

全国高等农业院校教材

植物免疫学实验

商鸿生 主编

植物保护
植物病理 专业用

中国农业出版社

内 容 简 介

本书共收录植物免疫学实验30个,内容包括植物抗病性的性质,机制,遗传,病原体致病机制,生理小种鉴定,毒性遗传变异以及典型病害的抗病性鉴定方法等。其中既有与〈植物免疫学〉相配合,验证理论的实验,又有该学科的一些常用技术和近年来广泛应用的研究方法。每一实验都介绍了基本原理和操作方法并附有思考题。本书内容较多,还编入了一些较大型的实验,可供农林院校植物保护专业和植物病理学专业学生根据各校实验室条件选作,也可供农学,林学,园艺,植物生理生化,植物遗传育种诸专业师生以及农业科学研究人员,农业技术人员参考。

前 言

植物免疫学是一门新兴的交叉学科，它为植物抗病性利用和抗病育种提供基本理论和基本方法。植物免疫学是高等农业院校植物保护专业，植物病理学专业本科的必修课，我国许多农业院校都已先后讲授了这门课程，但因缺乏适用的实验指导书，难以正常开设实验课。为完善和发展植物免疫学的教学，我们在总结历年教学实践的基础上，挑选了我们在教学和科研中用过的一些实验方法，并吸收了国内外一些先进的实验内容，编成了这本植物免疫学实验。

本书是〈植物免疫学〉（李振歧，曾士迈，商鸿生编著）的配套教材，编入了关于植物抗病性的性质，病原物致病机制，致病性分化，抗病性机制，抗病性与致病性的遗传变异以及抗病性鉴定等内容的实验30个。其中既有操作简便不需精密仪器的传统实验，也有比较复杂的大型实验，收入了本学科的常用技术和广泛应用的研究方法。它可作为高等农林院校植物保护专业，植物病理学专业本科生的实验指导书，也可供有关专业本科生，研究生，教师，农业技术人员和研究人员参考。

我国目前开设植物免疫学课程的院校较多，实验条件和工作基础相差较大，为适应这种情况，本书力求适合多方面的要求，编入的实验较多，供各院校根据各自的实际情况选作，有些实验周期较长，难度较大，可以选用其中部分内容。各地的病害种类不尽相同，有些实验还可以用当地较易获得的或有较大经济重要性的试验材料替换原定的试材。

本书是集体劳动的成果，在编写过程中，西北农业大学植物保护系教师杨之为为本书编写了实验29，康振生为本书编写了实验11，20，21，本系其它教师，研究生和兄弟院校同行专家也给予很大帮助，提供资料和提出修改意见。编者水平有限，编写时间仓促，不妥之处，敬请读者批评指正。

编 者

一九九一年十一月

主 编 商鸿生 (西北农业大学)
编写人 李振岐 (西北农业大学)
主审人 曾士迈 (北京农业大学)
审稿人 朱之瑛 (河北农业大学)

目 录

实验一	小麦过敏性坏死反应的整叶透明观察	1
实验二	小麦抗白粉病反应的显微检查	4
实验三	植物木栓化组织观察	6
实验四	木质素的组织化学检定	8
实验五	棉花导管侵填体和胶质物观察	9
实验六	测定植物保卫素的液滴渗出技术	11
实验七	辣椒疫霉果胶酶提取和离解活性测定	14
实验八	玉米小斑病菌毒素作用测定	16
实验九	植物细胞膜透性的病理变化	19
实验十	小麦条锈病植物苯丙氨酸解氨酶的活性测定	21
实验十一	烟草对病毒的诱发抗病性	22
实验十二	植物慢发抗病性的组分分析	24
实验十三	营养因素对稻苗抗瘟性的影响	26
实验十四	小麦条锈菌生理小种鉴定	30
实验十五	病原菌群体毒力频率的测算	33
实验十六	小麦品种抗锈性的遗传分析	36
实验十七	植物抗病基因推导	39
实验十八	小麦叶锈菌的有性重组分析	41
实验十九	紫外线照射诱发小麦叶锈菌毒性突变	45
实验二十	植物病原真菌细胞核的染色方法	48
实验二十一	植物病原真菌的异核作用	51
实验二十二	植物病原菌定量接种技术	53
实验二十三	小麦品种抗锈性和抗白粉病性鉴定	55
实验二十四	植物抗病性的离体叶片鉴定方法	60
实验二十五	小麦对散黑穗病的抗病性鉴定	61
实验二十六	小麦对黄矮病抗病性的鉴定	63
实验二十七	水稻对稻瘟病和白叶枯病的抗病性鉴定	65
实验二十八	大白菜对软腐病的抗病性苗期鉴定	67
实验二十九	棉花黄、枯萎病速成病圃的建立和使用	69
实验三十	玉米品种对大、小斑病抗病性的鉴定	72
附录		74
一、过滤除菌方法		74

二、植物组织病理学研究的荧光染色方法.....	75
三、主要农作物品种抗病性鉴定方法.....	76
四、主要农作物病原菌生理小种的鉴定方法.....	82
五、一些常用的缓冲溶液	87
六、精密仪器的保养.....	90
七、 χ^2 值表.....	91
参考文献.....	92

实验一 小麦过敏性坏死反应的整叶透明观察

一、基本原理

过敏性坏死反应通常指植物受到非亲和性病原物侵染后，受侵细胞及邻近细胞表现高度敏感、迅速坏死，从而使病原物不能正常生存和繁殖的现象。它是植物发生最普遍的保卫反应。小麦抗病品种受到锈菌侵染后即发生过敏性坏死反应，导致反应型级别降低。多数研究者认为，过敏性坏死反应是小麦低反应型抗锈性的主要机制。低反应型抗锈性属于小种专化性抗病性。

小麦锈菌夏孢子在小麦感病品种叶面萌发后产生芽管趋向气孔，在气孔上方形成膨大的附着胞，由附着胞产生侵入丝，穿过气孔保卫细胞间隙，侵入气孔腔，形成气孔下囊。由气孔下囊生出初生侵染菌丝，向周围叶肉细胞生长，接触到叶肉细胞后其尖端产生初生吸器母细胞，由吸器母细胞产生侵入丝，穿透寄主细胞壁，在叶肉细胞内形成初生吸器，与寄主建立寄生关系。初生侵染菌丝在产生吸器母细胞的后方发生分枝，产生次生侵染菌丝，在叶肉细胞间隙蔓延，次生侵染菌丝不断分枝，向各个方向扩展，产生大量吸器母细胞和吸器，形成菌落（图1），以后分化为孢子堆。

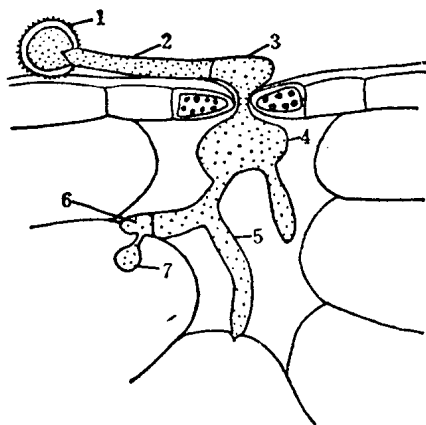


图1 小麦锈菌的侵染机构

1.夏孢子 2.芽管 3.附着胞 4.泡囊（气孔下囊） 5.侵染菌丝 6.吸器母细胞 7.吸器

低反应型抗锈品种典型的过敏性反应最早出现在初生吸器母细胞形成后，表现为叶肉细胞坏死、菌丝生长受抑、吸器母细胞和吸器形成减少（图2），但由于控制抗锈性的主效基因不同，抗锈程度不同，过敏性坏死反应的特点亦不同，根据过敏性反应发生的时间以及细胞坏死与菌丝受抑的关系，至少可分为以下类型：

1. 寄主细胞早期坏死型 初生吸器母细胞和初生吸器形成后即发生典型叶肉细胞过敏性坏死，锈菌发育中断。

2. 锈菌早期抑制型 锈菌吸器母细胞的形成和侵染菌丝生长早期受抑，叶肉细胞坏死出现较晚。

3. 锈菌抑制滞后型 在锈菌侵染早期，寄主叶肉细胞就发生坏死，但菌落仍持续发育，在较晚阶段方明显受抑。

4. 晚期坏死抑制型 叶肉细胞坏死和菌落受抑均延迟出现，坏死叶肉细胞分布在菌落边缘或散生在侵染菌丝间。

上述现象表明，过敏性坏死反应中，寄主细胞坏死也并非一定是锈菌受抑制的直接原因，低反应型抗锈性可能有复杂的生化基础。

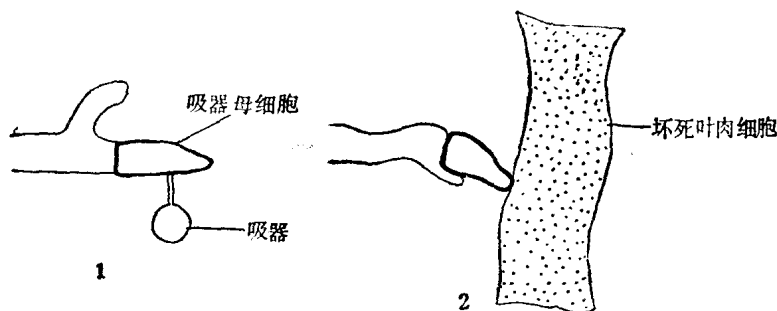


图2 小麦叶肉细胞对锈菌侵染的反应（正常叶肉细胞未划出）

1. 亲和性反应 2. 非亲和性反应，叶肉细胞过敏性坏死

整叶透明染色技术（whole-leaf clearing and staining technique）常用于在组织和细胞水平研究过敏性坏死反应，该法比常规的组织切片方法经济快速，适于观察大量样本和进行定量研究，可以展示寄主和病原物相互作用的顺序性和整体动态。这一方法包括材料固定、透明、染色、分色和制片镜检等步骤。本实验采用的Shipton和Brown整叶透明染色法以棉蓝乳酚和乙醇混合液处理叶片材料、固定、透明、染色同时完成，然后用水合氯醛脱叶绿素，增强透明度，但该法难以区分细胞的病理性坏死和机械创伤。荧光染色技术则能克服这一缺点，能更准确、快速地观察各种抗病反应（附录二）。

二、目的要求

学习Shipton和Brown整叶透明染色技术，观察植物过敏性坏死反应的发生过程和主要组织病理学特点，以加深对过敏性反应和低反应型抗锈性本质的了解。有条件的学校，尚可按附录二的介绍学习荧光染色方法。

三、材料、用具和药品

1. 小麦品种和锈菌菌种 供试品种由锈菌生理小种鉴别品种中或当地栽培品种中选取。试验菌种可以是小麦三种锈菌（秆锈菌、叶锈菌、条锈菌）中的任何一种。供试生理小种应能使各供试品种分别表现0，0₁，1，2，3~4等各级反应型。用当选小种的新鲜夏孢子作接种体。

2. 用具 小花盆、毛笔、手持喷雾器、保湿筒（箱），单刃刀片、镊子、烧杯（50ml）、滴瓶、酒精灯、三角架、石棉网、载玻片、盖玻片、测微尺、研究用显微镜等。

3. 药品 95%乙醇、棉蓝乳酚液（乳酚油配方为：乳酸20ml，苯酚20g，甘油40ml，蒸馏水20ml。乳酚油中加入0.5%棉蓝）、50%甘油液，水合氯醛。

四、方法和步骤

1. 植株接种和培育 供试小麦品种饱满种子播于直径9cm花盆中，在16~20℃和日照12~16小时的条件下育苗。幼苗第1叶片展平后接种。接种叶片用手指沾水轻抹去叶表面

的蜡粉（去蜡），用小毛笔蘸取叶锈菌新鲜夏孢子涂抹在叶片上接种，然后用装满清水的手持喷雾器向接种叶片上喷以细雾。接种后将整个花盆移入保湿筒内，筒底加水，盖上筒盖后，保湿12~24小时，然后移出在温室内适宜温度下（条锈为16~18℃，叶锈为20~22℃，秆锈为20~25℃）培育，每天光照16小时，除自然光照外，尚须补充人工光照，光强不低于10000lx。

2. 取样和处理 分别在接种后12、24、72和96小时取样。每次每品种摘取3个接种叶片，用单刃刀片将叶片各切去2cm，其余部分切成2cm长的叶段，叶段的上表皮朝上，在顶部由左下方向右上方斜切成楔形，以便于透明，染色后区分叶片上、下表面。叶段按以下程序处理：

（1）将95%乙醇和棉蓝乳酚液等量混合，装入小烧杯中，投入叶段，在酒精灯上加热煮沸1.5分钟，然后在室温下静置48小时；

（2）取出叶段用蒸馏水漂洗2次；

（3）按5g氯醛加2ml蒸馏水的比例配成饱和溶液，装入小烧杯中，放入洗涤后的叶段处理30~50分钟（也可长时间放置）或用小火加热数分钟，但勿使溶液沸腾；

（4）取出叶段用清水漂洗；

（5）将叶段置于载玻片上，用50%甘油液作浮载剂制片。

3. 样片检查和记载 样片用复式显微镜镜检并进行显微计测。各品种每次取样的材料至少检查30个单个夏孢子侵入形成的侵染点。检查和记载的项目有：

（1）吸器母细胞：统计各侵染点中吸器母细胞数目，计算平均数；

（2）菌落线性长度：用测微尺测定菌落线性长度，该长度指菌落两端伸长最远的侵染菌丝尖端之间的直线距离。小菌落只在一侧产生侵染菌丝，则计测由气孔下囊至最长菌丝顶端间的直线距离。若不用测微尺测量，则可以气孔长度为单位，估计菌落线性长度相当于气孔长度的倍数。若同一叶段上有含坏死细胞与不含坏死细胞的两类侵染点，则分别测定其菌落线性长度。

（3）叶肉坏死细胞 坏死细胞深蓝色至黑褐色，内部粗糙颗粒状、崩坏。统计含坏死细胞的侵染点数和各侵染点坏死细胞数，计算含坏死细胞的侵染点百分率和单个侵染点平均坏死细胞数。

4. 反应型记载 各品种均保留部分接种苗，在接种后约12~14天，已充分发病，反应型正常时，按常规分级标准，记载反应型级别。

五、作 业

1. 列表比较各供试品种在接种后不同时间，单个侵染点的吸器母细胞数目、菌落线性长度、寄主坏死细胞数目、含坏死细胞的侵染点百分率的增长情况。

2. 根据供试品种的实验数据，区分出过敏性坏死反应的不同类型。

3. 绘制各供试品种的典型侵染点形态图。

六、思 考 题

1. 整叶透明染色法有哪些优缺点？

2. 试分析过敏性坏死反应的病理学意义和在抗病育种中的应用价值。

实验二 小麦抗白粉病反应的显微检查

一、基本原理

小麦白粉病菌 (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*) 主要在叶片和叶鞘表面为害。在感病品种叶表面上, 白粉病菌分生孢子萌发后通常产生2个芽管, 一个呈小突起状, 称为初生芽管, 另一个加长变粗, 前端形成膨大的附着胞。附着胞与叶片表皮细胞接触, 产生侵入钉, 穿透细胞壁而侵入, 在细胞内形成梨形吸器中心体。以后中心体两端产生小突起, 继而加长形成3~7个指状体。附着胞还产生次生菌丝沿叶脉生长, 次生菌丝再度侵入表皮细胞产生次生吸器。次生菌丝不断伸长和分枝, 形成典型菌落, 菌落中产生多数分生孢子梗和分生孢子(图3)。

在抗病品种上, 上述侵染过程中断或明显减慢, 并出现多种抗病反应。例如, 抑制分生孢子萌发, 抑制附着胞形成、附着胞分瓣畸形, 产生乳突, 表皮细胞过敏性坏死, 阻滞吸器和次生菌丝发育, 菌落败育等。乳突是在小麦表皮细胞壁内侧, 与白粉病菌附着胞和侵入钉相对应的位置上产生的乳头状突起, 主要成分是胼胝质。乳突周围表皮细胞壁亦发生改变, 形成晕圈(图4)。乳突因其机械屏障作用或化学抑制作用而阻止白粉病菌侵入, 从而显著降低侵入率。表皮细胞的过敏性坏死反应则是主要的抗扩展因素, 能有效地抑制白粉菌吸器和菌落发育, 降低反应型级别。

利用常规整叶透明染色技术或荧光显微检查都能观察到小麦多种抗病反应, 在组织和细胞水平揭示小麦品种与白粉菌相互作用的特点, 从而为

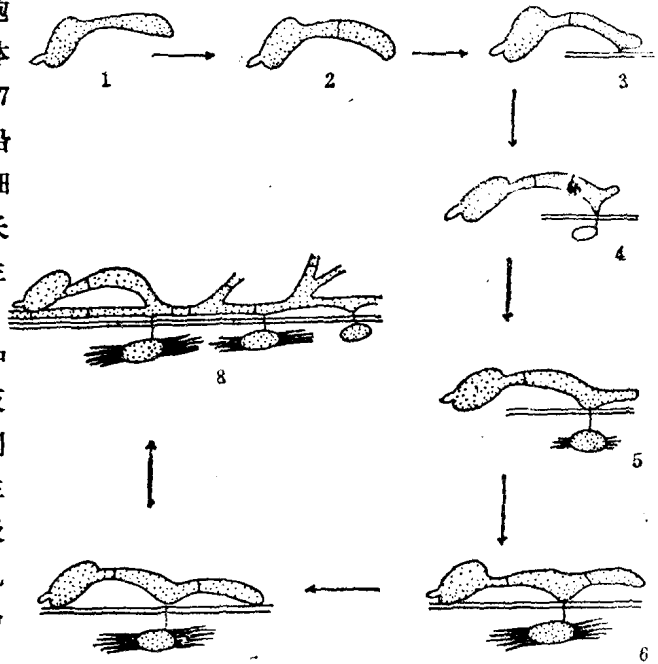


图3 小麦白粉病菌侵染过程

1. 分生孢子萌发, 产生芽管 2. 形成附着胞 3. 开始侵入 4. 形成初生吸器中心体 5—7. 形成初生吸器指状体 8. 形成次生吸器

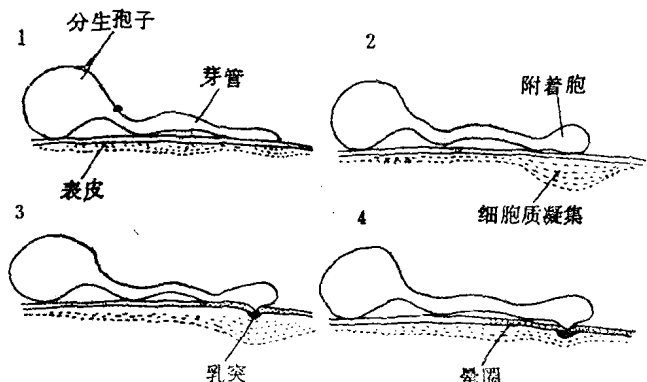


图4 植物表皮细胞壁内侧的乳突形成

进一步研究小麦抗白粉病的生化机制和合理利用抗病品种提供依据。

二、目的要求

利用整叶透明染色技术和光学显微镜检查,了解小麦白粉病菌的侵染过程和小麦的抗病反应。要求能准确的辨认白粉病菌的侵染机构,特别是正常附着胞,畸形附着胞,不同发育阶段的初生吸器和次生吸器等,识别寄主表皮细胞的乳突和过敏性坏死。有条件的学校还可参照附录二的方法进行荧光显微检查。

三、材料、用具和药品

1. 小麦品种 阿夫、高加索、新疆小白冬麦、宁7840、Maris Huntsman、CI 12633、白免3号、肯贵阿、Khapli等。也可选用当地栽培品种,但要供试白粉病菌株有明确的抗、感反应。

2. 白粉病菌菌株 田间标样的单斑分离菌株,在供试小麦品种上抗病或感病反应明确而稳定。菌种在感病品种阿夫幼苗上繁殖备用。

3. 用具 小花盆(直径12cm)、玻璃筒(直径10cm,长20cm)、纱布、载玻片、盖玻片、单刃刀片、镊子、毛笔、烧杯(50ml)、滴瓶、测微尺,复式显微镜等。

4. 药品 冰醋酸、95%乙醇、棉蓝乳酚液(按乳酸20ml、苯酚20g、甘油40ml、蒸馏水20ml的比例配成乳酚油并加入0.5%的棉蓝),50%甘油液。

四、方法和步骤

1. 接种和培育 供试品种盆栽幼苗第1叶片展开后,选留大小均匀一致的叶片用毛笔涂抹法接种,即取充分发病并正处于产孢盛期的阿夫幼苗,用毛笔蘸取孢子在接种叶片上轻轻震动,使分生孢子均匀附着在叶片上,然后用玻璃筒将已接种幼苗套住,上口用2~3层纱布封盖。接种幼苗培育温度为18~22℃,相对湿度60~70%,每日光照16小时,除自然光照外,尚需补充人工光照。

2. 取样和处理 分别在接种后8、24、72和96小时各取样一次,每次每品种摘取3个叶片。用单刃刀片将样品叶片两端各切去1~2cm,剩余部分切成2cm长的叶段,叶段上表皮朝上,在顶部由左下方向右上方斜切,然后进行以下处理:

(1) 将叶段放入冰醋酸与95%乙醇混合液(1:1, v/v)中固定、透明24小时;

(2) 用蒸馏水漂洗2次;

(3) 将叶段转入棉蓝乳酚液中染色12小时;

(4) 用清水漂洗2~3次;

(5) 将叶段上表皮朝上放在载玻片上,以含少量乳酚油的50%甘油作浮载剂制片。

3. 检查和记载 样片用复式显微镜(目镜10×,物镜10×,20×)镜检和进行显微计测。检查和记载的主要项目有:

(1) 孢子萌发 用接种后8小时取样的样片,统计孢子萌发的数目(芽管长度超过分生孢子长径1/2者即记为萌发),计算孢子萌发率;

(2) 附着胞 用接种后24小时取样的样片统计附着胞形成数目,计算附着胞形成率。

利用接种后48小时取样的样片，检查附着胞是否畸形并统计畸形附着胞数目；

(3) 侵入 以附着胞下方寄主表皮细胞内产生初生吸器中心体作为侵入完成的标记。取接种后24小时和48小时的样片检查记载病菌侵入数目和表皮细胞中出现的乳突数目，计算侵入率和形成乳突率；

(4) 吸器 检查并记载各品种样片中出现初生吸器和次生吸器的最短时间，产生次生吸器的侵染点百分率，各类吸器（仅有中心体、中心体两端产生小突起、产生指状体）数目及各占吸器数的百分率。利用接种后96小时的样片，测量吸器长度，吸器长度指吸器两侧伸展最长的指状体顶端之间的距离。

(5) 菌落 白粉菌在寄主表皮细胞表面已产生次生菌丝，即认为已形成菌落。检查并统计形成菌落的侵染点数目，测量菌落线性长度（菌落两侧伸展最远的菌丝顶端之间的距离）。

(6) 寄主细胞坏死 正常寄主细胞呈淡蓝色，侵染引致的坏死细胞深蓝色，内部粗糙颗粒状，镜检并统计各样片含坏死细胞侵染点百分率和单侵染点平均坏死细胞数，测定含坏死细胞侵染点的菌落线性长度。

(7) 病菌繁殖体形成 检查记载各品种上白粉菌产生分生孢子梗和分生孢子时间和程度。

此外，各品种部分接种苗需保留至充分发病后（约为接种后8~10天），调查记载各品种的反应型。

五、作 业

1. 列表按各调查记载项目归纳供试品种接种后不同时间取样测得的数据，列举各类低反应型品种的抗病反应及其特征。

2. 绘图表示吸器形成过程。

3. 绘制抗病品种和感病品种的典型菌落形态图。

六、思 考 题

1. 在抗病性不同的小麦品种中乳突产生时间、数量和病理学作用有何异同？

2. 能否根据小麦叶片上白粉菌侵染点的特征判断小麦品种是否具有抗病性？能否据此推测具有哪种类型的抗病性（低反应型抗病性、慢发抗病性）？

实验三 植物木栓化组织观察

一、基本原理

植物木栓化组织的细胞壁和组织间隙充满木栓质（Suberin），木栓质是多种高分子量醇类构成的复杂化合物，用苏丹Ⅲ染色液可染成红色。植物受到伤害后，在伤口周围形成伤愈木栓化组织，能抵抗病原真菌和细菌的伤口侵入和扩展，是重要的被动抗病性因素

之一。通常高温高湿的环境条件有利于愈伤木栓化发生。在较高的温度和湿度下，马铃薯块茎和甘薯块根等贮藏器官愈伤木栓化速度加快，减轻或阻止病菌造成的组织浸解和腐烂。此外，病原菌侵染也能诱导木栓质积累，并常伴随有植物细胞重新分裂和保护组织形成，有效地防止病原菌的扩展，因而木栓化也是常见的细胞壁保卫反应。

二、目的要求

以马铃薯块茎为试材，学习植物愈伤木栓化的基本观察方法，了解木栓化组织的抗病作用。

三、材料、药品和用具

1. 材料 马铃薯块茎和马铃薯干腐病菌 [*Fusarium solani* var. *coeruleum* (Sacc.) Booth]。在实验前，将马铃薯干腐病菌转接于PDA平板，获得充分发育的菌落。

2. 药品 苏丹Ⅲ (SudanⅢ) 溶于80%乙醇的饱和溶液。

3. 用具 培养皿 (直径6cm, 高1.5cm) 2个, 保湿皿 (直径15.5cm, 高3.5cm) 1个、解剖刀、双刃刀片、载玻片、盖玻片, 表面皿、解剖针、玻璃铅笔、温箱、冰箱、显微镜等。

四、方法和步骤

(一) 木栓化程度观察

1. 用解剖刀削去马铃薯块茎外皮，将肉质部分切成1.3cm见方的小块 (图5)，块面平滑。共需切出14个小块，分别放入2个培养皿中，每皿7块。将2个培养皿分别放置在24~25℃的温箱和0~5℃的冰箱中，处理48小时。

2. 由上述处理各取马铃薯小块2块，进行徒手切片，切片置于表面皿内的清水中。

3. 由清水中选取最薄的切片，用解剖针挑出移至载玻片上，滴加苏丹Ⅲ染色液1~2滴，染色5分钟，后用清水冲洗3次，然后封片在显微镜下检查，凡细胞壁染成红色部分即为木栓化细胞。记载各处理的木栓化程度。

4. 切取新鲜马铃薯块茎，并立即进行徒手切片和切片染色，作为鉴定木栓化程度的对照。

(二) 木栓化组织阻滞干腐病菌侵入和扩展的观察

1. 将前述两种温度处理的块茎小块和未经处理的新鲜块茎小块各5块按图6的设计置于保湿皿内，保湿皿中央放置一个小培养皿，内盛清水和脱脂棉，用玻璃铅笔在保湿皿底部写明处理名称。

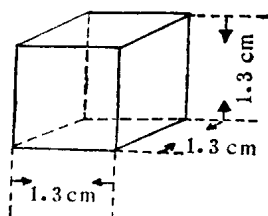


图5 供木栓化程度观察的马铃薯块茎小块

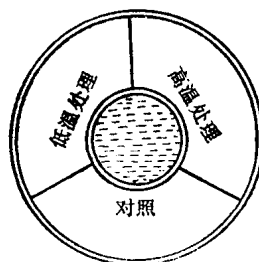


图6 木栓化组织阻滞干腐病菌侵入和扩展的试验配置图

2. 取已培养好的马铃薯干腐病菌，连同PDA培养基，切成4mm见方的菌丝琼脂块，分别移接于各温度处理和对照的块茎小块上表面的中央，每个块茎小块移接1个菌丝琼脂块。小心操作，避免碰伤马铃薯小块表面。

3. 盖好保湿皿皿盖，置于28℃温箱中培育1周，然后取出马铃薯小块，检查发病情况，测量褐变腐烂部分的长径和深度。

五、作 业

1. 按无(-)、弱(+)、中(++)、和强(+++) 4级记载不同温度处理和对照的木栓化程度。

2. 检查并记载各处理马铃薯小块褐变腐烂部分的长径和深度。

六、思 考 题

为什么说植物木栓化作用是重要的抗病因素？如何利用木栓化作用防治贮藏期马铃薯块茎腐烂？

实验四 木质素的组织化学检定

一、基本原理

木质素(lignin)是苯丙烷衍生物的聚合物。植物细胞的初生壁、次生壁和胞间层都能积累木质素，具有木质素的厚壁组织是一种被动的物理防卫因素。不仅如此，植物受到病原物的侵染后还能在细胞壁、细胞质和胞间层等不同部位产生和积累木质素，这称为木质化作用(lignification)。木质素沉积使细胞壁能够抵抗病原菌侵入的机械压力和病原菌分泌的酶类对细胞壁的降解作用，从而阻滞病原菌的侵入和扩展，成为重要的主动抗病性因素。

植物细胞壁的木质素可以应用组织化学方法进行检定和定位。木质化的植物细胞含有香草醛，它是木质素氧化后的一种产物。均苯三酚(phloroglucinol)与香草醛作用生成红紫色的均苯二酚草醛复合物。用均苯三酚作试剂处理植物组织切片，便可根据细胞壁的颜色变化，推断木质素的存在。

二、目的要求

学习植物木质素的组织化学检定方法，了解木质化与植物抗病性的关系。

三、材料、用具和药品

1. 植物材料 对霜霉病[*Peronospora parasitica* (Pers.) Fr.] 抗病和感病的白菜品种，取成株叶片供试。

2. 病原菌来源 采集田间感染霜霉病的白菜病叶，在室内诱发产生孢子囊。

3. 用具 培养皿、滤纸、接种环、刀片、载玻片、盖玻片、显微镜等。
4. 药品 70%乙醇、20%盐酸、均苯三酚液（称取0.1g均苯三酚溶于100ml 95%乙醇中）。

四、方法和步骤

1. 采集白菜霜霉病病叶，用自来水冲洗干净后放置在皿底铺有2层湿滤纸的培养皿内。在20℃下保湿培养一夜后，病斑上产生新的孢子囊。
2. 供试白菜抗病品种和感病品种的叶片中肋用自来水冲洗干净后，再用70%乙醇表面消毒，在无菌条件下切成长约1cm的小段，放置在培养皿皿底的湿滤纸上。
3. 用浸有无菌水的接种环蘸取白菜病叶上的霜霉病菌孢子囊，接种在叶片中肋小段的表面上，盖好培养皿的盖子，在20℃和光照条件下培养。
4. 接种4~5天后取出接种的中肋小段，切成小条，用左手的拇指和食指夹住小条，用右手握刀片，刀口向内作横切面切片。刀片由左前方向右后方移动时，中途不要停顿。用切得的薄片移入70%乙醇中固定。
5. 将切片放在载玻片上，先滴上1滴盐酸（媒染），再加1滴均苯三酚液，盖上盖玻片用显微镜检查表皮细胞壁。木质化细胞壁染成樱桃红色或紫红色。抗病和感病品种试样各检查10个切片，每个切片检查5个视野，统计记载有无木质化细胞壁的平均细胞数。

五、作业

列表比较供试各品种细胞壁木质化程度，写出实验结论。

六、思考题

1. 为什么说细胞壁木质化是重要的抗病性因素？
2. 试述用组织化学方法检验木质素的优缺点。

实验五 棉花导管侵填体和胶质物观察

一、基本原理

维管束阻塞是棉花抵抗枯萎病等维管束病害的一种保卫反应。维管束阻塞的主要原因是病原物侵染诱导寄主产生了侵填体（tylose）和胶质物（gum）。侵填体是导管附近的薄壁细胞通过纹孔膜在导管腔内形成的膨大球状体（图7）。胶质物是由导管细胞壁和胞间层产生的，其主要成分为果胶和半纤维素。棉花抗病品种受到枯萎病菌（*Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*）侵染后，迅速形成导管侵填体和胶质物，有效地阻止了枯萎病菌孢子上行扩展和病原菌酶与毒素的扩散。棉花枯萎病菌产生的多种毒素是重要的致病因子，用毒素处理棉苗，能诱导枯萎症状，亦能诱导棉花的保卫反应，产生导管侵填体和胶质物。本实验利用致萎毒素的这种物质，用病菌培养滤液处理棉苗，代替病原菌接

种。

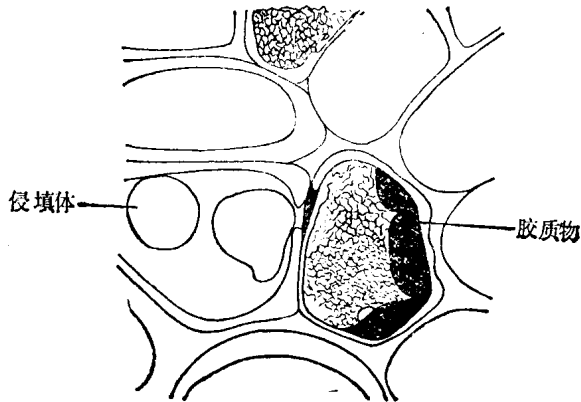


图7 导管侵填体和胶质物

二、目的要求

制备棉花枯萎病菌的培养滤液并处理棉苗，诱导棉苗表现萎蔫症状，观察棉苗子叶柄和幼茎导管中侵填体和胶质物。

三、材料、用具和药品

1. 棉花品种 感病品种和抗病品种各2个。选取纯净饱满的种子供试。
2. 菌种 棉花枯萎病菌强致萎力菌株。
3. 培养基 改良理查德 (Richard) 液体培养基 (配方: KNO_3 10g、 KH_2PO_4 5g、

$\text{MgSO}_4 \cdot 2.5\text{g}$ 、 FeCl_3 微量、葡萄糖 34g、蒸馏水 1000ml)、PDA培养基。

4. 用具 纸钵 (装有细沙和土壤)、三角瓶、烧杯 (500ml, 附有硬纸板作的盖子, 纸板上孔洞用以固定棉苗)、量筒、表面皿、接种针、镊子、双刃刀片、纱布、新华1号定性滤纸、通草茎髓 (用70%酒精浸泡备用)、SHA-C型恒温水浴振荡器、离心机、烘箱、显微镜等。

5. 药品 粗硫酸、70%抗菌剂“402”、FAA固定液 (配方: 50%酒精90ml、冰醋酸5ml、甲醛5ml)、1%番红水溶液、40%甘油液。

四、方法和步骤

1. 供试棉苗培育 棉花种子经硫酸脱绒后, 用70%抗菌剂“402”稀释2000倍的热药剂 (55℃) 浸种30分钟, 捞出冷却后, 在25℃条件下催芽。芽尖微露后播于装有细沙和土壤的纸钵内。细沙和土壤等量混合, 事先在烘箱内 (170℃) 间歇灭菌2次, 每次1小时。播种后在20~25℃、每天光照12小时的条件下育苗, 待1片真叶展平后供试。

2. 制备病菌培养滤液

(1) 将供试枯萎病菌转接在PDA平板上培养, 3天后由菌落边缘切取5×5mm的菌饼, 接种于装有改良理查德培养液的三角瓶内, 放置在恒温水浴振荡器上, 在25℃条件下培养10天。

(2) 培养液用双层纱布过滤, 除去菌丝, 收集滤液并离心 (1500r/min) 15分钟, 除去沉淀的孢子和菌丝片段, 收集上清液, 煮沸10分钟。待滤液冷却后通过新华1号定性滤纸过滤, 收集滤液保存备用。

3. 诱导症状 用清水仔细清洗供试棉苗根部, 去掉细沙和土壤, 轻轻取出棉苗, 选出苗龄和长势一致的棉苗。用去离子水将病菌培养滤液稀释成50%的浓度, 装入500ml烧杯中, 烧杯加盖硬纸板, 硬纸板上孔洞用以固定棉苗。选出的棉苗根部由孔洞浸入培养滤液中, 在25~28℃下培育, 同时用改良理查德培养液设置对照。分别在24、48和72小时后, 按下列5级标准调查记载棉苗萎蔫程度:

- 0级 棉苗无表现症状;
- 1级 子叶边缘开始退绿变色;
- 2级 子叶退绿变色面积低于叶面积的50%;
- 3级 子叶叶面积的50%至全部退绿变色,真叶正常或略有退绿;
- 4级 子叶和真叶全部变色或青干,幼茎变褐萎垂。

4. 导管侵填体和胶质物检查

(1) 在棉苗萎蔫程度调查的同时,选取各品种代表性棉苗,切取子叶叶柄并在幼茎中部距子叶3cm处,向下切取2cm长的茎段制得试样。

(2) 试样用FAA固定液固定。

(3) 取出试样直接或以通草茎髓作夹持物制作徒手切片,切片放入盛有清水的表面皿中。

(4) 选择切面完整,厚薄均匀的薄片用1%番红水溶液染色12小时。

(5) 用清水冲去红色染料后,用40%甘油作浮载液制片(必要时先用50%酒精脱色至木质化细胞壁染成深红色,其它部分染成浅红色后再制片)。

(6) 显微镜检查。毒素为害严重的导管及其周围的薄壁细胞呈红褐色,健导管及其周围呈红色。侵填体囊状、球状,数量变化较大,有的很小,只占据导管腔的小部分,有的则堵塞了整个导管。胶质物有的在导管内壁上,有的则充满导管腔。经仔细辨认后,统计镜检切片上含有侵填体和胶质物的导管数目,若数目较多,每切片只检查5个显微镜视野,求平均数。

五、作 业

- 1. 列表表示供试各品种各次调查的平均萎蔫级别。
- 2. 列表表示供试各品种各次、各部位样片具有侵填体和胶质物的导管数。
- 3. 分析侵填体和胶质物产生与品种抗病性、表现萎蔫程度、取样时间与取样部位的关系。

六、思 考 题

- 1. 有时在棉苗导管中难以发现侵填体和胶质物,你认为导致实验失败的原因是什么?
- 2. 哪些因素影响棉花枯萎病菌培养滤液致萎作用?

实验六 测定植物保卫素的液滴渗出技术

一、基本原理

植物保卫素(phytoalexin)是植物受到病原物侵染或受到多种生理的、物理的刺激后所产生或积累的一类低分子量抗菌性物质。现已知21科100种以上的植物能产生植物保卫素,已确定了90多种植物保卫素的化学结构,其中多数为类异黄酮和类萜化合物。豆科