

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4630—2016

植物病原菌及病害标本采集保存规范

Criterion for collection and preservation of plant pathogens and disease specimen

2016-08-23 发布

2017-03-01 实施

中 华 人 民 共 和 国
国家质量监督检验检疫总局 发 布



前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布结构不承担识别这些专利的责任。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国天津出入境检验检疫局、中国检验检疫科学研究院、中华人民共和国山东出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：刘鹏、郭京泽、张莹、胡佳续、林宇、王禹、姜一、廖芳、赵文军、封立平、黄国明。

植物病原菌及病害标本采集保存规范

1 范围

本标准规定了植物病原菌及病害标本的采集、保存和记录方面的要求和规范。

本标准适用于植物和植物产品中植物病原菌及病害标本的采集和保存。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

SN/T 2589 植物病原真菌检测规范

SN/T 2601 植物病原细菌常规检测规范

SN/T 2682 植物有害生物信息采集要求

SN/T 2964 植物病毒检测规范

SN/T 3689 植物检疫性有害生物实验室生物安全操作规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

植物病原菌 plant pathogen

能侵染寄生于植物体并导致侵染性病害发生的生物。本标准中植物病原菌的定义包括有植物病原真菌、细菌、病毒、类病毒和植原体。

3.2

病害标本 disease specimen

本标准中特指带有症状的植株或植物组织。

4 基本原则

植物病原菌及病害标本的采集和保存应用于病害识别、检测和鉴定依据及科研工作中,保存的菌种和标本须满足以上的工作要求。

5 器具和试剂

5.1 仪器和工具

常用的工具有刀、剪、锄、锯等,以及标本夹、标本箱、标本纸、小玻璃瓶、塑料袋、标签、便携保温箱等。分离纯化病原菌需要的工具和仪器有酒精灯、接种针、手术刀、镊子、玻片、超净台、显微镜、灭菌锅等。

植物病原菌保存常用到玻璃试管、安瓿瓶、冰箱、培养箱、冷冻干燥机等。

5.2 试剂

标本保存会用到多种浸渍液,其用途是保持植物标本的稳定性,例如防腐浸渍液等。用于菌种和核酸保存的保护剂和缓冲液,例如甘油缓冲液、矿物油、二甲基亚砷(DMSO)、奶粉溶液、TE 缓冲液等。常用试剂见附录 A。

6 植物病原菌及病害标本的采集和制作

6.1 准备

对于植物病原菌及病害标本的采集需要了解待研究病害的发生发展规律、症状特征,选择合适的季节、时间以及植株部位,选用合适的工具。

6.2 症状观察

根据具体病害的症状特征,选取典型症状的发病植株部位和病原菌存活部位进行采集。

6.3 病害标本的采集

选用合适的工具对带有症状的植株或植物组织进行取样,对于病害症状标本要尽量保持原有性状,用于分离纯化的样品要保证病原菌能够得到有效分离,例如在采集过程中携带保温箱,可将采集样品及时放置于低温条件以免性状发生变化。注意避免采集的样品之间交叉污染,以及在储存和运输过程中保证样品的密封,防止污染和扩散。

6.4 病害标本的制作

采集的标本通过鉴定后,除作为分离用组织材料外,一般采用干燥法和浸渍法进行保存,要求能够尽量保持标本的本来性状。干燥法是指用吸水纸、脱脂棉等吸取植物组织水分,压制成干燥的标本并保存,对于水分多和较大的标本一般采用冷冻干燥或烘箱脱水等方法;浸渍法是指用具有防腐和保持标本色泽的浸渍液对标本进行浸泡保存的方法。

6.5 记录

依据 SN/T 2682 要求,对于采集的标本要及时记录信息,主要包括寄主名称、时间和地点、主要发生情况、生态环境因子等。典型病害症状其性状容易发生变更的标本要保存照片资料。信息记录表格见附录 B。

6.6 病害标本的保存

植物病害标本一般放置于干燥、避光的室温环境,每 3 个月~6 个月进行定期检查,干燥法制作的标本主要防止发霉和虫蛀,可定期更换吸水纸等干燥材料并使用除虫药剂。浸渍法制作的标本要注意避光或在暗处保存,以延缓浸渍液的氧化,增加保存时间,同时定期检查标本瓶的密封情况。

6.7 病原菌的分离纯化和鉴定

植物病原真菌和细菌的分离纯化要注意的方面包括实验环境条件、材料选择、表面消毒、分离方法

和转接纯化。应依据 SN/T 2589、SN/T 2601 和 SN/T 2964 等技术标准对采集的病原菌标本进行分离纯化和鉴定,对于不能及时分离的标本样品要低温冷藏,应尽快进行病原菌的分离纯化。病原菌的鉴定方法若无标准可循,应在科赫法则指导下完成鉴定工作。

7 植物病原菌的保存

7.1 真菌菌种的保存方法

7.1.1 定期移植

又称传代培养保藏法,包括斜面培养、穿刺培养、液体培养等。将菌种接种于适宜的培养基中,最适条件下培养,待生长充分后,于 $4^{\circ}\text{C}\sim 8^{\circ}\text{C}$ 进行保存并间隔一定时间(6 个月~8 个月)进行移植培养。常用培养基见附录 A。

7.1.2 矿物油保存

将菌种接种在适宜的斜面培养基上,在最适条件下培养至菌种长出健壮菌落后注入灭菌的矿物油,使其覆盖整个斜面,加的量应该超过斜面顶部 1 cm,室温或冷藏保存。该方法在真菌菌种保藏中应用广泛,多数真菌可以用这种方法保存,一般能够存活 3 年以上,有的存活期可达 10 年。

7.1.3 土壤保存

土壤保存法一般用于产生孢子的真菌,有两种不同的方法。一种方法是将孢子悬浮液加在试管中灭菌的土壤中,任其干燥后保存,或将干的真菌孢子与试管中灭菌的干土壤混合后保存。另一种方法是试管中放 5 g 含水量 70% 的土壤,灭菌后加 1 mL 的孢子悬浮液,在室温下培养 10 天后保存。土壤保存的菌种,一般都是放在冰箱 $4^{\circ}\text{C}\sim 6^{\circ}\text{C}$ 冷藏。

7.1.4 干燥保存

干燥以后的真菌孢子或菌丝体,与干燥的砂、土壤或硅胶等混合,也可将纯培养菌丝放置于灭菌滤纸上,抽真空后密封室温或低温保存。该方法在真菌菌种的短期保存中经常采用,一般能保存 2 年以上。

7.1.5 冻干保存

该方法适用于能够产生孢子的真菌,将孢子悬浮液少许放置于安瓿瓶中冷冻后在低温环境下抽真空,抽气使冷冻状态的悬浮液完全干燥后,安瓿瓶封口后在室温下或冷藏保存,该方法一般能保存 3 年以上。

7.1.6 灭菌蒸馏水中保存

将保存的真菌先在琼脂培养基平皿上培养,然后切取小块琼脂培养基,放在灭菌的蒸馏水中保存。灭菌的蒸馏水可以盛在有螺盖的小玻瓶中或者用橡皮塞密封的试管中室温或低温保存。该方法常用于真菌菌种的短期保存,一般能保存 1 年以上。

7.1.7 -80°C 超低温保存

将真菌孢子悬浮液或菌丝培养物置于 -80°C 超低温冰箱中保存。注意在保存准备时需要添加合

SN/T 4630—2016

适的保护剂,一般能够保存 2 年以上。保护剂常用灭菌甘油,浓度一般为 30%~50%。

7.1.8 液氮保存

将干燥的真菌孢子或菌丝体,或者加有保护剂的菌体培养物放置于无菌安瓿瓶中,经过预冻至 -40°C ,然后立即放入液氮生物贮存罐中保存。该方法常用于真菌菌种的长期保存,一般能保存 3 年以上。

7.1.9 核酸保存

将分离纯化的真菌菌种提取核酸,提取方法可参照相关技术资料,也可采用商品试剂盒。提取的核酸可以放置于 TE 缓冲液中冷藏保存,或分装后 -20°C 保存,注意避免反复冻融,一般能够保存 1 年以上。需要长期保存的可以干燥处理后超低温保存。

7.2 细菌菌种的保存方法

7.2.1 植物组织保存

某些细菌可以在干燥的植物组织上常温保存,如叶斑病可以保存干燥的叶片。对于根、茎等组织,可以放在塑料袋内,在 -20°C 下保存。

植物组织中保存也能应用于植原体等不能培养的病原菌,采用组培或定期接种,维持病株的办法。

7.2.2 斜面冷藏保存

斜面保存方法适用于短期保存。多数细菌在斜面上不断生长,因此保存期不过 1 周~10 周。由于不断生长和移植,致病力容易发生变化,斜面应放置于冰箱冷藏保存。常用培养基见附录 A。

7.2.3 灭菌蒸馏水中保存

新鲜培养的细菌,从斜面上洗下或挑下,放在灭菌的蒸馏水中密闭保存,稀释浓度每毫升含细菌 $10^6 \sim 10^7$ 个菌体,该方法适用于大多数细菌,一般能存活 1 年以上。

7.2.4 矿物油保存

具体方法可参见真菌的保存。矿物油下保存细菌,最好使用缓冲作用好的培养基。菌种可在室温下保存,适宜在冰箱中保存。多数植物病原细菌可以存活数月,甚至数年。

7.2.5 甘油保存

使用灭菌的甘油溶液(浓度 15%~30%)稀释新鲜培养的细菌成菌悬液,放置于密闭小管中在 -20°C 的冷柜中保存,存活期可达 1 年以上。

7.2.6 冷冻干燥

冷冻干燥是保存细菌的最好的方法,世界各国的植物病原细菌收藏中心,都是采用冷冻干燥作为菌种长期的保存方法。使用灭菌奶粉溶液将新鲜培养的细菌菌体制成悬浮液,取少许放置于安瓿瓶中冷冻后在低温环境下抽真空,抽气使冷冻状态的悬浮液完全干燥后,安瓿瓶封口后在室温下或冷藏保存,该方法一般能保存 5 年以上,有的菌种能够存活 20 年以上。

7.2.7 干燥保存

干燥保存法也适用于细菌,特别是产生芽孢的细菌。将细菌悬浮液加在灭菌的土壤中,室温下干燥后放在冰箱中。有些植物病原细菌可用这种方法长期保存,致病性也不减退。细菌也可以往沙土和硅胶中,特别是硅胶保存是很好的方法,操作步骤与真菌相同。

7.2.8 液氮保存

用甘油或二甲亚砜(DMSO)作保护剂制备细胞悬液,分装入无菌安瓿瓶,每管 0.2 mL,在控制温度下降速率为 1 °C/min 的条件下预冻至 -40 °C,然后立即放入液氮生物贮存罐中气相(-150 °C)保存。

7.2.9 商品化菌种保存试剂盒

有商品化的菌种保存管,通过磁珠吸附细菌,把纯培养的菌种接到该保存管混匀低温保存,用时解冻挑取一个磁珠传种。

7.3 植物病毒的保存

7.3.1 植物组织保存

植物病毒的短期保存,基本在一周之内,可以将植物组织放置于冰箱或冰盒内,温度越低保存时间越长。植物病毒接种于生长的植株上进行保存容易发生突变或退化,影响保存效果,可以通过接种方式来保持其活性。植物类病毒的保存方法可以参考植物病毒的保存方法。

植物病毒的长期保存一般采用带毒组织的干燥保存,如叶片进行干燥处理后粉碎装入无菌安瓿瓶中低温保存。

带毒的植物新鲜组织放置于 -80 °C 条件下可保存 1 年~2 年。

7.3.2 核酸保存

植物病毒核酸提取后可保存在去除 RNA 酶的 TE 缓冲液或 70% 的乙醇溶液中,低温环境下保存时间会更长,在 -80 °C 条件下能保存 1 年以上。目前有商品化的试剂盒来保存植物病毒核酸。常用试剂见附录 A。

8 菌种的保存时间和复活方法

针对不同的保存方法和菌种,应采取保守的保存时间,以保证菌种的活性;针对菌种的生物学性状选择适宜的培养基和培养条件进行复活,为保证菌种的稳定性,建议实验中采用二代以内的菌株。

9 其他技术要求

菌种的保存和使用要进行登记记录,专人管理。

菌种移植过程中,要对菌株编号和培养基进行核对,避免发生错误。

植物病原菌保存期间,要定期检查存放设施的运行状况以及菌株有无污染情况。

确保实验操作过程中对环境和人员不造成污染。

废弃的标本和菌株要进行除害处理,防止污染扩散。

SN/T 4630—2016

其他实验室操作事项均依据 SN/T 3689 要求。

10 病害标本及菌种的保存记录

植物病原菌的保存记录中应包括:采集时间、采集地点、采集人、寄主植物、保存状态、菌种中文名称、菌种拉丁文名称、菌种保存时间、菌种保存编号、图片编号、核酸保存物编号等。

附 录 A
(规范性附录)
常用培养基和试剂

A.1 细菌保存斜面培养基

A.1.1 肉汁冻培养基

蛋白胨 8 g, 牛肉浸膏 3 g, 蔗糖 10 g, 水(H_2O) 1 000 mL。调整 pH 值至 7.0, 121 °C 湿热灭菌 20 min。

A.1.2 金氏 B 培养基

蛋白胨 20 g, 甘油 10 g, 硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 1.5 g, 磷酸氢二钾(K_2HPO_4) 1.5 g, 琼脂 15 g, 蒸馏水 1 000 mL。调整 pH 值至 7.2, 121 °C 湿热灭菌 20 min。

A.1.3 523 培养基

蛋白胨 8 g, 酵母粉 4 g, 硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.3 g, 蔗糖($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$) 10 g, 磷酸氢二钾(K_2HPO_4) 2 g, 琼脂 18 g, 蒸馏水 1 000 mL。调整 pH 值至 7.0~7.1, 121 °C 湿热灭菌 20 min。

A.2 真菌保存斜面培养基

A.2.1 PDA 培养基

马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 15 g~20 g, 蒸馏水 1 000 mL, 121 °C 湿热灭菌 20 min, 自然 pH。

A.2.2 燕麦培养基

燕麦片 30 g, 琼脂 17 g~30 g, 蒸馏水 1 000 mL, 121 °C 湿热灭菌 20 min, 自然 pH。

A.3 标本制作常用浸渍液

A.3.1 防腐浸渍液

甲醛 50 mL, 乙醇(95%) 300 mL, 蒸馏水 2 000 mL。

该浸渍液具有防腐作用, 不能保持标本原色, 能够长时间保存标本。

A.3.2 瓦查(Vacha)浸渍液

甲醛 3 mL, 亚硫酸(饱和溶液) 142 mL, 乙醇(95%) 142 mL, 丁子香油 1 mL, 硫酸铜($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 1 g, 乙酰水杨酸 1.5 g, 加蒸馏水定容至 1 000 mL。

该浸渍液适用于保持标本色泽, 如叶片和果实的绿色、黄色, 建议每年更换 1 次浸渍液。

A.4 菌种保存常用缓冲液

A.4.1 甘油缓冲液

甘油和蒸馏水配制成浓度 15%~30% 的甘油缓冲液, 121 °C 湿热灭菌 20 min 后室温保存备用。

A.4.2 奶粉溶液

脱脂奶粉和蒸馏水配制成浓度 20% 的奶粉溶液, 121 °C 湿热灭菌 20 min 后室温保存备用。

A.4.3 TE 缓冲液

1 mol/L Tris · HCl 溶液 (pH8.0) 5 mL, 0.5 mol/L EDTA 溶液 (pH8.0) 1 mL, 加蒸馏水定容至 500 mL, 121 °C 湿热灭菌 20 min 后室温保存备用。

附 录 B
(规范性附录)
病害标本采集保存信息登记表

B.1 病害标本采集信息登记表

病害标本采集信息登记表见表 B.1。

表 B.1 病害标本采集信息登记表

标本采集信息表			
编号		采集地点	
寄主学名		采集时间	
寄主中文名		采集人	
采集部位		发生情况	
目标病原物		气候情况	
保存条件		环境因子	
备注			

B.2 菌种保存信息登记表

菌种保存信息登记表见表 B.2。

表 B.2 菌种保存信息登记表

菌种保存信息表			
菌种学名		菌种中文名	
菌种异名		病害英文名	
实验室编号		菌库编号	
资源归类		菌种来源	
寄主名称		来源国家	
采集地区		采集环境	
分离人		鉴定人	
分离时间		鉴定人单位	
保存时间		保存条件	
危险等级		培养基	
备注			

中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
植物病原菌及病害标本采集保存规范
SN/T 4630—2016

*

中国标准出版社出版
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)
北京市西城区三里河北街16号(100045)
总编室:(010)68533533

网址 www.spc.net.cn

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

*

开本 880×1230 1/16 印张 1 字数 20 千字
2017年12月第一版 2017年12月第一次印刷
印数 1—500

*

书号: 155066·2-32357 定价 18.00 元



SN/T 4630-2016