

植物病害

组织制片技术

ZHIWU BINGHAI ZUZHI ZHIPIAN JISHU

贺冰 著



 中国农业出版社

植物病害组织制片技术

ZHIWU BINGHA! ZUZHI ZHIPIAN JISHU

贺 冰 著



中国农业出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

植物病害组织制片技术 / 贺冰著. —北京: 中国农业出版社, 2014. 4

ISBN 978-7-109-19047-4

I. ①植… II. ①贺… III. ①病害—切片 (生物学)—制作 IV. ①S432

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2014) 第 065502 号

中国农业出版社出版

(北京市朝阳区农展馆北路 2 号)

(邮政编码 100125)

策划编辑 张洪光 阎莎莎

文字编辑 宋美仙

北京通州皇家印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行

2014 年 4 月第 1 版

2014 年 4 月北京第 1 次印刷

开本: 889mm×1194mm 1/32 印张: 4 插页: 2

字数: 100 千字

定价: 16.00 元

(凡本版图书出现印刷、装订错误, 请向出版社发行部调换)

植物病害组织制片方法

内容简介

本书是一本介绍植物病害组织制片方法的技术图书，主要介绍了植物病害组织及病原物制片的基本原理和制片方法。植物病害组织制片方法包括石蜡制片、快速石蜡制片、整体封固制片、徒手切片制片、冰冻切片制片、薄切片制片和超薄切片制片等。本书着重介绍了快速石蜡制片及染色技术的原理和方法，还对有关仪器设备作了简要的介绍，同时附有以上制片方法所做玻片的彩色显微照片。

本书可作为植保、植检工作者及高等农林院校相关专业师生的专业工具书，亦可作为生物类专业师生的参考用书。

前言

oooooooooooooooooooooooooooo



植物在生长发育过程中，受真菌、细菌和病毒等病原物的侵染，其组织细胞及生理生化等方面都发生了一系列的病理变化，引起各类农林产品产量与品质变劣，从而给国民经济和人民生活带来很大的影响。因此，研究和控制植物病害发展显得尤为重要。研究和控制植物病害，首先要认识和诊断病害，这就需要对植物病害组织进行制片。进入 21 世纪，分子生物学虽已应用到植物病理学和病原学等领域，但植物病害组织制片技术始终是植物病害研究的重要手段。当前植物病害组织制片技术的应用范围越来越广泛，如病原物的种类鉴定、病原物在寄主植物体内存在状态、病原物组织细胞发育特性、寄主植物与病原物的相互关系以及植物品种抗病性等方面。理想的永久、半永久和临时玻片对于植物病害研究工作具有十分重要的意义。

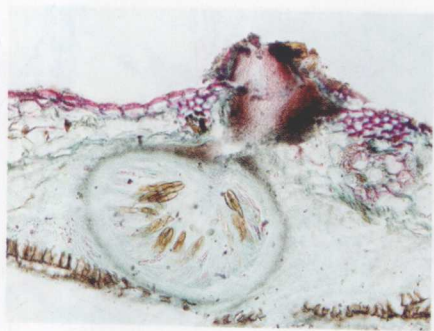
本书介绍了植物病害组织制片常用的 8 种方法。对于学习和研究植物病害的工作者来说，掌握其中几种制片方法是必要的。相关人员在了解和掌握植物病害制片的基本原理和技术方法的基础上，根据研究的对象、材料的性质以及目的和任务，结合现有的仪器和设备，选用一种或几种合适的制片方法，并加以灵活应用，对研究工作具有很大的帮助。

笔者从多年制片研究的实践中深刻体会到制片者应认真学习和掌握制片的基本原理和方法。植物病害组织制片是一个连续的工作过程，时间性强，技术要求严格。在制片过程中，制片者常常会遇到各种各样的问题和困难，致使制片失败，如脱水或渗蜡不充分、切片破碎、染色过深或过浅等。这时决不可气馁，而要仔细分析原因，通过反复试验找出改进和解决问题的方法。制片工作的每一个环节都很重要。只要认真分析，及时总结提高，找出制片材料所适宜的技术和方法，就一定能制作出理想的显微玻片。

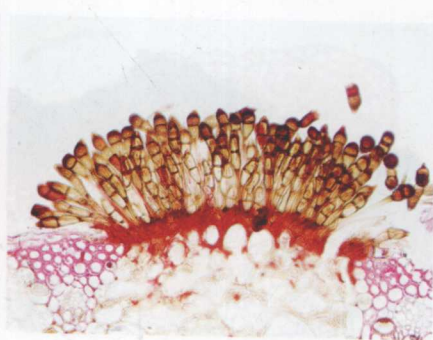
由于笔者知识和理论水平有限，书中难免有不妥之处，恳请广大读者批评指正，提出宝贵的意见，以便不断完善和充实本书的内容。

山西农业大学 贺冰

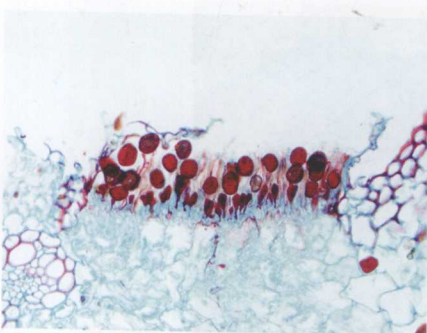
2013年10月



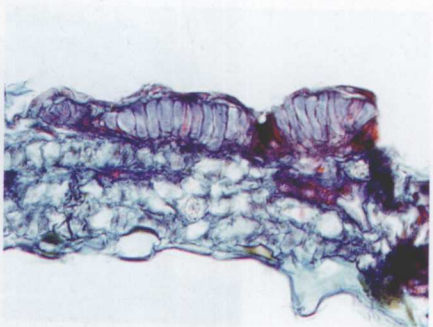
彩图1 小麦秆枯病菌 (*Gibellina cerealis*) 子囊壳及子囊孢子



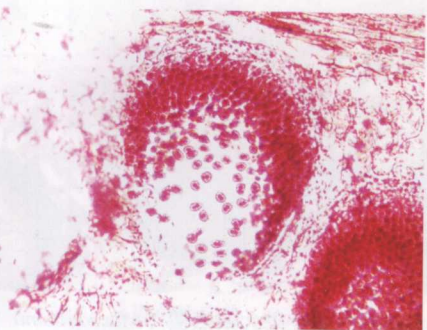
彩图2 小麦秆锈病菌 (*Puccinia graminis* var. *tritici*) 冬孢子堆及冬孢子



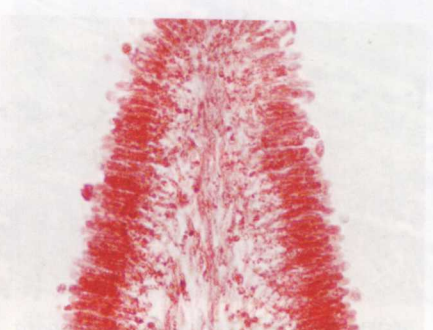
彩图3 小麦条锈病菌 (*Puccinia striiformis* f.sp. *tritici*) 夏孢子堆及夏孢子



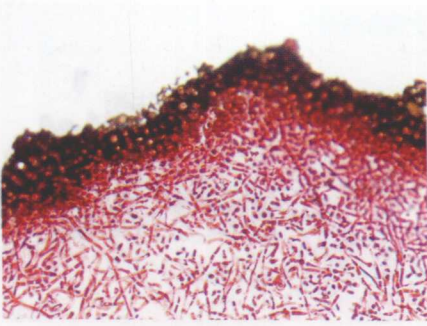
彩图4 杨树锈病菌 (*Melempsoora larici-populina*) 冬孢子堆



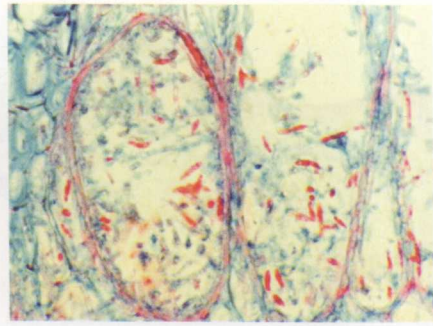
彩图5 桑锈孢锈菌 (*Aecidium mori*) 锈孢子器及锈孢子



彩图6 凤尾菇 (*Pleurotus sajor-caju*) 菌褶、担子及担孢子



彩图7 向日葵菌核病菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*) 菌核剖面



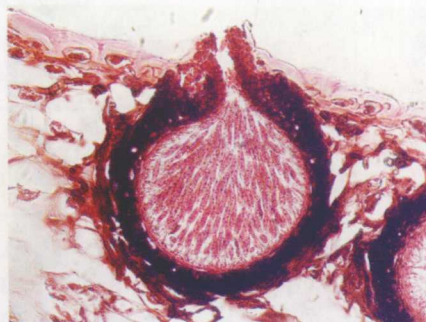
彩图8 西瓜枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum* f.sp.*niveum*) 在导管中菌丝及分生孢子



彩图9 杧果炭疽病菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*) 分生孢子盘及分生孢子



彩图10 苹果树腐烂病菌 (*Cytospora mali*) 分生孢子器



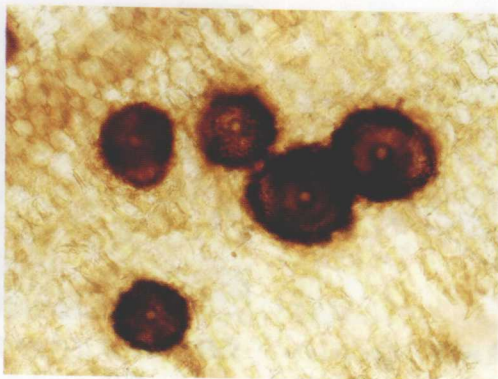
彩图11 杧果大茎点菌 (*Macrophoma mangiferae*) 分生孢子器及分生孢子



彩图12 芹菜斑枯病菌 (*Septoria apiicola*) 分生孢子器及分生孢子



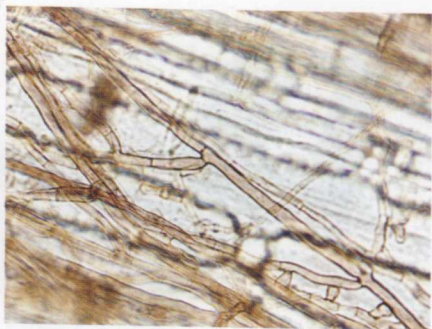
彩图13 日本菟丝子 (*Cuscuta japonica*) 侵入木本植物组织中的吸根



彩图14 叶点霉 (*Phyllosticta* sp.) 分生孢子器



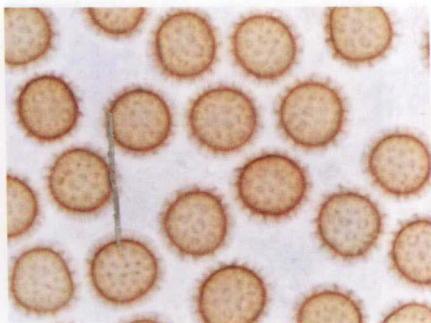
彩图15 小麦全蚀病菌 (*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*) 在叶鞘上的子囊壳



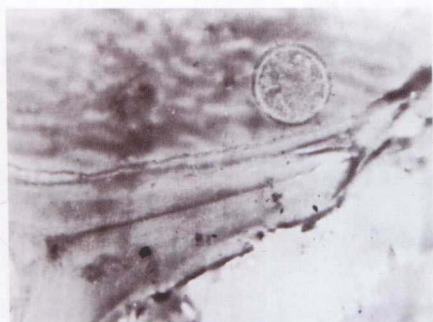
彩图16 小麦全蚀病菌在叶鞘上的菌丝体



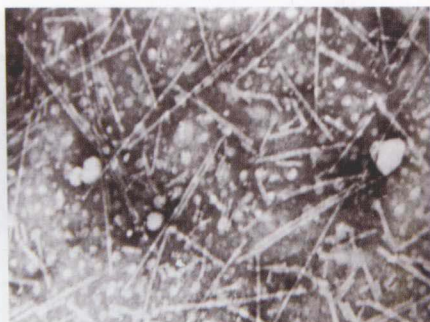
彩图17 镰刀菌 (*Fusarium* sp.)
分生孢子



彩图18 小麦矮腥黑穗病菌 (*Tilletia controversa*) 冬孢子 (美国)



彩图19 棉花枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*)
在导管中的菌丝形态结构



彩图20 烟草花叶病毒 (TMV) 杆状
颗粒



彩图21 白菜软腐病菌
carotovora subsp
菌体 × 27000



薯环腐病菌 (*Clavibacter ganens* subsp. *sepedonicum*)
菌体 × 7500

目 录

.....
oooooooooooooooooooooooooooo



前言

一、植物病害组织制片的准备工作	1
(一) 基本仪器设备和试剂	1
1. 仪器设备	1
2. 常用试剂	6
3. 常用染料	7
4. 薄切片制片法与超薄切片制片法常用试剂	7
(二) 植物病害组织制片标本的采集和取材	8
1. 植物病害切片标本的采集	8
2. 切片材料的选择与分割	10
(三) 制作切片注意事项	12
二、植物病害组织制片的一般原理	14
(一) 固定与固定液	14
1. 选择理想固定液的几个原则	15
2. 配制固定液的常用试剂	16
3. 常用固定液	18
4. 固定时应注意事项	21
(二) 脱水与脱水剂	22
1. 脱水的作用	23
2. 常用脱水剂	23

(三) 透明与透明剂	25
(四) 石蜡渗透与石蜡	27
1. 石蜡渗透的原则	27
2. 渗透与包埋所用的石蜡	27
(五) 制片的其他试剂	28
1. 粘贴剂	28
2. 封固剂	30
3. 漂白剂	32
4. 软化剂	33
三、植物病害组织切片染色	35
(一) 染色原理	35
1. 染色的必要性	35
2. 染色原理	36
3. 染料的性质	38
4. 染料种类	39
(二) 常用染料	41
1. 苏木精	41
2. 番红	42
3. 固绿	42
4. 亮绿	43
5. 亚甲绿	43
6. 甲基绿	43
7. 橘红 G	43
8. 碱性品红	44
9. 酸性品红	44
10. 苯胺蓝	44
11. 苏丹Ⅲ和苏丹Ⅳ	44
12. 俾斯麦棕	44

13. 钒红	45
14. 曙红	45
15. 刚果红	45
16. 孔雀绿	45
17. 马蒂阿黄	45
18. 硫堇	45
(三) 染色方法与步骤	46
1. 染色方法的种类	46
2. 染色缸的组合及排列	47
3. 染色剂及染色步骤	48
四、植物病害组织制片技术	56
(一) 石蜡制片法	56
1. 固定	57
2. 脱水	58
3. 透明	59
4. 石蜡渗透	60
5. 石蜡包埋	61
6. 切片	62
7. 粘片与展片	67
8. 染色	68
9. 封固	68
(二) 快速石蜡制片法	70
1. 固定	71
2. 脱水和透明	71
3. 石蜡渗透	72
4. 石蜡包埋	74
5. 切片	74
6. 粘片与展片	74

7. 染色	74
8. 封固	74
(三) 整体封固制片法	74
1. 病原真菌整体封固制片法	75
2. 病原细菌玻片制作法	78
3. 线虫整体封固制片法	83
(四) 徒手切片制片法	91
1. 材料	91
2. 方法与步骤	91
(五) 冰冻切片制片法	93
1. 冰冻制片具体步骤	93
2. 冰冻制片时注意事项	94
(六) 薄切片制片法	95
1. 固定	95
2. 脱水	98
3. 渗透与包埋	98
4. 切片	100
5. 染色和封固	101
(七) 超薄切片制片法	102
1. 固定液及材料的固定	102
2. 脱水	102
3. 渗透	102
4. 包埋	103
5. 聚合	103
6. 切片	104
7. 染色	105
(八) 病原体负染膜制作法	107
1. 病毒粒体负染膜制作法	107
2. 细菌与真菌孢子悬液负染膜制作法	108

3. 福尔马膜的制备	108
附录	109
附录 1 玻璃器皿的洗涤	109
附录 2 各级浓度酒精的配制	111
附录 3 石蜡切片切削质量不佳的原因分析 和解决方法	112
附录 4 切片厚度与室温及石蜡熔点的关系	114
主要参考文献	115

设备加以改造重新利用,也可达到相同的目的。本书也介绍了超薄切片法,由于此种切片法所需的超薄切片机和电子显微镜等设备价格特别昂贵,一般植物病理实验室不具备,只能在专用电镜室使用,所以这种设备不在本书中介绍。

(一) 基本仪器设备和试剂

在植物病害组织制片中,有些制片过程是连续不断的,因此,在组织制片之前必须将基本的仪器设备、常用试剂和染料准备好,以免影响制片的质量和效果。

1. 仪器设备

(1) 普通仪器

1) 光学显微镜 (optical microscopy)。一般需要两台光学显微镜,一台普通光学显微镜供检查病理切片刃的刀口磨损和切片染色后的情况使用,另一台高级光学显微镜供研究观察使用。

2) 双筒解剖镜 (dissecting microscope)。双筒解剖镜又称作式显微镜、立体显微镜和实体显微镜,用于植物病害标本症状的观察和选取病害材料部位的观察。

3) 切片机 (microtome)。切片机是植物病害组织制片的最



植物病害组织制片的准备工作

植物病害组织制片工作之前必须做好准备工作，且应具备一定的工作条件。本书介绍植物病害组织制片所需要的基本设备与试剂，只是一些常规设备和制剂，不需较大投入，还可用废旧的设备加以改造重新利用，也可达到相同的目的。本书也介绍了超薄切片法，由于此种制片法所需的超薄切片机和电子显微镜等设备价格特别昂贵，一般植物病理实验室不具备，只能在专用电镜室使用，所以这种设备不在本书中介绍。

(一) 基本仪器设备和试剂

在植物病害组织制片中，有些制片过程是连续不断的，因此，在组织制片之前必须将基本的仪器设备、常用试剂和染料准备好，以免影响制片的质量和效果。

1. 仪器设备

(1) 普通仪器

1) 光学显微镜 (optical microscopy)。一般需要两台光学显微镜，一台普通光学显微镜供检查病理切片刀的刀口磨损和切片染色后的情况使用，另一台高级光学显微镜供研究观察使用。

2) 双筒解剖镜 (dissecting microscope)。双筒解剖镜又称体式显微镜、立体显微镜和实体显微镜，用于植物病害标本症状的观察和选取病害材料部位的观察。

3) 切片机 (microtome)。切片机是植物病害组织制片的最

重要的仪器之一。近年来，切片机的研发和设计发展很快，已有电脑石蜡切片机，电脑冷冻切片机，电脑快速冷冻、石蜡两用切片机及轮转式切片机等多种类型（图 1、图 2）。根据笔者的经验认为：轮转式切片机经济适用、操作简便、性能稳定，有故障后易于排除，可作为制片工作者的首选。

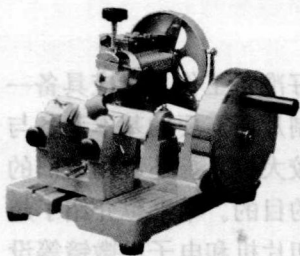


图 1 旧式轮转式切片机

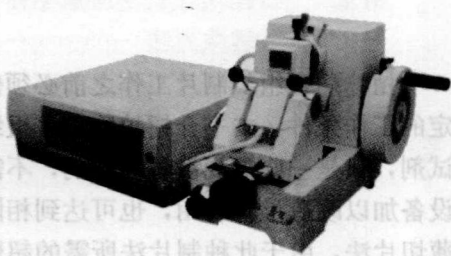


图 2 冷冻、石蜡两用切片机

4) 切片机附属设备 (parts of microtome)。

①切片刀。传统制片中使用两面平直的切片刀（110mm 或 120mm），并附有刀柄及刀架，供磨刀和荡刀时用。

近年来，科研人员已多选用一次性刀片（一般另配有刀架），如市场销售的“羽毛”牌和“莱卡”牌刀片（50 片一盒）。由于使用方便，切片效果好，减少了磨刀等工序，被越来越多的人所接受。

②磨刀石。传统的病理切片刀使用一段时间后，刀口经常发生磨损，使用前需要磨刀。目前市场上已很难购买到切片刀专用磨刀石，所以需要制片工作人员自行找到粗磨石和细磨石，并且要自己加工成磨刀石才能使用。

③磨刀机。可选用显微切片刀自动磨刀机，该机选用天然青石磨盘。磨刀时将切片刀装在刀架中，刀片即可紧贴磨盘在设定时间自动翻转刀片；同时可以调节刀刃角和刃磨压力，自动完成刀片两面的磨刀。一般选用 ZMD-2 型自动磨刀机。

④荡刀皮。一般采用皮革制成的长条形皮带。