

The background of the cover features a stylized illustration of several wheat stalks. The stalks are depicted with thin, white, angular lines that branch out from the bottom towards the top. At the ends of these stalks are clusters of wheat grains, rendered in a light, textured white. The entire design is set against a solid, muted blue background.

世界农业
丛刊

植物病理学译丛

(六)

农业出版社

植物病理学译丛

(六)

裴维蕃 主编

农业出版社

《世界农业》丛刊
植物病理学译丛

(六)

裘维蕃 主编

* * *

责任编辑 李永庆

农业出版社出版 (北京朝内大街130号)

新华书店北京发行所发行 农业出版社印刷厂印刷

787×1092 毫米 16 开本 10 印张 230 千字
1987 年 2 月第 1 版 1987 年 2 月北京第 1 次印刷
印数 1—1,478 册

统一书号 16144·3091 定价 2.10 元

目 录

日本土传病害的现状及其防治.....	高尾荒喜 (1)
用十二烷基磺酸钠 (SDS) 处理植物病毒及其内含体的免疫双扩散试验.....	
..... D. E. Purcifull D. L. Batchelor (9)	
A 蛋白 (从金黄色葡萄球菌中获得的) 在免疫电镜检测植物病毒中的应用.....	
..... D. D. Shukla K. H. Gouch (21)	
水稻白叶枯病菌血清学的专化性.....	崔在乙 (24)
简易琼脂扩散法诊断黄瓜花叶病毒.....	匠原监一郎 井上忠男 (31)
植物病毒的提纯.....	M. H. V. Van Regenmortel (37)
植物检疫效果的评价.....	G. Mathys B. A. Baker (46)
种子和花粉在以病毒为主的植物病原物传播中的作用	H. C. Phatak (56)
水稻白叶枯病菌野生型和诱导突变体的细菌学和病理学特性.....	
..... K. Tsuchiya T. W. Mew S. Wakimolo (64)	
植物病毒的节肢动物和线虫媒介.....	K. F. Harris (71)
百种植物病毒性状 (续)	(87)
土壤和植物线虫.....	И. А. Баранавская (122)

日本土传病害的现状及其防治

高尾荒喜

1960 年左右旱作和果树开始兴起,接着划定蔬菜生产地区,并在此地区内大规模发展园艺,1970 年确定了改造稻田的措施,1975 年以后得到政府的积极推动,这些都给以稻作为主的日本农业带来了很大的变化。由于推广了大量的农业机械,因此,在主要旱作地区连作和快速轮作换茬已经很普遍了,在蔬菜产区这种趋向也很明显,结果造成了单作栽培。此后日本的各个地区已开始观察到连作引起的生长退化现象,这种情况在数量上逐年增加。1975 年农林和水产研究委员会在连作引起生长退化方面进行一次咨询,根据咨询结果,认为土传病害是退化的主要原因,占 35%,其次是线虫(16%),缺素(12%),土壤理化性降解(17%)和其他未知的原因(21%)。1978 年蔬菜试验站作过一次调查,表明蔬菜连作造成各种生长退化情况中,57%是因土传病害引起的。显然,连作引起的生长退化,大多数是土传病害和线虫造成的。

土传病害是一种病原菌存活于土中或土表,侵害土中和地上植物茎部的病害。防治土传病害之所以困难,其原因在于它们的发生是以寄主、寄生物和土壤微生物三种因子之间的相互关系为基础的,并以复杂的土壤环境作培养基,而其他的植物病害一般仅以寄主和寄生物之间的相互关系作基础。虽然对已知土传病害的防治方面已作了长期的研究,但至今未制定出明确的防治措施。从主产地的目前情况来看,连作不可避免,轮作的旱地已引进了旱地作物,新土传病害的发生是非常可能的。事实上人们愈来愈关心这问题,迫切需要防治措施。以下介绍过去 10 年间有关日本土传病害的实际情况和所进行的防治研究。

一、日本土传病害流行的实际情况

在日本和国外,大多数的土传病害,其病原菌都是真菌。细菌、病毒和放线菌的数量远比真菌为少。由于这个缘故,土传病害的研究大多数集中在真菌方面。主要的土壤真菌中,在美国认为严重的病原菌是瘤梗单孢霉(*Phymatotricum*),日本尚未发现。日本发现的一些病,如桑卷担菌(*Helicobasidium mompa*)引起的紫纹羽根腐病,和白纹羽病菌(*Rosellinia necatrix*)引起的白纹羽病,为害果树等各种作物的根部,相反,这种病害在美国则认为不严重。日本对须壳孢属真菌(*Pyrenochaeta*)引起的植物病害不甚了解。近来,在静冈县园艺作物中发现的 *Pyrenochaeta lycopersici*,已确证它是番茄褐色根腐病的病原菌。现在也已澄清连作引起的陆稻生长退化,是由稻黑点病菌(*P. oryzae*)造成的。此外,³洋葱和大蒜栽培地区已发现 *P. terrestris* 造成粉腐病。这样,现已集中注意于须壳孢属引起的病害上了。

在日本普遍发生的土传病害示于表 1。此表是 1976 年日本病理学会召开的第八届土

表 1 日本广泛发生的主要土传病害

普 通 名	病 原 体	报告的试验站数
1. 病毒		
烟草花叶病毒	TMV	8
其他病毒病	—	5
2. 细菌		
软腐病 (十字花科)	<i>Erwinia carotovora</i> var. <i>carotovora</i>	30
软腐病 (马铃薯)	<i>Erwinia carotovora</i>	5
粘液状软腐病	同上	21
其他细菌腐烂病	同上	8
细菌性萎蔫病 (茄科)	<i>Pseudomonas solanacearum</i>	20
黑腐病 (萝卜)	<i>Xanthomonas campestris</i>	21
细菌性斑点病	<i>Pseudomonas lachrymans</i>	7
其他细菌性病害	—	6
3. 放线菌		
马铃薯疮痂病	<i>Streptomyces scabies</i>	6
4. 真菌		
(1) 藻菌纲		
根肿病 (十字花科)	<i>Plasmodiophora brassicae</i>	13
疫霉腐烂病	<i>Phytophthora parasitica</i>	16
立枯病	<i>Pythium</i> spp. 等	10
疫霉腐烂病	<i>Phytophthora</i> spp.	23
根腐病	<i>Pythium</i> spp.	7
疫霉白腐病	<i>Phytophthora porri</i>	7
(2) 担子菌纲		
紫纹羽病	<i>Helicobasidium mompa</i>	7
丝核菌病	<i>Rhizoctonia solani</i>	9
立枯病	同上	9
Megare 病 (草莓)	同上	6
(3) 子囊菌纲		
白根腐病	<i>Rosellinia necatrix</i>	7
茎腐病	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	14
(4) 半知菌类		
镰孢霉枯萎病 (番茄)	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>	25
同 上 (黄瓜)	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cucumernum</i>	10
同 上 (西瓜)	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>niveum</i>	7
黄化病 (萝卜)	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>raphani</i>	7
同 上 (草莓)	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>fragariae</i>	13
其他枯萎病	<i>F. oxysporum</i> f.sp. —	7
立枯病	<i>Fusarium</i> spp.	12
干腐病	<i>F. solani</i> f.sp. —	6
复合镰孢霉病	<i>Fusarium</i> spp.	7
轮枝菌萎蔫病	<i>Verticillium albo-atrum</i> , <i>V. dahliae</i>	12

注: (), 主要寄主植物

传病害座谈会上调查结果的摘要。表中每种病害是经日本农业试验站和园艺试验站等56个试验站中5个以上试验站报道的。表中土传病害方面, 最普遍的是蔬菜的细菌病害, 其次是十字花科作物的根肿病、立枯病、紫纹羽病和疫霉菌腐烂病。和1963年日本第一届土传病害座谈会相比, 约有40种土传病害, 包括烟草花叶病毒、蔬菜细菌性软腐病、细菌性

腐烂病、萝卜黑腐病、疫霉腐烂病、丝核菌病、枯萎病、黄萎病、萝卜和草莓黄化病等，都是第八届座谈会报告中新增的。大家认为，土传病害中，土传病毒病和细菌病，土传真菌病如疫霉腐烂病、白纹羽病、紫纹羽病和枯萎病是最难防治的病害。

在 1963—1976 年期间，总共发现了 63 种土传病害，其数量还在继续增加。新发现的土传病害中，由尖镰孢霉菌新变型引起的病害，包括草莓黄化病在内，各地经常发现，其次是葫芦的枯萎病和萝卜黄化病形成的大量番茄萎蔫座镰孢霉 (*F. oxysporin* f. sp. *lycopersici*) 小种 J-3，在高知县的园艺作物上继续发生，这是日本初次发现的一种病害。迄今，已在日本西南部的一些温暖地区和北海道南部也观察到了。小种 J-3 表现出根腐和萎蔫的病状，其侵染适温是 15—20℃，明显低于小种 J-1(28℃)。还发现了菠菜和大葱的镰孢菌枯萎病。已知马铃薯干腐病是由 *F. solani* f. sp. *radicicola* 引起的，但在北海道，由真马氏茄腐皮镰孢霉菌 (f. sp. *eumartii*) 造成干腐和萎蔫，并已证实其侵染适温很低。

近年，接连不断地发现疫霉腐烂病菌的新变种。包括草莓根腐病原菌(草莓疫霉菌)、大葱疫霉白腐病原菌(韭葱疫霉)和黄瓜疫霉腐烂病菌(寄生疫霉)造成的病害，由于发生普遍，已引起人们注意。轮作旱地中生长的作物也受到疫霉腐烂病菌新变种的侵害；大豆上已发现了疫霉茎腐病病原菌大雄疫霉 (*P. megasperma* var. *sojae*)，现正研究它的生理小种分类方法。同时，已知是苜蓿和玫瑰根腐病病原菌，从其极为有限的寄生现象来看，正在试验其变种和类型的分类方法。在北海道发现的赤豆疫霉茎腐病病原菌是 *P. vignae* 变种的一个生理小种。因为这种病害发生广泛，所以主张及早进行防治。迄今报道的新疫霉病菌，包括在日本初次发现的在内，危害栗树的 *P. castaneae* 是其中之一。苹果疫霉菌引起的疫霉腐烂病也在梨、桃和梅树上发现过。近年引入日本北部地区的苹果树矮化砧中，一种新疫霉病菌的发生已成为一个问题。1979 年已澄清了近来日本普遍发生的草莓急性萎蔫病是烟草疫霉菌 (*P. nicotiana* var. *parasitica*) 引起的，冲绳岛流行的菠萝根腐病和萎蔫病是由樟疫霉菌 (*P. cinnamomi*) 和烟草疫霉菌致病的。由此可见，疫霉菌引起的新土传病害正在连续不断地发生。

1979 年已明确姜根腐病是由姜腐霉菌引起的一种腐霉病，这种菌也侵染茗荷。在连作地区，这些病害引起了人们注意。北海道十胜地区，豌豆连作地由豌豆根腐丝囊霉菌 (*Aphanomyces euteiches*) 造成的根腐病，和赤豆连作地由大豆茎腐头孢霉引起的落叶是近年查明了病原的病害。许多植物上也发生轮枝菌病害。除了已知的茄子黄萎病外，还有许多植物包括草莓、白菜、菊、日本款冬和土当归发生轮枝菌病。现已清楚土当归上的病原菌是大丽轮枝菌。有人认为除了土当归外，上述植物中流行的轮枝菌病害是由黑白轮枝菌引起的。不过，新近报道茄子、西瓜、黄瓜、甜瓜、辣椒、青椒、草莓和菊花只受害于大丽轮枝菌。有鉴于此，目前有必要再检查这种病原菌的分类。

近年来发现的土传病害，其特征是弱寄生菌引起的病害经常发生。现已了解水稻烂秧是由镰孢霉菌、腐霉菌和立枯丝核菌造成的。稻苗机械插秧时，因采用育苗箱，弱寄生菌如绿木霉菌和根霉菌的发生已变得突出起来。在德岛县初次发现的萝卜根侧条纹病，已证明是由立枯丝核菌引起的，这种病已在许多地方发生。其不同的病状和立枯丝核菌的一些两性菌丝融合类群有关系。在旱地萝卜中，已发现丝囊霉菌引起根茎畸形。总而言之，对这些病害都需要进一步的研究。1978 年在北海道马铃薯块茎上观察到的相似病状，证明是

由双核立枯丝核菌造成的。这些病状限于块茎表面，对马铃薯本身并不是一个威胁。希望能立即防治，因为受害的马铃薯失去商品价值。

放线菌引起的病害症状也是限于表面。在马铃薯产区马铃薯疮痂病的发生急剧增加。轮作作物萝卜上也已发现这种疮痂病，因此难以建立一个稳定的轮作制。在长崎县，在含有加工贝壳碎片的碱土中栽培的马铃薯块茎上发现zohi病(锈斑)，经鉴定是一个新种*Streptomyces verrucosus*。至今，对这几种土传病害的研究不太多，所以希望将来工作能集中于这些病害的研究上。

关于细菌性病害，已报道了番茄的细菌性溃疡(*Corynebacterium michiganense*)和黄瓜的细菌性叶斑病(*Pseudomonas lachrymans*)是新的土传病害。但是，正如上面提到的稻苗根霉情况一样，这些病原菌存活于土中，情况也尚未澄清，难以把它们分在土传病害内。

目前在日本已知有20来种土传病毒，大部分是最近发现并在日本是初次报道的。这些病害可以分为四类：

(1) 这一类包括四种，这四种在土中传播不要求传毒介体，而由土中病毒传播。代表这类病害的是烟草花叶病(TMV)和马铃薯X病毒(PVX)。前者的土传病害是在番茄、青椒和草莓上观察到的，后者是两年前在番茄上看到的。

(2) 由线虫传播的病毒有六种。其中烟草脆裂病毒(TRV)由*Trichodorus minor*作媒介传播，因其寄生范围广泛，引起人们注意。

(3) 这类病毒由真菌作媒介传播，共有7种。所有的媒介都是专性寄生，其中有些在日本是初次发现。近来在北海道发现的甜菜Rhizomania病，长期以来病因不明，只以为是连作引起的退化。现已鉴定，它是由甜菜坏死黄脉病毒(BNYVV)引起的一种病害，由一种专性寄生的甜菜多孢粘壶菌寄生而传播。

(4) 这一类的病毒，是由土壤传播的，但其机制尚不清楚。

大家强烈地感到应该更加集中注意于土传病毒，尤其是由线虫和真菌作媒介而传播的土传病毒。

除了上述病原体已清楚的病害之外，还有许多植物病害，其病因尚在研究之中，例如以葫芦作砧木时发生的西瓜急性枯萎病即是。引起土传病害的病原种类非常之多，包括真菌、放线菌、细菌和病毒，以及和这些病原体有关的线虫。不仅有由一种病原体引起的土传病害，而且由2种或3种病原体复合感染引起的土传病害也已大量增加，作物在土中的栽培情况往往造成土传病害。根据当前日本农业推广单作的情况看，土传病害造成的为害以及新病害的发生将会进一步增加。

二、日本土传病害的防治趋势

土传病害的防治实质上是以建立一个稳定的轮作制度为基础的。根据日本目前的情况，及早实施不那么容易。因此本文不讨论轮作制问题。以下介绍的是近来日本防治土传病害的趋势，包括减少土中存活的病原体密度以及提高植株抗病能力以防感染等的方法。

1. 利用抗病品种和砧木根

尖镰孢霉菌和茄腐皮镰孢霉菌引起的土传病害生理专化程度极高，所以利用抗性品种

控制病害是很可能的。10年前，东京地区用氯化苦消毒土壤大大减少了甘蓝黄化病（芥属黄萎镰孢霉）。但因染病地区邻近住宅区，所以人们决定要引进抗病品种防治此病。有一种抗病品种A型，在各种土壤中表现质量抗性，它是从美国引入的。美国研究抗性品种已有长久的历史。和各研究所合作，在A型基础上，生产了几个新品种，包括Nagaoka YR No. 3和Sakata YR No. 2。到1974年已有20多个品种投放市场，分布于东京的各甘蓝产区，完全控制了病害。至今还没有报道该病存在新小种。现在希望培育具有抗根肿病等病害的多抗性新品种。

目前通过和番茄近缘的野生种 (*Lycopersicon pimpinellifolium*) 杂交培育了各种抗番茄萎蔫座镰孢霉菌的品种。包括以Okitsu No. 1—No. 6为亲本的F₁，表现对小种1抗性良好，但感染其他的小种。高知县在寒冷季节塑料温室内培植的番茄发生了尖镰孢霉菌造成的根腐和萎蔫病，经证实这种病是由新小种J₃致病的。有一种抗小种1和小种2的新品种Walter，感染小种J₃。现每个抗萎蔫病的品种不耐小种J₃的侵染。为了防治番茄疫霉菌造成的褐色根腐病，近来采用KNVF和KVF品种的抗性根砧木。这两种都表现抗性，甚至抗小种J₃。因此，有些番茄产区利用KNVF的抗性根砧木嫁接。不过，最好还是培育一个完全抗小种J₃的新品种。

已知为害葫芦科植物的各种尖镰孢霉专化型具有不同程度的致病性并在葫芦科植株上存活。在葫芦科植物中，葫芦对尖镰孢霉的各种专化型表现出抗性。在西瓜和甜瓜栽培中利用葫芦根砧木嫁接。黄瓜栽培中也用西葫芦的根砧木嫁接。但近来长在葫芦根砧木上的西瓜和甜瓜常发生急性萎蔫。当用西葫芦根砧木嫁接时就不发生病害，鉴此，现已推广西瓜嫁接在西葫芦根砧木上的栽培技术。

虽然病原菌生理专化性很高，但用抗病品种和根砧防治仍有很多困难，而只用质量抗性来防治寄主范围广泛的土传病害，困难就更多得多。对甘蓝来说推迟播种期是一项措施；就甘薯紫纹羽病来说及早收获是一项措施。防治苹果树紫纹羽病和白纹羽病则用健树和病树嫁接的方法。这样，靠抗性品种和根砧木完全防治一种寄主范围广泛的土传病害是达不到的。

2. 利用有机物质

在日本早已利用充分发酵的堆肥增加土壤肥力，同时也用以防治土传病害。不过现在因为农业机械化和劳力减少而不用堆肥了，改用大量有机物质诸如秸秆代替堆肥。和重复使用化学肥料相比，在黑色火山灰土中使用堆肥，对减少各种土传病害如黄瓜萎蔫病和甜菜立枯病的发生，已证明是有效的，其危害仍然很轻。

表2表示日本近10年间使用各种有机物质和土传病害之间关系相比的主要结果。结果提出了一个引人注意的事实，即施用堆制的猪粪防治黄瓜萎蔫病有效，而防治萝卜的镰孢霉黄化病和牛蒡的立枯丝核菌根腐病无效。同样，施用鸡粪防治番茄萎蔫座镰孢霉菌引起的番茄枯萎病有效，但不防治 *F. oxysporium* f. sp. *fragariae* 造成的草莓黄化病。同样的有机物质，因病原菌的不同，效果各异。每种病的病原，虽然专化型不同，但同属于尖镰孢霉菌。效果不同的原因仍不清楚。

低碳/氮比绿肥促使发生腐霉和立枯丝核菌引起的甜菜立枯病，而高碳/氮比的麦秸则相反，减少了病害发生。其间，茨城县农业试验站报道，使用各种有机物后2星期或3星期播种，和施肥不足的相比，黄瓜枯萎病减少了。这种现象说明，犁入粗有机物一方面减

表2 1968—1978年日本使用的有机物对土传病害的影响

寄主植物	普通名称	病原体	使用的有机物	对病害影响	研究者
黄瓜	镰孢霉萎蔫病	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cucumerinum</i>	堆制的木屑, 咖啡饼	减少	驹田 (1973)
同上	同上	同上	堆制的木屑	同上	古等 (1975)
同上	同上	同上	粗秸秆 (稻)	同上	山本 (1976)
同上	同上	同上	猪粪干	同上	松田等 (1977)
番茄	同上	<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>	鸡粪 堆制的木屑	同上	本间等 (1977)
同上	同上	同上	鸡粪	同上	驹田等 (1978)
萝卜	黄化	<i>F. oxysporum</i> <i>raphani</i>	猪粪干	增加	松田 (1977)
萝卜	黄化	同上	猪粪干	增加	驹田 (1978)
草莓	黄化	<i>Fusarium oxysporum</i> <i>fragariae</i>	菜籽饼 鸡粪	增加	吉野等 (1973)
十字花科植物	根肿病	<i>Plasmodiophora</i> <i>brassicae</i>	鸡粪	减少	田村等 (1973)
甜菜	立枯病	<i>Pythium</i> spp.	绿肥 (红三叶草)	增加	泽田 (1969)
同上	立枯病	<i>Rhizoctonia solani</i>	绿肥 (红三叶草, 小麦) 麦秆 (小麦)	减少	松田等 (1968)
牛蒡	根腐	<i>Rhizoctonia solani</i>	猪粪干	增加	同上 同上 (1978)

少了土中的抑真菌素, 另方面增加了病原体的活动, 使作物不耐侵染。据认为土中这样的情况会持续 2—3 星期。自从认识了土中抑真菌素对于使用有机物的比未施肥的土壤, 会更有效地防治病害后, 建议施用有机物后的一段时间内暂时不要翻动土壤。

有时结合使用熟石灰可提高防治效果, 因为它会提高土中细菌和放线菌的群体密度。

果树常发生白纹羽病的原因, 是因为在栽树时将犁并埋入大量树枝叶等的有机物。这些处理有利于具有高纤维素酶作用而需要大量氧的病害, 使之经常发生。因此应避免使用作为土壤病菌养分基础的有机物质。特别在连作条件下, 不要把作物残株犁入土内, 以见频频发生土传病害, 这是很重要的。

如上所述, 利用有机物质防治土传病害是极困难的, 因为它的效果取决于各种病菌的腐生竞争力、有机物质的种类和土壤情况差异的综合作用。目前, 利用充分腐熟的堆肥, 作为一个整体来说, 是最安全的防治措施。

3. 用微生物防治

在应用拮抗菌微生物防治土传病害中, 曾用过绿木霉, 但除了对罗氏白绢病菌外, 已证明它是无效的。美国特别注意寄生于植株根部的专化拮抗菌, 对其中有些拮抗菌的实际应用问题已进行研究。日本也应该研究这个方面, 以作为未来土传病害的防治途径。

用蟹壳和昆布片处理土壤, 增加了土中拮抗微生物群落密度, 并能有效防治如萝卜黄化病那样的枯萎病。据认为, 放线菌和产生基丁酶、昆布酶以及一种拮抗菌毒素的细菌, 产生和侵害镰孢霉菌的细胞成分。可是, 已知上述处理用以防治西瓜上由腐霉菌造成的立枯病无效, 因为腐霉菌的细胞成分不同。

防治番茄萎蔫座镰孢霉引起的番茄枯萎病, 迄今是基于设想进行试验, 即番茄栽植后接种不亲和的菌株便不受亲和菌株的侵染。这种方法已通过无致病力的病毒用于番茄花叶

病毒的处理上,并已部分置于实际应用。可以说,除了病原体外,研究微生物的交叉保护,将来会成为土传病害生物防治的一条途径。

4. 使用漫灌和利用太阳能进行土壤消毒

旱地灌溉及太阳能利用等控制环境防治土中侵染源病原体的存活和活动,已是个试验项目。

在日本,除了近来对有一些病害进行试验外,很少在旱地内施行漫灌来防治土传病害。莴苣菌核腐烂病的菌核,需要长期漫灌才能腐烂,水温升高时可加速其腐烂。温度低于30℃约需2个月菌核才完全分解。番茄枯萎病,在温度30—35℃范围内,施行漫灌后2个星期,病原菌大量减少。甘薯紫纹羽病,施行漫灌后18个月(即使根据病原菌种类而漫灌时期有所不同),病害消失了。土壤和温度条件不同,施行漫灌的效果也不同。这意味着此法只能在有限的地区使用,因而缺乏普遍实用的意义。

奈良县农试站设计了一种用太阳能为主消毒土壤防治温室内草莓黄化病的方法,奈良县也像邻县一样完成了这套装置。其特点是利用夏季热度以长期40—45℃的热处理,帮助杀死休闲地的土壤病原菌。在污染的土壤中由于漫灌和加施有机物质,其氧化—还原势(Eh)下降,40℃1星期或35℃2星期可以杀死*F. oxysporum* f. sp. *fragariae*菌。在密闭温室内使用的标准方法略图注于图1(略)。首先,每10公亩用1吨或2吨粗稻秸等的粗有机物和100公斤石灰氮,通过深耕使之与栽培土壤混合以提高土壤肥力。作垄(80—90厘米)后,用塑料薄膜覆盖地面并进行沟灌。然后,温室密闭保暖14—30日。使用后,拿走薄膜促使有机物组成并消灭盐害。除了上述标准方法以外,还推广休闲期间栽种青刈作物如玉米,因为它有两种用处,既可获得有机物质又能除掉盐害。虽然上述的太阳能利用可以消毒温室内发生的草莓黄化病及其他土传病害的土壤,但寒冷年份或寒冷地区如何使用这种方法是个问题。不过,在当前节省能源的时代,由于此法成本低、省劳力,还是很理想的。

5. 化学防治

至于土壤病的化学防治,读者可参考日本农药情报评论(17:5—9, 1973; T. Ui),该文详细讨论了这个问题。本文只涉及当前日本土壤杀菌剂的情况,以避免重复。

日本所用的全部土壤杀菌剂中,氯化苦使用最普遍。1966年以来其消费量迅速增加,1975年达到600万公升。此后,甲基溴的消费也表现同样的增长。这种趋向和园艺发展相一致。虽然这两种药在土中气化和扩散良好,效果优异,但其效果极大地取决于土壤的种类、温度和干燥情况。其使用有时会引起病原菌的再群集现象。氯化苦因有强刺激性(催泪),使用不理想也不方便。五氯硝基苯广泛用以防治十字花科作物如大白菜和甘蓝的根肿病,但近来效果减低,因此希望发展一种新的取代药剂。

过去10年间(1968—1978)日本注册的土壤杀菌剂示于表3。其中如甲基托布津、Hymexazole和有效霉素在日本已取得发展。甲基托布津的可湿性粉、粉剂以及与福美双或链霉素的混合剂防治各种作物的立枯病和镰孢霉病害有效。近来已确证甲基托布津的可湿性粉剂和苯来特一样,对苹果白纹羽病具有预防和治疗的效果。因此,其实用性得到高度的评价。

Hymexazole的液剂和粉剂防治黄瓜和甜菜等各种作物的立枯病有效。Hymexazole对甜菜立枯病的镰孢霉菌、腐霉菌和丝囊霉菌是极其有效的,但对立枯丝核菌效果甚差。

表3 1968—1978年日本注册的土壤杀菌剂

农药普通名称	剂型	可使用的作物	可防治的病害
甲基托布津	可湿性粉剂, 粉剂	草皮, 草莓, 小麦, 烟草, 郁金香, 果树 (苹果等); 蒺藜水稻, 树木	褐斑, 黄化, 雪腐, 立枯等, 鳞茎腐烂, 白根腐, 干腐
五氯硝基苯·甲基托布津	可湿性粉剂	水稻, 花 (郁金香等), 树木	立枯, 鳞茎腐烂, 立枯
甲基托布津·链霉素	可湿性粉剂	洋葱	细菌性软腐, 鳞茎灰腐
苯来特	可湿性粉剂	马铃薯, 草莓, 烟草, 郁金香, Cyclamen, 草皮, 葫芦, 黄瓜, 番茄, 甘薯, 水仙	疮痂, 黄化, 立枯, 黑根腐, 鳞茎腐烂, 镰孢霉枯萎, 褐斑, 枯萎, 立枯, 黑腐, 干腐
Hymexazole	液剂, 粉剂	水稻, 黄瓜, 甜菜, 树木 (苗), 石竹, Cyclamen	立枯, 镰孢霉根腐, 枯萎
有效霉素	粉剂	马铃薯	丝核菌病
氯唑灵	乳剂	蒺藜, 黄瓜, 烟草	根腐, 疫霉腐烂
D-D·methylisothiocyanate	油剂	茶	苗根腐, 白根腐

因此推广甜菜移栽时混合使用 Hymexazole 粉和五氯硝基苯粉。此药防治育苗箱内发生的立枯病也非常有效。随着近年根霉菌的大发生, 它和百菌清粉一起可有效防治该病, Hymexazole 对稻株根系发育的影响也已被引起注意。

有效霉素是吸水链孢菌的一个新品种产生的一种抗菌素。它对立枯丝核菌没有直接的杀菌作用, 但独特的是引起菌丝生长不正常, 这样便有效地减弱了立枯丝核菌的致病性。这种抗菌素防治水稻和马铃薯的丝核菌病非常有效。自从近来不断发生新丝核菌病为害萝卜和马铃薯根部以来, 正考虑使用有效霉素。

苯来特效果与甲基托布津相似。播种前用苯来特和福美双混合剂拌种可有效防治镰孢霉菌。Etridiazol 和氯唑灵防治蒺藜的腐霉根腐病和烟草的疫霉病有效。由于将来这些病要增加, 因此, 应该推广使用这种药。

S-3349 (一种新化合物) 是日本植保协会考虑的候选化合物之一, 迄今已证明它防治马铃薯和甜菜的丝核菌病极为有效, 希望能早日注册。现在也已清楚 CG117 [(CGA 48988, 甲基 d, 1-N-(2, 6-二甲酚) -N(2'-甲氧-乙酰基) alaninate)] 对防治腐霉和疫霉有选择作用, 防治黄瓜和灯笼椒的立枯病非常有效。

日本还在继续开发对防治主要病原菌表现有选择作用的各种土壤杀菌剂。当然, 迫切需要它们不久便能在实际中应用, 它们的开发成功, 对未来防治土传病害带来希望。

原载 [日] “Japan Pesticide Information” 1979 年第 36 期第 1—13 页

瞿雅莲 译

用十二烷基磺酸钠(SDS)处理植物病毒及其内含体的免疫双扩散试验

D. E. Purcifull D. L. Batchelor

摘 要

本文描述在含有 SDS 和叠氮化钠的琼脂凝胶中进行的免疫双扩散试验。过去是将提纯的免疫抗原与福氏佐剂一起乳化,对家兔作肌肉注射制备抗血清。在某些情况下,为了制备能和 SDS 处理的抗原起良好反应的抗血清,则必须用 SDS 处理免疫抗原。常规使用的抗血清不需稀释,若需要稀释,则用正常兔血清作稀释液。用正常兔血清稀释的抗血清效价是用 Tris 缓冲盐水稀释的抗血清效价的 2—8 倍。本文还介绍了防止在含有 SDS 的免疫双扩散介质中可能发生各种类型非特异沉淀的方法。根据文献和本文的一些试验结果看,含有 SDS 的凝胶双扩散试验已经成功地应用于研究各种各样的抗原。其中包括 19 种长形病毒(15 种马铃薯 Y 病毒组病毒,3 种马铃薯 X 组病毒和烟草花叶病毒),4 种球状病毒(柑桔传染性杂色病毒、豇豆花叶病毒、南方菜豆花叶病毒和南瓜花叶病毒),1 种弹状病毒组病毒,5 种马铃薯 Y 病毒组成员的风轮状内含体蛋白和烟草蚀纹病毒的内含体。这一技术既适应于研究提纯的病毒,也适应于检测粗汁液中存在的特异病毒。

一、绪 言

在过去的 15 年间,免疫双扩散试验已经广泛地应用于植物病毒学,以研究植物病毒蛋白的性质、病毒鉴定和病毒间的血清学关系。最初,将这一技术用于长形病毒,因为该种病毒粒体太长,不易进入琼脂,因而实验遭到失败。为了解决这一问题,对几种长形病毒进行化学降解,使其成为能扩散进入琼脂的免疫反应成分。近几年采用的有十二烷基磺酸钠(Sodium dodecyl sulfate—SDS)和其他降解物质。超声波也已用于降解病毒。

十二烷基磺酸钠是一种离子洗涤剂,分子式为 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}$ 。SDS 结合到蛋白上对降解病毒和许多种蛋白是很有效的。SDS 在植物病毒上的作用,早在 40 年以前就有人证明了。Bawden 和 Pirie 报道,用 SDS 处理的 PVX,其病毒的侵染性、血清学活性、流体双折射和沉淀能力(沉淀未处理的病毒)都丧失了。根据 Sreenivasaya 和 Pirie 的做法,SDS 用在 TMV 上也有相似的结果。他们报道用 SDS 处理 TMV 使核酸从蛋白中游离出来。他们还测定了 SDS 处理的效果与温度、SDS 浓度和 pH 值有关。他们尝试了用降解的病毒制备抗血清,没有取得成功。

病毒学家和生物化学家现在广泛地把 SDS 作为一种变性剂,用在聚丙烯酰胺凝胶的蛋

表 1 SDS 处理植物病毒或病毒诱发的内含体的免疫双扩散的研究对象

研究对象 (病毒或内含体)	普通名称	缩写	研究对象 (病毒或内含体)	普通名称	缩写
大麦条纹花叶病毒	Barley stripe mosaic virus	BSMV	辣椒斑驳病毒	辣椒斑驳病毒	PeMV-I
菜豆荚斑致病毒	Bean pod mottle virus	BPMV	辣椒脉斑致病毒	辣椒脉斑致病毒	PVMV
菜豆黄花叶病毒	Bean yellow mosaic virus	BYMV	马铃薯 X 病毒	Potato virus X	PVX
鬼针草斑致病毒	Bidens mottle virus	BMoV	马铃薯 Y 病毒	Potato virus Y	PVY
鬼针草斑致病毒的风轮状内含体	Bidens mottle pinwheel inclusions	BMoV-I	马铃薯 Y 风轮状内含体	Potato virus Y pinwheel inclusions	PVY-I
黑眼豇豆花叶病毒	Blackeye cowpea mosaic virus	BICMV	马铃薯黄矮病毒	Potato yellow dwarf virus	PYDV
仙人掌 X 病毒	Cactus virus X	CVX	苦苣菜黄网病毒	Sonchus yellow net virus	SYNV
香石竹脉斑致病毒	Carnation vein mottle virus	CVMV	南方菜豆花叶病毒	Southern bean mosaic virus	SBMV
柑桔杂色病毒	Citrus variegation virus	CVV	大豆花叶病毒	Soybean mosaic virus	SoyMV
三叶草黄花叶病毒	Clover yellow mosaic virus	CYMV	南瓜花叶病毒	Squash mosaic virus	SMV
三叶草黄脉病毒	Clover yellow vein virus	CYVV	烟草蚀纹病毒	Tobacco etch virus	TEV
豇豆花叶病毒	Cowpea mosaic virus	CPMV	烟草蚀纹病毒风轮状内含体	Tobacco etch pinwheel inclusions	TEV-I
黄瓜花叶病毒	Cucumber mosaic virus	CMV	烟草蚀纹病毒核内含体	Tobacco etch nuclear inclusions	TEV-NI
建兰花叶病毒	Cymbidium mosaic virus	CyMV	烟草花叶病毒	Tobacco mosaic virus	TMV
芋花叶病毒	Dasheen mosaic virus	DMV	烟草脉斑致病毒	Tobacco vein mottle virus	TVMV
黄褐菊花叶病毒	Fulva iris mosaic virus	FIMV	芜菁花叶病毒	Turnip mosaic virus	TuMV
莴苣花叶病毒	Lettuce mosaic virus	LMV	芜菁花叶病毒风轮状内含体	Turnip mosaic pinwheel inclusions	TuMV-I
水仙花叶病毒	Narcissus mosaic virus	NaMV	芜菁黄色花叶病毒	Turnip yellow mosaic virus	TYMV
木瓜花叶病毒	Papaya mosaic virus	PMV	西瓜花叶病毒	Watermelon mosaic virus	WMV
花生斑致病毒	Peanut mottle virus	PMoV	白三叶草花叶病毒	White clover-mosaic virus	WCMV
辣椒斑致病毒	Pepper mottle virus	PeMV			

白分析上和研究植物病毒蛋白—RNA 的相互作用。新近, Gooding 和 Bing 又将 SDS 用到植物病毒的血清工作中, 即在琼脂免疫双扩散的介质中加入 SDS。这一技术已经成功地应用到长形病毒、球状病毒和杆状病毒的免疫双扩散试验中 (表 1), 还用来研究病毒诱发的内含体 (表 1)。

这篇报告的主要目的是介绍和讨论应用 SDS 处理植物病毒和有关病毒蛋白的免疫双扩散的一种特殊方法, 并且简要讨论这一技术在植物病毒学各方面的应用。为读者提供了关于植物病毒血清学和免疫双扩散的基本参考资料。关于 SDS—蛋白间的反应和 SDS 使用技术的参考资料, 在第 VI 部分 (本译稿因不附参考文献, 故第 VI 部分删去)。

二、材料和方法

下面描述的许多方法是本实验室在过去几年里用过的方法。也介绍了其他人报告的一些特殊方法。对于任何一种病毒粒体来说要找到可靠的方法均需要进行试验。

1. SDS 的来源和纯化

使用市售的 SDS (Sigma), 不需进一步纯化, 但是, 有时市售 SDS 含有杂质, 进行纯化是很重要的。关于纯化的方法, 是采用热乙醇再结晶法。

2. 免疫原的制备和免疫作用

为了获得能与 SDS 处理的病毒抗原起反应的抗血清, 通过三种基本途径制备免疫原。选择那种途径, 取决于抗原本身的性质及其血清学试验。

(1) 使用未处理的病毒或病毒诱发的内含体作为免疫原

用病毒或蛋白作免疫原, 已取得良好的结果, 这已在马铃薯 Y 病毒组的许多病毒和内含体上得到明显的证明。用未处理的病毒所制备的抗血清也用于测定 SDS 处理的 TMV 蛋白和几种球状病毒, 例如: 黄瓜花叶病毒 (CMV)、南方菜豆花叶病毒 (SBMV) 及大豆花叶病毒 (SoyMV)。

(2) 使用 SDS 处理的免疫原

SDS 处理的南方菜豆花叶病毒用下面的程序生产: 2 毫克冻干的提纯病毒重新悬浮在 1 毫升 1% 的 SDS 和 20 微升 2-巯基乙醇 (2-mercaptoethanol 2-ME) 的混合液中, 煮沸 2—4 分钟, 然后直接与 Freund 完全佐剂乳化, 通过肌肉注射到家兔体内, 6 周后采血, 其抗血清与 SDS 处理煮沸的感染南方菜豆花叶病毒植株榨取液呈强阳性反应, 而与健康植株榨取液没有反应。

Batchelor 制备出能与 SDS 处理过的马铃薯 X 病毒组中的 3 种病毒抗原、马铃薯 Y 病毒组中的 3 种病毒抗原、SBMV 和马铃薯 Y 病毒组中 2 种病毒诱发的内含体起反应的专化性抗血清。这样就必须将提纯的病毒或内含体与 SDS 和 2-ME 分开, 然后将免疫原重新浓缩。SDS 在使用前要用热乙醇再结晶。具体做法是: 1 毫升病毒或病毒内含体的制备物加入 SDS 和 2-ME, 使其最后浓度均为 3% (分别为 W/V 和 V/V)。病毒制备物使用浓度为 2—4 毫克/毫升, 内含体浓度调到 3—5 吸收单位/毫升 (波长为 280 毫微米)。然后将这样的溶液置沸水浴中 1—2 分钟, 热处理后内含体制备物经 4,500 转/分钟离心 15 分钟, 除去不溶性物质。将 1 毫升上述材料放到 15K/30 葡聚糖 (G50—150) 凝胶柱的上面, 用 0.02M 硼酸钠液 (pH8.0) 洗脱样品, 流速为 1—2 毫升/分钟。流出物用 ISCO 吸

收仪和 UA-4 型的光学单位来测定, 这种光学单位是用 1 厘米光程的比色杯, 用 610 型 ISCO 外面的线条图纸记录计记录柱层析样品的紫外吸收值。以完整的木瓜花叶病毒 (1 毫克/毫升) 或 TMV (1 毫克/毫升) 作为柱层析校准的排斥体积 (V_0), 而 2-ME (1%) 作为总体积 (V_1)。样品的高峰出现在 V_0 , 将其收集在用 400 筛目尼龙网包被的 12 毫升的注射器中, 注射器的顶端用薄膜封闭起来。所得到的制备物中加入葡聚糖 G25-150, 并让其膨胀 10—15 分钟, 然后除去封闭在注射器上薄膜, 连同注射器一起经 1,500 转/分钟离心 15 分钟, 所得到的上清液就是浓缩的制备物。然后将这一程序重复进行, 直到得到所希望的体积。根据紫外吸收测定过柱样品的结果看, 至少有 90% 可以回收作免疫原。

(3) 使用其他降解因素制备免疫原和 SDS 降解的免疫原进行比较

用吡啶降解马铃薯 X 病毒 (PVX) 制备的抗血清与 SDS 降解的 PVX 蛋白也起反应。同样用胍—盐酸降解的木瓜花叶病毒 (PMV) 的抗血清也与 SDS 降解的 PMV 起反应。吡啶处理的烟草蚀纹病毒 (TEV) 的抗血清也跟 SDS 处理的 TEV 起反应。

(4) 免疫原的乳化和免疫方法

免疫抗原与福氏佐剂乳化可以直接在注射器中进行, 把注射器顶端塞住, 然后部分浸入水浴中, 先把佐剂放在注射器中, 在激烈地摇动下逐渐加入等量的抗原。这种搅拌装置由一个带有可转动把手的非力普起子插到搅拌器的卡盘上而构成的。在大约 5,000—7,000 转/分钟速度下摇动几分钟后即成为注射用的乳剂。

采用普通的免疫方法, 无论对未处理的或处理的病毒抗原都得到满意的结果。免疫原 (降解的病毒浓度为 2—4 毫克/毫升, 内含体浓度为 1—3 单位 OD_{280} /毫升) 和福氏完全佐剂以 1:1 的比例乳化, 用 1 毫升乳化好的抗原对新西兰白兔的后腿肌肉注射。大约 1 个月以后, 用以上相近量的乳化 (用福氏不完全佐剂) 抗原再注射该动物。在第二次注射后的 1—2 周开始采血, 采血期可延至几个月。

3. 血清的提取

尽管我们已经用标准的方法来制备抗血清, 而下述方法对于生产好的血清和最大限度地缩短生产血清的时间都有良好的效果。全部血都是通过耳静脉采集, 盛入玻璃器皿或圆底离心管中, 离心管保持在 37℃ 水浴中 1 小时, 然后在 Servall SP 台式离心机上 3,000 转/分钟离心 10 分钟。所得到的血清直接滴入圆锥形试管中, 再用 4,000—4,500 转/分钟离心 15 分钟, 取其上清液冰冻或冻干保存, 以供使用。

4. 免疫双扩散的介质

Gooding 和 Bing 最初报道的介质已证明对许多用 SDS 处理的病毒和病毒内含体都是有效的。这种介质的成分是 0.8% 的琼脂 (Difco Labs., Detroit Mich., U. S. A.), 0.5% SDS (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., U. S. A.) 和 1% 叠氮化钠 (Matheson, Coleman, 和 Bell, Norwood, Ohio, U. S. A, 或 Sigma), 这些成分和水之比为重量和体积 (W/V) 之比。加 SDS 的目的是为了降解抗原, 并且使非专化性反应减少到最小。叠氮化钠有利于离子强度的稳定, 并能抑制微生物的生长。但需要注意的是叠氮化钠是有毒的, 并且在超过安全期以后, 可以和某些金属容器起反应生成爆炸性化合物。若丢掉叠氮化钠容器, 必须用流水彻底冲洗。

制备大约 40 块板 (塑料的培养板, 100×15 毫米) 的介质的配制法是将 4 克 Noble 琼脂加到 300 毫升的蒸馏水或无离子水中, 然后加压溶解 (250°F) 5 分钟, 再加入 5 克叠

表2 重新悬浮冻干的病汁液作抗原所进行的SDS免疫双扩试验中呈阳性反应的病毒

病毒	毒	制作粗汁液所使用的寄主	制备物 ^{a,b}
鬼针草斑致病毒	Bidens mottle	莒 葵	SDS
三叶草黄花叶病毒	Clover yellow mosaic	莒 葵	SDS
莒葵花叶病毒	Lettuce mosaic	豆 烟	W
木瓜花叶病毒	Papaya mosaic	莒 葵	SDS
辣椒斑致病毒	Pepper mottle	豆 葵	SDS
辣椒脉斑致病毒	Pepper veinal mottle	瓜 豆	SDS
马铃薯Y病毒	Potato Y	木 种	W
辣椒脉斑致病毒	Pepper veinal mottle	种	W
马铃薯X病毒	Potato X	种	W
南方菜豆花叶病毒	Southern bean mosaic	种	W
烟草蚀纹病毒	Tobacco etch	种	W
烟草花叶病毒	Tobacco mosaic	种	W
芜菁花叶病毒	Turnip mosaic	种	W
西瓜花叶病毒	Watermelon mosaic	种	W
		深 芜	SL
		西 葫	SDS

a. SDS = 用1.5% SDS 处理的粗汁液，经冻干后用水重新悬浮，用于试验 b. W = 用水制备的粗汁液，经冻干后用水重新悬浮用于试验