



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103789216 A

(43) 申请公布日 2014.05.14

(21) 申请号 201410006432.3

(22) 申请日 2014.01.07

(71) 申请人 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 黄柳 谭金乐 陈江凝

(74) 专利代理机构 广西南宁公平专利事务所有
限责任公司 45104

代理人 王素娥

(51) Int. Cl.

C12N 1/14 (2006.01)

权利要求书1页 说明书4页 附图4页

(54) 发明名称

一种烟草立枯病离体接种的人工发病方法

(57) 摘要

本发明公开了一种烟草立枯病离体接种的人工发病方法。该方法的步骤如下:1) 接种用主要器具准备;2) 烟苗培育;3) 接种菌丝体的准备;4) 离体叶片的采集;5) 离体叶片的处置;6) 接种病菌;7) 接种后处置。本发明的优点是:1) 所用器具简单,接种发病过程时间短,占用空间场地少;发病症状清晰易识别,重现性好。2) 实施操作简便快捷;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. 一种烟草立枯病离体接种的人工发病方法,其特征在于,在倾斜的培养皿内将烟草离体叶片接种烟草立枯病菌,导致叶片组织坏死而表现出清晰的发病症状;

操作步骤如下:

1) 接种用主要器具准备:用普通培养皿作接种用主要器具,清洁消毒后备用;

2) 烟苗培育:按常规方法培育烟苗,常规水肥管理,直至烟苗叶片长度与步骤1)的培养皿直径相近时,即可使用;

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) 离体叶片的采集:用干净剪刀,剪取步骤2)烟草植株上的叶片长度与步骤1)的培养皿直径相近的叶片,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后待用;

5) 离体叶片的处置:将步骤1 备好的培养皿倾斜放置,打开皿盖,取步骤4)准备的离体叶片一片展开放入培养皿内,叶片的顶端置于倾斜培养皿的高处,叶片的基端置于培养皿的最低处,并用一段干净灭菌的短玻璃棒将叶片的基端压住,然后取干净清水注入培养皿,清水浸没叶片基部;

6) 接种病菌:挑取步骤3)准备的菌丝块,轻轻贴放于步骤5)操作完备的叶片上,盖回培养皿盖;

7) 接种后处置:将步骤6) 装载接种叶片的培养皿置于具备正常散射光的普通室内培养,培养温度维持在 26 ~ 28℃;

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

一种烟草立枯病离体接种的人工发病方法

技术领域

[0001] 本发明涉及农业技术和生物技术。具体是一种烟草立枯病离体接种的人工发病方法。

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烟草立枯病离体接种的人工发病方法。

[0005] 本发明解决上述技术问题的技术方案如下:

[0006] 一种烟草立枯病离体接种的人工发病方法是在倾斜的培养皿内将烟草离体叶片接种烟草立枯病菌,导致叶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:

[0007] 1. 接种用主要器具准备:用普通培养皿作接种用主要器具,清洁消毒后备用。

[0008] 2. 烟苗培育:按常规方法培育烟苗,常规水肥管理,直至烟苗叶片长度与步骤1的培养皿直径相近时,即可使用。

[0009] 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。

[0010] 4. 离体叶片的采集:用干净剪刀,剪取步骤 2 烟草植株上的叶片长度与步骤 1 的培养皿直径相近的叶片,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后待用。

[0011] 5. 离体叶片的处置:将步骤 1 备好的培养皿倾斜放置,打开皿盖,取步骤 4 准备的离体叶片一片展开放入培养皿内,叶片的顶端置于倾斜培养皿的高处,叶片的基端置于培养皿的最低处,并用一段干净灭菌的短玻璃棒将叶片的基端压住,然后取干净清水注入培养皿,清水浸没叶片基部。

[0012] 6. 接种病菌:挑取步骤 3 准备的菌丝块,轻轻贴放于步骤 5 操作完备的叶片上,盖回培养皿盖。

[0013] 7. 接种后处置:将步骤 6 装载接种叶片的培养皿置于具备正常散射光的普通室内培养,培养温度维持在 26 ~ 28℃。

[0014] 接种结果导致叶片出现非常清楚的叶片坏死症状,一般接种后 30 小时开始出现坏死症状,4 ~ 6 天后整个叶片全部坏死。

[0015] 本发明的优点是:

[0016] 1) 所用器具简单,接种发病过程时间短,占用空间场地少。

[0017] 2) 发病症状清晰易识别,重现性好。

[0018] 3) 实施操作简易便捷。

[0019] 4) 接种发病局部条件容易控制,容易实现技术方法的标准化。

附图说明

[0020] 图 1 是本发明接种用的培养皿处于倾斜状态。

[0021] 图 2 是本发明的离体叶片的放置方式及接种后的状态。

[0022] 图中,箭头所指的是接种体琼脂块。

[0023] 图 3 是本发明烟草离体叶片接种立枯病菌的发病表现过程样例 1。

[0024] 图中,A ~ C 部是同一叶片发病依次从病情轻到病情重的表现;D 部是接种对照的表现,箭头所指的是空白培养基琼脂块。

[0025] 图 4 是本发明烟草离体叶片接种立枯病菌的发病表现过程样例 2。

[0026] 图中,A ~ C 部是同一叶片发病依次从病情轻到病情重的表现;D 部是接种对照的表现,箭头所指的是空白培养基琼脂块。

[0027] 图 5 是本发明烟草叶片接种立枯病菌后严重发病的表现。

[0028] 图中 A ~ C 部是不同的叶片发病样例;D 部是接种对照的表现,箭头所指的是空白培养基琼脂块。

具体实施方式

[0029] 下面结合附图与实施例对本发明作进一步描述。

[0030] 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。发明人利用在

倾斜放置培养皿内加水的简单操作,巧妙地达到上述的技术要求。本发明以此技术要点为核心,建立一种在烟草离体叶上接种立枯病的配套方法,即以倾斜放置的培养皿为主要器具,如图1所示,在培养皿内放置离体叶片并接种病菌,如图2所示。烟草离体叶片接种立枯病菌后,在25~28℃条件下培养,一般30小时后离体叶片可见坏死出现,如图3的A部所示,随着时间的推移,病斑自接种点往四周扩大,最后可导致整个叶片坏死腐烂,如图3~图5所示。从接种到整个叶片坏死通常耗时4~5天。

[0031] 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。

[0032] 实施例1

[0033] 一种烟草立枯病离体接种的人工发病方法,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:

[0034] 1. 主要器具准备:采用直径为15cm的普通培养皿作接种用器具,清洁消毒后备用。

[0035] 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,直至烟苗叶片长度与步骤1的培养皿直径一致时(叶片长度为14cm左右),即可使用。

[0036] 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。

[0037] 4. 离体叶片的采集:用干净剪刀,剪取步骤2烟草植株上的叶片长度约为14cm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后待用。

[0038] 5. 离体叶片的处置:如图1所示将步骤1备好的培养皿倾斜放置;打开皿盖,取步骤4准备的离体叶片一片展开放入培养皿内,叶片的顶端置于倾斜培养皿的高处,叶片的基端置于培养皿的最低处,并用一段干净灭菌的短玻璃棒将叶片的基端压住,然后取30mL干净清水注入培养皿,清水浸没叶片基部,如图2所示。

[0039] 6. 接种病菌:挑取步骤3准备的菌丝块,轻轻贴放于步骤5操作完备的叶片上,如图2所示,然后盖回培养皿盖,使培养皿内形成一个稳定高湿度的小空间。

[0040] 7. 接种后处置:将步骤6装载接种叶片的培养皿置于具备正常散射光的普通室内培养架上培养,培养温度维持在25~27℃。

[0041] 结果表现出如图3~图5一样清晰的叶片坏死症状;接种后72小时坏死病斑直径为4.5cm。

[0042] 实施例2

[0043] 一种烟草立枯病离体接种的人工发病方法,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,操作步骤按实施例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25~27℃,本实施例的步骤7)接种后培养温度维持在19~21℃。结果也表现出如图3~图5一样清晰的叶片坏死症状,但病斑扩大速度比实施例1的速度慢,接种后72小时坏死病斑直径为1.7cm。

[0044] 实施例3

[0045] 采用本发明一种烟草立枯病离体接种的人工发病方法,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,操作步骤按实施例 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。结果也表现出如图 3 ~图 5 一样清晰的叶片坏死症状,但病斑扩大速度比实施例 1 的速度慢,接种后 72 小时坏死病斑直径为 1.9cm。

[0046] 实施例 4

[0047] 采用本发明一种烟草立枯病离体接种的人工发病方法,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,操作步骤按实施例 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 19 ~ 21℃;结果同样表现出如图 3 ~图 5 一样清晰的叶片坏死症状,但病斑扩大速度比实施例 1 的速度慢得多,接种后 72 小时坏死病斑直径为 0.9cm。

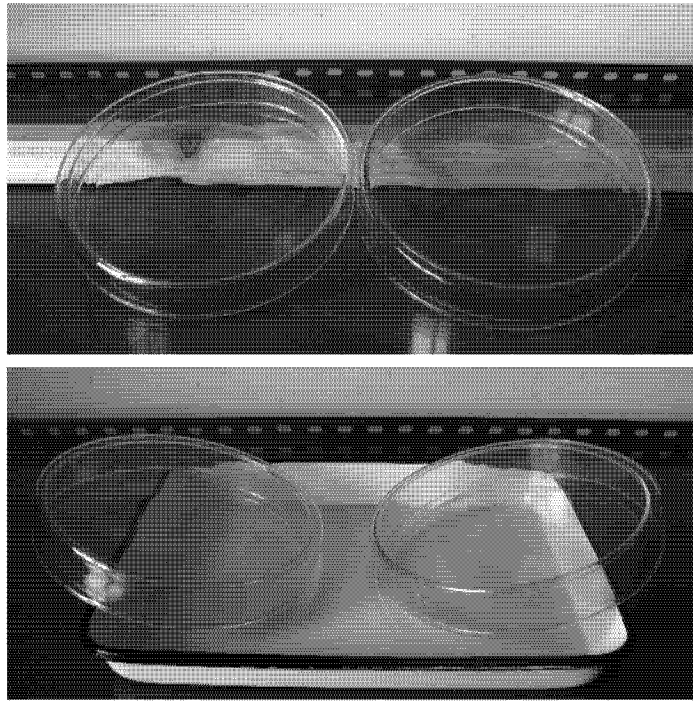


图 1



图 2

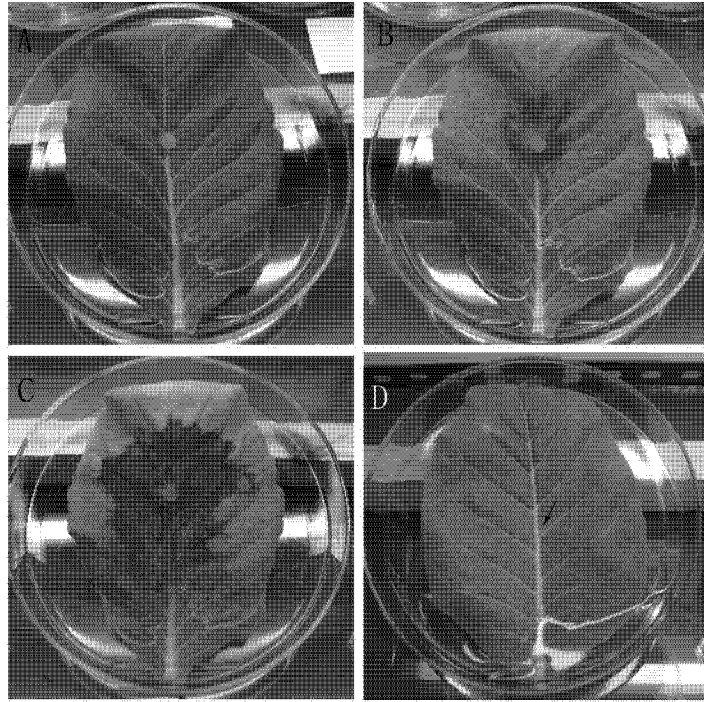


图 3

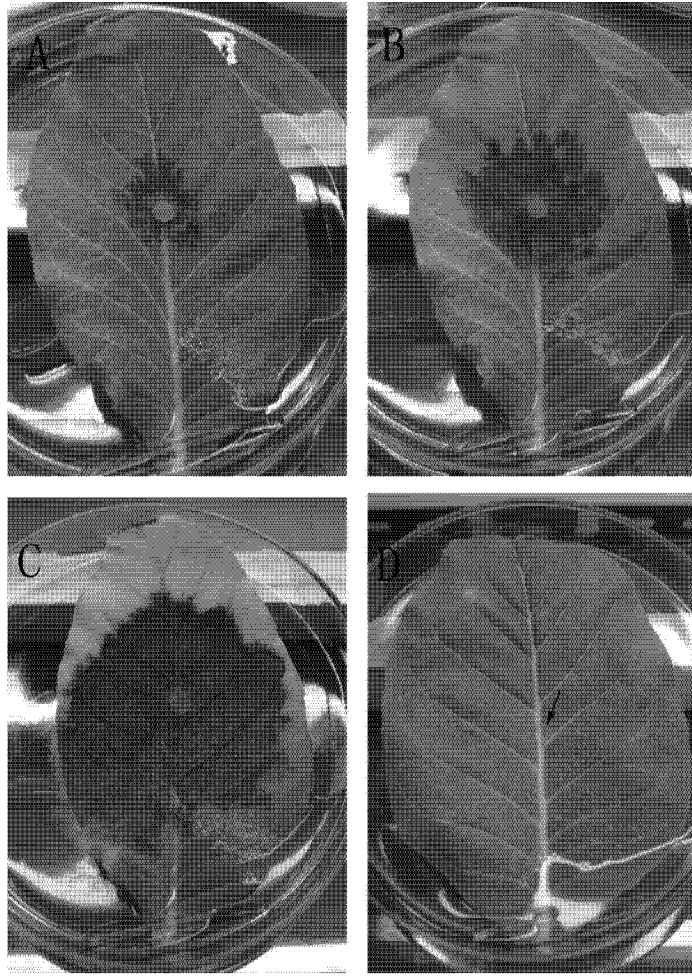


图 4

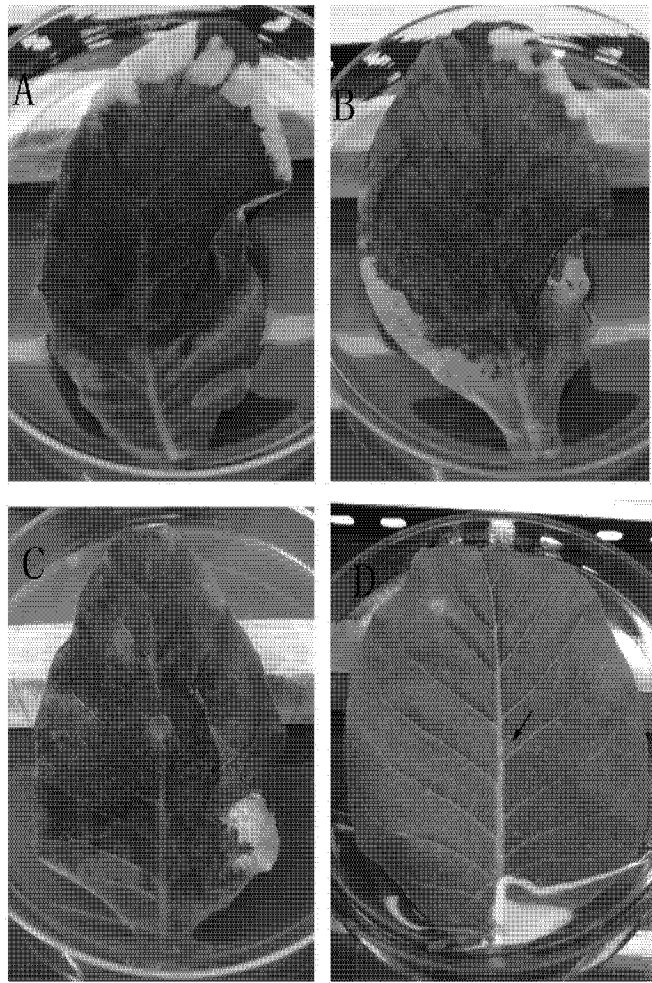


图 5