

植物病理学和 真菌学技术彙編

俞 大 紱 編



本书主要介绍在试验室和温室内研究植物病理学和真菌学的各种技术,包括培养基、组织培养液和高等植物营养液的配制法,真菌和细菌的分离和接种,孢子的产生和萌芽,病原体侵入寄主的观察,环境的控制,病株解剖,制片技术,染色剂的配制和染色方法,组织细胞和生物化学测定法,以及其他的研究技术。此外本书还对研究植物线虫、细菌和病毒的技术方法作了介绍。

植物病理学和真菌学技术汇编

卷一

俞大绂编

*

人民教育出版社出版

新华书店北京发行所发行

人民教育出版社印刷厂印装

*

1959年9月第1版 1975年7月第2次印刷

(精装本)

书号 13010·640 定价 3.30 元

目 录

培养基[1—511].....	1
分离法[512—574].....	334
接种法[575—650].....	368
誘引产生无性和有性孢子法[651—681].....	399
孢子萌芽[682—701].....	410
病菌侵入寄主观察[702—706].....	416
环境[707—714].....	418
氫离子濃度、指色剂和緩冲液[715—719].....	428
誘起真菌和細菌变异的技术[720—724].....	445
捕捉孢子[725].....	449
土壤微生物分离和檢查[726—734].....	451
分离病原体的表面灭菌法[735—737].....	457
檢查病原体[738—750].....	460
噬菌体[751—756].....	466
植物寄生綫虫[757—797].....	470
植物細菌[798—832].....	494
植物病毒[833—891].....	538
固定液[892—908].....	589
染色剂[909—929].....	616
染色及切片法[930—1163].....	644
脫水剂、脫水和封藏[1164—1167].....	744
透明剂[1168—1171].....	748
切片一般技术[1172—1173].....	751

制片标本封藏法〔1174—1176〕	755
切片粘着保藏剂〔1177—1185〕	757
玻片整体封藏法〔1186—1187〕	761
石蜡切片校正〔1188〕	767
硬組織軟化法〔1189〕	769
切片粘着剂〔1190—1191〕	771
盖玻片封閉剂〔1192—1193〕	773
保存标本顏色液〔1194—1198〕	776
洗滌玻片〔1199〕	779
組織細胞化学測定和植株化学分析法〔1200—1203〕	780
有机碳化合物測驗〔1204—1223〕	787
矿質測驗〔1224〕	808
酶的測驗法〔1225—1241〕	817
維生素測定〔1242—1243〕	830
矿質的生物測定〔1244〕	833
維生素生物測定〔1245〕	833
类核質染色〔1246〕	835
碘值測定〔1247〕	835
植物色素〔1248—1251〕	836
化学測定法資料〔1252〕	838
杂类〔1253—1339〕	851

附录

表 1 国际原子量表	902
表 2 氫离子濃度	905
表 3 氫离子濃度顏色指示剂	907
表 4 普通用的煤落染色剂溶液	908
表 5 染色剂的溶解度	908
表 6 切片技术通用液剂的溶媒特性	913
表 7 切片技术通用溶媒的物理特性	915

表 8 脱水剂的物理特性	916
表 9 合成透明剂的物理特性	917
表10 香精油的物理特性	919
表11 封藏剂折射率	920
表12 温度轉換表	921
表13 高压灭菌压力和温度的关系	927
表14 硫酸銅液的比重	928
表15 福馬林液稀釋	928
表16 乙醇稀釋表	929
表17 水溶蔗糖粘度	931
表18 水溶蔗糖液,在 $\frac{20^{\circ}}{4^{\circ}}\text{C}$ 下的比重	932
表19 电离度	934
表20 氨基酸在水 100 克內的溶解度(克)	935
表21 試驗室一般用的化学剂	936
表22 水摻和其他物質的冷却剂(低温)	940
表23 酸稀釋表	941
表24 氨基酸成分	942
表25 一般用碳水化合物物理特性	943
表26 干湿球相对湿度表	947
表27 水溶液的滲压	948
表28 冷却混合物	952
表29 配制百分率溶液表	953
表30 恒定湿度液	954
表31 酸和硷的濃度	954
表32 氧化-还原指色剂	955
表33 校准氫离子器的标准緩冲液	956
表34 混合指色剂	958
表35 酸硷指色剂	959
表36 通用指色剂	962
表37 度量衡制	963
参考文献	975

中文索引.....	1068
-----------	------

外文索引.....	1107
-----------	------

培养基

人工方法培养真菌和细菌的物质体,称为培养基。根据组织成分,可分培养基为三类:(一)自然培养基,其中完全包含成分不确定的本质复杂的自然物质,大都是植物性的,如马铃薯、水果、蔬菜、麦芽、酵母膏等物质。许多植物部分,可以直接采用或制成浸渍液应用。有时采用各种植物的叶、茎或根制成自然培养基。有时采用动物性的物质,如肝、心脏、血清等制培养基。(二)半综合培养基,其中包含一部分自然物质再加入一些成分已知的化学化合物,如马铃薯葡萄糖培养基。(三)综合培养基,其中包含成分已知的化学化合物,如 Raulin 培养基。为使某些真菌或细菌生长并产生特型的子实体,时常采用自然培养基。半综合培养基应用最广,能供绝大多数真菌和细菌生长。研究真菌和细菌的生理,宜采用综合培养基。一般情况下,在真菌培养基内,需含有铁、锌和锰。先配制原液,每毫升原液内含有铁⁺⁺0.1 毫克,锌⁺⁺0.1 毫克和锰⁺⁺0.05 毫克。称硝酸铁·9H₂O 723.5 毫克,硫酸锌·7H₂O 439.8 毫克;硫酸锰·4H₂O 203 毫克,溶在 600 毫升蒸馏水内,加入足量的纯硫酸,成为清晰透明的溶液,再加蒸馏水到总容量为 1000 毫升。配制培养基时,每 10000 毫升培养基内加原液 20 毫升。培养基的炭源,一般是每公升加炭源物 10 到 25 克,视用途而定;氮原一般是每公升培养基内加入相当于无水天门冬酰胺 2 克所含的氮含量(0.425 克氮)。综合培养基应用再蒸的蒸馏水,和纯的化学化合物,特别是进行微量元素的生理研究。许多化合物时常沾带有杂质,例如硝酸氨沾带有钠、镁和钙;磷酸一氢钾沾带有铝、铅、钠、钙、镁;硫酸镁沾著有钠、铜;硫酸锌沾著有铁、砷、镁、铜、硅、钠、锰;硫酸铜沾着有铁、锰、硅、镁、

銅、鉛；硫酸錳沾著有鈉、鐵、銅、鋁、鈣、鉻、硅、鎂、鈣；鉬酸鈉沾著有銅、錳、鐵、鋁、鎳、鎂、鈣、鉀、錳、硅、鋰；氯化鋁沾著有鈉、鎂、硼、鈣、鉀、鈉、鈣、錳、鈣、鉀、錳、鋁、鐵、鎂、鎳、銀、銅、鎂、錫、硼、硅。

培养基可分为液体和固体两种。一般情况是在液体培养液內加洋菜或明胶制成固体培养基。除此以外，也可用硅酸盐制成硅凝胶培养基。洋菜、明胶和硅凝胶的特性如下：

	洋菜	明胶	硅凝胶
来源	植物	动物	矿质
化学本质	多糖	蛋白胨	硅凝胶
反应	弱酸	酸	酸
熔点—尋常濃度	96°C	25°C	—
凝固点	40°C	10°C	—
胰朊酶消化	无影响	消化	—
凝縮水	有	无	无
尋常濃度	1—1.5%	10—12%	5—6%

洋菜本身不是一种营养物质，因此最适宜供配制固体培养基用。洋菜提自各种海水生的紅藻，大都提自石花菜(*Gelidium corneum*)。用热水提出物几乎全是多糖类(大部分是半乳糖胶和少量戊糖胶)及少量蛋白胨和矿质的混合物。提淨的洋菜是复杂的多糖硫酸脂。試驗室內所用洋菜的成分为：水 16%；灰分 4.4%；氧化鈣 1.15%；氧化鎂 0.77% 和氮 0.4%。明胶的成分为：水 14—15%；灰分 0.6%；氮 18.3%。

洋菜在温度升高时逐渐成胶体溶液, 約在 45°C 凝結成凝胶。当酸解时, 形成 D-半乳糖及其相应构体和 L-半乳糖, 以及硫酸。

洋菜含有鈣、鎂、鈉、鉀等矿质和生长素。如需用比較純淨的洋菜, 可采用如下的洗淨洋菜法: 將一磅洋菜攪在大三角瓶內, 加入 5 公升蒸餾水和 500 毫升氮苯, 靜置 24 小时。插入一根口徑 6 毫米的长玻璃管, 容空气透入瓶內。瓶口包裹紗布, 瓶倒置, 容氮苯液濾去。用蒸餾水洗洋菜三次, 95% 乙醇洗两次, 乙醇浸过液, 瀝去乙醇。把洗过洋菜攪在紗布間, 鋪成薄层, 干化。处理的整个过程約需 10 天。洗去洋菜內的鎂, 可以把洋菜反复地浸在 10% 氯化鈉液內, 随后用蒸餾水洗到沒有自由氯存在。

又法, 把洋菜裝在袋內, 悬在盛有蒸餾水的玻器內, 2 或 3 天, 每天換水两次, 每次換水时挤出洋菜所含有的水。直接加入培养液內。

又法: 把洋菜攪在滲濾器內, 繼續用 5% 水溶氮苯、蒸餾水, 1% 盐酸和蒸餾水浸漬后, 用氫氧化鈣中和, 洗去余鈣, 用 95% 乙醇部分去水, 在 40°C 下干燥。

已經用过的洋菜, 尚可供普通培养基重用。已培养过的洋菜培养基, 随时收集, 灭菌, 干燥后磨碎, 用普通水洗, 移去能溶解的物质, 滤去水, 干燥, 随时应用。在使用前, 在每 1000 毫升重用的洋菜液內, 加活性炭約 10 克, 攪拌, 过滤, 即能应用。

[1] 綿霉属菌培养基

淀粉(可溶性)	3 克
朊	1 克
苕子(10 克)热水浸漬液	少量
洋菜	20 克
蒸餾水	1000 毫升

内含:

盐 类	克分子濃度	% (約)
磷酸二氫鉀	3×10^{-4}	0.00045
硫酸鎂	1.2×10^{-4}	0.0003
氯化鈣	10^{-5}	0.0001
氯化鉄	10^{-6}	0.000016
硫酸鋅($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	10^{-7}	0.000003

綿霉属菌(*Achlya*)对水內溶解的物質十分敏感, 因此需用已知成分的培养基, 已往所用的蒸餾水均用活性炭处理, 以吸去可能影响菌生长的物質。这个培养基供給 *Achlya ambisexualis* 菌作杂交, 研究有性生殖用。

[2] 綿霉菌培养液

黄玉米粉	5 克
酵母浸漬物	1 克
葡萄糖	2.5 或 5 克
蒸餾水	1000 毫升

如制配固体培养基, 每 1000 毫升培养液內加洋菜 15 克、酵母浸漬物 0.5 克。黄玉米粉, 如用浸漬水, 可先浸在蒸餾水內煮半小时, 再用离心机处理, 仅用上层浸漬水。

容量 200 毫升, 三角瓶內、装培养基 20 毫升。培养基供研究 *Achlya colorata* 菌有性世代用。

[3] 綿霉菌培养液

有下列各种:

(1) 蕈菌 grub;

- (2) 0.05% 血球朊 + 0.2% 磷酸盐 (生长最旺);
- (3) 0.05 血球朊 + 0.2% 硝酸钾;
- (4) 0.05 血球朊 + 0.1% 磷酸钾 + 0.1% 硫酸钾;
- (5) 0.05 % 血球朊 + 0.1% 磷酸钾 + 0.1% 氯化钠;
- (6) 0.05% 血球朊 + 0.1% 磷酸一氢钠 + 0.1% 硫酸钾;
- (7) 0.05% 亮氨酸;
- (8) 0.05 亮氨酸 + 0.1% 磷酸钾;
- (9) 0.05% 亮氨酸 + 0.1% 磷酸钙 (抑制菌生长, 但转入新鲜水内后, 经 12 小时后; 菌能产生大量雄器)。

[4] 曲霉菌分解纤维质培养基

酵母浸渍物	0.01%
硫酸镁	0.03%
硝酸氨	0.1%
1/100 克分子磷酸盐	0.1%

开始 pH 值为 6.3。玻管 (20×150 毫米) 内捆 1×3 寸布条和加入培养液 9 毫升, 灭菌后, 冷却, 接种 *Aspergillus* 菌孢子悬浮液 1 毫升, 在 30°C 下培养两星期。

[5] 异水霉 *Allomyces* 菌培养基

	培养基 A	培养基 B
葡萄糖	0.5%	0.3%
dl-谷氨酸	0.1%	0.1%
dl-蛋氨酸	0.01%	0.01%
磷酸二氢钾	0.05%	0.2%
硫酸镁	0.025%	0.01%

硫酸氮	0.1%	0.1%
氯化鈣		0.001%
維生素 B-盐酸	20 微克/100 毫升	15 微克/100 毫升
蒸餾水	1000 毫升	1000 毫升

培养基配成后, 用氫氧化鉀調配到 pH 7, 灭菌, 供研究 *Allomyces* 菌生理用。

[6] 异水霉 *Allomyces* 菌培养液

最低培养基

葡萄糖	1 克
天門冬酰胺	0.1 克
硫酸鎂	0.05 克
1/150 克分子磷酸二氫鉀	50 毫升
1/150 克分子磷酸鈉	50 毫升
dl-蛋胺酸	2.5 毫克
維生素 B	1 微克

完全培养基

葡萄糖	1 克
天門冬酰胺	0.10 克
硫酸鎂	0.05 克
1/150 克分子磷酸二氫鉀	50 毫升
1/150 克分子磷酸鈉	50 毫升
酵母浸漬物	0.4 克

在高压灭菌前, pH 值为 6.8。如需用固体培养基, 在上液內加 2% 洗淨的洋菜。供研究 *Allomyces arbusculus* 遺傳突变用。把游动孢子悬浮液接种在玻皿內的最低培养基上, 在 25°C 下培养 48 小时, 当菌落

发展后,在培养基上再倒上一层完全培养基(固体培养基)。

[7] 彈囊菌属(*Ascobolus*)培养基

酵母浸漬物-葡萄糖培养基

酵母浸漬物	4 克
葡萄糖	10 克
洋菜	25 克
蒸餾水	1000 毫升

供营养生长用。

酵母浸漬物-纖維素培养基

酵母浸漬物	0.25—3 克
纖維質(濾紙直徑 9 厘米)	每玻皿內一張
洋菜	25 克

供 *Ascobolus* 菌生长子实体用。

[8] 阿舒氏囊霉属菌最低培养基

葡萄糖	5 %
天門冬酰胺或硫酸氨(純品)	0.2 %
磷酸二氫鉀	0.15 %
硫酸鎂(純)	0.05 %
环己六醇	0.02
維生素 B-盐酸	500 毫克 %
d-促生素(Biotin)	1 微克 %
洋菜	1.5 %
蒸餾水	100 毫升

調配到 pH 6.5, 在 121.5°C 下, 灭菌 20 分钟。这个培养基仅含有

为菌的生长不可缺少的营养成分。为培养棉病囊霉 (*Ashbya gossypii*) 作促生素生物测定的培养用。

[9] Wickerham M-Y 培养基

朊	0.5%
酵母浸渍物	0.3%
麦芽浸渍物	0.3%
葡萄糖	1.0%
洋菜	2.0%
蒸馏水	1000 毫升

不必调配 pH 值, 灭菌后为 pH6。在 121.5°C 下, 灭菌 20 分钟。
这个培养基供棉病囊霉 (*Ashbya gossypii*) 产生维生素 B₂ 用。

[10] Olive 5 号培养基

洋菜	20 克
麦芽糖	3 克
朊	1 克
蒸馏水	1000 毫升

[11] Olive F-13 培养基

洋菜	20 克
麦芽糖	1.5 克
朊	0.04 克
蒸馏水	1000 毫升

按 Olive 用 Olive 培养基 5 号, F-13 和 Czapek 培养基三种培养基, 研究曲霉菌 (*Aspergillus fischeri*) 的子囊壳的发育。在三种培养基

上均产生子囊壳。在 Czapek 培养基上面, 营养菌絲生长最繁盛; 在 5 号培养基上, 营养菌絲生长很繁盛; 在 F-13 培养基上, 营养菌絲生长最少, 但子囊壳产生最多(糖含量最少)。

[12] Moyer 曲霉菌产生孢子培养基

葡萄糖	165 克
脲	1 克
硫酸鎂	0.05 克
磷酸二氫鉀	0.06 克
硝酸鉀	0.5 克
酒石酸鉄	0.04 克
洋菜	30 克
蒸馏水	1000 毫升

供黄曲霉(*Aspergillus flavus*)和黑曲霉(*A. niger*)产生孢子用。*A. flavus* 在 22—24°C 下培养, *A. niger* 在 30°C 下培养。

[13] 改訂 Kogl 和 Fries 培养基

葡萄糖	20 克
磷酸二氫鉀	1 克
硫酸鎂	0.5 克
醋酸氨	2.5 克
硫酸氨	5 克
氯化鈣	0.1 克
氯化鈉	0.1 克
氯化鉄(1%液)	几滴

促生素	0.4 微克
維生素 B-盐酸	40 微克
內消旋环己六醇	10 毫克
Tween 80	1% 容量/容量
蒸餾水, 配成	1000 毫升

这个綜合培养基供 *Ashbya gossypii* 菌生长产生維生素 B₂, 培养基內必需含有 Tween 80 和醋酸氨。

[14] 改訂 Robbins 和 Schmidt 培养基

蔗糖	20 克
磷酸二氫鉀	0.5 克
硫酸鎂	0.5 克
醋酸氨	5 克
d, l-天门冬酰胺	1 克
硼	0.01 克
鉬	0.02 克
鉄	0.2 p. p. m
鋅	0.18 p. p. m
銅	0.04 p. p. m
錳	0.02 p. p. m
維生素 H(促生素)	0.4 微克
維生素 B-盐酸	0.2 微克
內消旋环己六醇	0.2 克
Tween 80	1% 容量/容量
蒸餾水, 配成	1000 毫升

供培养 *Ashbya gossypii* 菌生长, 产生維生素 B₂ 用。

〔15〕 曲霉菌乳糖-玉蜀黍浸漬物培养基

乳糖	20 克
玉蜀黍浸漬物	20 克
硝酸鈉	3 克
磷酸二氫鉀	0.5 克
硫酸鎂	0.25 克
硫酸鋅	0.04 克
蒸餾水	1000 毫升

供构巢曲霉 (*Aspergillus nidulans*) 菌产生青霉素发酵用的培养液。容量 1000 毫升三角瓶内装培养液 500 毫升, 在摇床上每分钟摇动 92 转, 在 24°C 下培养。用玉米浸渍物 4% 和乳糖 2%, 产量最高。可用大豆粉代玉米浸渍物, 但作用仍不及玉米浸渍液。

〔16〕 曲霉菌产生孢子培养基

葡萄糖	91.5 克
硝酸氨	0.45 克
磷酸二氫鉀	0.072 克
硫酸鎂	0.06 克
啤酒	60 毫升
蒸餾水, 配成	1000 毫升

如配制固体培养基, 则在上液内加洋菜 30 克, 碳酸鈣 0.5 克。这种培养基供 *Aspergillus niger* 产生孢子用。

〔17〕 曲霉菌产生孢子培养基

葡萄糖	50 克
-----	------