát hiện bệnh vàng lá gân xanh trên cây họ cam quýt Gonggan

Cành cây họ cam quýt Gonggan cần phát hiện được thu thập từ vườn cây họ cam quýt tại Đức Thanh ngày 29 tháng 5 năm 2013 và được đưa vào trong nhà. Cành cây này được ngâm trong nước và lá được bọc trong túi nhựa màu

đen để xử lý trong tối trong 24 giờ, để thu được lá đã được xử lý trong tối (lá cần phát hiện là lá đã bị nhiễm bệnh vàng lá gân xanh, đã được chẩn đoán thông qua phương pháp phát hiện bằng phân tử axit nucleic). Sau đó lúc 6:00 sáng ngày 20 tháng 5, lá đã được xử lý trong tối được cấp đông trong ngăn cấp đông của tủ lạnh tại nhiệt độ -10°C trong 14 giờ, sau đó lúc 8:00 sáng ngày 31 tháng 5, lá được cắt thành các dải mảnh với chiều rộng 1 mm (mỗi lá được xén ở một bên của gân chính từ viền lá dọc theo đường gân phụ hướng tới gân chính và tới khi chạm tới gân chính, mà không cắt đứt gân chính, để xén lá thành các dải lá mảnh với chiều rộng 1 mm như được thể hiện trên Hình 1A), để thu được lá đã được cấp đông. Các lá đã được cấp đông được đưa vào trong các ống nghiệm, và sau đó 25 ml dung dịch tẩy màu diệp lục (metyl benzen) được thêm vào mỗi ống nghiệm, trong đó trong quá trình thêm vào, ống được lắc 2-3 lần. Lúc 3:00 chiều, các lá dạng dải mảnh đổi sang màu trắng và do đó thu được lá đã được tẩy màu. Sau đó dung dịch hiện màu tinh bột (cồn iot) được nhỏ trực tiếp lên các dải lá mảnh của lá đã được tẩy màu để tiến hành chẩn đoán bằng cách quan sát sự thay đổi màu của lá.

Kết quả được thể hiện trên Hình 8, trong đó trên Hình 8, B là lá cần phát hiện trong phương án này, và A là lá bình thường không bị nhiễm bệnh vàng lá gân xanh trên cây họ cam quýt đã được chứng minh bằng các kỹ thuật đã biết. Trên Hình 8, có thể thấy rằng sau khi lá (B) cần phát hiện trong phương án này được làm hiện màu, các lá dạng dải mảnh chuyển sang màu xanh da trời, cho thấy lá cần phát hiện được xác định là đã bị nhiễm bệnh vàng lá gân xanh trên cây họ cam quýt; và màu của lá bình thường (A) không thay đổi, cho thấy lá (A) được xác định là lá bình thường không bị nhiễm bệnh vàng lá gân xanh trên cây họ cam quýt. Kết quả phát hiện này đồng nhất với kết quả phát hiện thu được bằng cách chẩn đoán bằng phương pháp phát hiện thông thường bằng phân tử axit nucleic.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp chẩn đoán nhanh bệnh vàng lá gân xanh trên cây họ cam quýt, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

a) xử lý trong tối: bọc lá cây họ cam quýt cần phát hiện trong túi màu đen, làm kín túi và tiến hành xử lý trong tối trong 12 đến 24 giờ để thu được lá đã được xử lý trong tối; hoặc theo cách khác, thu thập cành cây họ cam quýt cần phát hiện, đưa cành cây này vào trong nhà và nhúng vào trong nước, sau đó bọc lá trên cành này trong túi màu đen hoặc đặt cành cây trong phòng tối để tiến hành xử lý trong tối trong 12 đến 24 giờ, và sau đó thu thập lá để thu được lá đã được xử lý trong tối; hoặc theo cách khác, trước khi mặt trời mọc, thu thập lá cây họ cam quýt cần phát hiện đã để qua đêm làm lá đã được xử lý trong tối;

b) xử lý cấp đông lá: cắt lá đã được xử lý trong tối, trong đó lá được xén ít nhất ở một bên của gân chính từ viền lá dọc theo đường gân phụ hướng tới gân chính và tới khi chạm tới gân chính, mà không cắt đứt gân chính, để xén lá thành các dải lá mảnh, và sau đó cấp đông các dải lá mảnh tại nhiệt độ nằm trong khoảng từ -4 đến -15°C trong 12 đến 24 giờ để thu được lá đã được cấp đông; hoặc cấp đông lá đã được xử lý trong tối tại nhiệt độ nằm trong khoảng từ -4 đến -15°C trong 12 đến 24 giờ, sau đó xén lá, trong đó lá được xén ít nhất ở một bên của gân chính từ viền lá dọc theo đường gân phụ hướng tới gân chính và tới khi chạm tới gân chính, mà không cắt đứt gân chính, để xén lá thành các dải lá mảnh, và bằng cách đó thu được lá đã được cấp đông;

c) tẩy màu lá: đặt lá đã được cấp đông vào trong dung dịch tẩy màu diệt lục cho đến khi các dải lá mảnh chuyển sang màu trắng, và sau đó lấy lá ra để thu được lá đã tẩy màu; và

d) phát hiện qua sự hiện màu: nhỏ thêm dung dịch hiện màu tinh bột lên trên dải lá đã được tẩy màu, và sau đó quan sát sự thay đổi màu của lá, trong đó nếu lá chuyển sang màu xanh da trời, cho thấy lá cây họ cam quýt cần phát hiện

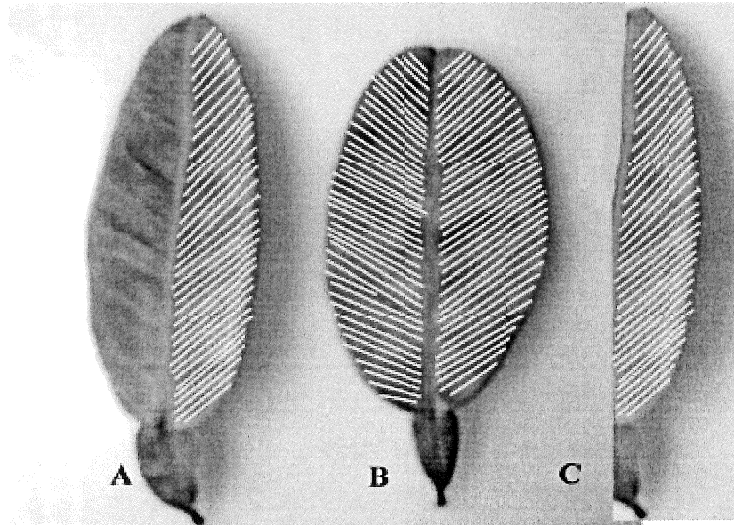
là lá đã bị nhiễm bệnh vàng lá gân xanh trên cây họ cam quýt, và nếu màu lá không thay đổi, lá này là lá bình thường.

2. Phương pháp chẩn đoán nhanh bệnh vàng lá gân xanh theo điểm 1, trong đó dung dịch tẩy màu diệt lục là axeton, rượu etylic, benzen, metyl benzen hoặc dimetyl benzen, hoặc hỗn hợp của chúng.

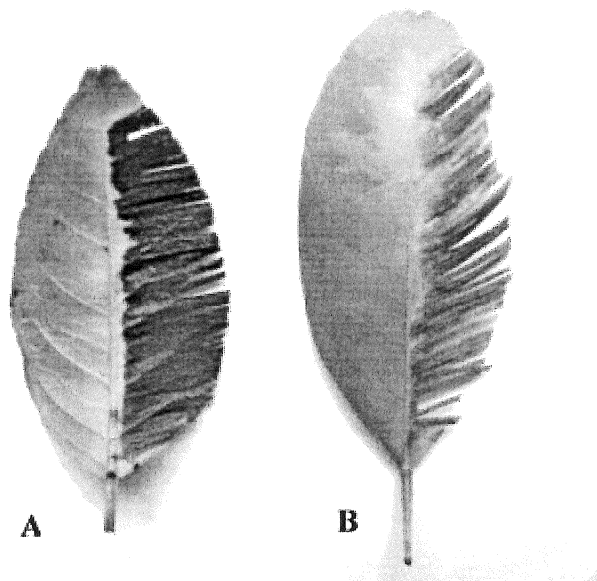
3. Phương pháp chẩn đoán nhanh bệnh vàng lá gân xanh trên cây họ cam quýt theo điểm 1, trong đó dung dịch hiện màu tinh bột là cồn iot, dung dịch kali iodua hoặc polyvinylpyrrolidon-iot.

4. Phương pháp chẩn đoán nhanh bệnh vàng lá gân xanh theo điểm 1, trong đó các dải lá mảnh là các dải lá mảnh có chiều rộng 1 mm.

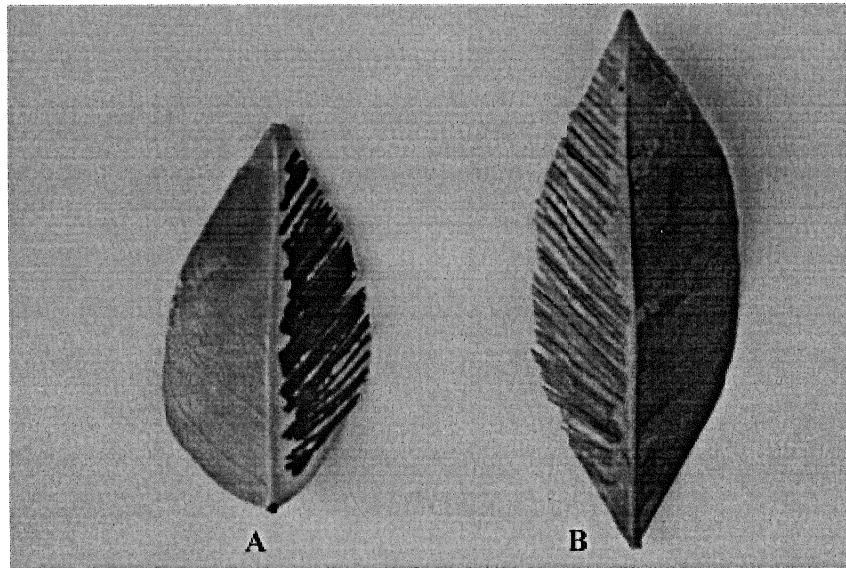
HÌNH 1



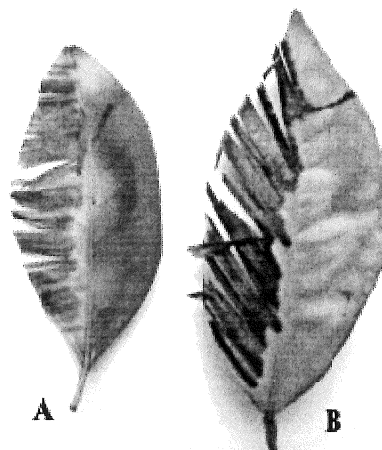
HÌNH 2



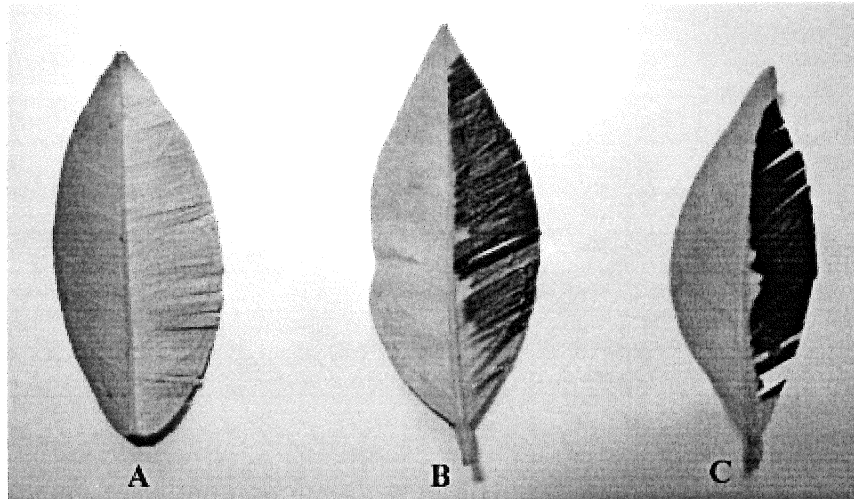
HÌNH 3



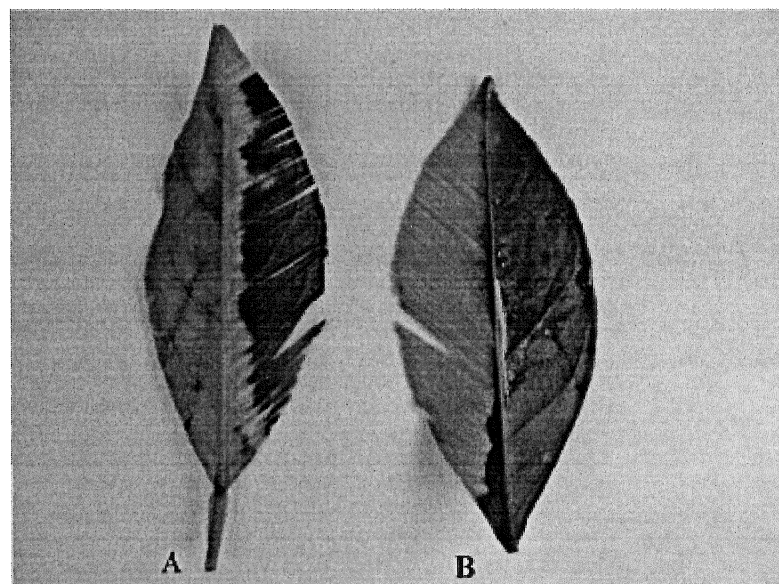
HÌNH 4



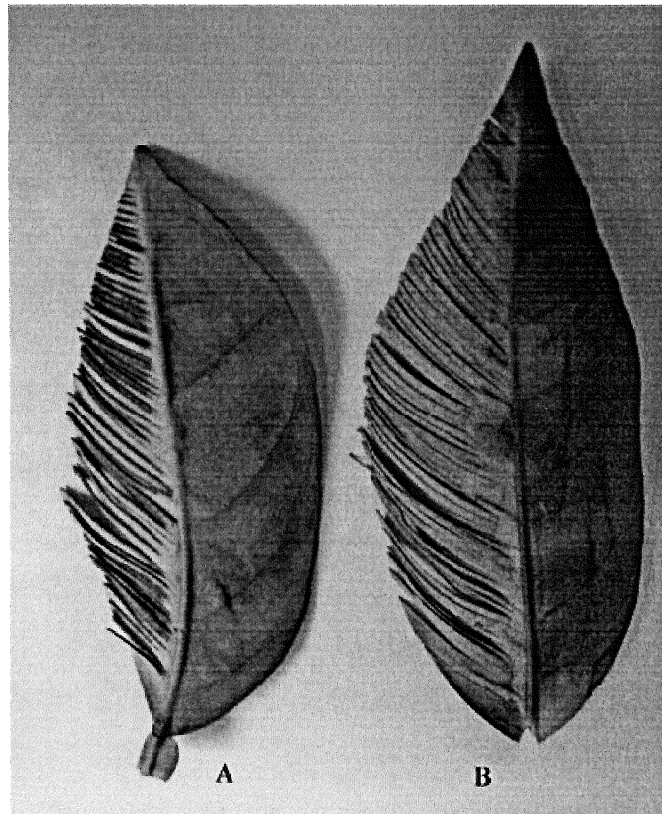
HÌNH 5



HÌNH 6



HÌNH 7



HÌNH 8

