

NONGYAO SHENGWU HUOXING CESHI BIAOZHUN
CAOZUO GUIFAN
SHAJUNJI JUAN

农药生物活性测试标准 操作规范

杀菌剂卷

康 卓 顾宝根 主编



化学工业出版社

农药生物活性测试标准 操作规范

杀菌剂卷

康 卓 顾宝根 主编



化学工业出版社

· 北 京 ·

作为杀菌剂分卷之一,本书根据农药良好实验室规范(GLP)要求,系统收集和整理了135项杀菌剂室内生物活性测试及相关病原菌保存和培养方法的标准操作规范,内容涵盖了粮食作物、经济作物、蔬菜和果树上重要病害室内测试方法,以及杀菌剂抗性监测、作用特性测定和新化合物筛选等标准操作规范。一致性的试材、统一性的设备、标准化的方法、规范化的程序是试验可重复、结果可追溯的基本保证,是提高农药研发和管理的需要。

本书内容权威全面,覆盖面广,信息量大,实用性强,非常有利于规范杀菌剂生物测定工作和评价标准,适合从事农药特别是杀菌剂的生产质量控制、农药管理、农药登记、核查市场商品以及国际贸易的相关人员查阅和参考。

图书在版编目(CIP)数据

农药生物活性测试标准操作规范·杀菌剂卷/康卓,顾宝根
主编. —北京:化学工业出版社,2016.6
ISBN 978-7-122-26958-4

I. ①农… II. ①康…②顾… III. ①杀菌剂-生物活性-农
药测定-技术操作规程 IV. ①S481-65

中国版本图书馆CIP数据核字(2016)第094116号

责任编辑:刘军
责任校对:边涛

文字编辑:孙凤英
装帧设计:关飞

出版发行:化学工业出版社(北京市东城区青年湖南街13号 邮政编码100011)

印刷:北京永鑫印刷有限责任公司

装订:三河市宇新装订厂

787mm×1092mm 1/16 印张13½ 字数335千字 2016年8月北京第1版第1次印刷

购书咨询:010-64518888(传真:010-64519686) 售后服务:010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书,如有缺损质量问题,本社销售中心负责调换。

定 价:60.00元

版权所有 违者必究

本书编写人员名单

主 编：康 卓 顾宝根

副 主 编：司乃国 袁善奎 刘君丽

编写人员：（按姓名汉语拼音排序）

陈立萍	陈 亮	顾宝根	康 卓	兰 杰
李志念	刘君丽	刘西莉	司乃国	孙 芹
王 斌	王军锋	徐文平	袁善奎	张文君
周明国	朱春雨			

前言

农药伴随着人类社会文明的进步而发展,从公元前 1000 多年古希腊用硫黄熏蒸杀虫,到 19 世纪末法国波尔多液的利用,从 20 世纪 60 年代的滴滴涕 (DDT)、2,4-滴(2,4-D) 等有机农药的问世,到后来诸多高效绿色农药以及仿生和生物农药的开发应用,农药一直在更新和进化,并在保护农林生产、确保粮食安全、改善人们环境卫生状况中,起着越来越重要的作用。随着食品安全要求的提高,环境保护意识的增强,对农药的要求越来越高,高效、安全、环保成为现代农药的发展方向,与此同时,农药检测技术也不断发展,以适应农药行业发展和农药管理的需要。

农药生物活性测定技术是最传统、最重要的农药检测技术,它贯穿于农药开发到生产应用的整个过程,是农药科研、教育、管理和应用的基本技术和方法。新农药的发现必须依赖生物活性测定所获得的各项资料和信息,对其是否有商品化价值做出评价。生测技术不仅是发现有效化合物的“眼睛”,也是新农药创制开发的“航标”。生测技术是农药登记管理进行药剂生物活性和使用效果验证的基本方法,通过规范的活性测定,验证药剂的有效性,确保农药的使用效果。此外,生测技术是农药药害鉴定、抗性监测、示范推广、使用技术形成及注意事项确定的必要手段,通过活性测定,完善农药使用技术,确保产品的安全性和使用的正确性。

随着农药科研技术水平的发展,农药管理标准和要求的提高,农药测试技术和方法不断向规范化、标准化方向发展,GAP 和 GLP 等实验质量管理体系不断形成和推广应用。生测技术是传统检测技术,具有生物试材多样、方法众多、条件复杂、评判标准不统一、结果变异大等问题,因此,生测技术的标准化和规范化尤为重要。为此,结合国家十五科技项目“创制农药生物活性评价 SOP 规范的建立”的成果,根据农药生测技术的实践和经验,农业部农药检定所和沈阳化工研究院组织国内从事农药生测技术工作的相关专家,编写了本书。

本书根据农药良好实验室规范 (GLP) 要求,对农药室内活性试验的试材、设备、方法、条件和结果分析等进行了规范,努力达到试材的一致性、设备的统一性、方法的标准化、程序的规范化、结果的可靠性,实现试验可重复,结果可追溯,以适应农药研发和管理要求不断提高的需要。本册涵盖靶标培养及杀菌剂试验操作的标准操作规范 (SOP) 135 条,希望有利于统一和规范我国农药生物测定工作,为农药研发、鉴定、示范、应用服务。

由于农药生物活性测定技术内容广、方法多,加之编者水平有限,书中难免有疏漏和不足之处,敬请专家和同仁批评指正。

编者

2016 年 6 月

目 录

第一部分 试材准备与培养 /1

SOP-SC-1001 稀释纯化法	2
SOP-SC-1002 琼脂平板稀释纯化法	3
SOP-SC-1003 单孢子分离纯化法	4
SOP-SC-1004 干孢子分离法	5
SOP-SC-1005 显微操作器分离法	6
SOP-SC-1006 培养皿稀释分离法	7
SOP-SC-1007 平板画线分离法	8
SOP-SC-1008 组织分离法	9
SOP-SC-1009 PDA 培养基的制作	10
SOP-SC-1010 肉汁胨培养基的制作	11
SOP-SC-1011 马铃薯蛋白胨琼脂培养基的制作	12
SOP-SC-1012 燕麦片琼脂培养基的制作	13
SOP-SC-1013 玉米粉琼脂培养基的制作	14
SOP-SC-1014 麦芽浸膏培养基的制作	15
SOP-SC-1015 胡萝卜培养基的制作	16
SOP-SC-1016 黑麦培养基的制作	17
SOP-SC-1017 玉米粉沙土培养基的制作	18
SOP-SC-1018 培养基的灭菌	19
SOP-SC-1019 菌种的常规保存	20
SOP-SC-1020 菌种的低温保存	21
SOP-SC-1021 菌种的矿物油保存	22
SOP-SC-1022 菌种的沙土管保存	23
SOP-SC-1023 菌种的干燥保存	24
SOP-SC-1024 菌种的水保存	25
SOP-SC-1025 菌种的真空冷冻干燥保存	26
SOP-SC-1026 菌种的超低温液氮保存	28
SOP-SC-1027 瓜类炭疽病菌的保存及培养	29
SOP-SC-1028 黄瓜霜霉病菌的保存及培养	30
SOP-SC-1029 黄瓜黑星病菌的保存及培养	31
SOP-SC-1030 黄瓜白粉病菌的保存及培养	32
SOP-SC-1031 黄瓜枯萎病菌的保存及培养	33
SOP-SC-1032 黄瓜幼苗猝倒病菌的保存及培养	34
SOP-SC-1033 黄瓜细菌性角斑病菌的保存及培养	35

SOP-SC-1034 番茄灰霉病菌的保存及培养 36

SOP-SC-1035 番茄晚疫病菌的保存及培养 37

SOP-SC-1036 番茄早疫病菌的保存及培养 38

SOP-SC-1037 番茄叶霉病菌的保存及培养 39

SOP-SC-1038 番茄绵疫霉病菌的保存及培养 40

SOP-SC-1039 茄子黄萎病菌的保存及培养 41

SOP-SC-1040 马铃薯晚疫病菌的保存及培养 42

SOP-SC-1041 马铃薯软腐病菌的保存及培养 43

SOP-SC-1042 十字花科黑斑病菌的保存及培养 44

SOP-SC-1043 油菜菌核病菌的保存及培养 45

SOP-SC-1044 白菜软腐病菌的保存及培养 46

SOP-SC-1045 芦笋茎枯病菌的保存及培养 47

SOP-SC-1046 辣椒炭疽病菌的保存及培养 48

SOP-SC-1047 辣椒疫病菌的保存及培养 49

SOP-SC-1048 小麦赤霉病菌的保存及培养 50

SOP-SC-1049 小麦根腐病菌的保存及培养 51

SOP-SC-1050 小麦白粉病菌的保存及培养 52

SOP-SC-1051 小麦锈病菌的保存及培养 53

SOP-SC-1052 玉米锈病菌的保存及培养 54

SOP-SC-1053 玉米小斑病菌的保存及培养 55

SOP-SC-1054 水稻恶苗病菌的保存及培养 56

SOP-SC-1055 水稻纹枯病菌的保存及培养 57

SOP-SC-1056 水稻稻瘟病菌的保存及培养 58

SOP-SC-1057 水稻白叶枯病菌的保存及培养 59

SOP-SC-1058 大豆锈病菌的保存及培养 60

SOP-SC-1059 棉花立枯病菌的保存及培养 61

SOP-SC-1060 棉花红腐病菌的保存及培养 62

SOP-SC-1061 棉花枯萎病菌的保存及培养 63

SOP-SC-1062 棉花黄萎病菌的保存及培养 64

SOP-SC-1063 花生褐斑病菌的保存及培养 65

SOP-SC-1064 葡萄霜霉病菌的保存及培养 66

SOP-SC-1065 葡萄白腐病菌的保存及培养 67

SOP-SC-1066 葡萄黑豆病菌的保存及培养 68

SOP-SC-1067 梨黑星病的保存及培养 69

SOP-SC-1068 梨轮纹病菌的保存及培养 70

SOP-SC-1069 苹果褐斑病的保存及培养 71

SOP-SC-1070 苹果斑点落叶病菌的保存及培养 72

SOP-SC-1071 烟草花叶病毒的保存及培养 73

第二部分 杀菌剂试验方法 /74

SOP-SC-1072 孢子萌发实验法 75

SOP-SC-1073	孢子产量法	77
SOP-SC-1074	抑菌圈法	79
SOP-SC-1075	菌丝干重法	81
SOP-SC-1076	琼脂稀释法	83
SOP-SC-1077	液体培养法	85
SOP-SC-1078	杀菌活性普筛喷雾法	87
SOP-SC-1079	杀菌活性普筛生长速率法	90
SOP-SC-1080	杀菌活性初筛喷雾法	92
SOP-SC-1081	杀菌活性初筛生长速率法	95
SOP-SC-1082	杀菌活性复筛喷雾法	97
SOP-SC-1083	杀菌活性复筛生长速率法	100
SOP-SC-1084	杀菌活性筛选标准靶标	102
SOP-SC-1085	杀细菌剂快速筛选方法	103
SOP-SC-1086	杀菌剂联合毒力测定法	104
SOP-SC-1087	杀菌剂治疗作用测定方法	106
SOP-SC-1088	杀菌剂持效性测定方法	108
SOP-SC-1089	杀菌剂内吸传导性测定方法	110
SOP-SC-1090	杀菌剂耐雨水冲刷能力测定方法	112
SOP-SC-1091	杀菌种衣剂盆栽法	114
SOP-SC-1092	种子处理剂安全性盆栽法	116
SOP-SC-1093	土壤处理剂安全性盆栽法	118
SOP-SC-1094	茎叶处理剂安全性盆栽法	120
SOP-SC-1095	植物诱抗剂测定法	122
SOP-SC-1096	瓜类炭疽病盆栽法	125
SOP-SC-1097	黄瓜霜霉病离体叶片法	127
SOP-SC-1098	黄瓜霜霉病盆栽法	129
SOP-SC-1099	黄瓜灰霉病离体叶片法	131
SOP-SC-1100	黄瓜灰霉病盆栽法	133
SOP-SC-1101	黄瓜白粉病盆栽法	135
SOP-SC-1102	黄瓜枯萎病盆栽法	137
SOP-SC-1103	黄瓜细菌性角斑病盆栽法	139
SOP-SC-1104	番茄早疫病离体叶片法	141
SOP-SC-1105	番茄早疫病盆栽法	143
SOP-SC-1106	番茄晚疫病盆栽法	145
SOP-SC-1107	白菜软腐病萝卜块根法	147
SOP-SC-1108	油菜菌核病盆栽法	149
SOP-SC-1109	马铃薯晚疫病离体叶片法	151
SOP-SC-1110	水稻纹枯病离体叶片法	153
SOP-SC-1111	水稻纹枯病盆栽法	155
SOP-SC-1112	水稻恶苗病盆栽法	157
SOP-SC-1113	水稻白叶枯病盆栽法	159
SOP-SC-1114	稻瘟病洋葱鳞片法	161

SOP-SC-1115	稻瘟病盆栽法	163
SOP-SC-1116	小麦白粉病盆栽法	165
SOP-SC-1117	小麦赤霉病盆栽法	167
SOP-SC-1118	玉米大小斑病盆栽法	169
SOP-SC-1119	玉米锈病盆栽法	171
SOP-SC-1120	大豆锈病盆栽法	173
SOP-SC-1121	棉花枯萎病盆栽法	175
SOP-SC-1122	棉花立枯病盆栽法	177
SOP-SC-1123	烟草花叶病毒半叶法	179
SOP-SC-1124	葡萄霜霉病离体叶片法	181
SOP-SC-1125	葡萄霜霉病盆栽法	183
SOP-SC-1126	梨黑星病盆栽法	185
SOP-SC-1127	苹果褐斑病盆栽法	187
SOP-SC-1028	药剂驯化法获得白粉病菌抗性菌株	189
SOP-SC-1129	紫外诱导法获得白粉病菌抗性菌株	191
SOP-SC-1130	白粉病菌对 QoI 类和 SBI 类杀菌剂敏感基线离体叶段法	193
SOP-SC-1131	灰葡萄孢病菌对 QoI 类和嘧啶胺类杀菌剂敏感基线果实法	195
SOP-SC-1132	马铃薯早疫病菌对 QoI 类和 SBI 类杀菌 剂敏感基线孢子萌发法	197
SOP-SC-1133	霜霉病菌对 QoI 类和 CAA 类杀菌剂敏感基线叶碟法	199
SOP-SC-1134	大豆锈病病菌对 QoI 类和 SBI 类杀菌剂敏感基线测定	201
SOP-SC-1135	菌核病菌对 SDHI 类杀菌剂敏感基线测定	203

第一部分

试材准备与培养

SOP-SC-1001 稀释纯化法

Pesticide Bioassay Testing SOP for Diluteness Purification

1 适用范围

本规范适用于产生孢子较多的真菌的纯化。

2 仪器设备

无菌室或超净工作台、压力蒸汽灭菌器、电热鼓风干燥箱、显微镜、恒温水浴锅等。

3 操作方法

3.1 将待分离纯化的菌种在适合该菌生长并产孢的斜面培养基或平皿培养基上进行前培养，长出孢子后备用。

3.2 将菌种上产生的孢子用无菌水洗下，放入灭菌试管或小烧瓶中，经多级不断稀释到每一小滴悬浮液中大致只有一个孢子。将孢子液滴在灭菌的载玻片上，在显微镜下检查，将只有一个孢子的小滴孢子悬浮液，用接种环移植到适当的培养基上培养。

3.3 将 14mL 左右洁净的硬琼胶培养基或纯琼胶注入 9cm 平皿中，凝固后，在平皿背面用记号笔画直径 4~5mm 的小圈 5~10 个。然后在灭菌的载玻片上滴一滴灭菌水，加孢子配成浓度适当的悬浮液。再用尖端圆形的细玻璃针，在沸水中灭菌后，蘸一小滴孢子悬浮液，移至所画圆圈范围内琼胶平板表面上，稍向下压，使培养基表面稍微下凹，但勿使表面破碎。然后，从平皿背面镜检圈内孢子数目，找到只含一个孢子的圆圈，用无菌的接种刀将这一小块培养基切下，移植到适宜的培养基上生长。

3.4 先在 9cm 平皿中注入熔融的 12mL 洁净纯琼胶，凝固后备用。将在菌种上产生的孢子用无菌水洗下，放入无菌试管或小烧瓶中，经过系列稀释，取样镜检后，取适当浓度的 2~3 级孢子悬浮液 10mL 左右，倒入上述已凝固的纯琼胶平板上，放置 10~20min，待孢子沉降后，倾斜平皿，去掉多余水分，倒置平皿，在显微镜下镜检，确认每个视野只有一个孢子时，用记号笔在皿底点上記号。同法在皿底寻找 5 个单孢点，然后用移植器切取记号点琼胶块到适宜该菌生长的斜面或平皿培养基中，置适宜温度下培养，从形成的单个菌落边缘移植菌丝体进行纯培养。

SOP-SC-1002 琼脂平板稀释纯化法

Pesticide Bioassay Testing SOP for Agar Flat Purification

1 适用范围

本规范适用于产孢较多的真菌或细菌的纯化。

2 仪器设备

无菌室或超净工作台，压力蒸汽灭菌器、电热鼓风干燥箱、显微镜、恒温水浴锅等。

3 操作方法

3.1 将待分离纯化的菌种在适合该菌生长并产孢的斜面培养基或平皿培养基上进行前培养，长出孢子后备用。

3.2 将菌种上产生的孢子用灭菌水洗下，放入灭菌试管或小烧瓶中，经倍量多级稀释，取样镜检后，取适当稀释浓度的 2~3 级孢子悬浮液各 0.5mL，分别注入灭菌 9cm 平皿中，然后再在各皿中加入预先熔融并冷却至 45℃ 左右的琼脂培养基，充分混匀，制成带菌平皿。凝固后，倒置平皿，在显微镜下镜检，将平皿中只有 10~20 个孢子的皿移至适宜温度下培养，从形成的单个分散的菌落边缘移植菌丝体进行纯化培养。

SOP-SC-1003 单孢子分离纯化法

Pesticide Bioassay Testing SOP for Single Spore Separating Purification

1 适用范围

本规范适用于产生孢子较多的真菌的纯化。

2 仪器设备

无菌室或超净工作台，压力蒸汽灭菌器、电热鼓风干燥箱、显微镜、恒温水浴锅等。

3 操作方法

3.1 将待分离纯化的菌种在适合该菌生长并产孢的斜面培养基或平皿培养基上进行前培养，长出孢子后备用。

3.2 将少量孢子悬浮液或分离的材料放在灭菌载玻片上的水滴中，在显微镜下观察其中孢子数。调节水滴中孢子到适当的数量，再移植接种到琼脂平板表面上。

3.3 单孢分离

3.3.1 平皿背面检查法

将 12mL 洁净硬琼脂培养基注入 9cm 平皿中，凝固后，用接种环将上述水滴中孢子悬浮液点接或画线或涂匀在皿底有记号的琼脂平板表面，用显微镜从平皿反面检查，在视野内只有一个孢子，用记号笔在皿底做一小点记号，用接种刀切下带有孢子的琼脂块，移植到适宜培养基上生长。切下的小块琼脂培养基最好移植到琼脂斜面的边缘，背面贴近玻管，以便检视孢子是否存在。

3.3.2 平皿正面检查法

将分离的孢子用以上同样方法加在洁净的硬琼胶培养基平板表面，用物镜放大倍数小（4~8×）而目镜放大倍数大的（28×左右）双筒解剖镜检查，用接种针将单个孢子挑出移植培养。

3.4 特殊孢子的分离

本法适用于分离子囊孢子和担子菌的小孢子和担孢子。将子囊移在凝固后的琼胶平板表面，用细接种针挑破子囊，挑取子囊孢子移植，或者等到移在琼胶平板上的子囊弹射出子囊孢子后再用针挑取。至于黑粉菌的小孢子的挑取，可以将厚垣孢子放在琼胶平板上萌发，产生小孢子后用针挑取。分离小而无色的孢子时，可以等到孢子萌发产生短芽管后再挑取。孢子萌发后容易看到和挑取。分离萌发的孢子，用 1% 的琼胶培养基，在 25℃ 左右条件下培养 12~18h 后，再用接种针（钩）移植。

SOP-SC-1004 干孢子分离法

Pesticide Bioassay Testing SOP for Dry Spores Purification

1 适用范围

本规范适用于黑粉菌、锈菌和某些担子菌的干孢子分离纯化。

2 仪器设备

无菌室或超净工作台，压力蒸汽灭菌器、电热鼓风干燥箱、显微镜、恒温水浴锅等。

3 操作方法

3.1 取黑粉菌厚垣孢子、锈菌夏孢子和某些担子菌的担孢子备用。

3.2 将黑粉菌厚垣孢子、锈菌的夏孢子和某些担子菌的担孢子，放在灭菌的玻片上，在低倍显微镜下检视，用细缝衣针或解剖针针尖轻轻接触孢子，使孢子离开玻片附着在针尖上，然后将针尖上干孢子移植到各适宜培养基平皿培养。

SOP-SC-1005 显微操作器分离法

Pesticide Bioassay Testing SOP for Microscope Purification

1 适用范围

本规范适用于产孢较多的真菌直接在显微镜下进行单个孢子分离。

2 仪器设备

无菌室或超净工作台，压力蒸汽灭菌器、电热鼓风干燥箱、显微镜、恒温水浴锅等。

3 操作方法

3.1 显微镜的调节

取下显微镜聚光器，插入中央带孔的软木塞，软木塞上用石蜡固定一个用玻璃毛细管制成的钩形针。移动软木塞将玻璃针尖调到低倍镜视野中央(10 倍接物镜)，调节聚光镜螺旋，玻璃针即可上下移动。取下载物台上固定载玻片的玻片夹，台上安装木制或塑料制的薄板，上面放置培养皿，调节推进器螺旋可使培养皿前后左右移动。

3.2 孢子准备

在 9cm 无菌平皿内倒入 12mL 1% 洁净纯琼胶培养基制成平板。将灭菌的接种环在琼胶表面轻轻涂抹，将接种环湿润，挑取病菌孢子，然后移植到琼胶平板上。在培养皿背面用记号笔在涂孢子的位置做标记。

3.3 显微分离

将平皿放在显微镜载物台上，使涂布孢子的部分移到视野中央，并聚焦（接物镜为 10~20 倍）。调节聚光器螺旋将玻璃针尖提升到孢子附近，微调螺旋使针尖略刺入琼胶表面，调节推进器螺旋，移动培养皿使孢子和针尖部交叉，旋转聚光器螺旋使针下降，孢子就可从纯琼胶表面被钩到针尖部。调节推进器螺旋移动培养皿，提升玻璃针使附着孢子的针尖再次出现在视野中，进一步提升玻璃针将孢子放置在琼胶表面，调节推进器螺旋，移动培养皿，孢子便离开针尖，留在琼胶表面。用记号笔在孢子外围做标记。如此反复操作，一个培养皿可分离 5~10 个孢子。在 25~28℃ 恒温箱内保存 1~2d，孢子萌发产生菌丝，用接种器移植到斜面培养基上进行纯培养。

SOP-SC-1006 培养皿稀释分离法

Pesticide Bioassay Testing SOP for Petri Dish Diluteness Purification

1 适用范围

本规范适用于新鲜病组织中植物病原菌的分离纯化。

2 仪器设备

无菌室或超净工作台，压力蒸汽灭菌器、电热鼓风干燥箱、恒温水浴锅等。

3 操作方法

3.1 新鲜病组织材料准备

采集新鲜的分离材料或将存放较久的病原物，经过重新接种感染，取新鲜病组织备用。

3.2 稀释分离

3.2.1 病组织表面消毒

将新鲜病组织病健交界部分切成 3~5mm 见方的小块放入灭菌皿内，另取 4 只灭菌皿，一只皿中放表面消毒液（1%~2% 次氯酸钠溶液或 70% 酒精溶液），另外 3 只各放无菌水。用镊子将病组织在次氯酸钠溶液中浸 1~4min，或在 70% 酒精中浸 30~60s，立即将病组织移入无菌水皿中清洗三次。

3.2.2 稀释培养

另取灭菌平皿一只，用接种环取 2~3 滴无菌水滴在平皿中，然后用灭菌镊子将经表面消毒的病组织片放在平皿水滴上，再用灭菌小镊子与灭菌解剖刀将病组织片破碎。组织中的细菌即渗入水中，用接种环取一滴细菌液，移入预先融化并保持在 45~50℃ 水浴锅的培养基试管中充分混匀，然后从中取一滴移入第二支试管培养基中，混匀后再从第二支试管中取一滴移入第三支试管培养基中并混匀。这样即制成经三级稀释的混合细菌培养基。将它们分别倒入三个灭菌平皿内，轻轻转动制成混合均匀平板。在 25~30℃ 恒温器内放置 2~3d 后即出现菌落。上述第二、第三级稀释平板中会出现孤立的菌落，挑取菌落并移植到斜面培养基上培养保存。有时，平板上可能长出除致病菌以外的其他细菌或真菌，如果不能与致病菌区别，就要分别从不同形态菌落上同时移取 2~3 个斜面，经培养后再进行人工活组织接种试验，明确致病性后，再将致病菌繁殖及保存。

SOP-SC-1007 平板画线分离法

Pesticide Bioassay Testing SOP for Agar Petri Dish Lining Purification

1 适用范围

本规范适用于新鲜病组织中植物病原菌的分离纯化。

2 仪器设备

无菌室或超净工作台、压力蒸汽灭菌器、电热鼓风干燥箱、恒温水浴锅等。

3 操作方法

3.1 新鲜病组织材料准备

采集新鲜的分离材料或将存放较久的病原物经过重新接种感染，取新鲜病组织备用。

3.2 病组织表面消毒

将新鲜病组织病健交界部分切成 3~5mm 见方的小块放入灭菌皿内，另取 4 只灭菌皿，一只皿中放表面消毒液（1%~2%次氯酸钠溶液或 70%酒精溶液），另外 3 只各放无菌水。用镊子将病组织在次氯酸钠溶液中浸 1~4min，或在 70%酒精中浸 30~60s，立即将病组织移入无菌水皿中清洗三次。

3.3 分离培养

将病组织放入加有一滴无菌水（或生理盐水或营养液）的灭菌平皿中，用灭菌玻棒研碎，静置 10~15min，使组织中的细菌渗入水滴中，然后用灭菌的接种环沾取以上组织液在前述预先准备好已完全消除冷凝水的第一只琼脂平板上，做蛇形画线，接着顺次用同一接种环在第二、第三个平板上做蛇形画线。倒置平皿，在适温下培养 2~3d，这时在第一、第二个平板上的菌落可能连在一起，但第三个平板上会出现孤立的菌落，然后用接种器将菌落移植到斜面纯培养和保存。