

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C12N 1/14 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810061931.7

[43] 公开日 2009 年 2 月 25 日

[11] 公开号 CN 101372670A

[22] 申请日 2008.5.27

[21] 申请号 200810061931.7

[71] 申请人 王立如

地址 315300 浙江省慈溪市浒山街道明洲路
818 号

共同申请人 王汉荣 徐永江 王连平 房聪玲

[72] 发明人 王立如 王汉荣 徐永江 王连平
房聪玲

权利要求书 1 页 说明书 5 页

[54] 发明名称

一种葡萄白粉菌的离体接种方法

[57] 摘要

一种葡萄白粉菌的离体接种方法，包括如下步骤：离体叶片的选择：采摘葡萄梢尖以下的第 3 ~ 6 片的叶片；菌种的选用：选用新鲜的葡萄白粉病菌孢子；药剂的配制：配制浓度为 10 ~ 90mg/L 的苯丙咪唑溶液；叶片的处理：清理后在叶片的叶柄上缠绕无菌棉，加滴配制好的苯丙咪唑溶液；接种：直接接种到上述经苯丙咪唑溶液处理的离体叶片上培养。本发明采用苯丙咪唑作为保绿剂使用，将葡萄白粉菌接种在离体叶片上，苯丙咪唑对离体叶片发生白粉病无影响，解决了葡萄白粉菌的培养与保藏的问题。

1.一种葡萄白粉菌的离体接种方法，其特征在于包括如下步骤：

离体叶片的选择：

采摘葡萄梢尖以下的第3~6片的新鲜叶片；

菌种的选用：

选用葡萄种植园中新鲜的葡萄白粉病菌孢子；

药剂的配制：

配制浓度为10~90mg/L的苯丙咪唑溶液；

叶片的处理：

将采集的新鲜葡萄叶片，用无菌水冲洗三遍后，用0.5%NaClO溶液中浸泡5分钟，再用无菌水冲洗三遍，沥干置于无菌培养皿中，叶片的叶柄上缠绕无菌棉，加滴配制好的苯丙咪唑溶液；

接种：

将毛笔在70%酒精中消毒后晾干，将感染白粉病的葡萄叶片上的白粉病菌，用毛笔轻刷，直接接种到上述经苯丙咪唑溶液处理的离体叶片上，置于25℃、RH为85%的人工气候箱中，每天进行16小时光培养，8小时暗培养。

2.如权利要求1所述的葡萄白粉菌的离体接种方法，其特征在于：所述苯丙咪唑溶液的浓度为50~70 mg/L。

3.如权利要求1或2所述的葡萄白粉菌的离体接种方法，其特征在于：采摘的离体叶片为葡萄梢尖以下的第3片叶。

一种葡萄白粉菌的离体接种方法

（一）技术领域

本发明涉及一种葡萄白粉菌的接种方法。

（二）背景技术

葡萄白粉菌属于专性寄生菌，目前只能在鲜活的组织材料上培养和保藏，因此葡萄白粉菌的培养和保存十分困难。现在技术条件下，葡萄白粉菌只在葡萄生长的植株上存在并存活，当其侵染葡萄植株的叶片和果实时才发病，并产生新鲜的白粉病菌孢子，才能进行防病、抗病育种等试验研究，受自然条件的影响大，存在时间短，不容易控制和保存，对实验研究带来不便。

（三）发明内容

为了克服现有葡萄白粉菌能在鲜活的组织材料上培养和保藏因此给实验研究带来不便的不足，本发明提供一种葡萄白粉菌的离体接种方法。

本发明解决其技术问题的技术方案是：一种葡萄白粉菌的离体接种方法，包括如下步骤：离体叶片的选择：采摘葡萄梢尖以下的第3~6片的新鲜叶片；

菌种的选用：选用葡萄种植园中新鲜的葡萄白粉病菌孢子；

药剂的配制：配制浓度为10~90mg/L的苯丙咪唑溶液；

叶片的处理：将采集的新鲜葡萄叶片，用无菌水冲洗三遍后，用0.5%NaClO溶液中浸泡5分钟，再用无菌水冲洗三遍，沥干置于无菌培养皿中，叶片的叶柄上缠绕无菌棉，加滴配制好的苯丙咪唑溶液；

接种：将毛笔在70%酒精中消毒后晾干，将感染白粉病的葡萄叶片上的白粉病菌，用毛笔轻刷，直接接种到上述经苯丙咪唑溶液处理的离体叶片上，置于25℃、RH为85%的人工气候箱中，每天进行16小时光培养，8小时暗培养。

优选的，所述苯丙咪唑溶液的浓度为50~70 mg/L，当苯丙咪唑溶液的浓度为

50~70 mg/L 时, 其保绿效果最好, 可保绿 22 天以上。

优选的, 采摘的离体叶片为葡萄梢尖以下的第 3 片叶, 葡萄梢尖以下的第 3 片离体叶片的白粉病发病最好。

本发明的有益效果在于: 采用苯丙咪唑作为保绿剂使用, 将葡萄白粉菌接种在离体叶片上, 苯丙咪唑对离体叶片发生白粉病无影响, 解决了葡萄白粉菌的培养与保藏的问题。

(四) 具体实施方式

下面结合具体实施方式对本发明作进一步详细说明。

实施例一

一种葡萄白粉菌的离体接种方法, 包括如下步骤:

离体叶片的选择: 采摘葡萄梢尖以下的第 3 片的新鲜叶片;

菌种的选用: 选用葡萄种植园中新鲜的葡萄白粉病菌孢子;

药剂的配制: 配制浓度为 60mg/L 的苯丙咪唑溶液;

叶片的处理: 将采集的新鲜葡萄叶片, 用无菌水冲洗三遍后, 用 0.5%NaClO 溶液中浸泡 5 分钟, 再用无菌水冲洗三遍, 沥干置于无菌培养皿中, 叶片的叶柄上缠绕无菌棉, 加滴配制好的苯丙咪唑溶液;

接种: 将毛笔在 70%酒精中消毒后晾干, 将感染白粉病的葡萄叶片上的白粉病菌, 用毛笔轻刷, 直接接种到上述经苯丙咪唑溶液处理的离体叶片上, 置于 25℃、RH 为 85%的人工气候箱中, 每天进行 16 小时光培养, 8 小时暗培养。

实施例二

一种葡萄白粉菌的离体接种方法, 包括如下步骤:

离体叶片的选择: 采摘葡萄梢尖以下的第 4 片的新鲜叶片;

菌种的选用: 选用葡萄种植园中新鲜的葡萄白粉病菌孢子;

药剂的配制: 配制浓度为 10mg/L 的苯丙咪唑溶液;

叶片的处理: 将采集的新鲜葡萄叶片, 用无菌水冲洗三遍后, 用 0.5%NaClO 溶液中浸泡 5 分钟, 再用无菌水冲洗三遍, 沥干置于无菌培养皿中, 叶片的叶柄上缠绕无菌棉, 加滴配制好的苯丙咪唑溶液;

接种：将毛笔在 70%酒精中消毒后晾干，将感染白粉病的葡萄叶片上的白粉病菌，用毛笔轻刷，直接接种到上述经苯丙咪唑溶液处理的离体叶片上，置于 25℃、RH 为 85%的人工气候箱中，每天进行 16 小时光培养，8 小时暗培养。

实施例三

一种葡萄白粉菌的离体接种方法，包括如下步骤：

离体叶片的选择：采摘葡萄梢尖以下的第 5 片的新鲜叶片；

菌种的选用：选用葡萄种植园中新鲜的葡萄白粉病菌孢子；

药剂的配制：配制浓度为 90mg/L 的苯丙咪唑溶液；

叶片的处理：将采集的新鲜葡萄叶片，用无菌水冲洗三遍后，用 0.5%NaClO 溶液中浸泡 5 分钟，再用无菌水冲洗三遍，沥干置于无菌培养皿中，叶片的叶柄上缠绕无菌棉，加滴配制好的苯丙咪唑溶液；

接种：将毛笔在 70%酒精中消毒后晾干，将感染白粉病的葡萄叶片上的白粉病菌，用毛笔轻刷，直接接种到上述经苯丙咪唑溶液处理的离体叶片上，置于 25℃、RH 为 85%的人工气候箱中，每天进行 16 小时光培养，8 小时暗培养。

实施例四

一种葡萄白粉菌的离体接种方法，包括如下步骤：

离体叶片的选择：采摘葡萄梢尖以下的第 6 片的新鲜叶片；

菌种的选用：选用葡萄种植园中新鲜的葡萄白粉病菌孢子；

药剂的配制：配制浓度为 70mg/L 的苯丙咪唑溶液；

叶片的处理：将采集的新鲜葡萄叶片，用无菌水冲洗三遍后，用 0.5%NaClO 溶液中浸泡 5 分钟，再用无菌水冲洗三遍，沥干置于无菌培养皿中，叶片的叶柄上缠绕无菌棉，加滴配制好的苯丙咪唑溶液；

接种：将毛笔在 70%酒精中消毒后晾干，将感染白粉病的葡萄叶片上的白粉病菌，用毛笔轻刷，直接接种到上述经苯丙咪唑溶液处理的离体叶片上，置于 25℃、RH 为 85%的人工气候箱中，每天进行 16 小时光培养，8 小时暗培养。

实施例五

一种葡萄白粉菌的离体接种方法，包括如下步骤：

离体叶片的选择：采摘葡萄梢尖以下的第3片的新鲜叶片；

菌种的选用：选用葡萄种植园中新鲜的葡萄白粉病菌孢子；

药剂的配制：配制浓度为50mg/L的苯丙咪唑溶液；

叶片的处理：将采集的新鲜葡萄叶片，用无菌水冲洗三遍后，用0.5%NaClO溶液中浸泡5分钟，再用无菌水冲洗三遍，沥干置于无菌培养皿中，叶片的叶柄上缠绕无菌棉，加滴配制好的苯丙咪唑溶液；

接种：将毛笔在70%酒精中消毒后晾干，将感染白粉病的葡萄叶片上的白粉病菌，用毛笔轻刷，直接接种到上述经苯丙咪唑溶液处理的离体叶片上，置于25℃、RH为85%的人工气候箱中，每天进行16小时光培养，8小时暗培养。

实施例六

一种葡萄白粉菌的离体接种方法，包括如下步骤：

离体叶片的选择：采摘葡萄梢尖以下的第4片的新鲜叶片；

菌种的选用：选用葡萄种植园中新鲜的葡萄白粉病菌孢子；

药剂的配制：配制浓度为20mg/L的苯丙咪唑溶液；

叶片的处理：将采集的新鲜葡萄叶片，用无菌水冲洗三遍后，用0.5%NaClO溶液中浸泡5分钟，再用无菌水冲洗三遍，沥干置于无菌培养皿中，叶片的叶柄上缠绕无菌棉，加滴配制好的苯丙咪唑溶液；

接种：将毛笔在70%酒精中消毒后晾干，将感染白粉病的葡萄叶片上的白粉病菌，用毛笔轻刷，直接接种到上述经苯丙咪唑溶液处理的离体叶片上，置于25℃、RH为85%的人工气候箱中，每天进行16小时光培养，8小时暗培养。

实施例七

一种葡萄白粉菌的离体接种方法，包括如下步骤：

离体叶片的选择：采摘葡萄梢尖以下的第5片的新鲜叶片；

菌种的选用：选用葡萄种植园中新鲜的葡萄白粉病菌孢子；

药剂的配制：配制浓度为40mg/L的苯丙咪唑溶液；

叶片的处理：将采集的新鲜葡萄叶片，用无菌水冲洗三遍后，用0.5%NaClO

溶液中浸泡 5 分钟，再用无菌水冲洗三遍，沥干置于无菌培养皿中，叶片的叶柄上缠绕无菌棉，加滴配制好的苯丙咪唑溶液；

接种：将毛笔在 70%酒精中消毒后晾干，将感染白粉病的葡萄叶片上的白粉病菌，用毛笔轻刷，直接接种到上述经苯丙咪唑溶液处理的离体叶片上，置于 25℃、RH 为 85%的人工气候箱中，每天进行 16 小时光培养，8 小时暗培养。

实施例八

一种葡萄白粉菌的离体接种方法，包括如下步骤：

离体叶片的选择：采摘葡萄梢尖以下的第 3 片的新鲜叶片；

菌种的选用：选用葡萄种植园中新鲜的葡萄白粉病菌孢子；

药剂的配制：配制浓度为 80mg/L 的苯丙咪唑溶液；

叶片的处理：将采集的新鲜葡萄叶片，用无菌水冲洗三遍后，用 0.5%NaClO 溶液中浸泡 5 分钟，再用无菌水冲洗三遍，沥干置于无菌培养皿中，叶片的叶柄上缠绕无菌棉，加滴配制好的苯丙咪唑溶液；

接种：将毛笔在 70%酒精中消毒后晾干，将感染白粉病的葡萄叶片上的白粉病菌，用毛笔轻刷，直接接种到上述经苯丙咪唑溶液处理的离体叶片上，置于 25℃、RH 为 85%的人工气候箱中，每天进行 16 小时光培养，8 小时暗培养。