



全国高等农林院校“十二五”规划教材

PRACTICAL TECHNOLOGY
OF PLANT PROTECTION

植物保护 实践技术

主 编 马良进



中国林业出版社

全国高等农林院校“十二五”规划教材

植物保护实践技术

马良进 主编

中国林业出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

植物保护实践技术/马良进主编. —北京: 中国林业出版社, 2013. 7

全国高等农林院校“十二五”规划教材

ISBN 978-7-5038-7128-3

I. ①植… II. ①马… III. ①植物保护—高等学校—教材 IV. ①S4

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2013) 第 171822 号

中国林业出版社·教材出版中心

责任编辑: 丰帆 杜建玲

电话: 83220109 83228701

传真: 83220109

出版发行 中国林业出版社 (100009 北京市西城区德内大街刘海胡同 7 号)

E-mail: jiaocaipublic@163.com 电话: (010) 83224477

http: //lycb. forestry. gov. cn

经 销 新华书店
印 刷 三河市华东印刷装订厂
版 次 2013 年 8 月第 1 版
印 次 2013 年 8 月第 1 次印刷
开 本 787mm×1092mm 1/16
印 张 17
字 数 382 千字
定 价 34.00 元

未经许可, 不得以任何方式复制或抄袭本书之部分或全部内容。

版权所有 侵权必究

《植物保护实践技术》

编写人员

主 编 马良进

副主编 毛胜凤 陈安良 刘兴泉

编写人员 (按姓氏笔画排序)

马良进 毛胜凤 王记祥

王义平 刘兴泉 张 昕

苏 秀 陈安良

《植物保护实践技术》是高等农林院校植物保护学科中一门重要的专业实践课程，集科研、教学、生产的最新成果于一体，侧重于实际操作技能的培养，具有基于农业生产过程的模块式教学特色。

本书分3个模块，一是病虫害田间调查统计方法、植物病害识别技术、病害的症状特征；二是害虫的形态特点、识别要点；三是农药安全使用技术，包括农药常见种类、农药配制、农药检测方法和农药的安全使用技术。通过这些实践，学生能够掌握病虫害调查识别应用技术的试验研究方法，更好地消化吸收该学科的基本理论知识，并达到能够初步独立从事植物保护工作和科学研究的水平。

本书中的实验项目是经过长期教学实践并经不断改进而确定的。内容比较丰富、具体且简明扼要，适合作为我国高等农林院校（包括专科）植物保护专业、森林保护专业的实验指导书，也可供农林职业院校师生以及从事植物保护科学工作者学习和工作参考。

植物保护实践技术是理论和实践紧密结合，广泛渗透和相互融合的实用性技术。我国的植物保护学基本上是从20世纪50年代初才开始建立和发展的。随着我国社会主义现代化的迅速发展，无论在教学科研方面，还是各应用领域，都希望有更新颖和更实用的植物保护实践技术得到普及。作者有30年的教学生涯，其中有不少时间投身于实验室工作，根据当前的形势和积淀的植物保护学教学经验，并广泛收集各有关方面资料，进行了整合、精选，组织教学第一线精悍力量编著了这本《植物保护实践技术》教科书。本书对农林院校师生有一定的参考价值。

本书由浙江农林大学的老师共同编写，编写分工如下：马良进负责前言、第一章和第二章；张昕、王记祥负责第三章和第四章；王义平负责第六章和第七章；苏秀负责第八章；陈安良和刘兴泉负责第九章；毛胜凤负责第五章及全书的统稿工作。

《植物保护实践技术》涉及面很广，由于作者水平所限，书中难免存在一些问题，希望读者批评指正。

马良进
2012.12

前言

第一章 植物病害基础研究方法	(1)
实验一 植物病害调查	(1)
实验二 植物病害标本的采集与制作	(4)
实验三 病原物的分离与培养	(7)
实验四 植物病原接种	(11)
实验五 植物病害的流行和预测	(13)
实验六 植物病害诊断和鉴定	(18)
第二章 微生物实验	(22)
实验一 普通光学显微镜使用技术	(22)
实验二 细菌的形态结构观察	(24)
实验三 霉菌的形态结构观察	(27)
实验四 血球计数板直接计数法测定微生物生长	(28)
实验五 培养基的制备	(30)
实验六 高压蒸汽灭菌	(33)
实验七 环境中微生物的检测	(34)
实验八 土壤中细菌、放线菌、酵母菌及霉菌的分离与纯化	(36)
实验九 食品中细菌总数的测定	(38)
实验十 水质中大肠菌群的检验	(41)
第三章 普通植物病理学实验	(44)
实验一 植物病害的症状观察	(44)
实验二 植物细菌病害及其诊断	(46)
实验三 植物病原真菌一般形态观察	(47)
实验四 植物病原真菌的分离与培养	(50)
实验五 孢子萌发与环境条件	(51)
实验六 植物病原物的接种技术	(53)

第四章 植物病原真菌的分类与鉴定	(54)
实验一 鞭毛菌亚门真菌及其所致病害	(54)
实验二 接合菌亚门真菌及其所致病害	(57)
实验三 子囊菌亚门真菌及其所致病害	(58)
实验四 担子菌亚门真菌及其所致病害	(62)
实验五 半知菌亚门真菌及其所致病害	(65)
第五章 植物病害识别与防治	(69)
实验一 水稻病害	(69)
实验二 麦类病害	(73)
实验三 杂粮病害	(78)
实验四 薯类病害	(82)
实验五 棉麻病害	(86)
实验六 油料作物病害	(91)
实验七 烟草和糖料作物病害	(97)
实验八 蔬菜病害的识别与鉴定	(105)
I. 葫芦科蔬菜病害的识别与鉴定	(105)
II. 茄科蔬菜病害的识别与鉴定	(108)
III. 十字花科蔬菜病害的识别与鉴定	(114)
IV. 豆科蔬菜病害的识别与鉴定	(119)
V. 其他蔬菜病害的识别与鉴定	(121)
实验九 林木病害	(124)
I. 果树病害及病原观察	(125)
II. 果树病害及病原观察	(129)
III. 经济林病害及病原观察(一)	(132)
IV. 经济林病害及病原观察(二)	(134)
V. 用材林病害及病原观察	(138)
VI. 主要园林植物病害及病原观察(一)	(140)
VII. 主要园林植物病害及病原观察(二)	(142)
第六章 植物虫害基础研究方法	(146)
实习一 昆虫学野外实习技术	(146)
实习二 昆虫形态的观察、描述与绘图	(155)
实习三 昆虫的摄影技术	(160)
实习四 饲养昆虫的方法和技术	(162)

第七章 常见农业害虫分类识别	(169)
实验一 水稻害虫的识别	(169)
实验二 旱粮害虫的识别	(172)
实验三 棉花害虫的识别	(173)
实验四 蔬菜害虫的识别	(175)
实验五 仓库害虫的识别	(177)
实验六 茶、桑树等害虫的识别	(178)
实验七 地下害虫的识别	(180)
第八章 常见林业害虫分类鉴别	(183)
实验一 食叶害虫(一)	(183)
实验二 食叶害虫(二)	(185)
实验三 枝梢、种实及苗圃害虫	(187)
实验四 蛀干害虫	(190)
第九章 植物化学保护技术方法	(193)
实验一 常用农药品种、剂型及植保机械	(193)
实验二 农药制剂的配制及质量鉴定	(201)
I. 农药制剂的配制及质量鉴定	(201)
II. 石硫合剂的煮制	(205)
III. 波尔多液的配制	(206)
IV. 植物质农药的鉴别	(208)
V. 75%百菌清农药可湿性粉剂加工	(209)
VI. 农药氯氰菊酯乳油的制备	(210)
实验三 农药理化成分分析实验	(212)
I. 农药水分及氢离子浓度测定	(212)
II. 农药粉粒细度	(214)
III. 三乙磷酸铝可湿性粉剂含量测定	(215)
IV. 农药乳液稳定性性能测定	(216)
V. 农药可湿性粉剂悬浮率测定方法	(217)
VI. 多菌灵含量的测定	(220)
VII. 气相色谱法测百菌清的含量	(222)
VIII. 氯氰菊酯含量测定	(223)
IX. 气相色谱法分析砒啉磺隆在玉米中的残留	(225)
实验四 农药生物测定方法	(227)
I. 醚菌酯对灰霉病菌的毒力测定	(228)
II. 戊唑醇对小麦赤霉病菌的生物测定	(229)

III. 百菌清·速克灵对蔬菜灰霉病菌的协同作用测定	(230)
IV. 敌敌畏对二化螟的生物活性测定	(231)
V. 甲维盐对棉铃虫的生物测定	(232)
VI. 阿维菌素对棉铃虫的生物测定——浸叶法	(233)
VII. 茎叶处理除草剂对杂草生物活性测定方法	(234)
VIII. 土壤处理除草剂对杂草生物活性测定	(235)
实验五 农药环境毒理——农药对非靶标生物和环境的影响评估实验	(237)
实验六 农药对作物的药害	(249)
I. 农药对作物药害的测定	(254)
II. 杀菌剂防治花生叶斑病、锈病(或长豇豆锈病、绿豆叶斑病)的田间试验	(255)
III. 田间小区药效试验	(256)
IV. 杀虫剂药效试验(盆栽法)	(260)
参考文献	(264)

第一章 植物病害基础研究方法

实验一 植物病害调查

一、调查的类别

植物病害的分布和危害、发生时期和症状的变化，以及栽培和环境条件对植物病害的影响，品种在生产中的表现，防治效果等，都要通过调查才能掌握。病害调查有一般调查(普查)、重点调查和调查研究。

普查是对局部地区植物病害种类、分布、发病程度的基本情况进行调查。当一个地区有关病害发生情况的资料较少，可先进行一般调查。一般调查的面要广，并且要有代表性。调查的病害种类很多，对发病率的计算并不要求十分精确。对一般发病情况的调查，为了节约人力和物力，调查次数可以少一些，最好是在发病盛期进行，有1次或2次就够了。如小麦病害调查的适当时期，叶枯病是在抽穗前，条锈病是在抽穗期，叶锈病可以迟一些，秆锈病、赤霉病、腥黑穗病和线虫病等可以到完熟期调查。如果一次要调查几种作物或几种病害的发生情况，可以选一个比较适中的时期。

对一般调查发现的重要病害，可作为重点调查对象，深入了解它的分布、发病率、损失、环境影响和防治效果等。重点调查次数要多一些，发病率的计算也要求比较准确。

调查研究是深入研究某一个问題，是通过调查研究或者是在调查研究的基础上解决的。调查研究和重点调查的界限是很难划分的，但调查研究一般不是对一种病害做全面调查，而是针对其中某一个问題。调查的面不一定广，但是要深入。除田间观察外，更要注意访问和座谈。调查研究不需要很多的设备，农田就是实验地，所以实验规模之大和各种对比处理之多，远远超过一般实验研究。许多植物病害问题是通过调查研究或在调查研究基础上解决的。调查研究和实验研究互相配合，逐步提高对一种病害的认识。

二、发病程度的调查

发病程度包括发病率和严重度。发病率一般是指发病田块、植株或器官等发病的百分率；而严重度是指田块植株或器官等的受害程度。

(一)记载方法

病害的种类很多，危害的情况不一，发病程度的记载方法比较复杂。为了使调查结果更有价值，记载方法的选择很重要，有些病害的记载还要自行设计。以下几点可

供选择和设计时参考：①要简单明了而相当准确，只求精确而过于复杂是不适用的，并且有时是不必要的；②要客观和具体，使各人在不同的地点和时期，用该方法记载得到的结果可以互相比较；③一种病害危害的方式可以是多方面的，要兼顾到各种危害方式；④发病率固然不能标示损失的大小，但是能指出与其他指标的关系为最好。

发病程度的记载方法很多，有人以产量的高低表示发病程度的轻重，优点是发病率就表示损失；缺点是所衡量的是最后结果，不能看到过程，并且产量的减少还受许多因素的影响。此外，由土壤传染的病害如根腐病和枯萎病等，以及其他植株成片枯死的病害，可将田块受害面积与田块的面积相比，求得发病率，这种方法也适用于菟丝子危害的调查。一般病害的调查，主要用直接计数法和分级计数法。

1. 直接计数法

直接计数法是一种比较简单的方法，就是计算发病田块、植株或器官的数目，从调查的总数，求得发病的百分率。直接计数法的优点是根据发病和不发病的计数，有明确的标准，记载比较一致；缺点是不能反映受害的严重度，因此只适用于植株或器官的受害程度大致相仿的病害，如系统感染的病毒病，影响全株的猝倒病、枯萎病和线虫病，以及局部生病而严重影响经济价值的如黑穗病、枯萎病和线虫病等。即使以上这些类型的病害，有的直接计数并不是很好的方法，例如，棉花枯萎病的记载，可以数田间的发病株数，求得发病的百分率。由于病株发病轻重的程度不同，比较精确的调查一般还是采取分级计数的方法。

2. 分级计数法

根据病害发生的轻重和对植物影响的不同，可将病害分级，调查时记录每级发病田块数、平均株(叶)发病率。分级标准可用文字、绘图或照相等方法表明。根据病害的性质，可以按叶片、果实、植株或田块分级。下面以马铃薯晚疫病为例，说明分级标准的用法(表 1-1)。

另外，分级还可用图或照片来表示，读者可另查阅资料，此处不再讲述。

表 1-1 马铃薯晚疫病发病率的分级标准

级别	发病率(%)	病害发生程度
1	0.0	田间无病
2	0.1	病株稀少，直径 11m 的面积内，只发现 1~2 个病斑
3	1.0	发病普遍，每株约 10 个病斑
4	5.0	每个病株约有 50 个病斑或有 1/10 的小叶片发病
5	25.0	每一小叶都发病，但病株外形仍正常，并呈绿色
6	50.0	每一植株都发病，有一半叶片枯死，病田呈绿色，但间或呈褐色
7	75.0	有 3/4 的面积枯死，病田呈黄褐色，顶叶仍呈绿色
8	95.0	只有少数叶片仍保持绿色，但茎仍呈绿色
9	100.0	叶片全部枯死，茎部亦枯死或正在枯死中

(二) 病情指数

分级计数记载，如每一级都是用百分率表示的，很容易计算它的平均百分率。例如，小麦感染锈病后，5张叶子的发病率，按照记载是100%、65%、65%、40%和25%，平均发病率就是 $(100 + 65 + 65 + 40 + 25)\% \div 5 = 59\%$ 。

分级计数法的级别，有的不是根据百分率分级的，得到的结果是每一级中有多少个体。针对这种情况，往往是计算病情指数来表示发病程度，即每一级用一代表数值，然后按以下公式计算：

$$\text{病情指数} = \frac{\sum (\text{病株数或叶数} \times \text{各级病株或叶数})}{\text{调查总株数或叶数} \times \text{最高代表级别值}} \times 100$$

例如，番茄早疫病的病株，分级情况如下：

病级	发病程度	代表数值	病株 (假定)
1	无病或者几乎没病	0	8
2	少至25%的叶片枯死	1	15
3	26%~50%的叶片枯死	2	20
4	51%~75%的叶片枯死	3	40
5	76%~100%的叶片枯死	4	30

$$\text{病情指数} = \frac{(0 \times 8 + 1 \times 15 + 2 \times 20 + 3 \times 40 + 4 \times 30)}{(8 + 15 + 20 + 40 + 30) \times 4} \times 100 = \frac{295 \times 100}{113 \times 4} = 63.5$$

发病最重的病情指数是100，完全无病是0，所以这个数值就能表示发病的轻重。

病情指数是将发病率和严重度两者结合在一起，用一个数值来代表发病程度，对调查和实验结果是有利的。在比较防治效果和研究环境条件对病害的影响方面，常常采用这种方法。除去根据整株发病轻重分级外，叶片、果实、器官等都可以根据发病的严重度分级记载，然后计算病情指数。但是病情指数算法，如使用不当也可能也发生一定的偏差。例如，分级的标准和确定各级的代表数值，就是突出的问题。代表数值是反映发病的严重度的，代表数值是4的级别，严重度要比代表数值1的级别大4倍。常常发生的情况是没有充分的根据，随意分级和确定代表数值，计算到的指数就不能代表真正的发病程度。

此外，病情指数含有发生量和严重度两方面的因素，有时看不出是发生量不同，还是严重度不同。例如，可以有两种不同的情况，一种情况是发病个体虽少，但是发病很重；另一种情况是发病个体很多，但是发病很轻。它们的病情指数可以相同，但是病害发生的情况显然不同。植物病害流行病学方面的研究，一般要求准确反映病害发生量的变化，最好是尽可能用具体的数值表示发生量。

总之，病情指数是表示发病程度的一种方式，但是使用要恰当，也不是都要用这种方式来表示。

(三) 取样方法

病害调查的取样方法，影响着结果的准确性，取样原则是可靠又可行。样本的取

样数目要看病害的性质和环境条件，取样不一定要太多，但一定要有代表性。取样方法有：

随机取样法，此法适宜于分布均匀病害的调查，力图做到随机取样，调查数目占总体的5%左右。

“Z”字形取样法，此法适于狭长地形或复杂梯田式地块病害的调查，按“Z”字形或螺旋式进行调查。

平行取样法，此法适宜于分布不均的病害，间隔一定行数进行取样调查。

对角线法，适于条件基本相同的近方形地块的病害调查，样点定在对角线上取5~9点调查，调查数目不低于总数的5%。

样本可以整株、穗秆、叶片、果实等作为计算单位，样本单位的选取，应该做到简单而能正确地反映发病情况。调查取样的适当时期，一般是在田间发病最盛期。

三、病害损失的估计

准确估计病害损失的多少是很复杂的问题。有些引起整株死亡或完全破坏有经济价值部位的病害，产量损失的多少，主要取决于发病率，损失的估计比较简单，例如，大麦条纹病减产的百分率，差不多就是发病分蘖的百分率。但是，即使是属于这类性质的病害，如麦类黑穗病，情况还有所不同，产量损失的百分率，有的接近病穗的百分率，有的低于病穗的百分率。至于其他在不同程度上影响产量的病害，损失的多少取决于发病率和严重程度，问题就更复杂。发病程度与损失的多少有一定的关系，但是这种关系不是固定不变的，受发病的时期、品种、栽培和气候等条件的影响很大。病害损失的估计方法有以下两种：

①统计方法。如根据一种作物某种病害发生轻重不同年份的产量，估计造成损失的多少。

②从病害的演变来估计损失。一种作物往往由于某种病害的发生受到损失，而在换用抗病品种或采取其他有效防治措施后，产量又逐渐恢复，由此可以看出病害损失的多少。

但是统计方法非但准确性差，而且只适用于估计一个地区或较大面积内的损失，不能用来估计小面积或某一块田的损失。

实验二 植物病害标本的采集与制作

一、标本采集要求

标本采集是获取植物病害标本的重要途径，也是熟悉植物病害症状、了解植物病害发生情况的最好方式。植物病害的发生时期与植物的生育期及采集地的地理生态环境、生产条件、病原物的生物学特性等密切相关。标本采集时，应注意症状要典型。对于真菌病害要尽量采集带有子实体的标本；病毒病要采集顶梢与新叶；幼嫩多汁的子实体或果实，应先用标本纸分别包装放于标本桶内，避免因挤压而变形；黑粉、黑

穗病应及时放入标本袋中，并注意相互隔离；对于较易失水的叶片，应注意随采随压，避免叶片打卷而不易展开；线虫病以及果树根癌病要挖取整个病根，装入采集桶中。采集时要有完整的野外采集记录，记载的主要内容有：寄主名称、病害名称、采集地点、采集日期、海拔高度、生态环境、发病情况、采集序号等。一般情况下，每种病害标本要采集 10 份以上。

二、标本的制作

(一) 蜡叶标本的制作

蜡叶标本就是经过压制的干标本。制作方法是把含水量较少的标本，如植物的茎、叶等，分层压在标本夹的吸水纸层中，同时将写好的标签和标本放在一块，标本夹压紧后日晒或加温烘烤，使其干燥。标本干燥愈快，保持原色的效果愈好。所以，蜡叶标本质量的好坏，关键在于勤换纸，勤翻晒。一般情况下，第一周每天换吸水纸 1~2 次，以后可隔 1~2d 换纸，直至标本完全干燥。果实及较粗的茎的干燥应置于朝阳通风处，自然干燥，同时定期翻动，以利于标本整体均匀干燥。

幼嫩多汁的标本如花和小苗等，可夹在两层脱脂棉中压制，水分过高的可在 30~45 ℃ 之间加温烘干。

肉质蕈类和大的肉孢子囊菌不能压制，要使它很快干燥，一般是放在铁丝框中，悬在煤油灯上或放在烘箱中或 100 W 的电灯下烘干，但是很难保持原有的形状和色泽。冷冻干燥保存是目前比较好的方法，标本在冷冻的情况下干燥，几乎能完全保持原有的色泽和形状。冷冻干燥后的标本可以再涂一层聚氨基甲酸酯保护，方法是聚氨基甲酸酯 2 份用石油溶剂 1 份稀释，标本在稀释液中浸过后，在 50~60 ℃ 烘箱中干燥。水分很少的标本如枝条和木质蕈等，一般就在空气中干燥，不必经过特殊干燥的手续。

(二) 浸渍标本的制作

多汁的果实、块茎、块根及多肉的真菌子实体等标本，不适于干制，必须用浸渍法保存。常用的浸渍液及其用法如下：

1. 普通防腐浸渍液

只适于防腐，没有保持原色的作用，如萝卜、甘薯等不要求保色的标本，洗净后直接浸入以下溶液中。

① 5% 的福尔马林溶液：福尔马林 50 mL；95% 酒精 300 mL；水 2 000 mL。上述溶液也可简化为 5% 的福尔马林溶液或 70% 的酒精溶液。70% 的酒精溶液对于保存多孢子囊菌及鬼笔目的子实体甚为适宜。

② 亚硫酸浸渍液：饱和亚硫酸 500 mL；95% 酒精 500 mL；水 4 000 mL。甘蓝黑腐病的病叶在这种浸渍液中保存和漂白后，感染的叶脉仍呈黑褐色，病原细菌侵入寄主的途径看得更加清楚。

2. 保存绿色的浸渍液

①醋酸铜及福尔马林液浸渍法：以50%的醋酸溶解醋酸铜结晶至饱和程度，然后将饱和液稀释3~4倍后使用。醋酸铜液处理标本分热处理和冷处理两种方法。热处理法是将稀释后的醋酸铜液加热至沸腾，投入标本。标本的绿色最初被漂去，经过数分钟绿色恢复至原来程度，立即取出标本用清水洗净，然后保存于5%的福尔马林液中。冷处理法是将标本投入2~3倍的醋酸铜稀释液，经3h绿色褪去，再经72h又可恢复原来的颜色，然后取出用清水洗净，保存于5%的福尔马林液中。

保色的原理大致是铜离子与叶绿素中镁离子的置换作用，因此醋酸铜浸渍液重复使用后，其中铜离子的量逐渐减少，使用太久会丧失其保色能力。重复使用后失效的浸渍液，补加适量的醋酸铜，可恢复其保色作用。这种方法的保色能力很好，但是标本必须煮过，棉桃、葡萄和番茄的果实等不能煮的标本就不能采用。同时，这种方法保存的标本有时带蓝色，与植物原来的颜色稍有出入。

②硫酸铜及亚硫酸浸渍法：将标本在5%硫酸铜溶液中浸6~20h，当绿色恢复后，取出用清水洗净，然后保存在亚硫酸溶液中。这种方法用于保存叶片、棉铃和葡萄等绿色的效果较好，但应注意密封瓶口，必要时每年换一次亚硫酸浸渍液。

3. 保存黄色和橘红色标本的浸渍液

亚硫酸是保存杏、梨、柿、柑橘及红辣椒等含胡萝卜素和叶黄素标本的适宜浸渍液。配制方法是将亚硫酸(含二氧化硫5%~6%)配成4%~10%的水溶液(二氧化硫0.2%~0.5%)。

胡萝卜素和叶黄素存在于细胞的色粒中，不溶解于水，可以用这种方法保存。亚硫酸有漂白作用，浓度太高会使果皮褪色，浓度过低则防腐力不够，所以浓度的选择要经过反复实践确定。如果防腐力不够，有时可加少量酒精；果实浸渍后如发生崩裂，可加少量甘油。

4. 保存红色的浸渍液

红色因大都是水溶性的花青素(蓝色也是如此)，所以难以保存。瓦查(Vacha)是比较好的保存红色的浸渍液。此种浸渍液分两部分：浸渍液1的主要成分为硝酸亚钴、福尔马林、氯化锡等；浸渍液2的主要成分为福尔马林、亚硫酸、酒精等。将标本洗净后，在浸渍液1中浸2周，然后在浸渍液2中保存。可用于保存草莓、辣椒、马铃薯以及其他红色的植物组织，是一种效果比较好的浸渍液。

(三) 标本瓶的封口

浸渍标本可保存在试管、玻璃瓶或标本瓶中。为了避免标本的漂浮和移动，可以将标本缚在玻璃上或者用玻璃将标本压下。浸渍标本最好放在暗处，以减少药液的氧化，或瓶口因温度变化太大而造成碎裂。保存标本的浸渍液，多为具有挥发性的化学物质，所以，必须密封瓶口才能长久保持浸渍液的效用。

1. 暂时封口法

取蜂蜡及松香各1份，分别熔化，然后混合，并加入少量的凡士林调成胶状，涂在瓶盖边缘，将盖压紧封口。明胶和石蜡的混合物也能用于封口，将明胶(4份)在水

中浸几小时，滤去水后加热熔化，加石蜡 1 份，融化后即成为胶状物，趁热使用。

2. 永久封口法

用明胶 28 g 在水中浸数小时，将水滤去加热熔化，再加入 0.324 g 的重铬酸，并加入适量的熟石膏使成糊状，即可使用。此外，将酪胶及消石灰各 1 份混合，加水调成糊状物，即可用于封口。干燥后，因钙的硬化而密封。

三、标本的保藏

制成的标本，经过整理和登记，按一定的系统排列和保藏。贮藏标本的标本柜(室)要保持干燥、清洁，并要定期施药以防虫蛀与霉变。

1. 标本盒保藏

教学和示范用的干制病害标本，采用玻面纸盒保藏比较方便。纸盒中先铺一层棉花，并在棉花中加少许樟脑粉以驱虫，最后在棉花上放上标本和标签。

2. 标本瓶保藏

浸渍的标本放在标本瓶内保藏，为了防止标本下沉和上浮，可把标本绑在玻璃条上，然后再放入标本瓶。瓶口盖好后滴加石蜡封口，然后贴上标签。

3. 纸套内保藏

大量保存的干制标本，大多采用纸套保藏，将标本装入纸套内，并贴好标签，放在标本柜中即可。

实验三 病原物的分离与培养

一、病原真菌的分离和培养

植物病原微生物分离和培养工作应该在专门的无菌操作室或超净工作台上进行，也可在清洁和安静的房间中进行。工作时在桌面上铺一块沾湿的纱布，所有工作用具放在湿纱布上，尽量少在室内走动，减少空气流动，以减少污染。选用的分离材料应尽量新鲜，减少腐生菌混入的机会。从受病组织边缘靠近健全组织的部分分离，可减少污染，同时这部分病原生物处于较为活动的状态，生长快，易分离成功。

植物病原真菌的分离有组织分离法和稀释分离法两种，在病组织上产生大量孢子的病原真菌以及病原细菌的分离都可用稀释分离法。

(一) 组织分离法

①培养皿准备：取灭菌培养皿 1 个，置于湿纱布上，在皿盖上注明分离日期、材料和分离人姓名。

②培养皿平板制备：用无菌操作法向培养皿中加入 25% 乳酸 1~2 滴(减少细菌污染)，然后将熔化并冷却至 45 ℃ 左右的马铃薯琼胶培养基一管倒入培养皿中，轻轻摇动使成平面(分离细菌时则不能加乳酸)。

③切取感病组织小块(叶斑病类)：取新鲜病叶，选择典型的单个病斑，用剪刀

或解剖刀从病斑边缘切取小块(每边长3~5mm)病组织数块。

④表面消毒:将病组织小块放入70%酒精中浸数秒钟后,按无菌操作法将病组织移入0.1%升汞液中消毒1~3 min,然后放入灭菌水中连续漂洗3次。也可用漂白粉精片(1~2片),研磨后加灭菌水10 mL,消毒5~10 min。果实、块茎和枝秆等组织内部的病原菌可用脱脂棉蘸70%酒精涂拭病部表面,通过火焰烧去表面酒精,重复进行2~3次,达到表面消毒。

⑤用无菌操作法将病组织小块移至培养基平面上,每培养皿内可放4~5块。

⑥翻转培养皿,放入26~28℃恒温箱内培养,3~4 d后观察结果。

⑦用无菌操作法自培养皿中选择菌落,挑取少许菌丝及孢子,在显微镜下观察。如系玉米小斑病菌孢子,即可用接种针自菌落边缘挑取小块菌落移入斜面培养基,在26~28℃恒温箱内培养,3~4 d后,观察菌落生长情况,如无杂菌生长,即得玉米小斑病菌纯菌种,可置于冰箱中保存。如有杂菌生长,需再次分离获纯培养后,方可移入斜面保存。

(二) 稀释分离法

以棉花红腐病果为材料,按照下列步骤分离。

①取灭菌培养皿3个,平放在湿纱布上,分别编号1、2、3,并注明日期、分离材料及分离者姓名。

②用灭菌吸管吸取灭菌水,在每一培养皿中分别注入0.5~1.0 mL灭菌水。

③用灭菌接种钩从棉花红腐病果上刮取病菌孢子,放入培养皿内的水滴中,配成孢子悬浮液。

④用接种钩蘸一钩孢子悬浮液,与第一个培养皿中的灭菌水混合,再从第一个培养皿移三钩孢子悬浮液到第二个培养皿中,混合后再移三钩孢子悬浮液到第三个培养皿中。每次移菌前,接种钩均需在酒精灯火焰上烧过。

⑤将三管融化并冷却到45℃左右的培养基,分别倒在3个培养皿中,摇动使培养基与稀释的菌液充分混匀,平置冷却凝固。

⑥将培养皿翻转后放入恒温箱(26~28℃)中培养,3~4 d后观察菌落生长情况。

⑦获纯培养后,从菌落边缘挑取菌丝块移入斜面培养3~4 d后,放入冰箱保存。

要获得纯净培养,一般需经3次稀释分离(重复3次),当培养物高度一致时才能作为纯培养的菌种保存。

(三) 真菌的培养

植物病原真菌多为好气性真菌,在有丰富营养的培养基上能很好地生长,但它们对温度的要求差异较大,绝大多数的真菌可以在20~30℃正常生长,但少数要在15~20℃才能正常生长,少数真菌孢子必须在5℃左右的低温下才能萌发。

二、病原细菌的分离和培养

病原细菌的分离方法以稀释分离法和划线分离法为最常用。在进行分离之前,首