

植物病理学和
真菌学技术汇编



植物病理学和 真菌学技术汇编

俞大绂 编

人民教育出版社

植物病理学和真菌学技术汇编

卷 二

俞大绂 编

*

人民教育出版社出版

新华书店北京发行所发行

山东新华印刷厂潍坊厂印装

*

开本 787×1092 1/32 印张 40.875 插页 4 字数 1,020,000

1977年9月第1版 1979年5月第1次印刷

印数 00,001—10,000

② 书号 13012·011 定价 4.50 元

前 言

建国以来,在毛主席无产阶级革命路线指引下,我国农村广大干部和社员认真学习马列主义、毛泽东思想,科学种田的水平不断提高,农业生产不断发展。

当前全国人民紧跟英明领袖华主席和党中央抓纲治国的战略布署,深入揭批“四人帮”,进一步掀起了“工业学大庆”、“农业学大寨”的新高潮。各条战线都正为在本世纪内,把我国建设成为全面实现农业、工业、国防和科学技术现代化的强大的社会主义国家,使我国经济走在世界的前列的宏伟目标而奋斗。

农业生产的发展和四个现代化的目标也向农业科学提出了新的要求。为了加强植物病理学方面基础理论的研究,为了满足植病工作者实际工作的需要,编者遵照毛主席“洋为中用”的教导,又收集摘录国内外有关资料,编写了本书的第二卷,供植保及有关学科的科研工作者、植保干部以及农林院校教师和学员的参考。

本卷除补充编写第一卷内所介绍的技术外,偏重介绍田间技术,并编入了农药测定、生理病害、酶测定、生物统计等项目。植物病理学是一门应用学科,涉及许多其它学科,因而也介绍了一些在植物病理学研究中常采用的其它基本技术,如血清学、电子显微、离心器等技术。

本卷所介绍的技术大多来源于1967年前的参考资料。进入70年代,植物病理学的研究在许多方面,如内吸杀菌剂、抗病育种、病害调查、预测预报、菌形体、媒介昆虫的人工培养、病毒提纯和病原体遗传学等,均已有较新的技术。这些待以后继续介绍。

由于国内外有关植物病理学的技术有大量的报导,对于许多研究项目,如抗病育种、生理小种等,本卷仅介绍代表性的技术。旧的,但认为是传统的、有用处的技术,虽当前已有所改订,也酌量编入。

病原体和其寄主都是生物,本身赋有遗传变异和适应性,并深受环境影响,因此采用本书所介绍的技术,须根据实际情况,灵活运用。本汇编中各项技术,相互间联系性差,编排上也不够系统,应用时请查索引。

书中病原体和寄主的中文名和拉丁学名均采用中国科学院自然科学名词编订室所公布的名称,仅少数的为暂拟名称。书内的度量衡制,有些已自原著折合成公制。

由于笔者学习马列主义、毛泽东思想不够,时间精力有限,书中的缺点和错误可能不少,恳切地请读者批评和指正。

本书在编写过程中曾得到华北农业大学领导大力支持,校内外许多同志的协助,卢宗海同志审阅统计学部分,王秉寅同志阅过一部分原稿,各方热情帮助,均此表达衷心感谢。

俞大绂

1977年9月,北京

目 录

前言

培养基 (1—231)	1
接种 (232—392)	156
分离 (393—466)	240
单孢分离 (467—473)	280
诱发和促进产生孢子和子实体 (474—509)	283
孢子萌芽 (510—538)	297
观察病菌侵入 (539—542)	309
测定环境因子 (543—557)	310
小气候 (558—560)	319
孢子捕捉器 (561—563)	323
土壤真菌 (564—602)	327
灭菌 (603—612)	357
病原体检查 (613—663)	363
噬菌体 (664—673)	394
植物寄生线虫 (674—689)	403
媒介昆虫 (690)	415
饲养昆虫 (691—692)	417
血清学 (693—705)	418
植物病毒提纯 (706—733)	433

植物病毒和病毒内含体染色 (734—742)	457
固定液 (743—745)	466
切片和染色 (746—824)	474
染色法 (825—836)	499
染色液 (837—838)	504
细胞核染色 (839—852)	513
标本封藏 (853—866)	521
包埋剂 (867—868)	526
封藏剂 (869—879)	528
玻片标本封闭剂 (880—889)	532
切片贴着剂 (890—893)	534
软化剂 (894—898)	535
缓冲剂 (899—905)	537
病级、病情指数和病害的反应型 (906—1056)	543
病害调查和损失估计 (1057—1107)	637
抗病育种 (1108—1115)	681
杂交抗病育种 (1116—1137)	691
利用环境筛选抗病植株 (1138—1155)	716
辐射抗病育种 (1156—1157)	732
生理小种和鉴定寄主 (1158)	736
病原体的遗传变异 (1159—1174)	744
杀菌剂和杀线虫剂药效测定 (1175—1256)	770
病原体保存法 (1257—1282)	858
标本保存法 (1283—1294)	872
电子显微和超微切片技术 (1295—1310)	876
植物根系的分泌物 (1311—1315)	890

寄生菌产生的毒素测定法 (1316—1322)	895
抗生素和抗菌素 (1323—1369)	904
病株生理 (1370—1378)	946
病原体生理 (1379—1384)	951
生理病害(缺素症) (1385—1411)	957
酶 (1412—1434)	984
生物统计 (1435—1475)	1004
杂类 (1476—1521)	1085
附录	
I 显微镜	1109
II 显微镜下物体放大倍数	1111
III 切片染色常用染色剂的吸收光谱与加“M”滤色镜片的吸收光谱的 比较	1112
IV 荧光显微技术	1112
V 核计细菌数目	1115
VI 药剂喷射漂移和淀积	1118
VII 植物病毒病害普通症状的国际代号和缩写字	1118
VIII F和t值表	1122
IX t值表(双侧概率)	1125
X χ^2 值表	1126
XI q值表(1%显著标准)	1127
XII q值表(5%显著标准)	1129
参考文献	1131
中文索引	1245
外文索引	1277

培养基

研究植物病害培养真菌和细菌常采用自然培养基、综合培养基和半综合培养基。自然培养基大都为植物的一部分。常用的有马铃薯、羽扇豆或苜蓿茎秆、稻米、麦粒和其他禾谷类作物的种子、亚麻种子、玉米粉、燕麦、梅干等，均供配制琼脂培养基用。综合培养基是由成分已知的物质所配制的，如蔡氏培养基。半综合培养基是在综合培养基内加入自然物质，如在蔡氏培养基内加2%麦芽抽提物，1%酵母抽提物。

培养基的种类虽多，然而它们的主要组分不外碳源、氮源、矿质和生长素，例如培养链孢霉需要生物素。

分离土壤内和植物寄主上的某些真菌和细菌，常采用选择培养基，以适合寄生菌生长所需，同时抑制其他腐生菌生长。这类培养基大都是在常用的培养基内加抑制剂，如抗菌素、化学物质等。

下列各种培养基，供培养植物寄生真菌和细菌时作参考，须灵活运用。

〔1〕 改订 Burkholder 培养基(MBA)

马铃薯	300 克
胨	5 克
K_2HPO_4	2 克
NaCl	2 克

柠檬酸钠	1 克
天门冬酰胺	0.6 克
葡萄糖	6 克
琼脂	12 克
水	1,000 毫升

将马铃薯去皮,煮沸,取液。加入上述物质和水到 1,000 毫升。煮溶琼脂。

这种培养基供培养紫苜蓿细菌萎蔫病棒状杆菌 (*Corynebacterium insidiosum*) 用。

[2] 根癌病细菌培养基

胡萝卜浸液培养基

胡萝卜(磨碎)	200 克
蒸馏水	1,000 毫升

蒸一小时,不必调配 pH 值。

酵母浸膏葡萄糖矿盐培养基

酵母浸膏(1%)液	100 毫升
CaCl_2	0.1 克
NaCl	0.2 克
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2 克
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	0.5 克
葡萄糖	5.0 克
蒸馏水	900 毫升

pH 6.8(不必调配)。

上两种培养基供培养根癌病土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 和发根癌病土壤杆菌 (*A. rhizogenes*) 用。

〔3〕 根癌病细菌培养基

蒸馏水	1,000 毫升
琼脂	20 克
MgCl ₂	2 克
丙酸钙	1.2 克
Mg ₃ (PO ₄) ₂ ·4H ₂ O	0.2 克
MgSO ₄	0.1 克
Na ₂ CO ₃	0.075 克
MgCO ₃	0.075 克
甘露醇(碳源)	15 克
NaNO ₃ (氮源)	5 克

高压灭菌, 冷却后加入:

小蘗碱(berberine)	275ppm
硒化钠(Na ₂ Se)	100ppm
青霉素 G(1025 单位/毫升)	60ppm
硫酸链霉素(streptomycin sulfate)	
(78.1% 链霉素)	30ppm

环己酰亚胺(cycloheximide)

(85—100% 活动成分) 250 ppm

短杆菌素(tyrothricin)(纯) 1 ppm

杆菌肽(bacitracin)(65 单位/毫升) 100ppm

用 1N HCl 调配到 pH7.1。

此培养基供分离根癌病细菌用, 它优于 Petal 培养基(见卷一, 下同, 均指本汇编卷一)和胡萝卜片。Petal 培养基适合许多土壤真菌生长, 胡萝卜片适合软腐细菌和真菌生长, 它们常掩盖根癌病细菌生长。而

甘露醇和硝酸钠容易被根癌细菌利用；硒化钠、丙酸钙和小苏碱有抑制许多种细菌生长的功用，同时又不影响根癌病细菌的生长。

又，观察根癌病细菌形成的星状体，可采用铁-锰-胡萝卜浸液 (Stapp & Bortels, 1931)。其配制方法如下：

将胡萝卜洗净，切成小块，加蒸馏水两倍，蒸煮 10 分钟，经铁纱网过滤，再加水三倍，用 Na_2CO_3 调配到 pH 7.0—7.2。用少量水溶化 MnSO_4 ，加入胡萝卜液配成 0.01% MnSO_4 液。再用少量水溶 FeSO_4 ，加入锰-胡萝卜液，配成 0.01% 铁-锰-胡萝卜液，摇动，液将呈深棕色。每玻管内盛液 5 毫升，每天蒸一小时灭菌，连续蒸三天。

接种生长 20—24 小时的根癌杆菌，在 26—28°C 下培养 24—36 小时。在显微镜下检查星状体。

根癌杆菌，*Agrobacterium tumefaciens* 和 *A. rhizogenes* 均形成星状体，这是该属菌种的一个特征。(Stapp & Bortels, 1931)

[4] Wilbrink 培养基

胨	5 克
K_2HPO_4	0.5 克
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.25 克
蔗糖	10 克
琼脂	18 克
蒸馏水	1,000 毫升

供培养甘蔗叶癍病黄单胞菌 (*Xanthomonas albilineans*) 用。

[5] 辣椒斑点病黄单胞菌选择培养基

葡萄糖	5 克
胨	5 克

dl-蛋氨酸	0.1 克
环己酰亚胺 (cycloheximide)	0.04 克
8-羟基喹啉铁 1:1 复杂体 (1:1 ferric-8-hydroxyquinoline)	0.0045 克
辛基苯氧烷基硫酸钠 (Sodium octyphenoxy alkyl sulfate)	0.032 克
琼脂	17 克
蒸馏水	1,000 毫升

此系改订 Starr 培养基的一种低营养培养基,供自土壤选择性分离辣椒斑点病黄单胞菌(*Xanthomonas vesicatoria*)用。

Peterson (1963) 采用三种培养基。上式是培养基 1。培养基 2,除 Starr 所用营养物以外,加有和培养基 1 等量的 dl-蛋氨酸、环己酰亚胺和辛基苯氧烷基硫酸钠。培养基 3 所用营养物,除了用 0.02 克鲸蜡基硫酸钠 (sodium cetyl sulfate) 代替培养基 2 中的辛基苯氧烷基硫酸钠以外,其余同培养基 2。

三种培养基的效用相等,但配制培养基 1 较简便。上述细菌在培养基 1 上面形成的菌落,直径为 5—10 毫米,呈黄色,在接近边缘处有一个内生的环或晕;在培养基 2 和 3 上面形成的菌落,直径为 2—4 毫米,呈乳黄色的色彩,鲜明的呈乳白色。

[6] 棉角斑病黄单胞菌培养基

KH_2PO_4	6.4 克
Na_2HPO_4	3.2 克
KCl	0.2 克
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2 克

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5.0 克
------------------------------	-------

蒸馏水	1,000 毫升
-----	----------

加果胶 1%、果胶酸钙 1% 或半乳糖酸 0.5%。

如配制固体培养基，则加 2% 琼脂。细菌在 27—29°C 下培养 24 小时。

此培养基供棉角斑病黄单胞菌 (*Xanthomonas malvacearum*) 产生果胶酶和纤维酶用。

[7] Starr 培养基

葡萄糖或麦芽糖	10 克
---------	------

NH_4Cl	1.6 克
------------------------	-------

KH_2PO_4	2 克
--------------------------	-----

MgSO_4	0.2 克
-----------------	-------

H_3PO_3	5 微克
-------------------------	------

CaCO_3	100 微克
-----------------	--------

CuSO_4	10 微克
-----------------	-------

$\text{FeSO}_4(\text{NH})_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	100 微克
---	--------

KI	1 微克
----	------

$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	10 微克
--	-------

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	50 微克
---	-------

生物素	5 微克
-----	------

硫胺素	2 微克
-----	------

蒸馏水	1,000 毫升
-----	----------

氮源用量以每升液含天门冬酰胺 2 克为标准。碳源用量以每升液含 4 克碳为标准。

培养基在灭菌前调配到 pH 6.8。糖分别灭菌。

此培养基供培养黄单胞菌属(*Xanthomonas*)用(参阅本卷条 5)。

又 Starr 分离软腐病细菌选择培养基

NaOH(1N)液	0.9 毫升
CaCl ₂ ·2H ₂ O(10%)液	0.6 毫升
溴百里酚蓝(1.5%乙醇溶)液	0.1 毫升
酵母浸膏	1.05 克
聚果胶酸钠	3.05 克
重蒸馏水	100 毫升

除聚果胶酸钠以外,将各种成分加入水内。CaCl₂液须现配现用。俟上物溶化后,缓慢地加入多果胶酸钠(sodium polypectate),边加边搅,并用药匙挑去块团和泡沫,放在沸水锅上,搅拌到溶化为止。制成的培养基呈玻璃绿色, pH 7.3。培养基须盛在相当大的烧瓶内,以防混合物冒泡沫,在 121°C 下高压灭菌 15 分钟。培养基也可装在玻管内,供穿刺接种用。

培养基灭菌后,趁未凝固前,立即倒入玻皿,这是因为它凝结得很快,一旦凝结后就不能再在热水浴锅内溶化了。培养基灭菌后,下降到 pH6.4。

配制半固体琼脂果胶酸盐培养基: 取 10 毫升蒸馏水配制尚未凝结的 3% 琼脂液,加入已灭菌尚未凝结的 100 毫升果胶酸盐培养基内,即配成 0.3% 琼脂果胶酸盐培养基。凝结后,当接种软腐病细菌时,即使果胶酸盐被分解,培养基仍保持相当的硬度。分解果胶质的细菌,在这类培养基上生长,形成下陷的菌落。

此选择培养基供分离软腐病细菌(*Erwinia carotovora*)用。(Starr, 1947; 又参阅 Dowson, 1957; Noble & Graham, 1956; Paton, 1958)

〔8〕 青枯病假单胞菌

纤维酶半综合培养基

蔗糖	20 克
酪朊水解氨基酸	1 克
酵母浸膏	1 克
CaCO_3	1 克
KH_2PO_4	0.441 克
K_2HPO_4	1.177 克
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.230 克
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3.08 毫克
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2.03 毫克
$\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2.99 毫克
蒸馏水	1,000 毫升

核计微量元素含量: Zn: 0.8 ppm; Mn: 0.5ppm; Fe: 0.6ppm。
Fe 原液含有 $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1.497 克和柠檬酸 0.958 克, 重蒸馏水 500 毫升。

在 2,000 毫升容量的三角瓶内, 盛培养液 500 毫升, 高压灭菌, 供培养青枯病假单胞菌 (*Pseudomonas solanacearum*) 产生纤维酶用。

500 毫升培养液内接种细菌悬液 5 毫升 (2×10^8 细菌/毫升)。31 $\pm 2^\circ\text{C}$ 下, 振荡培养 96 小时, 经孔口 C 的细菌过滤器, 滤去 CaCO_3 。过滤液内加 methiolate 0.1 克/升, 在 4°C 下保存待用。

〔9〕 氯化四唑培养基

葡萄糖	5 克
-----	-----

胨	10 克
酪朊水解物	1 克
三苯氯化四唑	5 毫克
蒸馏水	1,000 毫升

先配制 1% 三苯氯化四唑原液。琼脂基倒入玻皿前，在无菌条件下再加入适量调配到所需浓度的三苯氯化四唑液。

在玻皿琼脂培养基上，划线接种细菌，在 32°C 下培养 36 小时。供检查青枯病细菌 (*Pseudomonas solanacearum*) 突变菌落。野生型菌落呈现白色或白色中有小的红色中央部分。突变型菌落呈现深红色并有狭窄白色周缘。

此培养基即葡萄糖-胨-酪朊水解物琼脂培养基 (见卷一)，外加三苯氯化四唑。

青枯病细菌，在培养中易发生变异，或丧失致病力。可采用下面基本培养基来选择致病力强的菌落。

基本培养基

葡萄糖	10 克
胨	10 克
酪朊水解氨基酸	1 克
琼脂	18 克
蒸馏水	1,000 毫升

配制上述的培养基 200 毫升，盛在三角瓶内，高压灭菌。取出后，在培养基未凝结前，加入 1 毫升 1% 2, 3, 3-三苯氯化四唑液 (2, 3, 3-triphenyl tetrazolium chloride, T. T. C.) 配制成 0.005% 三苯氯化四唑培养基。

用接种环取青枯病细菌悬液，在玻皿内 T. T. C. 培养基表面上划线，于 32°C 下培养 36 小时，检查。赋有致病力的野生型细菌，菌落呈