



植物病害制片技术

贺运春 编著

ZHIWU BINGHAI ZHIPIAN JISHU

中国农业出版社

33
03

图书编号 (CIP) 数据

中国农业出版社 北京 贺运春 编著 植物病害制片技术

植物病害制片技术

ISBN 7-109-07501-X

贺运春 编著

植物病害制片技术是植物病理学的重要组成部分，也是植物病理学教学和科研中必不可少的基本技术。本书在总结作者多年从事植物病害制片工作的经验基础上，结合国内外有关文献，系统地介绍了植物病害制片的基本原理、方法和步骤。全书共分五章，第一章介绍植物病害制片的基本原理和常用材料；第二章介绍植物病害制片的基本步骤；第三章介绍植物病害制片的常用方法；第四章介绍植物病害制片的常用试剂；第五章介绍植物病害制片的常用设备。本书可作为植物病理学教学和科研的参考书，也可供从事植物病害制片工作的技术人员参考。

本书由贺运春编著，中国农业出版社出版。全书共分五章，第一章介绍植物病害制片的基本原理和常用材料；第二章介绍植物病害制片的基本步骤；第三章介绍植物病害制片的常用方法；第四章介绍植物病害制片的常用试剂；第五章介绍植物病害制片的常用设备。

植物病害制片技术 贺运春 编著
中国农业出版社 北京 100026
(书号 7-109-07501-X)

植物病害制片技术 贺运春 编著
中国农业出版社 北京 100026
(书号 7-109-07501-X)

植物病害制片技术 贺运春 编著
中国农业出版社 北京 100026
(书号 7-109-07501-X)

中国农业出版社

(本图书出版前，曾蒙中国农业出版社出版部审阅)

图书在版编目 (CIP) 数据

植物病害制片技术/贺运春编著. —北京: 中国农业出版社, 2002. 3
ISBN 7-109-07501-X

I. 植... II. 贺... III. 植物病害-切片 (生物学) -
制作 IV. S432

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2002) 第 008792 号

中国农业出版社出版

(北京市朝阳区农展馆北路 2 号)

(邮政编码 100026)

出版人: 沈镇昭

责任编辑 张洪光

北京科技印刷厂印刷 新华书店北京发行所发行

2002 年 3 月第 1 版 2002 年 3 月北京第 1 次印刷

开本: 850mm×1168mm 1/32 印张: 3.25 插页: 2

字数: 80 千字 印数: 1~1000 册

定价: 9.80 元

(凡本版图书出现印刷、装订错误, 请向出版社发行部调换)

前 言

植物病害主要是由于病原物寄生于植物组织内外，使植物进行非正常生理变化的过程。因此，植物病害制片包含了植物制片与病原物制片两方面内容。它是以植物制片技术为基础，又与植物制片有所不同的专门制片技术。

本书介绍了植物病害制片的基本原理和常用的七种制片方法。其中快速石蜡制片是作者经过多年实践，不断总结和改进的制片方法，这一方法克服了传统的石蜡制片法耗费时间长的缺点。本书可供植保工作者、生物工作者及农、林等院校师生参考之用。

由于编者业务水平有限，书中不妥之处，敬请指正。

贺运春

于山西农业大学

2001年10月

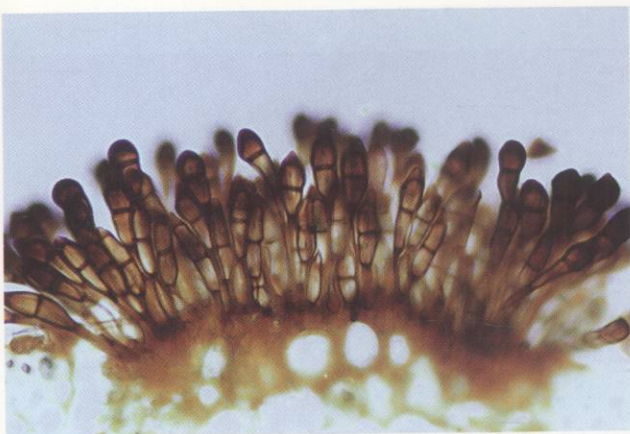


图1 小麦秆锈病菌(*Puccinia graminis*)冬孢子堆纵切面
× 330, 石蜡包埋, 切片厚度12μm, 酸性品红马蒂阿黄染色, 加拿大树胶封固

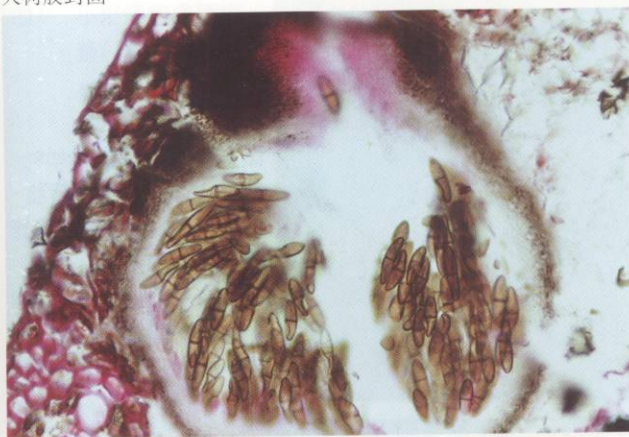


图2 小麦秆枯病菌(*Gibberella cerealis*)子囊壳纵切面

× 330, 石蜡包埋, 切片厚度12μm, 番红结晶紫橘红G染色, 加拿大树胶封固

图3 棉花枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*)在导管中的分生孢子和菌丝(苗期)
× 660, 石蜡包埋, 切片厚度10μm, 番红固绿染色, 加拿大树胶封固

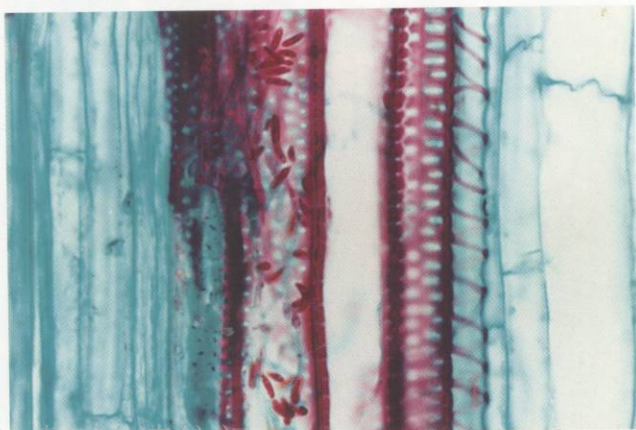


图4 向日葵菌核(*Sclerotinia sclerotiorum*)剖面

× 330, 石蜡包埋, 切片厚度
11μm, 番红染色, 加拿大树
胶封固

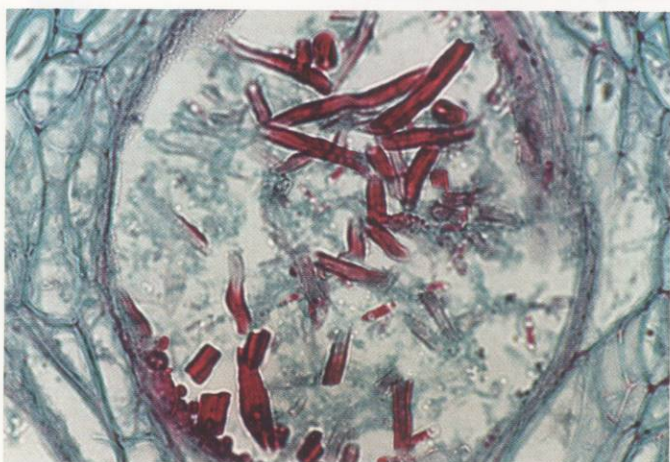
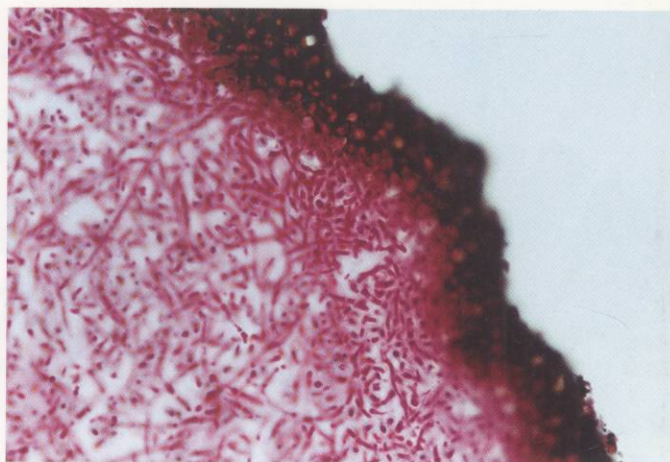


图5 立枯病菌(*Rhizoctonia solani*)菌丝
侵染西瓜根部导管
横切面

× 900, 石蜡包埋, 切片厚度
10μm, 番红固绿染色, 合成
树脂封固

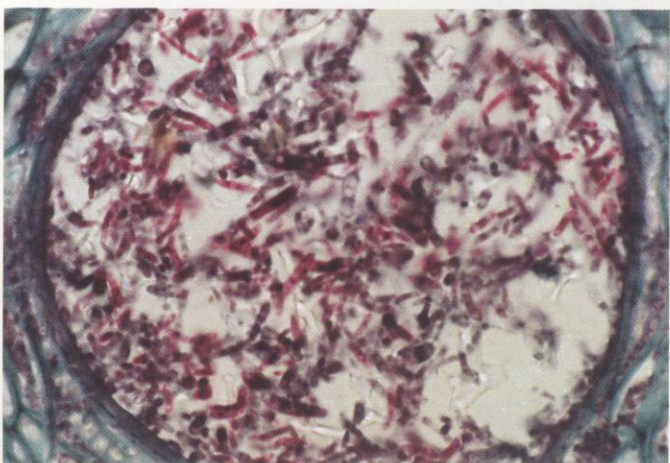


图6 西瓜枯萎病菌
(*Fusarium oxysporum*
f.sp. *niveum*)导管
中的分生孢子与菌
丝

× 900, 石蜡包埋, 切片厚度
10μm, 番红固绿染色, 合成
树脂封固



图7 苹果树腐烂病菌
(*Valsa mali*)分生
孢子器纵切面

× 92, 石蜡包埋, 切片厚
度12μm, 番红染色, 加拿
大树胶封固

图8 小麦矮腥黑穗病
菌(*Tilletia con-
troversa*)冬孢子
(美国)

× 920, 甘油乳酸封固

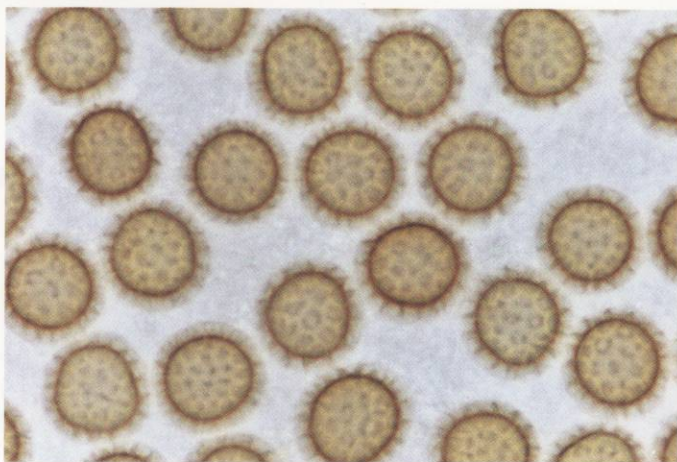
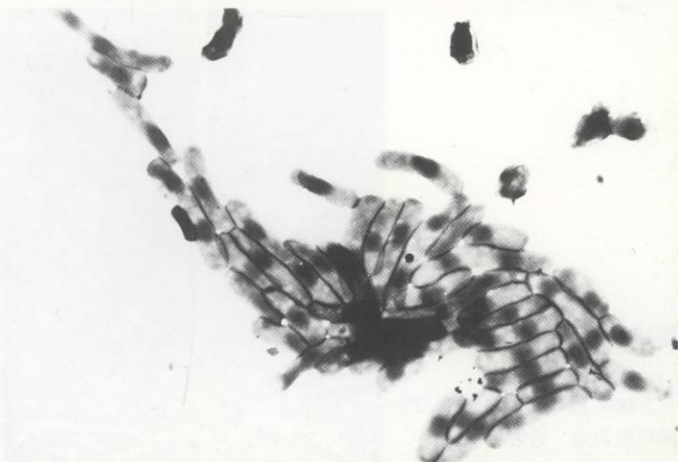


图9 马铃薯环腐病菌
(*Corynebacterium
sepedonicum*)细
菌孢子

× 7500, PDA斜面培养, 1%
磷钨酸负染, 透射电镜照片



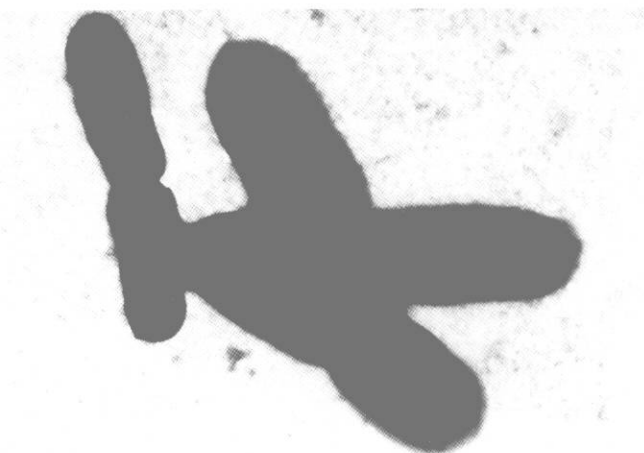


图 10 白菜软腐病菌 (*Erwinia carotovora*) 细菌孢子

× 27000, PDA 斜面培养, 2% 磷钨酸负染, 透射电镜照片

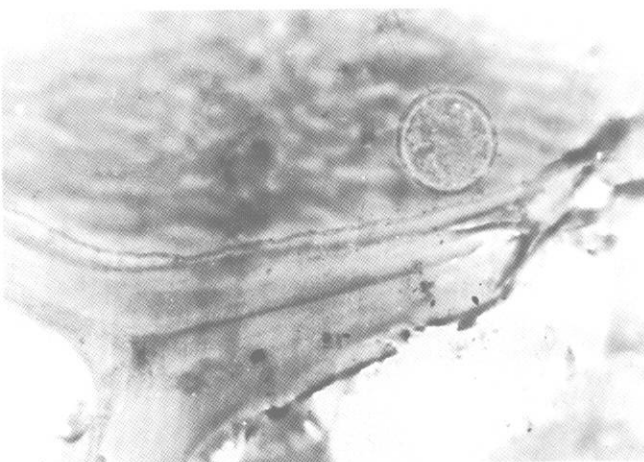


图 11 棉花枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*) 在导管中的菌丝形态结构

× 7500, 环氧树脂包埋, 超薄切片厚度 0.03μm, 醋酸铀与柠檬酸铅染色, 透射电镜照片

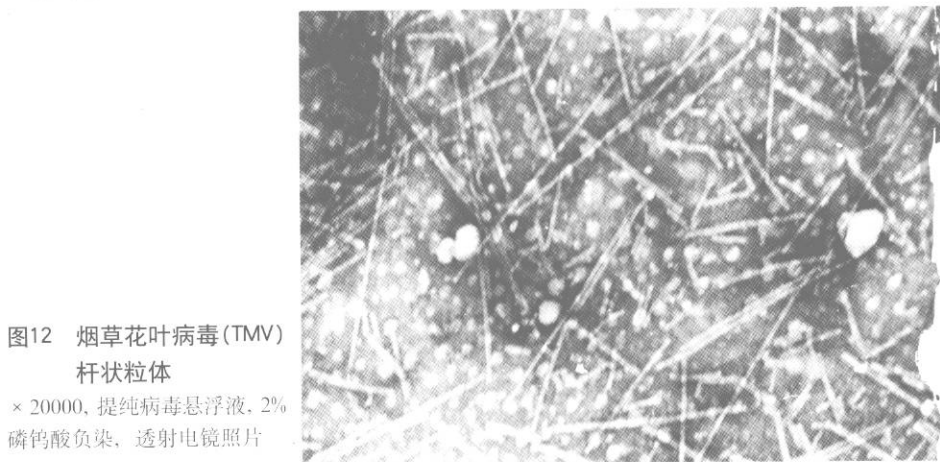


图12 烟草花叶病毒(TMV) 杆状粒体

× 20000, 提纯病毒悬浮液, 2% 磷钨酸负染, 透射电镜照片

目 录

一、引言	1
二、植物病害制片的基本条件与要求	3
(一) 植物病害制片的基本设备与试剂	3
(二) 植物病害切片标本采集与取材	8
(三) 制作切片应注意事项	12
三、植物病害制片的一般原理	14
(一) 固定作用与固定剂	14
(二) 脱水作用与脱水剂	22
(三) 透明作用与透明剂	25
(四) 石蜡渗透与石蜡	26
(五) 制片的其他用剂	28
四、植物病害切片染色	35
(一) 染色原理	35
(二) 常用染料	42
(三) 染色方法与步骤	45
五、植物病害制片方法	54
(一) 快速石蜡制片法	54
(二) 整体封固制片法	66
(三) 徒手切片制片法	82
(四) 冰冻切片制片法	84
(五) 薄切片制片法	85
(六) 超薄切片制作法	92
(七) 病原体负染膜制作法	97

一、引言

植物病害是由于植物受到病原生物侵染（侵染性病害）并寄生于植物组织内外，在生理生化和组织形态等方面发生异常而进行的非正常的生理变化过程。植物病害由寄主植物与病原物二者构成了一个矛盾的统一体。因此，植物病害制片包含了植物制片与病原物制片两方面内容，它是以植物制片技术为基础，又与植物制片有所不同的专门制片技术。

1845 年爱尔兰岛因马铃薯晚疫病大流行，造成几十万人饥饿死亡和大量移民。当时的科技工作者利用光学显微镜观察研究，发现了植物病害的存在，之后相继又观察到了多种严重危害作物的病害。随着人们对植物病害多年的研究和更深入的认识，以及研究手段和技术的不断提高，逐步形成了植物病理学这一学科。植物病理学 100 余年发展的历史，也就是植物病害制片技术发展的历史，从初期利用光学显微镜对植物病原物的一般形态特征进行描述、鉴定、分类及其在植物体内存在状态的研究，到进一步对病原物的侵入、扩展和致病机理，植物形态学方面的抗病机制等的进行研究都离不开植物病害制片技术。1940 年发明电子显微镜，并广泛应用于生物界，超薄切片等技术也有了很大发展。用电镜可以观察研究病原物更细微的形态特征，包括病原物的细胞分裂、内含体、繁殖体的发育过程及与植物组织细胞之间更为密切的相互关系等各方面研究都取得了突破性进展。因此，植物病害制片技术及其发展为植物病理学发展作出了突出贡献。在生产实践中这一技术也同样发挥了重要作用，是当前植保、植病工作者不可缺少的一种基本技能。

植物病害制片技术现已广泛应用于农作物和林木病害诊断、

病原物鉴定、病害防治、植物检疫与抗病育种等领域。本书可供植保、农学、园艺、园林、生物等专业师生参考之用。

本书概括了植物病害制片的7种常用方法，对于学习和研究植物病理学的工作者来说，掌握其中几种制片方法是必须的。在掌握植物病害制片技术之前，了解和熟悉植物病害制片基本原理最为重要。在实践中可根据观察研究的目的和任务、材料特性及设备条件等，确定用什么方法制片，加以灵活应用。制片方法有很多种，还不能说尽善尽美，包括作者经多年实践，不断总结和改进的快速石蜡制片法，都需要在今后应用中不断改进，不断创新，加以完善。

另外，在植物病害制片过程中，常会遇到很多困难和问题，甚至失败。如切不出理想切片、材料变硬变脆、染色过深或过浅、病原物与寄主组织不易区分、硬材料软化等等，应仔细分析其原因，反复试验，坚持不懈，以便找到改进和解决问题的方法，决不能气馁。只要不断努力，及时总结提高，一定会取得成功。

本书在编写过程中，参考了国内外许多有关植物病害制片的书籍和文献，并得到了许多同行专家的指导和帮助，在此表示衷心的感谢。由于编者水平有限，书中难免存在不足之处，恳请读者批评指正。

二、植物病害制片的基本条件与要求

从事植物病害制片工作之前，必须有一些准备工作，应具备一定的工作条件，下面简要介绍植物病害制片所需基本设备及试剂。本书也介绍超薄切片法，由于此种制片法所需仪器设备特别昂贵，一般植病制片室不能具备，只有在专用电镜室使用，此类设备不在本书中介绍。

(一) 植物病害制片的基本设备与试剂

在植物病害制片过程中，需要以下基本的仪器设备和常用药剂及染料。

1. 仪器设备

(1) 普通仪器

1) 显微镜 一般需用两台显微镜，一台普通显微镜供检查刀口和切片染色情况之用，另一台高级显微镜供研究观察用。

2) 双筒解剖镜 用做植物病害症状观察和选做制片所取部位时用。

3) 切片机

普通回转切片机：手轮回转切片机作石蜡切片和冰冻切片用。

电脑切片机：具采用单片计算机系统控制切片厚度等优点，但价格较贵，用途同上。

4) 切片机的附属设备

切片刀：目前多用两面平直短的切片刀（110mm 或 120mm 长），并附有刀柄及弹簧夹，供磨刀及荡刀时用。

磨刀石：应具有粗磨刀石和细磨刀石（油用）两块，供磨刀

用。

磨刀机：较先进的磨刀机具，一般选用 ZMD-2 型自动磨刀机。

荡刀皮：皮革制的长条形带，供荡刀用。

5) 保温箱 用于熔蜡、浸蜡、烤片等用，要求温度范围在 25~60℃ 为宜。也可自制专用灯光熔蜡箱，使用也很方便，但必须在箱内四壁装有隔热材料。

6) 冰箱 制片时所用材料，采集新鲜材料作暂时保存和制作超薄切片时用。

7) 电温台 在粘片时用于展伸蜡带和烤片，恒温 36~40℃ (亦可用水温台代替)。

8) 医用吸引器 YB·DX23D 型电动吸引器 (上海医用吸引器厂) 较为适用。负压值 90.66kPa，使用方便，噪声小，可供快速石蜡制片中固定、脱水等过程中使用。

9) 天平 配制各种溶液药品时称量用。

10) 放大镜 供采集标本和室内观察植物病害症状和取材部位用。

(2) 玻璃器具

1) 真空干燥器 用作植物病害快速制片过程中，材料固定、脱水、透明、浸蜡抽气，选用口径为 15~18cm 的为宜。

2) 染色缸 通常有立式和卧式两种。立式一般为 5 片装，容量较小，节省药液，卧式 10 片装，用药量较多，口较大，染液易蒸发。

3) 载玻片 普通常用的规格为 75mm×25mm，厚度为 1~1.5mm，以平整无杂质为好。

4) 盖玻片 有圆形、方形和长方形等多种规格，方形的多用 18mm×18mm 或 22mm×22mm。长方形的 22mm×40mm~22mm×60mm，供作连续切片时用。

5) 量筒 应备有 25ml、50ml、100ml、200ml、500ml 几种

不同容量。

6) 烧杯 备有 25ml、50ml、100ml、500ml 等几种不同容量。

7) 指形管 固定材料和脱水等用,也可用医院已用过的青霉素玻璃瓶(带橡胶盖)代替指形管。

8) 广口瓶和细口瓶 应备有各种容积(30~1 000ml)广口瓶和细口瓶,放固定液及脱水剂等。

9) 滴瓶 根据需要准备数个。

10) 漏斗 可供过滤染液时用,有口径 50mm 和 100mm 两种。

11) 树胶瓶 通常使用有密封盖的,由于放置时间较长,盖不易打开,而损坏密封盖,暂时不用时,可用废二甲苯液泡全瓶,但要防止废二甲苯液浸入树胶内。

(3) 其他一般用具

1) 解剖器 包括解剖刀、解剖针、剪刀、大镊子、小镊子、单面刀片等。

2) 切片盒 存放切片用。

3) 切片盘 存放蜡带,也可用植病标本盒代替。

4) 温度计 温箱、熔蜡箱等仪器测试温度时使用。

5) 毛笔 切片时用以取片。

6) 滤纸 过滤染液或清洁切片等用。

7) 清洁用布 纱布及白绸布。

8) 木载蜡块 根据需要可用硬木作成 2cm×2cm 木块,以便固着石蜡用。

2. 常用试剂

95%酒精

无水酒精 (absolute alcohol)

甲醇 (methanol)

甲醛 (formaldehyde)

醋酸 (乙酸) (acetic acid)

丙酸 (propionic acid)

盐酸 (hydrochloric acid)

硝酸 (nitric acid)

硫酸 (sulfuric acid)

乳酸 (lactic acid)

高锰酸钾 (potassium permanganata)

草酸 (oxalic acid)

氢氧化钠 (sodium hydroxide)

氢氧化钾 (potassium hydroxide)

氯化铁 (ferric chloride)

铁矾 (iron alum)

正丁醇 (nor-butylalcohol)

叔丁醇 (tertiary butyl alcohol)

丙酮 (acetone)

苯 (benzene)

二甲苯 (xylene)

甲苯 (toluene)

丁香油 (clove oil)

香柏油 (ceder oil)

石炭酸 (苯酚) (carbolic acid, phenol)

纤维素乙酸脂 (cellulose acetate)

铁明矾 (lrom alum)

阿拉伯胶 (Arabic gum)

明胶 (gelatin)

石蜡 (paraffin)

加拿大树胶 (Canadin balsam or Canada balsam)

火棉胶 (celloidin)

3. 常用染料

番红 (safranine)
洋红 (carmin)
地衣红 (orcein)
橘红 G (orange G)
苏木精 (haematoxylin)
苏丹Ⅲ或Ⅳ (Sudan Ⅲ or Ⅳ)
俾斯麦棕 (Bismark brown)
中性红 (neutral red)
固绿 (fast green)
亮绿 (light green)
甲基绿 (methyl green)
甲基紫 (methyl violet)
亚甲蓝 (methylene blue)
苯胺蓝 (aniline blue)
酸性品红 (acid fuchsin)
碱性品红 (basic fuchsin)
结晶紫 (crystal violet)
曙红 (eosin)
真曙红 (erythrosin)
钌红 (ruthenium red)
甲基橙 (methyl orange)

4. 薄切片与超薄切片法应用试剂

戊二醛 (glutaraldehyde)
丙稀醛 (acrolein)
环氧树脂 (Epon812)
环氧丙烷 (propylene oxide)
乙二醇甲基丙烯酸酯 (GMA, glycolmethacrylate)
聚乙二醇 (Poly, polyethylene glycol)
过氧化苯酰 (benzoyl peroxide)

Spurr 环氧树脂 (ERL - 4206, VCD, Vinylcyclobexene dioxide)

3 - 二甲氨基苯酚 (DMP - 30, 3 - dimethylaminomethylphenol)

NSA 固化剂 (nonenyl succinic)

DDSA 固化剂 (dodecenylsuccinic anhydride)

DMAE 加速剂 (2 - dimethylamnoethanol)

苯乙烯 (phenylethylene)

多聚甲醛 (paraformaldehyde)

磷酸氢二钠 (disodium, hydrogen phosphate)

磷酸二氢钠 (sodium biphosphata)

磷酸 (phosphoric acid)

钼酸 (osmic acid)

醋酸铀 (uranium VI acetate)

柠檬酸钠 (sodium citrate tribasic)

硝酸铅 (lead II nitrate)

氢氧化铅 (lead II hydroxide)

磷钨酸 (phosphotungstic acid)

(二) 植物病害切片标本采集与取材

制作植物病害切片, 供教学或研究观察使用, 第一步是采集植物病害标本。根据制片的目的要求, 应针对性的采集病害标本, 如采集、选材得好, 就为制做好的切片打下了良好基础。

1. 植物病害切片标本采集

植物病害标本采集的用具有标本夹、标本筒、放大镜、刀、剪、小锄、小锯、标本纸、纸袋、标签和记录本等。如较远距离采集标本, 还应带固定液、指形管 (带盖) 等。

植物病害标本主要有病的根、茎、叶和果实等。如果要观察