

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4643—2016

线虫标本采集分离保存规范

Standards for sampling, detecting and preserving specimen of nematodes

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。

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：中华人民共和国宁波出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：顾建锋、陈先锋、张慧丽、何洁。

线虫标本采集分离保存规范

1 范围

本标准规定了出入境植物检疫中线虫标本的采集、制作和保存方法。

本标准适用于出入境检验检疫部门对线虫标本的采集、制作和保存工作。

2 方法原理

根据植物病原线虫不同的寄生方式,采集表现瘰瘤、叶斑、坏死、变色、畸形等症状的样品,或采集寄主植物的根及根围土壤或介质,用改良漏斗分离法等分离线虫,然后浸泡保存或制作成永久玻片,达到对线虫标本保存的目的。

3 仪器、试剂和用具

3.1 仪器

体视显微镜(10×以上,具透射光源)、恒温培养箱、移液器(20 μL~200 μL)、离心机(2 000 r/min以上)、冷藏箱、天平、Fenwick 漂浮器等。

3.2 试剂

福尔马林(4%甲醛)、甘油、乙醇、蔗糖、封片剂(中性树胶、阿拉伯树胶、指甲油)、石蜡、溶液Ⅰ(96%乙醇/甘油/蒸馏水体积比 20:1:79)、溶液Ⅱ(甘油/96%乙醇体积比 1:19)、乙二胺四乙酸二钠、二甲基亚砷、氯化钠、氢氧化钠。

DESS 溶液配制方法参见附录 A。

3.3 用具

钟面皿或培养皿、细胞培养皿、盖玻片、载玻片、剪刀、线虫挑针、酒精灯、双层纸巾、线虫滤纸、纱布、500 μL 微量离心管、密闭塑料盒、漏斗、漏斗架、乳胶管、止水夹、加热板、筛网(10 目、60 目、300 目、400 目、500 目)、取样铲、塑料袋、水桶、记号笔等。

4 样品采集

4.1 病变组织或土样的采集

植物病原线虫按寄生方式不同一般可分为内寄生和外寄生线虫。大多数寄生线虫危害寄主植物根和地下茎,如根结属线虫 *Meloidogyne* 寄生于根内,孢囊属线虫 *Heterodera* 部分外露于根部。但也有部分线虫(如粒属线虫 *Anguina*、滑刃属线虫 *Aphelenchoides*、伞滑刃属线虫 *Bursaphelenchus* 等)危害植物地上的芽、叶片、茎秆、种子、穗部等。部分植物受线虫危害后,有时可表现瘰瘤、叶斑、坏死、变色、畸形等症状,但地上部分症状一般不显著。

植物受线虫危害后,发生明显病变的部位,往往也是病原线虫存在的部位。如粒属线虫在籽粒虫瘿

中,部分滑刃属线虫在穗部籽粒颖壳的内侧,根结属线虫和孢囊属线虫都在根部。

检测茎、块茎、叶中的线虫时,要注意观察植株花、叶、芽等是否有枯死、褐色角斑、矮小、畸形等受害症状,块茎、鳞茎、球根等是否有干腐、变黑等症状。重点选取表现上述症状的花、叶、芽、块茎等植物组织。

无论针对植物内寄生或外寄生线虫,应考虑把样品可能带有的土壤或介质作为取样重点。取样时应用取样铲采集根系附近的土壤、介质,并尽量多采集根系,采集深度一般为土表下 10 cm~20 cm。样品的数目可考虑具体情况设置,一般每个样品重量为 0.5 kg 左右。

4.2 采集信息记录和编号

对于进口样品,需记录采集时间、采集地点、采集人、寄主等信息。对于国内采集的样品,还应记录其经纬度和海拔等,必要时摄影存档。从采集的样品到最后的凭证标本、显微照片及 DNA 等,均需有统一的唯一性标号相对应,可实现系统溯源。

4.3 采集样品的保存

采集到的组织或土样等要防止干燥,写好标签后应立即放在塑料袋中,密闭袋口,避免阳光直射,及时送实验室检测。如不能及时送检,可将样品置 4℃~10℃冷藏箱贮存。

5 线虫分离

5.1 直接解剖法

该方法适用于分离孢囊属线虫、根结属线虫等内寄生线虫,以及粒属线虫等体型较大的线虫。其方法是洗净根或种子等表面,放在盛有适量水的玻片或培养皿中,用解剖针撕破组织表面,可见组织内的线虫,有时线虫游离到水中。用线虫挑针或移液器收集线虫或孢囊。

5.2 直接浸泡法

该方法适用于分离地上和地下部分的迁移性内外寄生的线虫,如茎属 *Ditylenchus*、滑刃属、穿孔属 *Radopholus* 等。将病组织剪成小段或撕开,加清水,浸泡数小时后即有线虫游出,在体视显微镜下用挑针或移液器收集线虫。

5.3 贝曼漏斗法

该方法适合分离多数样品,但对土壤效果不佳。将 10 cm~15 cm 直径的漏斗固定在支架上,下端接一段硅胶管或乳胶管,管的近末端用止水夹夹紧。将待分离的样品(剪成小段的叶片、茎、芽、花或破碎的种子等)用纱布包好,轻轻放入盛有适量清水的漏斗(使样品略露出水面为宜)。20℃~25℃静置 24 h~48 h,打开止水夹,用培养皿或钟面皿接取线虫液 5 mL~10 mL,镜检。

5.4 浅盘分离法

该方法系贝曼漏斗法的改进,能一次分离较多的样品,因筛网面积大,通气性好,能提高分离效率。浅盘分离法装置由两只不锈钢浅盘和双层纸巾或纱布组成,上盘为 10 目的筛网,下盘为正常浅盘。分离线虫时,将双层纸巾或纱布平铺在上盘的筛网上,然后将待分离的样品(介质、土壤、及剪成小段的叶片、茎、芽、花、病残体或破碎的种子等)撒铺在表面,将筛网放在装有适量清水的底盘内(水量以刚好浸透样品为宜)。20℃~25℃静置 24 h~48 h 后,移去筛网,用 400 目分样筛收集线虫,然后将线虫液转移到培养皿或钟面皿,镜检。

5.5 改良漏斗分离法

改良漏斗法吸取了浅盘法和传统漏斗法各自的优点,在提高了漏斗法分离效率的同时,又解决了浅盘法必须使用套筛而使植物组织等杂物经常堵塞 400 目筛的筛孔的问题,适合分离各类样品。

改良漏斗分离装置由一只较大并类似于贝曼漏斗的玻璃或有机玻璃作为外壳,上部装置则与浅盘装置相似。将线虫滤纸或双层纸巾平放在筛盘筛网上,用水淋湿滤纸边缘与筛盘结合部分;将待分离线虫的样品放置其上;从筛盘下部的空隙中将水注入分离器中,以淹没供分离的材料为止;在约 20℃~25℃ 下放置 24 h~48 h 后,打开止水夹,用离心管接取约 5 mL 的水样;静置 20 min 左右或 1 500 r/min 离心 3 min,吸去离心管内上层清液后,即获得浓度较高的线虫水悬浮液。

5.6 直接过筛分离法

该方法可用于分离土壤中的线虫。将约 500 g 土样置于 5 L 水桶中,捏碎土块并用急水流冲成土壤悬浮液,静置约 30 s 后将上清液通过 60 目的分离筛将悬浮液注入第二个水桶中,再静置约 30 s,将土壤悬浮液再经过 300 目的分样筛,收集筛子上的残留物,用漏斗法进行分离。

5.7 离心漂浮分离法

该方法可用于分离土壤中的线虫。将 30 g 供试土样放在离心管内,加约 100 mL 水并充分小心搅匀,置于离心机内以 2 000 r/min 离心 5 min,弃去上清液,加进配好的 800 g/L 蔗糖溶液搅匀,再次以 2 000 r/min 离心 5 min,将上清液注进预先装水的烧杯里,用 300 目、400 目、500 目网筛套在一起,将烧杯内的水倒入筛网,并用水冲洗,最后将三个筛网里的线虫分别洗到带平行横纹的塑料培养皿中,置于体视显微镜下观察。

5.8 淘洗-过筛-离心分离法

该方法可用于分离土壤中的线虫。称取土壤约 100 g,将称好的土倒入水盆中,加水搅匀,静置 1 min。将水倒入一组网筛,即上层为 60 目,下层为 400 目,边倒边震荡分样筛,防止水充满下层的 400 目筛而从筛中溢出。然后在盆中加入水后混匀,静置 1 min,倒入网筛中,如此重复三次。将 400 目的分样筛取下,用喷头把 400 目网筛中的线虫悬液中的泥浆冲洗干净,倒入烧杯中,静置。将静置烧杯中的上层水轻轻倒掉,只保留下层大约 30 mL 水、线虫和泥浆的混合物。将混合物轻轻摇匀,倒入离心管中,在天平上调平衡,把平衡后的离心管放入离心机中,第一次离心(离心机的转速 2 000 r/min,离心时间为 4 min)。倒掉第一次离心后的离心管内的上层液,保留土层。在离心管中分别注入比重为 1 180 g/L 的蔗糖溶液约 10 mL,在天平上调平衡后,摇匀,放入离心机中进行第二次离心。离心后,迅速取出离心管,把离心管内的上层液倒入 500 目筛中,用水把蔗糖液冲掉,以防线虫在蔗糖液中脱水变形。然后把线虫液冲入烧杯中,随后再转入试管中镜检。

5.9 Fenwick 漂浮器法

该方法可用于孢囊属雌虫的分离。预先将漂浮器和筛子淋湿,漂浮筒内灌满清水。风干的土样放在顶筛中,用强水流冲洗,使全部淋洗到漂浮筒内,并从环颈水槽流到筛子中。静置 2 min 后,把孢囊集中到三角瓶中,水加满而不外溢,孢囊等即漂浮到水面。将漂浮物倒在铺有滤纸的漏斗中,滤去水晾干后挑取孢囊观察。

6 线虫标本及其 DNA 固定保存

6.1 福尔马林保存

在体视显微镜下,用移液器将培养皿中的线虫转移到 500 μ L 微量离心管中,2 000 r/min 离心

SN/T 4643—2016

3 min,使线虫沉降到微量离心管底部;或静置片刻,使线虫自然沉降。用移液器将微量离心管上层的水吸出,使管中仅留少量的线虫液(约 10 μL),然后向管中加入 400 μL 95 $^{\circ}\text{C}$ 的福尔马林溶液,杀死线虫,即可长期保存。

用该方法保存的线虫适合永久玻片制作及形态学观察,但不适合 DNA 提取。

6.2 95%乙醇保存

在体视显微镜下,用移液器将培养皿中的线虫转移到 500 μL 微量离心管中,2 000 r/min 离心 3 min,使线虫沉降到微量离心管底部;或静置片刻,使线虫自然沉降。用移液器将微量离心管上层的水吸出,使管中仅留少量的线虫液(约 10 μL),然后向管中加入 400 μL 95%乙醇溶液。

用该方法保存的线虫适合 DNA 提取,但不适合永久玻片制作及形态学观察。

6.3 DESS 溶液保存

在体视显微镜下,用移液器将培养皿中的线虫转移到 500 μL 微量离心管中,2 000 r/min 离心 3 min,使线虫沉降到微量离心管底部;或静置片刻,使线虫自然沉降。用移液器将微量离心管上层的水吸出,使管中仅留少量的线虫液(约 10 μL),然后向管中加入 400 μL DESS 溶液,杀死线虫,即可长期保存。

用该方法保存的线虫既适合 DNA 提取,又可进行永久玻片制作及形态学观察。

6.4 线虫永久玻片制作

对于上述用福尔马林溶液或 DESS 固定保存的线虫标本,可进一步制作线虫永久玻片保存。

将微量离心管 2 000 r/min 离心 3 min,吸去上层福尔马林或 DESS 溶液后,用移液器将线虫移至细胞培养皿中,加入溶液 I 至皿的一半体积,再将皿置于加有 1/10 体积 96%乙醇的密闭塑料盒中,置 40 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中放置 12 h。仔细用移液器吸去皿中大部分溶液 I (注意不要吸走线虫),加满溶液 II,置于 40 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中放置 12 h 以上,直至乙醇完全挥发。然后取一干净载玻片,在中间加一小滴甘油,在体视显微镜下用挑针将已完全脱水的雌、雄线虫各数条移至甘油滴的中央,排列整齐。取与线虫直径大小一致的玻璃丝 3 根~4 根,放在甘油滴的边缘。在甘油滴两边对称放两块小蜡块,加盖玻片,置于 64 $^{\circ}\text{C}$ 的加热板上加热,待蜡块融化后自然冷却。用中性树胶、阿拉伯树胶或指甲油封片,待封片剂干后再封 1 次。贴上标签,注明中文名、拉丁名、样品编号、寄主、产地、制作日期、鉴定人等信息,放入标本盒中(注意保持玻片水平,以防线虫滑动)。

6.5 标本保存要求

应建立完整的标本档案。标本应按照不同类别和保存要求分别置于专门的标本盒或标本柜内保存,定期检查。标本柜和标本盒应做到防潮、防震、防尘。标本保存场所应保持干燥、通风、凉爽、避光。

附 录 A
(资料性附录)
DESS 溶液配制方法

A.1 配制 1 L 0.5 mol/L 乙二胺四乙酸二钠溶液(pH 8.0)

称取乙二胺四乙酸二钠 186.12 g,加入 500 mL 去离子水中,再逐渐加入 5 mol/L 氢氧化钠,调节到 pH 8.0(有时可能需要 5 mol/L 氢氧化钠 500 mL。注意:每次不要加入 5 mol/L 氢氧化钠过多,每次加大约 5 mL,每次间隔约半小时。当 pH 值为 7 时,乙二胺四乙酸二钠开始溶解,这个过程需要数小时)。最后用去离子水定容至 1 L。

A.2 配制 1 L DESS 溶液

在 1 L 的容量瓶中分别加入 500 mL 0.5 mol/L 乙二胺四乙酸二钠(pH 8.0)、200 mL 二甲基亚砷和 300 mL 去离子水,然后加入氯化钠至溶液饱和(通常需要加氯化钠 300 g~400 g)。可先加氯化钠 300 g,待全部溶解后,每次加氯化钠 20 g~30 g,搅拌并等待 20 min~30 min。如全部溶解,则重复上述步骤。直到氯化钠不再溶解。该过程需要数小时。室温过夜,紧盖盖子以防水分挥发。最后将配制好的 DESS 溶液倒入试剂瓶中,弃去底部的氯化钠结晶。室温保存,盖紧瓶盖。

中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
线虫标本采集分离保存规范
SN/T 4643—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 0.75 字数 12 千字
2017 年 11 月第一版 2017 年 11 月第一次印刷
印数 1—500

*

书号: 155066 · 2-32257 定价 16.00 元



SN/T 4643—2016