

# 植物病原学实验指导

主编：刘大伟

东北农业大学

# 植物病原学实验指导

主 编：刘大伟

副主编：潘春清

主 审：文景芝

东北农业大学

## 目 录

实验须知	1
实验一 植物病害的症状观察	2
实验二 植物病原壶菌、接合菌及其所致病害症状观察	3
实验三 植物病原子囊菌及其所致病害症状观察（一）	4
实验四 植物病原子囊菌及其所致病害症状观察（二）	5
实验五 植物病原半知菌及其所致病害症状观察（一）	7
实验六 植物病原半知菌及其所致病害症状观察（二）	9
实验七 植物病原担子菌及其所致病害症状观察	11
实验八 植物病原根肿菌、卵菌及其所致病害症状观察	13
实验九 植物病原细菌及其所致病害症状观察	15
实验十 植物病原病毒及其所致病害症状观察	17
实验十一 植物病原线虫及其所致病害症状观察	19

## 实验须知

1. 实验前必须认真阅读实验指导，明确本次实验的目的要求，了解本次实验的内容。
2. 实验课必须携带实验指导、实验报告、绘图铅笔、铅笔刀、软橡皮和指定参考书。
3. 实验时必须按照规定的程序方法操作，要细心谨慎，认真观察，做好实验记录。
4. 实验结果应如实记载，不得臆造，绘图力求正确，不得潦草，需指明各部分名称。
5. 必须爱护和节省实验材料，不得浪费，剩余材料应放回原处。
6. 使用仪器时要按要求操作，取、放显微镜时应一手握住镜臂，一手拖住底座，使显微镜保持直立，防止镜头滑落地面而损坏。
7. 实验用过的菌种及带有活菌的各种器皿应先经高压灭菌后才能洗涤，制片上的活菌应先浸泡于 3%来苏尔或 5%石炭酸溶液中半小时后再洗刷。
8. 实验完毕后，应将仪器放回原处，擦净实验台，收拾整齐，并用肥皂洗手。

## 实验一 植物病害的症状观察

植物生病后在生理和形态上均可发生改变，患病植物外部形态的反常现象就是症状。症状是诊断植物病害的重要依据之一，可分为病状和病征两种类型。病状是指植物生病后本身形态上表现出的各种异常变化，病征是指病原生物在植物罹病部位所形成的特征性结构。

### 一、目的要求

通过本实验了解植物病害的种类及多样性，认识病害对农业生产的危害性，掌握规范描述和记载植物病害症状的方法，为学习和掌握植物病害的诊断技术奠定基础。

### 二、内容、材料和方法

#### （一）植物病害的病状类型

1. 变色：大多发生在叶片，由于叶绿素的形成受阻或破坏而发生不同程度的褪绿或出现其他色素。变色的主要类型有褪绿、黄化、花叶和斑驳。观察黄瓜花叶病标本。

2. 坏死：植物局部细胞和组织的死亡，常随病原和发病部位而表现不同的坏死类型：斑点、枯死、穿孔、疮痂、溃疡、猝倒、立枯等。观察水稻白叶枯病、马铃薯晚疫病、柑橘疮痂病、番茄溃疡病、瓜苗猝倒病标本。

3. 腐烂：植物组织较大面积的分解和破坏。根、茎、叶、花、果都可发生腐烂，幼嫩或多肉的组织则更容易发生。根据组织分解的程度不同，可分为干腐、湿腐和软腐。观察大白菜软腐病、甘薯茎线虫病、苹果树腐烂病、柑橘贮藏期青霉病标本。

4. 萎蔫：全株茎叶呈失水状萎垂甚至枯死，引起植物萎蔫的原因有生理性和侵染性两种，典型的萎蔫症状是指植物根茎的维管束组织受到破坏而发生的凋萎现象。观察黄瓜枯萎病、番茄青枯病、茄子黄萎病标本。

5. 畸形：由于病组织或细胞的生长受阻或过度增长而造成的形态异常，包括叶、花、枝、果等各种反常生长的性状。常见的类型有矮化、徒长、丛生、发根、卷叶、蕨叶、瘤肿、菌瘿、畸果等。观察水稻恶苗病、大白菜根肿病、番茄根结线虫病、玉米瘤黑粉病标本。

#### （二）植物病害的病征类型

1. 粉状物：某些卵菌和真菌一定量孢子在病部所表现的特征，出现的部位、形状、颜色各不相同，常见的类型有锈粉、黑粉、白粉和白锈。观察玉米瘤黑粉病、黄瓜白粉病、小麦秆锈病标本。

2. 霉状物：由菌丝、孢子梗和孢子构成，霉层的颜色、形状、结构、疏密程度等随真菌和卵菌种类的不同而有差异，在空气湿度较高时，霉层易于产生和发现。常见的类型有霜霉、绵霉、毛霉、青霉和灰霉。观察番茄灰霉病、大豆霜霉病、稻瘟病标本。

3. 点状物：多种真菌繁殖器官（子囊壳、子囊盘、分生孢子器、分生孢子盘等）的表现特征，在植物受害部位形成的褐色或黑色小颗粒。观察苹果树腐烂病、榆树白粉病标本。

4. 菌核：发生在植物病部体表或茎秆内部髓腔中，常伴随整株或局部的腐烂或坏死。观察向日葵菌核病、稻曲病标本。

5. 菌脓：细菌性病害在植物病部表面溢出含菌体的粘液，白色或黄色。观察水稻白叶枯病组织的菌溢现象。

### 三、实验报告

1. 将上述所观察到的病害标本按下表内容填写。

#### 植物病害症状观察

病害名称	发病部位	病状类型	病征类型

#### 四、思考题

1. 植物病害的名称与病害症状特征有哪些联系？

## 实验二 植物病原壶菌、接合菌及其所致病害症状观察

壶菌门的真菌称为壶菌，是真菌界中唯一在生活史中的某些阶段产生能动细胞的成员。壶菌多为水生，大多腐生在动植物残体上或寄生于水生植物、藻类、小动物和其他真菌上，少数寄生于高等种子植物上。

接合菌门的真菌称为接合菌，也是真菌中比较低等的一类，这类真菌的营养体为无隔菌丝体，无性繁殖产生孢囊孢子，有性生殖产生接合孢子。接合菌门分两个纲：接合菌纲和毛霉纲，与植物病害关系较大的是接合菌纲中的毛霉目真菌。

### 一、目的要求

通过本实验了解壶菌门、接合菌门真菌的主要形态特征，掌握与植物病害有关的重要属的基本形态特征、分类依据及其所致病害的症状特点。观察真菌的异宗配合现象。同时，学习使用检索表来鉴定病菌，为分类鉴定打下初步基础。

### 二、内容、材料和方法

#### （一）壶菌门

##### 1. 节壶菌属 (*Physoderma*)

观察玉米褐斑病标本，注意发病部位，病斑大小、颜色，是否隆起？用解剖针挑破病斑可见到大量黄褐色的粉末，即病菌的休眠孢子囊，制片镜检休眠孢子囊的形态是否为扁球形圆壶状，具有囊盖。

#### （二）接合菌门

##### 1. 根霉属 (*Rhizopus*)

菌丝发达，有分枝，分布在基物表面或其内部，有假根和匍匐丝。孢囊梗 2~3 根丛生，在假根相反方向从菌丝上产生，一般不分枝，顶生孢子囊，产生大量孢囊孢子，有囊轴，钺锤形，孢囊孢子单胞，表面有纹饰。挑取培养皿中培养的根霉制片，镜检小黑点是什么器官？注意假根和匍匐丝的形态，孢囊梗着生的位置，能否见到囊轴？什么形状？

##### 2. 毛霉属 (*Mucor*)

无假根与匍匐丝，孢囊梗单生，直立，其它形态同根霉属。挑取培养皿中培养的毛霉制片，镜检孢囊梗、孢子囊和孢囊孢子，注意观察其与根霉属的区别。

##### 3. 笄霉属 (*Choanephora*)

该属真菌产生大、小两种类型的孢子囊。条件不适时，产生大型孢子囊，着生在顶端弯曲的孢囊梗上，其内产生孢囊孢子，孢子顶端有数根细毛。通常形成小型孢子囊，聚生在孢囊梗顶端膨大的头状体的小梗上。该菌为害花和果实，引起花腐和果腐，取制备片镜检笄霉的孢囊梗和孢子囊形态，注意观察该属与根霉属、毛霉属的区别。

##### 4. 犁头霉属 (*Absidia*)

产生假根和匍匐丝，孢囊梗着生在假根间的弓形匍匐丝上，与假根不对生，配囊柄上长出附属丝包围接合孢子。镜检犁头霉的假根、匍匐丝，注意孢囊梗着生的位置和根霉属有何不同。

### 三、实验报告

#### 1. 绘节壶菌属、根霉属和毛霉属的形态图。

### 四、思考题

#### 1. 结合所学的知识，谈谈什么是同宗配合、异宗配合？

### 实验三 植物病原子囊菌及其所致病害症状观察（一）

子囊菌门真菌简称子囊菌，是真菌中数量最多的一个类群，它们的形态、生活史、寄生性及所致病害症状千差万别。营养体除少数种类是单细胞外，大多数是发达、有隔膜、能分枝的菌丝体，而且很多种类可形成菌组织，形成子座、菌核等营养结构。无性繁殖产生分生孢子，有性生殖产生子囊孢子。

子囊菌的分类主要根据有性阶段的形态特征，根据是否形成子囊果、子囊果的类型和子囊的结构，分为六个纲：原子囊菌纲、不整囊菌纲、虫囊菌纲、核菌纲、腔菌纲和盘菌纲，其中与植物病害有关的主要有核菌纲、腔菌纲和盘菌纲。

#### 一、目的要求

通过本实验了解核菌纲白粉菌目真菌的形态特征及分类概况，掌握白粉菌中与植物病害有关的重要属的形态特征、分类依据及所致病害的症状特点，以便为白粉菌的分类和病害鉴定打下基础。

#### 二、内容、材料和方法

白粉菌目的真菌统称为白粉菌，都是高等植物上的专性寄生菌。以吸器伸入寄主表皮细胞吸取养分，子囊果为闭囊壳，其上生有各种形状的附属丝，根据附属丝的形态和闭囊壳内子囊的数目进行分类，常见的有以下七个属。

##### 1. 白粉菌属 (*Erysiphe*)

观察芍药白粉病标本，注意病部是否有白色粉状物和小黑点，挑取小黑点制片，镜检闭囊壳的形态，注意附属丝的形状和长短，然后用解剖针轻压盖片，挤压闭囊壳使之慢慢破裂，注意观察其内子囊的数目及形态，能否看到子囊孢子？

##### 2. 布氏白粉属 (*Blumeria*)

该属是从白粉菌属划出来的一个新属，观察小麦白粉病标本，注意病部是否有白色粉状物和小黑点，挑取小黑点制片镜检，注意附属丝呈短菌丝状，闭囊壳内子囊多个。

##### 3. 单丝壳属 (*Sphaerotheca*)

取黄瓜白粉病标本，观察症状特点。挑取小黑点制片镜检闭囊壳和附属丝的形态，注意附属丝菌丝状，闭囊壳内只有1个子囊。

##### 4. 叉丝壳属 (*Microsphaera*)

取丁香白粉病标本，观察症状特点。挑取小黑点制片镜检闭囊壳和附属丝的形态，注意附属丝刚直，顶端有数回二叉状分枝，末端常卷曲，闭囊壳内子囊多个。

##### 5. 叉丝单囊壳属 (*Podosphaera*)

取山楂白粉病标本，观察症状特点。挑取小黑点制片镜检闭囊壳和附属丝的形态，注意附属丝刚直，顶端有数回二叉状分枝，末端常卷曲，闭囊壳内只有1个子囊。

##### 6. 球针壳属 (*Phyllactinia*)

取梨白粉病标本，观察症状特点。挑取小黑点制片镜检闭囊壳和附属丝的形态，注意附属丝刚直，球针状，基部膨大呈半球状，顶端针状，闭囊壳内子囊多个。

##### 7. 钩丝壳属 (*Uncinula*)

取榆树白粉病标本，观察症状特点。挑取小黑点制片镜检闭囊壳和附属丝的形态，注意附属丝顶端卷曲呈钩状，闭囊壳内子囊多个。

#### 三、实验报告



1. 绘白粉菌属、叉丝壳属、球针壳属和钩丝壳属的形态图。
2. 编制白粉菌目白粉菌科主要属的检索表。

#### **四、思考题**

1. 白粉菌危害植物的特点如何？分类的主要依据是什么？

## 实验四 植物病原子囊菌及其所致病害症状观察（二）

### 一、目的要求

通过本实验了解核菌纲球壳目、腔菌纲和盘菌纲真菌的形态特征及分类概况，掌握与植物病害有关的重要属的形态特征、分类依据及所致病害的症状特点，以便为子囊菌的分类和病害鉴定打下基础。

### 二、内容、材料和方法

#### （一）核菌纲球壳目真菌

球壳目真菌的子囊果为有孔口的子囊壳，孔口乳突状或长筒状，子囊圆形、棍棒形或纺锤形，一般排列成子实层，子囊间大都有侧丝，也有的早期消解或没有，一般都有很发达的分生孢子阶段。球壳目真菌大多是腐生的，其中也有不少是寄生的，以下各属都可引起重要的植物病害。

##### 1. 长喙壳属（*Ceratocystis*）

取甘薯黑斑病标本，观察症状特点，注意病斑是否凹陷？其上是否有毛刺状物？毛刺状物为何物？挑取毛刺状物少许制片镜检，观察子囊壳是否呈烧瓶状？颈的长度约为子囊壳直径的几倍？孔口上是否有口须？能否看见钢盔形的子囊孢子和圆形的厚垣（分生）孢子？为什么看不见子囊？

##### 2. 小丛壳属（*Glomerella*）

取苹果炭疽病、菜豆炭疽病标本，观察症状特点，注意斑是否凹陷？其上是否有小黑点长出，小黑点为何物？取苹果炭疽病菌制备片镜检，观察子囊的形态，着生部位，壳外是否有毛状菌丝？能否看到子囊和子囊孢子？

##### 3. 黑腐皮壳属（*Valsa*）

取苹果腐烂病标本，注意观察发病部位、病斑形态、颜色、气味、小黑点大小及疏密程度等特点。取带小黑点的小块病皮组织切片，镜检子囊壳的形状、颜色、着生部位、子囊壳及子囊孢子的形态。子囊壳烧瓶形，子囊孢子腊肠形，单胞无色。

##### 4. 赤霉属（*Gibberella*）

取小麦赤霉病标本，观察为害部位及其上的淡粉色霉层，是否有小黑点？挑取带小黑点的病组织切片，镜检子囊壳的形状、颜色及着生情况，能否看到子囊和子囊孢子，形态如何？子囊壳孔口处细胞加厚呈深蓝色或紫色，子囊孢子梭形，无色，有2~3个隔膜。

##### 5. 顶囊壳属（*Gaeumannomyces*）

取水稻全蚀病标本，观察症状特点，注意受害部位、颜色，能否见到小黑点？挑取小黑点制片，镜检子囊壳、子囊和子囊孢子的形态。子囊圆柱形，子囊孢子线形，多分隔。

#### （二）腔菌纲真菌

腔菌纲真菌的主要特征是子囊果为子座性质的子囊座，子囊座内含一到多个子囊腔，每个子囊腔内通常含有多个子囊，另一个重要的特征是子囊双层壁。

##### 1. 痂囊腔菌属（*Elsinoe*）

取葡萄黑痘病标本，观察症状特点。取葡萄黑痘病菌制备片，镜检子囊着生状态，是否散生？能否见到多隔的子囊孢子？球形的子囊单生于子囊座内的子囊腔中，子囊孢子大多为长圆筒形，有3个横隔膜。

##### 2. 黑星菌属（*Venturia*）

观察苹果黑星病和梨黑星病标本，注意发生部位和黑色星状霉层。取苹果黑星病菌制备片，镜检子囊座着生位置及孔口周围少数黑色具分隔的刚毛，子囊是否平行排列？子囊孢子是否为双胞不等大？

### （三）盘菌纲真菌

盘菌纲真菌的主要特征是子囊果为子囊盘，子囊平行排列形成子实层。盘菌大多数是腐生的，只有少数是植物寄生菌。

#### 1. 核盘菌属 (*Sclerotinia*)

取油菜菌核病标本，观察菌核萌发形成的子囊盘。镜检油菜菌核病菌制备片，观察子囊盘的形状，棍棒状子囊平行排列，子囊孢子单胞，无色，椭圆形。

### 三、实验报告

1. 绘长喙壳属、赤霉属、痂囊腔菌属和核盘菌属的形态图。

### 四、思考题

1. 如何区别闭囊壳、子囊壳、子囊盘和子囊腔？

## 实验五 植物病原半知菌及其所致病害症状观察（一）

半知菌，严格地说，是未发现性阶段的子囊菌和担子菌的无性阶段，也称为无性繁殖真菌、有丝分裂孢子真菌或分生孢子真菌。半知菌的形态差异很大，引起的植物病害种类很多，主要产生斑点、腐烂、萎蔫等症状。

半知菌的分类主要根据无性阶段（分生孢子阶段）的形态特征，其分类单元（纲、目等）的性质属于“式样性”的，并不反映系统发育关系。半知菌分为三个纲：芽孢纲、丝孢纲和腔孢纲。芽孢纲真菌大多腐生，有些寄生在人和动物体上，与植物病害无关，而丝孢纲和腔孢纲的多数种类是重要的植物病原菌。

### 一、目的要求

通过对半知菌中重要的植物病原丝孢菌进行观察，基本识别丝孢菌的形态特征，了解半知菌的分类依据，为半知菌所致病害的鉴定打下基础。

### 二、内容、材料和方法

丝孢纲是半知菌中最大的一个纲，大多数是高等植物上危害严重的寄生菌。分生孢子着生于分生孢子梗或分生孢子座上，该纲分为四个目，即无孢目、丝孢目、束梗孢目和瘤座孢目。

#### （一）无孢目

无孢目是无性态不产生分生孢子而以有隔菌丝繁殖的一类真菌，有时形成菌丝变态结构，如厚垣孢子、菌核等。

##### 1. 丝核菌属（*Rhizoctonia*）

菌核褐色或黑色，内外颜色一致，老熟菌丝褐色多直角分枝，在分枝处有缢缩。取水稻纹枯病标本观察症状特点，挑取培养皿中培养的立枯丝核菌制片，镜检菌丝颜色、分枝和分隔的特点。

#### （二）丝孢目

丝孢目真菌分生孢子着生于裸露而散生或丛生的分生孢子梗上，或直接着生在菌丝上。该目包括淡色孢科和暗色孢科两个科，其中许多属都是重要的植物病原菌。

##### 1. 粉孢属（*Oidium*）

取小麦白粉病标本观察症状特点，注意受害部位的白色粉状物，镜检白粉病菌制备片，注意观察分生孢子梗及分生孢子的形态特点，分生孢子梗是长还是短？梗是否分枝？分生孢子是否单胞？是否链生？孢子成熟的顺序如何？

##### 2. 丛梗孢属（*Monilia*）

取苹果褐腐病标本观察症状特点，注意病部呈轮纹状排列的灰白色霉层，镜检苹果褐腐病菌制备片，注意分生孢子梗是否分枝？分生孢子连接特点及孢子成熟顺序之间有什么不同？与粉孢属有何异同？

##### 3. 曲霉属（*Aspergillus*）

镜检曲霉病菌的制备片，注意观察分生孢子梗较长、直立、不分枝、顶端膨大、上面生1~2层放射形分布的瓶状小梗，以及串生在小梗上的分生孢子特点。

##### 4. 青霉属（*Penicillium*）

观察苹果青霉病标本，注意其霉烂状与梨褐腐病的霉烂状有何不同，挑取培养皿中培养的青霉制片，镜检分生孢子梗和分生孢子，注意分生孢子梗是否为扫帚状分枝？顶端是否膨

大？与曲霉有何不同？

#### 5. 轮枝孢属 (*Verticillium*)

取棉花黄萎病标本，观察其症状特点，镜检棉花黄萎病菌制备片，注意分生孢子梗和分生孢子的形态特点，孢子梗是否分枝？能否见到轮枝状分枝？分生孢子是怎样着生的？

#### 6. 葡萄孢属 (*Botrytis*)

常引起花、茎、叶、果实及贮藏器官的灰霉病，观察番茄灰霉病标本，注意腐烂状及被害部位的灰色霉状物，镜检番茄灰霉制备片，注意分生孢子梗及分生孢子着生情况。

#### 7. 梨孢属 (*Pyricularia*)

观察稻瘟病标本，注意受害部位及症状特点，挑取培养的稻瘟病菌制片，镜检分生孢子梗和分生孢子的形态，注意分生孢子梗曲膝状，分生孢子3胞呈阳梨形。

#### 8. 黑星孢属 (*Fusicladium*)

取梨黑星病标本观察症状，注意发病部位、病斑形状、颜色及霉状物。取梨黑星病叶，挑取霉层制片镜检分生孢子梗和分生孢子，注意其颜色为深褐色，孢子广梭形，观察孢子梗的长短，是否有明显的孢痕？

#### 9. 尾孢属 (*Cercospora*)

该属菌是一类重要的病原物，可引起许多种植物病害。观察大豆灰斑病标本，注意症状特点，镜检大豆灰斑病菌制备片，注意分生孢子梗及分生孢子有无颜色？分生孢子梗是否较短？分生孢子形状、隔膜数？

#### 10. 平脐蠕孢属 (*Bipolaris*)

观察玉米小斑病标本，注意症状特点。挑取玉米小斑病病斑上的霉层制片，镜检分生孢子梗和分生孢子的形态，分生孢子梗与内脐蠕孢属相似，分生孢子长梭形，直或弯曲，深褐色，具假隔膜，脐点略突起，基部平截。从两端细胞萌发伸出芽管。

#### 11. 突脐蠕孢属 (*Exserohilum*)

观察玉米大斑病标本，注意症状特点，挑取玉米大斑病病斑上的霉层制片镜检分生孢子梗和分生孢子的形态，分生孢子梗与内脐蠕孢属相似，分生孢子梭形，圆筒形或纺锤形，浅褐色，具假隔膜，脐点明显突出于基细胞外。从两端细胞萌发伸出芽管。

#### 12. 弯孢属 (*Curvularia*)

观察玉米弯孢菌叶斑病标本，注意症状特点，病斑上是否形成小型蛙眼斑？刮取玉米弯孢菌叶斑病病叶上的霉层制片，镜检分生孢子梗是否分化明显，顶端曲膝状，褐色有隔？分生孢子单生，弯曲，近纺锤形，多具3个隔膜，中间1~2个细胞特别膨大、色深。

#### 13. 链格孢属 (*Alternaria*)

观察马铃薯早疫病和大葱紫斑病标本，注意症状特点，病斑上是否形成同心轮纹？取大葱紫斑病叶挑取病斑上的霉层制片，镜检分生孢子梗和分生孢子的形态，注意有无颜色？分生孢子是否有纵横隔膜？孢子顶端是否有喙状细胞？

### (三) 瘤座孢目

瘤座孢目真菌的特征是分生孢子梗集生在分生孢子座上，该目真菌与植物病害关系较大的主要有以下两个属。

#### 1. 绿核菌属 (*Ustilaginoidea*)

观察稻曲病症状特点，注意稻曲病粒及其上墨绿色的粉末都为何物，镜检稻曲病菌制片，注意厚垣孢子表面是否有瘤状突起？能否见到厚垣孢子产生在分生孢子座上？

#### 2. 镰孢菌属 (*Fusarium*)

镰孢菌分布广泛，可引起多种植物多种类型的病害。观察黄瓜枯萎病标本，注意症状特

点，挑取黄瓜枯萎病病株上粉红色的霉状物，镜检分生孢子梗和大小两种类型分生孢子的形态，大型孢子镰刀型，小型孢子卵圆形，注意分生孢子座的特点和两种孢子的区别。

### **三、实验报告**

1. 绘突脐蠕孢属、弯孢属、链格孢属和镰孢菌属的形态图。
2. 编制丝孢目真菌分科分属的检索表。

### **四、思考题**

1. 试述半知菌“式样属”、“式样种”的概念。

## 实验六 植物病原半知菌及其所致病害症状观察（二）

### 一、目的要求

通过对半知菌中重要的植物病原腔孢菌进行观察，了解腔孢纲的分类依据，掌握腔孢纲主要属的形态特征及其所致主要病害的症状特点，进一步学习和训练徒手切片技能。

### 二、内容、材料和方法

腔孢纲真菌是一类很重要的植物病原物，这类真菌的特征是分生孢子梗和分生孢子着生在分生孢子盘上或分生孢子器内。该纲分为2个目：分生孢子产生在分生孢子盘上的黑盘孢目和分生孢子产生在分生孢子器内的球壳孢目。

#### （一）黑盘孢目

分生孢子梗着生在分生孢子盘上，分生孢子盘在寄主的表皮或角质层下形成，成熟后外露。分生孢子小，排列紧密，分生孢子单个顶生，有些属在盘上有刚毛。

##### 1. 痂圆孢属 (*Sphaceloma*)

取葡萄黑痘病标本，注意其症状特点、发生时期和受害部位，镜检葡萄黑痘病菌的制备片，注意分生孢子盘的形状有无刚毛？有无子座？分生孢子梗极短，不分枝，紧密排列在子座组织上，分生孢子单细胞，卵圆形或椭圆形。

##### 2. 炭疽菌属 (*Colletotrichum*)

取苹果炭疽病标本，观察其症状特点，注意受害部位和病斑形状，是否凹陷？是否产生小黑点。镜检苹果炭疽病菌制备片，分生孢子盘生在寄主表皮，有时生有褐色具分隔的刚毛，分生孢子梗无色至褐色，分生孢子无色单胞，长椭圆形或新月形。注意和 *Sphaceloma* 的区别。

##### 3. 盘二孢属 (*Marssonina*)

观察苹果褐斑病标本，注意其症状特点，镜检苹果褐斑病菌制备片，注意分生孢子盘极小，分生孢子卵圆形或椭圆形，无色，双细胞不等大，分隔处缢缩。

#### （二）球壳孢目

分生孢子梗着生在分生孢子器内，分生孢子器由拟薄壁细胞形成，形态多样，不形成在子座或基质上，埋生或表生。分4个科，750个属，6000余种，其中球壳孢科与植物病害的关系最密切，多寄生于叶片上引起叶斑病，也可侵染茎秆、枝条引起溃疡或腐烂。

##### 1. 叶点霉属 (*Phyllosticta*)

取苹果灰斑病标本，观察症状特点，镜检苹果灰斑病菌制备片。注意观察分生孢子器及分生孢子的形态，分生孢子器褐色膜质，孔口圆形深褐色，分生孢子单细胞，很小，卵圆形至椭圆形，孢子大小一般在15μm以下，发生部位主要是叶部，病斑初褐色，后变灰褐色，边缘暗红色。

##### 2. 茎点霉属 (*Phoma*)

取甜菜蛇眼病标本，注意发生部位及症状特点，叶斑边缘是否明确？镜检甜菜蛇眼病菌制备片，注意分生孢子大小、颜色和细胞数目。与叶点霉属相似，但寄生性较弱，主要危害植物茎部。

##### 3. 大茎点霉属 (*Macrophoma*)

取苹果轮纹病标本，注意症状特点，镜检苹果轮纹病菌制备片，该属与上述两属相似，注意分生孢子大小与叶点霉属及茎点霉属的区别。分生孢子较大，一般超过15μm。

#### 4. 拟茎点霉属 (*Phomopsis*)

观察茄子褐纹病症状特点，取茄褐纹病菌制备片镜检分生孢子器及分生孢子的形态，能否见到钩形和卵圆形两种分生孢子？能否见到分生孢子器周围的子座组织。

#### 5. 壳囊孢属 (*Cytospora*)

观察苹果树腐烂病标本，注意发生部位和症状特点，用刀切取带小黑点的病皮制片，镜检分生孢子器及分生孢子的形态，注意分生孢子器着生在瘤状子座组织中，分生孢子器腔不规则地分为数室，分生孢子梗极细、不分枝，分生孢子香蕉形或腊肠形。

#### 6. 壳针孢属 (*Septoria*)

取番茄斑枯病标本，观察症状特点，取带小黑点的番茄斑枯病叶制片，镜检分生孢子的形态，注意分生孢子无色、线形、多细胞。

#### 7. 壳二孢属 (*Ascochyta*)

取棉花茎枯病标本，观察其症状特点，并镜检其制备片，注意分生孢子双细胞无色，卵圆形至圆筒形，大小不等。

### 三、实验报告

1. 绘炭疽菌属、盘二孢属、茎点霉属和壳针孢属的形态图。
2. 比较叶点霉属、茎点霉属和大茎点霉属之间的区别。

### 四、思考题

1. 丝孢纲真菌和腔孢纲真菌的分生孢子在传播途径方面有何异同？并分析其原因。



## 实验七 植物病原担子菌及其所致病害症状观察

担子菌门的真菌通常称为担子菌，是真菌中最高等的类群，其特点是有性生殖产生担子和担孢子。担子菌的无性繁殖不发达，大多数担子菌在自然条件下不发生或极少发生，一般通过芽殖或菌丝断裂的方式产生芽孢子、粉孢子或分生孢子。有性生殖配合方式简单，性结合后从担子上形成外生型的担孢子。

### 一、目的要求

通过本实验了解担子菌门真菌的形态特征及分类概况，掌握担子菌门中与植物病害有关的重要属的形态特征、分类依据及所致病害的症状特点，为担子菌的分类和病害鉴定打下初步基础。

### 二、内容、材料和方法

根据担子菌菌丝隔膜显微结构特征和 rDNA 序列分析，担子菌分为 3 个纲，即层菌纲、黑粉菌纲和锈菌纲。锈菌纲包括锈菌目和隔担菌目，锈菌目全部为高等植物的寄生菌，隔担菌目多为昆虫共生菌。黑粉菌纲仅包括黑粉菌目，绝大多数都是高等植物上的寄生菌。

#### （一）锈菌目

锈菌的特征是冬孢子从双核菌丝的顶端细胞形成，担子是由外生型的冬孢子萌发而成的，担子多产生三个横隔分为四个细胞，每个细胞上产生一个担孢子。锈菌的生活史可以产生几种形态学和细胞学性状不同的孢子器，并有转主寄生现象，锈菌都是专性寄生菌。

##### 1. 栅锈菌属 (*Melampsora*)

冬孢子无柄，单细胞，侧面密结成整齐的单层，多生在表皮下，取亚麻锈病标本观察症状特点，并镜检亚麻锈病菌制备片，注意以上形态特点。

##### 2. 层锈菌属 (*Phakopsora*)

冬孢子无柄，单细胞，彼此上下侧面互相密结成多层、垫状，埋生在寄主表皮下，取枣锈病标本观察症状特点，并镜检该菌制备片，注意上述形态特点及与栅锈菌属的区别。

##### 3. 单胞锈菌属 (*Uromyces*)

冬孢子有柄，单细胞，顶壁较厚，突破寄主表皮生于体外，取菜豆锈病病叶标本观察夏孢子堆和冬孢子堆的大小、颜色，是否穿破表皮？用解剖针挑取病叶上的冬孢子制片镜检，注意该属的形态特征。

##### 4. 柄锈菌属 (*Puccinia*)

冬孢子有短柄，双细胞，壁厚，遇水不胶化，取麦类秆锈病、叶锈病和条锈病的标本，注意观察症状特点，比较三种锈病发生部位，夏孢子堆和冬孢子堆的大小、形状、颜色，排列及开裂情况等有何不同，然后用解剖针挑取小麦秆锈病菌的冬孢子堆制片镜检，注意该属的形态特征。

##### 5. 胶锈菌属 (*Gymnosporangium*)

冬孢子有长柄，双细胞，壁薄，遇水胶化，取梨锈病标本，观察症状特点，特别注意在转主寄主柏树上的症状，哪种孢子发生在柏树上？该菌是否有夏孢子阶段？取梨胶锈菌冬孢子制片，注意该属的形态特征。

##### 6. 多胞锈菌属 (*Phragmidium*)

冬孢子单生，具长柄，大而显著，柄的下部膨大，3 至多细胞，壁厚，表面光滑或有瘤状突起，观察玫瑰锈病标本，镜检其制备片，注意该属的形态特征。

## （二）黑粉菌目

黑粉菌的主要特征是形成成堆的黑色粉末状的冬孢子，冬孢子萌发产生先菌丝和担孢子，它与锈菌的主要区别是冬孢子从双核菌丝的中间细胞形成，担孢子直接着生在先菌丝（没有小梗）的侧面或顶部，成熟后也不能弹出，黑粉菌不是专性寄生菌，生活史也不像锈菌那样复杂。

### 1. 黑粉菌属（*Ustilago*）

冬孢子堆粉状，彼此分离，孢子堆外没有由菌丝构成的假膜包围，冬孢子表面光滑或有纹饰。观察小麦散黑穗病和玉米瘤黑粉病的标本，注意受害部位及症状特点，取小麦散黑穗病菌制备片镜检冬孢子及冬孢子萌发的形态。

### 2. 轴黑粉菌属（*Sphacelotheca*）

冬孢子堆粉状，彼此分离，孢子堆外有由菌丝构成的假膜包围，孢子堆中间有由寄主维管束残余组织形成的中柱，冬孢子表面光滑或有纹饰。观察玉米丝黑穗病标本，注意症状特点，挑取玉米丝黑穗病菌冬孢子制片，镜检其大小、形状、颜色及表面特征。

### 3. 腥黑粉菌属（*Tilletia*）

冬孢子堆多生于子房内，成熟后呈粉末状或带有胶性，具有鱼腥味。冬孢子表面常有网状或瘤状纹饰，少数种光滑，冬孢子萌发时产生无隔膜的先菌丝，顶端产生成束的担孢子，常成对作“H”形结合。观察小麦普通腥黑穗病（包括网腥和光腥）标本，注意受害部位和症状特点，镜检腥黑穗病菌萌发状态制备片，注意先菌丝和担孢子的形态，担孢子是否作“H”状结合。

### 4. 叶黑粉菌属（*Entyloma*）

冬孢子堆成熟后长期埋生在叶片、叶柄或茎组织内，不呈粉末状。观察水稻叶黑粉病标本，注意发生部位，镜检水稻叶黑粉病菌制备片，注意堆生在叶组织中的冬孢子堆。

### 5. 条黑粉菌属（*Urocystis*）

冬孢子聚集成团，坚固而不易分离，冬孢子团外有无色不孕细胞包围褐色冬孢子。观察小麦秆黑粉病标本，注意症状特点，镜检小麦秆黑粉病菌制备片，观察冬孢子团和不孕细胞。

## 三、实验报告

1. 绘栅锈菌属、单胞锈菌属、柄锈菌属和腥黑粉菌属的形态图。

2. 编制锈菌目真菌分科分属的检索表。

## 四、思考题

1. 比较锈菌目和黑粉菌目之间的异同点。

## 实验八 植物病原根肿菌、卵菌及其所致病害症状观察

在新的分类体系中，植物病原根肿菌和卵菌分别归属于原生动物界和藻物界。根肿菌全部为专性寄生菌，寄生高等植物的往往引起细胞膨大和组织增生，受害根部肿大，故称为根肿菌。卵菌分布广泛，一般认为是从水生演变到陆生，由腐生到专性寄生进化的。卵菌中不少种类是高等植物的寄生菌，引起植物的腐霉、疫霉、霜霉、白锈等病害。

### 一、目的要求

通过本实验了解根肿菌门、卵菌门菌物的主要形态特征，掌握与植物病害有关的重要属的基本形态特征、分类依据及其所致病害的症状特点。

### 二、内容、材料和方法

#### （一）植物病原根肿菌

根肿菌的特点是营养体为无壁、多核的原质团，有性生殖整个原质团形成大量散生或成堆的厚壁休眠孢子囊，无性繁殖由原质团形成薄壁的游动孢子囊，其中产生前端具有两根长短不等尾鞭的游动孢子，其中与植物病害关系密切的有以下两个属。

##### 1. 根肿菌属 (*Plasmodiophora*)

观察大白菜根肿病的液浸标本，注意根肿的特点。镜检大白菜根肿病菌制备片，注意在寄主细胞内能否见到成堆的休眠孢子？受病细胞的大小与正常细胞有无区别？是薄壁细胞受害，还是输导组织受害？

##### 2. 粉痂菌属 (*Spongospora*)

观察马铃薯粉痂病标本，注意马铃薯块茎皮层上形成的疮痂状小瘤。镜检马铃薯粉痂病菌制备片，观察寄主细胞内聚集成多孔、中空、海绵状的圆球形休眠孢子堆。

#### （二）植物病原卵菌

卵菌的营养体为发达无隔膜的菌丝体。无性繁殖由孢子囊产生梨形或肾形的游动孢子，游动孢子具等长双鞭毛，茸鞭在前，尾鞭在后。有性生殖通过异型的雄器和藏卵器交配，在藏卵器中形成一个或多个卵孢子。卵菌门仅有 1 个卵菌纲，其中与植物病害关系密切的是水霉目、腐霉目、指梗霉目和霜霉目。

##### 1. 腐霉属 (*Pythium*)

观察蔬菜幼苗猝倒病标本，注意为害部位和症状特点。将瓜果腐霉斜面菌种的菌落少许移至清水中，在 18~20℃ 下培养 24~36 h，然后用解剖针从水中挑取少量菌丝制片镜检，观察菌丝有无隔膜？孢子囊的形状如何？孢囊梗和菌丝的形态有无差别？能否看到孢子囊萌发的情景？

##### 2. 疫霉属 (*Phytophthora*)

观察马铃薯晚疫病标本，注意为害部位和症状特点。特别要注意叶片上病斑的位置、大小、状态、颜色、边缘是否清楚，是否产生灰白色的霉层？挑取马铃薯晚疫病菌斜面培养物制片，镜检孢囊梗的分枝特点和孢子囊的形态。

##### 3. 指梗霉属 (*Sclerospora*)

观察谷子白发病标本，注意为害部位和症状特点。挑取培养皿底部的黄色粉末制片，镜检卵孢子的形态，取谷子白发病制备片镜检孢囊梗的形态，注意孢囊梗的粗壮程度及有无分枝，末端是否丛生小梗？

##### 4. 单轴霉属 (*Plasmopara*)

观察葡萄霜霉病标本，注意为害部位和症状特点。挑取病叶上的霉层制片，镜检孢囊梗和孢子囊的形态，注意分枝特点是否为单轴直角分枝？分枝末端的特征是否近掌状？

#### 5. 霜霉属 (*Peronospora*)

观察十字花科霜霉病和大豆霜霉病标本，注意为害部位和症状特点。挑取少许霉层制片，镜检孢囊梗和孢子囊的形态，注意孢囊梗的分枝特点是否为对称的二叉状锐角分枝？

#### 6. 假霜霉属 (*Pseudoperonospora*)

观察黄瓜霜霉病标本，注意为害部位和症状特点。挑取霉层制片镜检孢囊梗和孢子囊的形态，注意孢囊梗的分枝特点是否为主轴单轴锐角分枝，侧轴二叉状分枝？与霜霉属形态如何区别？

#### 7. 盘梗霉属 (*Bremia*)

观察莴苣霜霉病标本，注意为害部位和症状特点。挑取病叶上的霉层制片，镜检孢囊梗的形态是否为双二叉状锐角分枝，末端是否膨大呈盘状？边缘是否有小梗？孢子囊的形态及着生位置如何？

#### 8. 白锈属 (*Albugo*)

观察十字花科白锈病标本，注意为害部位和症状特点。切取白锈病病叶制片镜检，注意孢囊梗着生的位置，是否为棍棒状？孢子囊是否串生于梗的顶端？孢子囊的形态如何？

### 三、实验报告

1. 绘根肿菌属、疫霉属、单轴霉属和霜霉属的形态图。

### 四、思考题

1. 霜霉菌危害植物时，为什么多发生在叶部？为什么多在病斑背面形成霉层？为什么常在低温多湿的条件下受害严重？

## 实验九 植物病原细菌及其所致病害症状观察

植物的细菌病害种类很多，发生和分布都很普遍，几乎在每种作物上都有一种或几种细菌病害，有的危害较重。细菌病害的症状主要是组织坏死、萎蔫或肿瘤。常见的在病斑的周围呈油渍状或水渍状，在病部上有时会产生菌脓。细菌（bacteria）很小，要观察细菌菌体的形态、大小等在一般的光学显微镜下不易看清，必须经过染色后才能观察。

### 一、目的要求

熟悉植物细菌病害的症状类型和病原细菌的基本形态，学习植物细菌病害简易诊断及病原细菌初步鉴定的程序和技术，为以后植物细菌病害的正确诊断和病原细菌的分类鉴定打下良好的基础。

### 二、内容、材料和方法

#### （一）植物细菌病害的症状观察

植物细菌病害的症状常作为鉴定属的一种辅助性状，即症状类型和病原属之间有一定的相关性，如棒形杆菌属的细菌主要引起萎蔫；假单胞菌属主要引起叶斑、腐烂和萎蔫；黄单胞菌属主要引起叶斑和叶枯；欧文氏菌属一般引起软腐，有时也引起萎蔫。此外，多数细菌病害在发病初期，特别是在潮湿的自然条件下常呈水浸状或油渍状；在饱和湿度下病斑上常有菌脓形成，干后成为菌痂，掌握症状类型及其形成的生态条件，对细菌病害的正确诊断是十分重要的。

观察水稻白叶枯病、棉花细菌性角斑病、马铃薯环腐病、大白菜软腐病、黄瓜细菌性角斑病、大豆细菌性角斑病的标本，区分其症状类型。

#### （二）植物细菌病害的简易诊断

植物细菌病害的诊断和病原鉴定是比较复杂的，初步诊断是根据症状特点和显微镜检查病组织中的细菌来完成的，绝大多数细菌病害能在受害部位的维管束或薄壁细胞组织中产生大量的细菌，并且吸水后形成菌溢。因此，镜检病组织中有无细菌的大量存在（菌溢的出现）是诊断细菌病害简单易行的方法。

取水稻白叶枯病新病叶，在病斑病健交界处剪取 0.5×0.5cm 的小块病组织，放在载玻片上，滴加一滴蒸馏水，盖好盖玻片后，立即在显微镜下观察，注意叶组织维管束剪断处是否有大量的细菌呈云雾状溢出，如将视野调暗观察更易见到。

#### （三）植物病原细菌形态观察和种类鉴定

细菌个体很小，无论形态观察还是种类鉴定，都须经染色后才能在显微镜下观察清楚，属的鉴定主要根据革兰氏染色反应、鞭毛数目和着生位置、菌落颜色及所致病害症状等进行。

##### 1. 培养性状观察

取培养皿中培养的水稻白叶枯病菌、马铃薯环腐病菌、茄青枯病菌和大白菜软腐病菌，注意观察菌落的颜色、大小、质地，是否产生荧光色素？和植物病原真菌培养菌落有什么根本性的不同？

##### 2. 染色反应观察

###### （1）革兰氏染色

革兰氏染色是鉴定细菌最重要的染色方法。由于细菌细胞壁的薄厚和细胞壁组分的差别，不同类型的细菌细胞壁对特定的染色物质反应不同。根据不同的染色反应，可将细菌分成革兰氏阳性（G<sup>+</sup>）菌和阴性（G<sup>-</sup>）菌两大类。最常用的方法有结晶紫草酸铵染色法，另外

KOH 溶解试验和氨基肽酶试验可用作辅助试验。

供试菌株：马铃薯环腐病菌和大白菜软腐病菌

操作步骤：①取洁净的载玻片，加一滴无菌水，用移菌环按无菌操作要求取一环菌苔，在水滴中制成菌悬液。

②另取一洁净的载玻片，在中央加滴无菌水，取一环上述配制的菌悬液至水滴中，均匀涂布成薄层后，自然晾干。

③将涂片在灯焰上缓慢通过 2~3 次进行固定。

④滴草酸铵结晶紫液于涂片上，染色 1min。

⑤倾去染液，水洗（亦可不用水洗）。

⑥加碘液处理 1min。

⑦倾去碘液、水洗、吸水纸吸干。

⑧用 95%酒精洗脱染液，时间约 30s。

⑨吸干后，滴加复染剂藏红 O 复染 10~30s。

⑩水洗、吸干镜检。

阳性反应的细菌染成紫色，阴性反应的细菌染成红色，注意涂片菌液不能太浓，褪色要彻底，否则是红是紫不易区分。

## （2）鞭毛染色

细菌的鞭毛很细（只有 0.02~0.03 $\mu\text{m}$ ），一般光学显微镜是看不见的，鞭毛上沉积了染料或银盐后才能看到，这是所有鞭毛染色的根据。由于染料也可以在载玻片上沉积，所以要用非常清洁的载玻片。染料处理的时间很重要，处理时间太短，鞭毛上没有足够的沉积物就看不清楚；处理时间太长，载玻片上的沉积物太多，也看不清楚。菌龄十分重要，培养时间不足或培养时间太长都不易染色成功，不同种类的细菌培养时间差异较大。总之，鞭毛染色比较困难，必须严格掌握每个操作环节。

供试菌株：大白菜软腐病菌

操作步骤：①载玻片准备：用新的载玻片，经过系列清洁处理（方法从略）后进行检验，合格者用于实验。

②细菌悬液的配制：供染色用的菌株，用前每隔 1~2d 转移一次，连续转移几次进行活化，增强细菌的活性。在已活化并在 16~28℃恒温箱中培养 16~18h 的白菜软腐病菌斜面上加 3~5ml 先在恒温箱中经预热的无菌水，静置 10~20min，使细菌游出配成稀薄的菌悬液，注意静置的时间不能太长，因为时间长了鞭毛可能脱落、染色固定前可在镜下观察其游动性。

③涂片：用移置环取配好的菌悬液上层 2~3 环于洁净的载玻片上，立即将玻片直立，使菌液流下展开，在玻片上遗留并形成菌悬液膜，在空气中自然干燥固定，勿用火焰固定。

④染色：鞭毛染色的方法很多，大致可分为两类：第一类是碱性品红染色法；第二类是银盐沉积法，本次实验用银盐沉积法。

银盐沉积法：滴甲液 3~5min，用蒸馏水轻轻冲洗甲液，再加乙液，处理 30~60sec，立即用蒸馏水轻轻冲洗乙液，空气中自然干燥后，镜检（有人在加乙液后，在灯焰上微加热，再用水洗）菌体染成深褐色，鞭毛染成褐色，注意鞭毛数目及着生方式。

## 三、实验报告

1. 根据革兰氏染色反应和鞭毛性状编出 5 个属的检索表。

## 四、思考题

1. 革兰氏染色中如何排除假阳性？

## 实验十 植物病原病毒及其所致病害症状观察

病毒(virus)是一类个体微小的专性寄生物,其结构简单,没有细胞结构,主要由核酸和蛋白质组成,故称分子寄生物。由于病毒甚为微小,在普通显微镜下观察不到,也不能在一般培养基上培养,所以通常只能靠病状的表现及病毒的属性,进行诊断和鉴定。在某些植物的病组织中,在一定时间内,能发生特殊的内含体,也可作为鉴定的参考。

### 一、目的要求

识别植物病毒病的病状类型及其特点,了解病毒的一般性质,学习植物病毒病害的鉴定方法和原理。

### 二、内容、材料和方法

#### (一) 病状的类型及其特点

##### 1. 外部形态的变化

植物病毒病害的病状有变色、枯斑、畸形及组织坏死等,变色又分为花叶和黄化两种,叶片、茎部、果实和根部均可发生坏死现象,畸形包括卷叶、缩叶、皱叶、蕨叶、花器退化、丛枝、矮化及癌肿等。观察实验课所提供的各种病毒病害的标本,记载其病状特点并指出其病状类型。

##### 2. 内部病变及内含体的观察

有些病毒一般不使植物组织坏死,而抑制其发育,常引起内部形态的变化。取受 TMV 危害的烟草病叶,于深绿部分与黄绿部分的交界处,进行切片观察,深绿部分与黄绿部分的细胞(包括栅栏组织及海绵组织)大小有无不同?细胞间隙如何?其中叶绿体的含量及大小有何不同?

另外,有些病毒特别是花叶型的病毒,还可在病株的细胞内出现内含体,这种内含体也可作为鉴定病毒的根据。一般在光学显微镜下可见的有非结晶体(亦称无定形体或 X 体)和结晶体两种,取表现出典型花叶症状的新鲜烟草病叶,取其叶片褪色(浅绿色)部分,将其表皮撕下,制片镜检,注意观察在叶背主脉的表皮或茸毛中,除细胞核外是否有圆形、椭圆形或其它不规则形物体存在?其位置及大小如何?是否具有折光性?

#### (二) 植物病毒的传染性观察

传染途径是病毒的鉴定性状,也是防治的重要依据,植物病毒可以通过多种途径进行传染,植物病毒的接种方法与它的传染途径有关。

1. 机械传染:是指病毒从植物表面的机械损伤侵入,引起植物的发病,机械传染病毒的接种方法,一般是将病株汁液在叶面摩擦,所以又称“汁液传染”或“汁液摩擦传染”。但这种传染只限于大部分引起花叶型症状的病毒,因为这些病毒在寄主细胞中的浓度较高,同时在寄主体外的存活期也较长,通过汁液接种便可证实病毒是由机械传染的。

具体操作步骤如下:先用肥皂将手彻底洗净、晾干,取烟草花叶病的病叶,用清水洗净,放入研钵中,磨碎挤出汁液,接种于无病烟草,选择生长健壮具有 4~5 个叶片的烟草植株,作为接种寄主,每株接 2~3 个叶片,接种时先用清水冲洗待接种的叶片,晾干后再撒上少许金刚砂(600 目)或硅藻土,以左手托着叶片,用右手食指蘸取少量病毒汁液。在接种叶片上轻轻摩擦,要求仅使叶片表皮细胞造成微伤口而不死亡,接种后用清水洗去接种叶片上的残留汁液,将接种的植株放在防虫的温室或纱笼中,在 20~25℃ 条件下培养,7~14d 内随时注意观察其发病情况。

2. 昆虫传染：是自然条件下植物病毒的一种主要传染方式，它是以昆虫为媒介，将病毒从病株到健株体内，蚜虫是植物病毒最主要的虫媒，蚜虫传毒实验步骤如下：

（1）蚜虫准备：接种前到田间无病的十字花科蔬菜上，用软毛笔轻轻采集蚜虫，经过饲养证实蚜虫不带毒后方能应用。

（2）饿蚜：为保证接种效果，接种前蚜虫必须使其饥饿一定时间，饿蚜方法如下：取培养皿一个，将口用玻璃纸封好，并用橡皮筋缚紧，在玻璃纸中间开一小洞，用软毛笔取蚜虫从小洞放入培养皿（取蚜虫时可将带蚜虫的叶片，轻轻敲打或稍加热烘一下，使蚜虫自己掉下，不能使蚜虫的口器受伤），每皿放入 50 个左右，然后用玻璃纸重新将小洞封闭，将培养皿放在温暖处，使蚜虫饥饿 2~4 h。

（3）饲毒：将经过饥饿的蚜虫重新用软毛笔从玻璃小洞中取出，挑到有病毒的病叶上喂饲 10min。

（4）接种：蚜虫饲养达到所要求时间后，用软毛笔触动蚜虫，使其自动拨出口器后，用软毛笔将其移置到无病接种植物上，每株接种蚜虫 10~15 个，接种后的植株放养虫笼内或玻璃罩内培养，接种 24h 后，用药杀死蚜虫，继续培养至症状表现。

同样将饥饿后的蚜虫放在无病毒的植株上吸食 10min，然后用软毛笔移到另一株无病接种植株上作为对照，其它方法同上。

### 三、实验报告

1. 绘病毒内含体的形态图。

### 四、思考题

1. 症状与内含体用作病毒的诊断有哪些限制？



## 实验十一 植物病原线虫及其所致病害症状观察

线虫(nematode)是一类虫体透明且体腔两侧对称的低等无脊椎动物,在自然界中分布广泛、种类繁多、形态各异。寄生在植物上的线虫,从某些种类和造成的经济损失上看,仅次于真菌、细菌和病毒,而且常与其它病原物一起造成复合侵染。植物受线虫危害后表现的症状与一般的病害症状相似,因此称为线虫病。近年来,线虫病害的发生日趋严重,线虫的研究愈来愈受到人们的重视。

### 一、目的要求

熟悉植物病原线虫的基本形态及其所致病害的症状特点,学习分离和鉴定主要植物病原线虫的方法,为开展线虫病害诊断和防治等科研工作做准备。

### 二、内容、材料和方法

#### (一) 植物线虫病害症状观察

植物受线虫危害后,除和真菌、细菌、病毒等病原物引起的症状相似,还有其特有的症状特点。线虫多在土壤中活动,因此,植物根部受害比较常见,根部受害的症状表现为:根生长点受破坏而停止生长或卷曲;根上形成瘤肿或过度分枝而形成发根或须根团。根部受害后,地上部生长受到影响而表现植株矮缩,色泽失常和早衰,严重时整株枯死。线虫也可引起植株地上部的症状,有顶芽和花芽坏死,茎叶卷曲或组织坏死,形成叶瘿或种瘿等。

植物病原线虫不同属所致症状也有一定的区别,根结线虫属(*Meloidogyne*)和胞囊线虫属(*Heterodera*)所致病害地上部一般无特异症状,仅表现生长不良、植株萎黄,地下部须根明显增多,往往形成须根团,根结线虫刺激根部肿胀形成根结,而胞囊线虫则不形成根结,但可直接看见附着须根的雌虫体。粒线虫属(*Anguina*)为害地上部分,使茎叶扭曲,穗部变形,籽粒变为虫瘿。茎线虫属(*Ditylenchus*)主要为害地下部分,使块根、块茎、鳞茎呈干腐状或湿腐状,地上只略见茎叶呈波状卷曲、发育迟缓等。拟滑刃属(*Aphelenchoides*)为害叶片和芽而引起局部干枯坏死等。

观察小麦粒线虫病、甘薯茎线虫病、水稻干尖线虫病、花生根结线虫病、大豆胞囊线虫病的标本,注意危害症状特点。

#### (二) 线虫主要属形态观察

##### 1. 粒线虫属 (*Anguina*)

切取浸泡的小麦粒线虫病虫瘿制片镜检,或取小麦粒线虫制备片,注意观察虫体形态均为线形,虫体肥大较长。垫刃型食道,口针较小。雌成虫虫体呈肥胖卷曲状,单卵巢前伸,卵母细胞多行绕中轴排列,前端1~2次回折;雄成虫虫体稍弯,但不卷曲,精巢常具有回折,精母细胞多行排列,交合伞长,但不包至尾尖,交合刺粗而宽。

##### 2. 茎线虫属 (*Ditylenchus*)

挑取甘薯茎线虫病组织制片镜检,或取甘薯茎线虫制备片,注意观察雌雄虫虫体形态均为线形细长,垫刃型食道,口针细小。前生单卵巢,卵母细胞1~2行排列,阴门在虫体后部;雄成虫虫体细长,尾长锥形,末端尖,交合伞不包至尾尖。雌虫头端平截,阴门在虫体后部,雄虫交合伞不包至尾尖,交合刺基部变宽,并有突起等特点。

##### 3. 胞囊线虫属 (*Heterodera*)

取过筛法分离到的大豆胞囊线虫胞囊在解剖镜下观察形状,颜色,区分头尾部,然后在低倍显微镜下压破胞囊(或取制备片)镜检卵或二龄幼虫的形态。成熟雌虫膨大呈柠檬形或

梨形，体壁褐化革质为胞囊，有突出阴门锥，阴门裂两侧为双半膜孔。雄虫尾短，末端钝圆，无交合伞。

#### 4. 根结线虫属 (*Meloidogyne*)

镜检番茄根结线虫制备片，注意雌雄成虫的形态和胞囊线虫属有何不同？虫卵产于何处？成熟雌虫膨大为梨形，表皮柔软透明，卵成熟后全部排出到体外的胶质卵囊中，有特征性的会阴花纹。雄虫蠕虫形，尾短，无交合伞，交合刺发达。

#### 5. 拟滑刃属 (*Aphelenchoides*)

镜检水稻干尖线虫制备片，注意观察雌雄虫均为细长蠕虫形，滑刃型食道，食道具明显的卵圆形中食道球。雌虫阴门位于虫体后部 1/3 处，有后阴子宫囊，尾末端钝圆，有尾尖突。雄虫交合刺玫瑰刺形，尾端弯曲成镰刀形、有 4 个尾尖突。

### (三) 线虫的分离技术

1. 贝曼漏斗分离法：植物材料和土壤中能游动的活线虫。

材料：甘薯茎线虫病组织。

2. 淘洗过筛分离法：土壤中胞囊线虫的分离。

材料：发生大豆胞囊线虫病的大豆田土壤。

### 三、实验报告

1. 绘小麦粒线虫和大豆胞囊线虫的形态图。

### 四、思考题

1. 植物寄生线虫危害植物可引起些什么特殊的症状？