

1. 菌物培养基:

基本营养: 水分、碳源、氮源、矿质元素、生长因子
 培养基类型: 合成培养基、半合成培养基、天然培养基
 培养基 PH: 5.0—6.8
 选择性培养基 = 普通培养基+抗菌素+杀菌剂+其它

2. 植物病理学常用培养基类型及灭菌方法。**PDA 培养基 (potato dextrose agar, PDA)**

Potatoes: 200.0g; Glucose: 20.0 g; Agar: 18.0-20.0 g; Water: 1000 ml;

Boil 200 g scrubbed and sliced potatoes in 1000 ml water for 1 hour. Pass through fine sieve.

V-8 琼脂培养基 (V-8 juice agar)

*V-8 Juice: 200.0ml; CaCO₃: 33.0g; Agar: 15.0-20.0 g;

Fill up with distilled water to 1000.0 ml. Adjust pH to 7.2.* May be replaced by tomato mash if not available.

燕麦片琼脂培养基

燕麦片 30G; 琼脂 15-20G; 水 1000ml;

燕麦片加水 10000 ml, 在沸水浴上加热 1 小时, 纱布过滤后加水补足 10000 ml, 加琼脂熔化后灭菌。

玉米粉琼脂培养基

玉米粉 300 g; 琼脂 15-2G; 水 1000 ml 配置方法同 (3);

3. 植物病原真菌的纯化方法、类型及各方法的特点。

保证所用菌种是从单个细胞或单个孢子繁殖而来的纯种

稀释法:**A. 水洋菜平板稀释法一**

将纯净的水洋菜培养基, 倒入培养皿中凝固, 然后在灭菌的载玻片上放入一滴水, 加入孢子, 配成浓度适当的悬浮液, 用三角涂抹玻棒, 蘸上孢子悬浮液, 涂抹于水洋菜培养基表面, 然后用低倍显微镜擦培养皿的反面检查孢子, 用蜡笔做一个记号, 再用灭菌后的刀子或接菌针将这一块培养基切下, 移置在适宜的培养基上生长。操作过程在接菌台上, 保持无菌状态。植物病理学常用培养基类型及灭菌方法。

B. 水洋菜平板稀释法二

将菌种上产生的分生孢子用灭菌水洗下, 稀释到每滴在低倍显微镜下每视野大约有 25 个孢子左右。取灭过菌的试管, 一支含有一毫升无菌水, 另一支含有 9 毫升 WA 培养基 (大约 45°C)。给无菌水的试管加一滴孢子悬浮液 (在低倍镜下, 每滴孢子悬浮液在视野含有大约 25 个孢子), 然后把孢子悬浮液到入含有 WA 培养基的试管中, 振荡后倒入灭过菌的培养皿中, 等凝固后, 用低倍显微镜擦培养皿的反面检查孢子, 用蜡笔做一个记号, 再用灭菌后的刀子或接菌针将这一块培养基切下, 移置在适宜的培养基上生长。

干针挑取法:

即用细缝衣针在低倍镜下直接挑取单个孢子。此方法最适用于分离的真菌孢子, 如黑粉菌的厚垣孢子、锈菌的夏孢子及一些担子菌的担子孢子。先将孩子放在灭菌的载玻片上, 用食指和拇指握住缝衣针, 在低倍镜下检视, 当针尖接触孢子时, 孢子即离开载玻片而附着于针尖上, 然后移殖培养。

适合于分生孢子较大, 颜色较深的孢子分离。

菌丝尖端分离法:

不产生孢子的或产生孢子而孢子不容易分离的真菌, 可以用切取菌丝尖端的方法纯化, 即将真菌培养在培养基表面, 用低倍镜找到单独的菌丝尖端后, 用玻璃毛细管, 从菌丝尖端徐徐插入, 连同培养基将菌丝尖端切下, 然后将这一带有菌丝的培养基吹在培养基平面或斜面上培养即成。为了便于找到单独分开的菌丝尖端, 最好在培养后不久的培养基表面分离。

适合于不产生分生孢子的菌丝体的分离。

4. 简要说明真菌保存的原理，例举说明常用的保藏方法。

保持原菌种特性，防止或延缓退化；保持活力而不死；保证纯培养，防止污染。

保存的基本原理是使微生物的生命活动处于半永久的休眠状态，也就是使微生物的新陈代谢作用限制在最低的范围内。干燥、低温、缺氧、避光和缺少营养是主要措施。

菌种保藏方法：

- 1) **室温保存：**斜面培养是最常用的方法；16-17℃；PCA培养基。
- 2) **冰箱保存：**4-8℃的冰箱中可以降低真菌的生长速率，培养基也不容易干燥。
- 3) **矿物油下保存：**在菌种表面加一层石蜡油，超过斜面顶部2cm。
- 4) **土壤保存：**试管中放5克含水量70%的土壤，灭菌后加1ml的孢子悬浮液，室温培养10天后保存。
- 5) **灭菌水中保存：**先在琼胶培养基上培养，然后切取小块琼胶培养基，放在灭菌的蒸馏水中保存。
- 6) **低温保存：**-70或-80℃；孢子+17%脱脂奶粉+硅胶颗粒；菌丝片+15~20%甘油
- 7) **冷冻干燥法保存：**需要真空和干燥设备
- 8) **液氮超低温保藏法：**将菌液悬浮于低温保护剂中置于液氮中

5. rRNA 在细菌病原菌研究中的应用。

rRNA 是研究细菌进化和亲缘关系的重要指标，它约占细菌 RNA 总量的 80%。rRNA 基因由保守区和可变区组成，在细菌中高度保守，是细菌系统分类学研究中最有用和最常用的分子钟。

原核生物的 rRNA：5S rRNA、16S rRNA 和 23S rRNA，并且它们位于同一操纵子上。其中 5S rRNA 信息量少，不适合分析；23S rRNA 尽管分子大，信息量多，但碱基突变速度较快，同样不适用于细菌鉴定；16S rRNA 的遗传较为稳定，长度在 1550±200 bp 左右，代表信息量适中，是研究系统进化的好材料。

通过对 16S rDNA 的序列分析，可以将细菌划分到属或种。16S rDNA 可以通过 PCR 法扩增获得，由于 16S rDNA 的两端较为保守，可以在这保守区域设计引物，扩增鉴定细菌的 16S rRNA 基因，然后进行 DNA 测序，再将其 DNA 序列与 GenBank 中的已知序列进行同源性比较后，可以了解检测细菌种类。

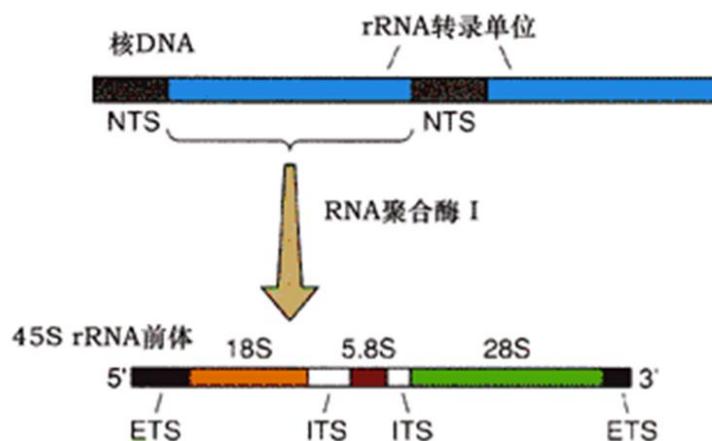
6. rDNA 的 ITS 序列鉴定植物病原菌原理

编码 rRNA 的 rDNA 是基因组 DNA 中的中等重复、并有转录活性的基因家族。

rDNA 一般由转录区和非转录区构成。转录区包括 5S、5.8S、18S 和 28S rDNA。内转录间隔区 ITS 位于 18S 和 5.8S rDNA(ITS1)之间以及 5.8S 和 28S rDNA 之间(ITS2)。在 18S rDNA 基因上游和 28S rDNA 基因下游还有外转录间隔区 ETS，ITS 和 ETS 区的转录物均在 rRNA 成熟过程中被降解。

18S、5.8S、28S rDNA 基因序列进化缓慢而相对保守，但这三个基因序列之间的 ITS 序列的进化则相当迅速，因而 rDNA 序列广泛用于真菌各级水平的系统学研究。

18S rDNA 和 28S rDNA 分别约为 1.8 kb 和 3.4 kb，序列中既有保守区又有可变区，在进化速率上比较保守，其中 18S 比 28S 基因更保守，是在系统发育中种级以上阶元的良好标记。5.8S 基因分子量小且高度保守，较少用于系统学研究。但它为真菌 rDNA PCR 扩增的通用引物的设计提供了极大的方便。



7. 如何应核糖体 DNA 的 ITS 序列鉴定植物病原真菌种类?

1. 序列直接比较 NCBI

根据 GenBank database 中已知种的序列进行比较, 初步可确定病原菌是已知种或未知种。

2. PCR—RFLP 分析

可根据已经报道的病原菌研究结果, 进行快速鉴定已知种或确定病原菌的存在

DNA 提取——PCR——酶切——电泳

3 species-specific polymerase chain reaction (PCR) primers

利用不同种的 ITS 序列差异, 设计专化性引物, 区别不同种的病原菌。主要用于快速鉴定已知种。

8. 田间发现一疑似新植物病害, 如何确定?

首先判断病害由病原菌还是环境因素造成, 寄主有典型的病征病状, 病原菌可检查孢子、菌丝、菌体、细菌喷菌现象。

如发现一种不熟悉的或新的病害时, 就应按柯赫氏法则的四个步骤来完成诊断与鉴定。诊断是从症状等表型特征来判断其病因, 确定病害种类。鉴定则是将病原物的种类和病害种类同已知种类比较异同, 确定其科学名称或分类上的地位。有些病害特征明显, 可直接诊断或鉴定, 如霜霉病或秆锈病。但在许多场合难以鉴定病原物的属、种。如花叶症状易于识别, 要判断由何种病原物引起, 就必须经详细鉴定比较后才能确定。

柯赫氏法则:

- (1)在病植物上常伴随有一种病原微生物存在;
- (2)该微生物可在离体的或人工培养基上分离纯化而得到纯培养;
- (3)将纯培养接种到相同品种的健株上, 出现症状相同的病害;
- (4)从接种发病的植物上再分离到其纯培养, 性状与接种物相同。

如果进行了上述四步鉴定工作得到确实的证据, 就可以确认该微生物即为其病原物。但有些专性寄生物如病毒、菌原体、霜霉菌、白粉菌和一些锈菌等, 目前还不能在人工培养基上培养, 可以采用其他实验方法来加以证明。

柯赫氏法则同样也适用来对非侵染性病害的诊断, 只是以某种**怀疑因子**来代替病原物的作用, 例如当判断是否缺乏某种元素而引起病害时, 可以补施某种元素来缓解或消除其症状, 即可确认是某元素的作用。

1) 关于病害方面的工作。

- a) 详细记载自然条件下的症状, 发病部位, 寄主范围, 地理分布;
- b) 根据柯赫氏准则进行病原菌的分离、培养、人工接种等一系列实验工作, 并将各项实验按: 材料、方法、实验结果、作详细记录, 然后与自然条件下病害的发生状况加以对比研究分析, 证明是新病害。

2) 关于病原真菌方面的工作。

- a) 在显微镜操作条件下, 做好病原真菌的原始记录, 主要包括: 病原菌的有性或无性繁殖器官或两者的形态学特征; 鉴别性特征集要; 必要的绘图或照相;
- b) 根据所得到的病原真菌形态特征、病害特性、寄主植物等第一手材料, 系统查阅有关植物病害和真菌文献, 经过查证和核对, 证明确实是以前没有报道过的病害或病原真菌。