



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103789215 B

(45) 授权公告日 2015. 10. 21

(21) 申请号 201410006425. 3

(22) 申请日 2014. 01. 07

(73) 专利权人 广西大学

地址 530004 广西壮族自治区南宁市西乡塘区大学东路 100 号

(72) 发明人 张君成 李界秋 黄柳 陈江凝 谭金乐

(74) 专利代理机构 广西南宁公平专利事务有限责任公司 45104

代理人 王素娥

(51) Int. Cl.

C12N 1/14(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101993822 A, 2011. 03. 30, 权利要求 1-3、说明书第 4 页第 0031 段-第 5 页第 0054 段以及说明书附图 1-7.

CN 102876767 A, 2013. 01. 16, 全文.

JP 特开平 7-69823 A, 2000. 06. 27, 全文.
US 6080565 A, 2000. 06. 27, 全文.
WO 01/07596 A1, 2001. 02. 01, 全文.

蒋家珍等. 新型杀菌剂对立枯丝核菌的室内毒力测定. 《江苏农业学报》. 2004, 第 20 卷(第 4 期), 第 271-272 页.

审查员 罗平

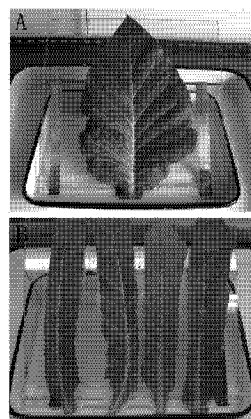
权利要求书1页 说明书5页 附图3页

(54) 发明名称

一种利用离体叶脉片接种烟草立枯病的人工发病方法

(57) 摘要

本发明公开了一种利用离体叶脉片接种烟草立枯病的人工发病方法, 该方法的步骤如下: 1) 接种用器具准备; 2) 烟苗培育; 3) 接种菌丝体的准备; 4) 离体叶脉片的采集处理; 5) 在接种器具上放置离体叶脉片; 6) 接种病菌; 7) 接种后处置。本发明的优点是: 1. 接种发病过程时间短, 占用空间场地少, 方法简易便捷, 工作效率高。2. 本发明利用较大的烟叶, 容易反映出结果病情的差异, 烟叶的取材也较有保证; 发病症状清晰易识别, 重现性好, 接种发病局部条件容易控制, 容易实现技术方法的标准化。



1. 一种利用离体叶脉片接种烟草立枯病的人工发病方法,其特征在于,将较大的烟草叶片,裁切成保留主叶脉的长片条(简称离体叶脉片),利用一套简单的器具接种烟草立枯病菌,导致离体叶脉片组织坏死而表现出清晰的发病症状;

人工发病方法的步骤如下:

1) 接种用器具准备:

接种用器具包括:大方盘、小方盘、玻璃罩、工作面板、支架板和支架片;用洁净剂将这些器具洗涤干净后备用;

2) 烟苗培育:

按常规方法培育烟苗,常规水肥管理,烟草叶片长度大于 20cm 即能使用;

3) 接种菌丝体的准备:

将立枯病菌移植到 PSA 普通真菌培养基平板中心,PSA 培养基成分为:马铃薯 200 克,蔗糖 20 克,琼脂 18 克,水 1000mL,28℃ 下培养至长出较大菌落,取直径为 6mm 打孔器在平板菌落外周打取大小一致的菌丝琼脂圆块,以此菌丝块作接种体;

4) 离体叶脉片的采集处理:

用干净剪刀剪取步骤 2) 烟草植株上的叶片,用干净的容器装回室内,在自来水下轻轻冲洗干净叶片表面,用干净的裁切工具将叶片裁切成保留主叶脉的离体叶脉片备用;

5) 在接种器具上放置离体叶脉片:

① 组装接种用器具,方法是:取出步骤 1) 备好的器具,将小方盘置于大方盘内的中间,取 2 个干净的普通橡皮筋分别套在工作面板的上下两头,将工作面板垫靠在支架板和支架片架成的支架上,使面板形成稳定的倾斜状态;

② 放置离体叶脉片:取步骤 4) 备好的离体叶脉片,顶端朝上,基端朝下,平行摆放于工作面板上,并挑起橡皮筋将离体叶脉片的两端夹稳;然后往小方盘内注入清水,使水面浸没离体叶脉片的基部;

6) 接种病菌:挑取步骤 3) 准备的菌丝块,轻轻贴放于步骤 5) 操作完备的离体叶脉片上;

7) 接种后处置:步骤 6) 操作完备后,取玻璃罩将小方盘以及盘内的工作面板和离体叶脉片全部罩在大方盘上,并往大方盘内注入薄层清水,使玻璃罩内部封闭并形成罩内稳定的高湿状态;然后将整套装置放于具备正常散射光的普通室内培养,培养温度维持在 26 ~ 28℃;

接种结果导致叶脉片出现非常清楚的坏死病斑,一般接种后 30 小时开始出现坏死症状,4 ~ 6 天后整个叶脉片全部坏死。

一种利用离体叶脉片接种烟草立枯病的人工发病方法

技术领域

[0001] 本发明涉及农业技术和生物技术。具体是一种利用离体叶脉片接种烟草立枯病的人工发病方法。

背景技术

[0002] 在植物病害控防研究中,许多基础问题的研究或重要理论问题的研究均离不开人工接种发病这基本手段。植物病害人工发病可以在活体植株上接种,也可在植物离体器官材料上接种。采用活体植株接种发病的研究结果,虽然更能反映寄主-病菌互作的本貌,但在活体上接种,往往需要较多的时间和空间场地,耗费较多的精力和财力,而且在许多情况下,局部条件控制的难度较大;而采用植物离体器官材料接种发病,往往需要较少的时间和空间需求,简单易行,接种发病的局部条件较容易控制,容易提高试验的规模与效率;许多植物病理学问题,采用离体材料接种发病手段进行研究,也能达到研究目的,或者说,采用在离体材料上接种与在活体植株上接种的研究结果是一致的。因此,在稻瘟病、稻纹枯病、小麦赤霉病、小麦白粉病、大豆锈病、马铃薯晚疫病、葡萄霜霉病、以及瓜类疫病、瓜类霜霉病、多种作物炭疽病等许多重要植物病害研究中,均有采用离体接种方法进行有关研究。

[0003] 由病原真菌 *Rhizoctonia solani* 侵染引起的烟草立枯病是烟草生产的重要病害之一,主要在苗期发病,引起死苗,严重时造成一些田块大量缺苗,近年在烟草成株期也常见发生,特别是一些高产栽培区,往往出现较高的发病率,由于在成株期该病害主要引起烟草植株的茎基部坏死,从而导致整株受害,造成较大的损失,这已成了生产上面临的重要问题。要解决这个问题,仍然有赖于加强烟草立枯病的基础研究,而人工发病又是该病害有关研究的基础手段之一。虽然该病害主要危害烟株茎基部,但发明人发现,立枯病菌也可以侵染烟草上部叶片引起清晰的坏死病斑,这个致病特性可在人工接种发病中加以利用,而至今未发现将烟草立枯病菌能侵染叶片致病的有利特性,在人工发病实践中加以应用并建立配套技术。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种利用离体叶脉片接种烟草立枯病的人工发病方法。

[0005] 本发明解决上述技术问题的技术方案如下:

[0006] 一种利用离体叶脉片接种烟草立枯病的人工发病方法,主要内容是将较大的烟草叶片,裁切成保留主叶脉的长片条(简称离体叶脉片),利用一套简单的器具接种烟草立枯病菌,导致离体叶脉片组织发病而表现出清晰的症状,人工发病方法的步骤如下:

[0007] 1. 接种用器具准备:接种用的主要器具包括:大方盘、小方盘、玻璃罩、工作面板、支架板和支架片等;用洁净剂将这些器具洗涤干净后备用。

[0008] 2. 烟苗培育:按常规方法培育烟苗,常规水肥管理,烟草叶片长度大于 20cm 即能使用。

[0009] 3. 接种菌丝体的准备:将立枯病菌移植到 PSA 等普通真菌培养基平板中心,PSA

培养基成分为：马铃薯 200 克，蔗糖 20 克，琼脂 18 克，水 1000mL，28℃ 下培养至长出较大菌落，取直径为 6mm 打孔器在平板菌落外周打取大小一致的菌丝琼脂圆块，以此菌丝块作接种体。

[0010] 4. 离体叶脉片的采集处理：用干净剪刀剪取步骤 2 烟草植株上的叶片，用干净的容器装回室内，在自来水下轻轻冲洗干净叶片表面，用干净的裁切工具将叶片裁切成保留主叶脉的离体叶脉片备用。

[0011] 5. 在接种器具上放置离体叶脉片：

[0012] 1) 组装接种用器具，方法是：取出步骤 1 备好的器具，将小方盘置于大方盘内的中间，取 2 个干净的普通橡皮筋分别套在工作面板的上下两头，将工作面板垫靠在支架板和支架片架成的支架上，使面板形成稳定的倾斜状态。

[0013] 2) 放置离体叶脉片：取步骤 4 备好的离体叶脉片，顶端朝上，基端朝下，平行摆放于工作面板上，并挑起橡皮筋将离体叶脉片的两端夹稳；然后往小方盘内注入清水，使水面浸没离体叶脉片的基部。

[0014] 6. 接种病菌：挑取步骤 3 准备的菌丝块，轻轻贴放于步骤 5 操作完备的叶脉片上。

[0015] 7. 接种后处置：步骤 6 操作完备后，取玻璃罩将小方盘以及盘内的工作面板和离体叶脉片全部罩在大方盘上，并往大方盘内注入薄层清水，使玻璃罩内部封闭并形成罩内稳定的高湿状态；然后将整套装置放于具备正常散射光的普通室内培养，培养温度维持在 26 ~ 28℃。

[0016] 接种结果导致叶脉片出现非常清楚的坏死病斑，一般接种后 30 小时开始出现坏死症状，4 ~ 6 天后整个叶脉片全部坏死。

[0017] 本发明的优点是：

[0018] 1) 采用较大的烟草叶片，发病结果病情轻重的差异容易得到体现；而且烟草植株可供利用的叶片数量较多，持续期较长；

[0019] 2) 实际实施仅用叶脉条而非全叶片，有利于在有限的器具空间内接种更多的寄主材料；

[0020] 3) 接种发病过程时间短，占用空间场地少；实施操作简易便捷，工作效率高；

[0021] 4) 发病症状清晰易识别，重现性好；

[0022] 5) 接种发病局部条件容易控制，过程管理简单，容易实现接种方法的标准化。

附图说明

[0023] 图 1 是本发明的离体叶脉片的处置方式示意图。

[0024] 图中，A 部示意离体叶片整片固定在工作面板及其基端插入水面下的状态；B 部示意离体叶脉片的式样及其接种后的状态。

[0025] 图 2 是本发明的一组离体叶脉片接种立枯病菌的发病表现过程样例 1。

[0026] 图中，A ~ D 部是发病后依次从病情轻到病情重的症状表现。E 和 F 部是空白接种对照，其中 E 部与 A 部同期，F 部与 D 部同期。

[0027] 图 3 是本发明的一组离体叶脉片接种立枯病菌的发病表现过程样例 2。

[0028] 图中，A ~ D 部是发病后依次从病情轻到病情重的症状表现。E 和 F 部是空白接种对照，其中 E 部与 A 部同期，F 部与 D 部同期。

[0029] 图 4 是本发明接种用器具示意图。

[0030] 图中 a 是大方盘, b 是小方盘, c 是玻璃罩, d 是工作面板, e 是支架板, f 是支架片, g 是橡皮筋; A 部是器具各组件装配完毕示意图; B 部是 A 部去掉玻璃罩 c 后的侧面观式样图; C 部是 B 部的正面观; D 部是在工作面板 d 放置离体叶脉片并罩上玻璃罩 c 后的整套器具正面观。

具体实施方式

[0031] 下面结合附图与实施例对本发明作进一步描述。

[0032] 进行离体叶片接种发病往往有如下的技术要求, 1) 叶片能稳定正常展开; 2) 叶片基端切口保持与水分接触但又要避免水液浸泡整个叶片, 3) 器具透明便于叶片采光和病情发展观察; 4) 器具简单且实施接种操作方便, 又能保持小环境处于高湿状态。发明人利用一套简单的器具组配成接种用具, 能达到上述的技术要求。

[0033] 将烟草叶片展放于这套器具的工作面板上, 如图 1 的 A 部所示, 非常有利于实施接种操作和发病过程观察, 由于烟草叶片较大, 占据面积大, 本发明设计为切取包含主叶脉的烟草离体叶脉片作材料, 如图 1 的 B 部所示, 这样有利于在有限的器具面积内接种更多的寄主材料, 提高效率; 实际上, 切取较大的烟草叶片的叶脉片作材料还有 2 个优势, 一是较长的叶脉片从始发病到严重发病, 有较多的病情变异空间, 因而非常适合用来开展病情差异的试验研究(如比较测定不同菌株致病力的大小等); 二是在烟草整个生育期中, 叶片较大者占大多数, 由于经裁切后都能适合本发明的使用, 使得接种工作的烟叶取材在时间和数量上不容易受到局限。

[0034] 烟草离体叶脉片接种立枯病菌后, 在 25~28℃ 条件下培养, 一般 30 小时后离体叶片可见坏死病斑出现, 如图 2 和图 3 的 A 部所示, 随着时间的推移, 病斑不断扩大并向叶脉片的两端扩展, 如图 2 和图 3 的 B~D 部所示, 最后可导致叶脉片全部坏死。从接种到叶脉片全部坏死通常耗时 4~6 天。

[0035] 接种导致病情发展的快慢或轻重, 与立枯病菌接种菌丝体菌龄状态有关, 也与接种后的培养温度有关, 病情轻重可用病斑大小等指标来衡量。

[0036] 实施例 1

[0037] 一种利用离体叶脉片接种烟草立枯病的人工发病方法, 在烟苗品种云烟 87 离体叶片上接种烟草立枯病菌菌株 Rs-1, 按如下步骤操作:

[0038] 1. 接种用器具准备: 用作接种的器具包括, 如图 4 所示的大方盘 a、小方盘 b、玻璃罩 c、工作面板 d、支架板 e 和支架片 f, 本实施例器具的用材与大小: 大方盘 a 为长 × 宽 × 高 = 40 × 30 × 3cm 的普通方盘; 小方盘 b 为长 × 宽 × 高 = 29 × 22 × 3cm 的普通方盘; 玻璃罩 c 为长 × 宽 × 高 = 31 × 25 × 20cm 的有机玻璃罩; 工作面板 d 为 24 × 24cm 的普通玻璃板, 支架板 e 为 24 × 9cm 的小玻璃板; 支架片 f 是两端折钩的薄金属片, 折钩后支架片长度为 15cm。用洁净剂将这些组件洗涤干净后备用。

[0039] 2. 烟苗培育: 按常规方法培育烟苗品种云烟 87, 常规水肥管理, 烟草叶片长度大于 20cm 即能使用。

[0040] 3. 接种菌丝体的准备: 将菌株 Rs-1 移植到 PSA 培养基平板中心, PSA 培养基组分为: 马铃薯 200 克、蔗糖 20 克、琼脂 18 克、水 1000mL; 在 28℃ 温度下培养 48 小时长出较大

菌落,取直径为 6mm 打孔器在平板菌落外周打取大小一致的菌丝琼脂圆块,以此菌丝块作接种体。

[0041] 4. 离体叶脉片的采集处理:用干净剪刀剪取步骤 2 烟草植株上的叶片,用干净的容器装回室内,在自来水下轻轻冲洗干净叶片表面,用干净的手术刀片将叶片裁切成保留主叶脉的离体叶脉片备用;

[0042] 5. 在接种器具上放置离体叶脉片:

[0043] 1) 组装接种用器具,方法是:取出步骤 1 备好的器具,将小方盘置于大方盘内的中间,取 2 个干净的普通橡皮筋分别套在工作面板的上下两头,在小方盘内用 3 条支架片将支架板和工作面板相互钩连成一个稳定的体系,使工作面板成倾斜状态,如图 4 的 B 和 C 部所示。

[0044] 2) 放置离体叶脉片:取步骤 4 备好的离体叶脉片,顶端朝上,基端朝下,平行摆放于工作面板上,并挑起橡皮筋将离体叶脉片的两端夹住固定,然后往小方盘内注入清水 800mL,水面浸没离体叶脉片的基部。

[0045] 6. 接种病菌:挑取步骤 3 准备的菌丝块,轻轻贴放于步骤 5 操作完备的叶脉片上,操作完备后的状态形如图 1 的 B 部所示;

[0046] 7. 接种后处置:步骤 6 操作完备后,取玻璃罩将小方盘以及盘内的工作面板和离体叶脉片全部罩在大方盘上,并往大方盘内注入薄层清水,使玻璃罩内部封闭并形成罩内稳定的高湿状态;然后将整套装置放于具备正常散射光的室内培养架上培养,培养温度维持在 26 ~ 28℃。

[0047] 结果离体叶脉片表现出如图 2 和图 3 一样清晰的坏死病斑;接种后 72 小时坏死病斑最宽距离为 6.1cm。

[0048] 实施例 2

[0049] 一种利用离体叶脉片接种烟草立枯病的人工发病方法,在烟苗品种云烟 87 离体叶片上接种烟草立枯病菌菌株 Rs-1,按实施例 1 的步骤 1 至步骤 7 操作实施,其中在步骤 7 的操作的与实施例 1 步骤 7 的操作有变化,实施例 1 的步骤 7) 接种后培养温度维持在 26 ~ 28℃,本实施例的步骤 7) 接种后培养温度维持在 20 ~ 22℃。结果离体叶脉片也表现出如图 2 和图 3 一样清晰的坏死病斑,但病斑扩大速度比实施例 1 的速度慢,接种后 120 小时坏死病斑最宽距离为 5.9cm。

[0050] 实施例 3

[0051] 一种利用离体叶脉片接种烟草立枯病的人工发病方法,在烟苗品种云烟 87 离体叶片上接种烟草立枯病菌菌株 Rs-1,按实施例 1 的步骤 1) 至步骤 7) 操作实施,其中在步骤 3) 的操作的与实施例 1 步骤 3) 的操作有变化,实施例 1 的步骤 3) 接种体菌丝的培养时长为 48 小时,本实施例的步骤 3) 接种体菌丝的培养时长为 96 小时。结果离体叶脉片也表现出如图 2 和图 3 一样清晰的坏死病斑,但病斑扩大速度比实施例 1 的速度慢,接种后 72 小时坏死病斑最宽距离为 2.8cm。

[0052] 实施例 4

[0053] 一种利用离体叶脉片接种烟草立枯病的人工发病方法,在烟苗品种云烟 87 离体叶片上接种烟草立枯病菌菌株 Rs-1,按实施例 1 的步骤 1) 至步骤 3) 操作实施,但在步骤 3) 中,本实施例的接种体菌丝培养时长为 96 小时;按实施例 1 的步骤 4) 至步骤 7) 操作实

施,但在步骤 7) 中,本实施例接种后的培养温度维持在 20 ~ 22℃ ;

[0054] 结果离体叶脉片同样表现出如图 2 和图 3 一样清晰的坏死病斑,但病斑扩大速度比实施例 1 的速度慢得多,接种后 120 小时坏死病斑最宽距离为 2.1cm。

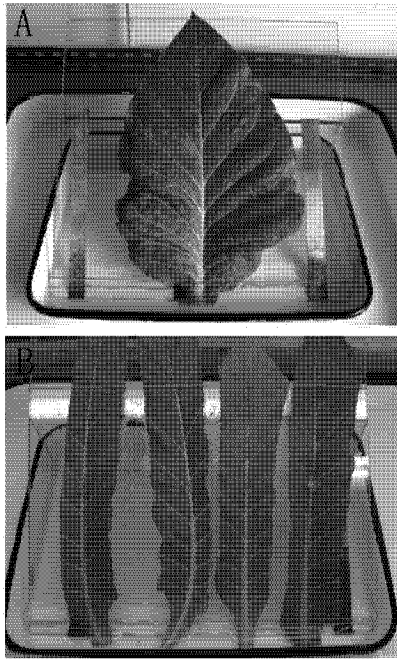


图 1

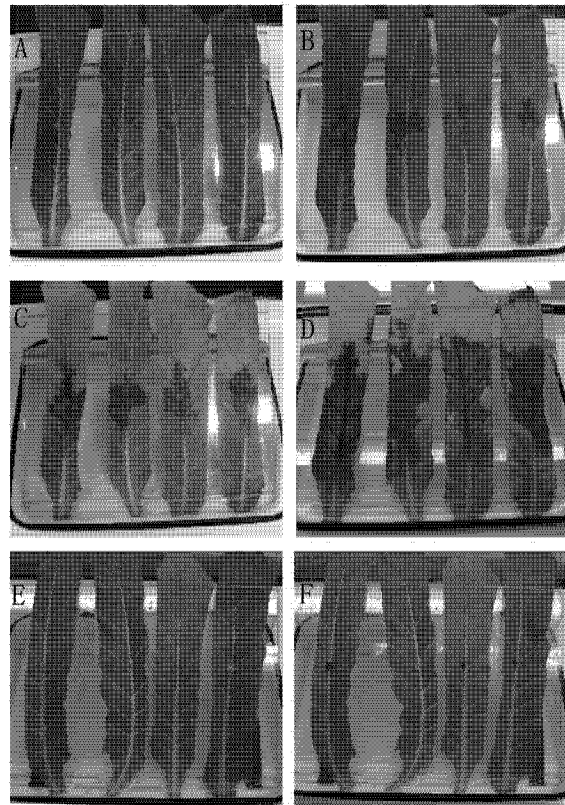


图 2

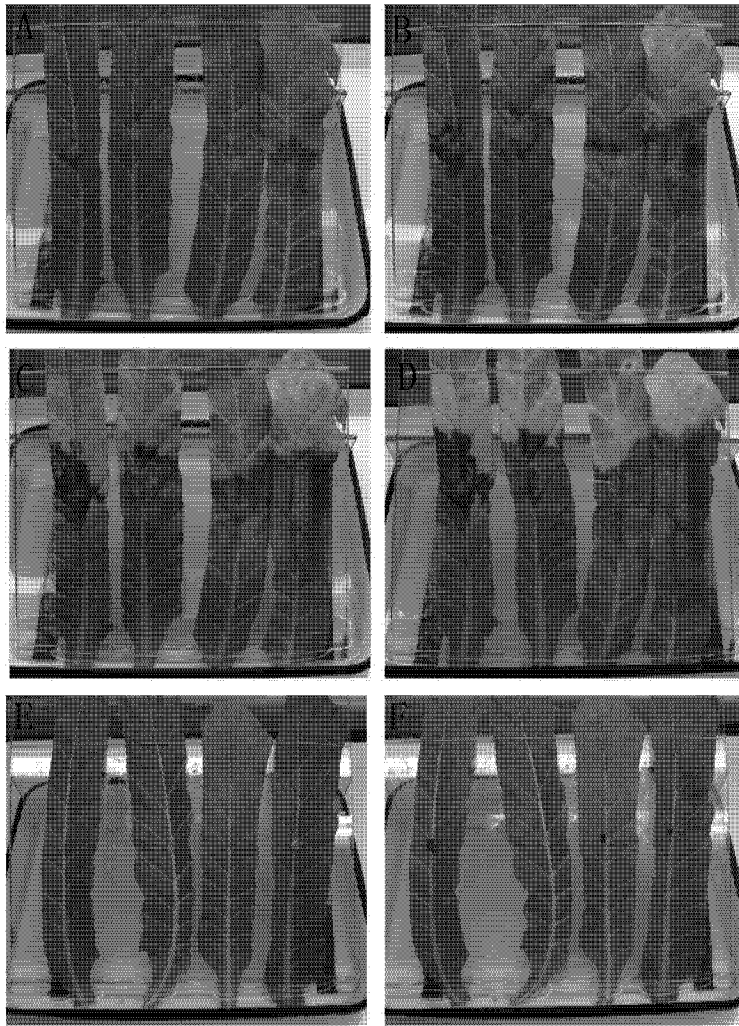


图 3

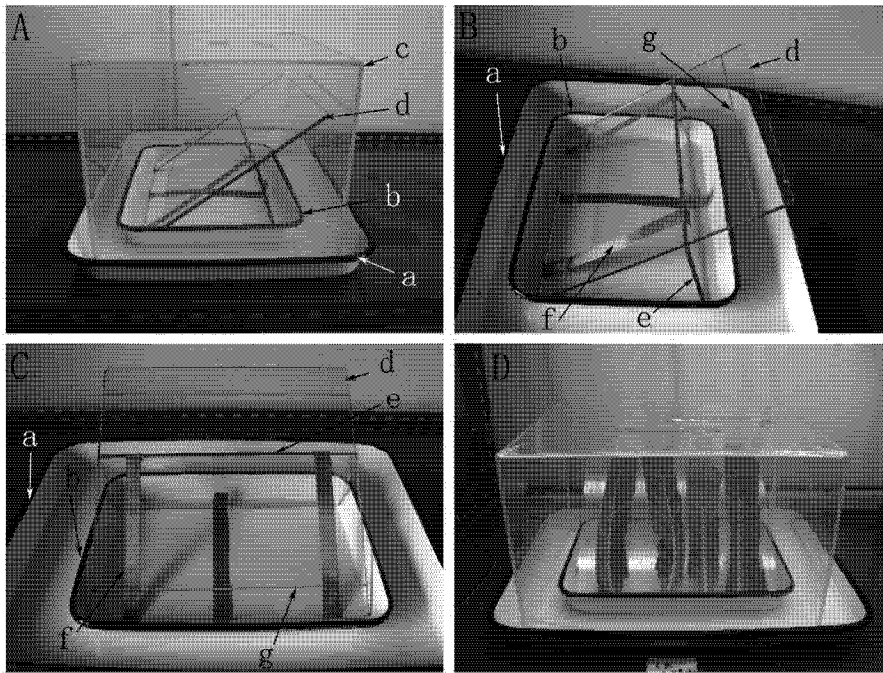


图 4