

葡萄霜霉病抗病性鉴定方法及品种抗病性测定

唐兴敏^{1,2}, 孙磊³, 张玮^{1,2}, 李兴红^{1,2*}

(1. 北京市农林科学院植物保护环境保护研究所, 北京 100097; 2. 北方果树病虫害绿色防控北京市重点实验室, 北京 100097; 3. 北京市农林科学院林业果树研究所, 北京 100097)

摘要 本文通过对葡萄霜霉病抗病性鉴定方法进行优化,建立了一种更为快捷、方便、可靠的鉴定方法,并对 32 个葡萄品种对霜霉病抗病性进行了鉴定,为葡萄抗病品种的选育和应用提供依据。结果显示:以田间混合的霜霉病菌为接种体采用叶盘法鉴定葡萄品种的抗病性更加快捷、方便。供试的 32 个葡萄品种对葡萄霜霉病的抗性存在显著差异。其中免疫品种有‘康拜尔早生’;高抗的有‘阳光玫瑰’、‘美乐’、‘Ms27-31’等 5 个品种;中抗的有‘贝达’、‘小芒森’、‘2E-16-2’等 6 个品种;低抗的有‘瑞都红玉’、‘早黑宝’、‘摩尔多瓦’等 10 个品种;感病的有‘里扎马特’、‘玫瑰香’、‘香妃’等 10 个品种。

关键词 葡萄; 霜霉病; 品种; 抗性鉴定

中图分类号: S 436.636.1 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2017077

Development of resistance identification method and determination of disease resistance of different grape cultivars to the grapevine downy mildew

TANG Xingmin^{1,2}, SUN Lei³, ZHANG Wei^{1,2}, LI Xinghong^{1,2}

(1. Institute of Plant and Environmental Protection, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China; 2. Beijing Municipal Key Laboratory for Environmental Friendly Management on Pests of North China Fruits, Beijing 100097, China; 3. Institute of Forestry and Pomology, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China)

Abstract This study aimed at establishing a more rapid, convenient and reliable method for identification of disease resistance to grapevine downy mildew via the optimization of resistance identification method. Resistance of 32 grape cultivars to downy mildew was identified. The results showed that using mixed strains and leaf disc method was more rapid and convenient for resistance identification. There were significant differences in the resistance to downy mildew among the 32 tested grape cultivars. ‘Campbell early’ was the only immune cultivar. 5 cultivars including ‘Shine-Muscat’, ‘Merlot’, ‘Ms27-31’ etc. were highly resistant. 6 cultivars including ‘Beta’, ‘Petit Manseng’, ‘2E-16-2’ etc. were moderately resistant. 10 cultivars including ‘Ruidu Hongyu’, ‘Zaoheibao’, ‘The Republic of Moldova’ etc. were weekly resistant, while 10 cultivars including ‘Rizamat’, ‘Muscat’, ‘Xiangfei’ etc. were susceptible.

Key words grape; *Plasmopara viticola*; cultivar; resistance identification

葡萄霜霉病 *Plasmopara viticola* (Berk. et Curtis) Barl. et de Toni 是葡萄生产上的第一大病害,主要危害葡萄叶片,影响果实品质,严重时可使葡萄减产 30%~50%,甚至 80%以上^[1],严重制约我国葡萄产业的发展^[2]。据国内外有关报道,不同葡萄品种对霜霉病的抗性存在明显差异^[3-6]。种植抗病葡萄品种是防治葡萄霜霉病最简单、经济、有效

的方法,因此,选育抗病品种是控制葡萄霜霉病的有效途径,而快速、方便、可靠的抗病性鉴定方法是筛选葡萄抗霜霉病品种的前提。目前,常用的较为简单快速的葡萄霜霉病抗病性鉴定方法为室内离体叶片接种鉴定法,即室内接种整个叶片或叶盘^[1,7],但哪种方式以及菌株的选择更为高效稳定并不明

收稿日期: 2017-03-14 修订日期: 2017-05-02

基金项目: 国家现代农业葡萄产业技术体系(CARS-30)

* 通信作者 E-mail:lixinghong1962@163.com

确。本研究在已有鉴定方法的基础上,通过整叶法和叶盘法的比较以及菌株的筛选进行优化,试图获得一种更为快捷、方便、可靠的鉴定方法,为葡萄霜霉病抗病品种的选育提供指导。在此基础上对生产上主要栽培的葡萄品种以及部分新育品种进行抗病性鉴定,为葡萄抗病品种的利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌源

供试的葡萄霜霉菌来自北京地区葡萄园,采集感染葡萄霜霉菌病的病叶带回实验室备用。

1.2 供试品种

供试葡萄品种共 32 个,其中欧亚种有‘瑞都红玫’、‘京香玉’、‘玫瑰香’、‘品丽珠’、‘小芒森’、‘赤霞珠’、‘美乐’、‘瑞都红玉’、‘无核翠宝’、‘瑞都香玉’、‘摩尔多瓦’、‘香妃’、‘早黑宝’、‘红地球’、‘美人指’、‘里扎马特’、‘0101’、‘0108’、‘0105’;欧美杂种有‘夏黑’、‘阳光玫瑰’、‘康拜尔早生’;美洲种有‘河岸’;欧亚种和欧美杂种杂交后代有‘2E-16-2’、‘6E-14-10’、‘3E-16-23’、‘3E-21-8’、‘3W-16-14’;欧亚种和圆叶葡萄回交后代有‘R23’、‘Ms27-31’、‘39’;美洲种和河岸葡萄的杂交后代有‘贝达’。

1.3 试验方法

1.3.1 接种体的筛选

1.3.1.1 接种体的准备

将田间采集的葡萄霜霉病叶冲洗后保湿 24 h,长出新鲜霜霉菌菌备用,记为田间混合菌株;田间采回的带有葡萄霜霉病单个病斑的葡萄病叶,用无菌水冲洗后放置在保湿盒中进行保湿,24 h 后,将长出的新鲜孢子囊扫描到健康的幼嫩叶片的叶背面,接种后的叶片放到保湿盒中,20℃,L//D=16 h//8 h 保湿培养,待 4~5 d 长出霉层后待用,记为第 2 代菌株;将第 2 代菌株扫描至健康叶片上继续培养,长出霉层后待用,记为第 3 代菌株。供试的葡萄品种选用‘瑞都红玫’,分别用田间混合菌株,第 2 代菌株和第 3 代菌株进行接种。接种浓度为 1×10^5 个孢子囊/mL 的孢子囊悬浮液。

1.3.1.2 葡萄霜霉菌的接种

取供试葡萄新枝条上的 2~4 位健康叶片,用 1%(质量百分浓度)次氯酸钠溶液消毒 30 s,用灭菌的超纯水冲洗 3 次,滤纸吸干叶片表面的水分,再用打孔器打取直径 1.5 cm 的叶盘,放入铺有两层湿润

滤纸的培养皿中进行保湿。每个平皿均匀摆放 10 个叶盘,叶背面朝上。采用滴接法接种,每个叶盘中央用移液器接种 25 μ L 孢子囊悬浮液。20℃培养箱中过夜黑暗培养,第 2 天用无菌滤纸吸干叶盘表面的液体,用封口膜封住培养皿,继续培养,培养条件为:温度 20℃,光照周期 L//D=16 h//8 h。每处理 10 个叶盘,3 次重复。9 d 后调查结果。

1.3.2 整叶法和叶盘法的比较

整叶法即将整个叶片叶背向上放置到保湿装置中,接种时,每个叶片多点接种,每个接种点面积约等于叶盘面积,每张叶片为 1 个处理,3 次重复,叶盘法及其他处理方法同 1.3.1.2,接种田间混合菌株的新鲜孢子囊。

1.3.3 32 个葡萄品种对霜霉病的抗病性测定

自北京市农林科学院林业果树研究所采集 32 个供试葡萄品种的幼嫩叶片带回实验室备用,试验方法同 1.3.1.2,接种田间混合菌株的新鲜孢子囊。

1.3.4 结果统计及分级标准

结果调查按叶盘的感病面积分级记载,统计病情指数。分级标准^[8]为 0 级:无病斑;1 级:病斑面积占叶盘面积的 5%及以下;3 级:病斑面积占叶盘面积的 6%~25%;5 级:病斑面积占叶盘面积的 26%~50%;7 级:病斑面积占叶盘面积的 51%~75%;9 级:病斑面积占叶盘面积的 75%以上。整叶法中,一个接种点视为一个叶盘。

病情指数 = $\frac{\sum(\text{各级病叶数} \times \text{相应级数的代表值})}{(\text{总叶数} \times \text{最高级数的代表值})} \times 100$;

参考赵雪艳等分级标准^[8]加以改进,将葡萄叶片感染霜霉病的表现型分为 5 级,即免疫(I):病情指数 0.00;高抗:病情指数 15.00 以下;中抗:病情指数为 15.00~25.00;低抗:病情指数为 25.01~50.00;感病:病情指数 50.00 以上。

1.3.5 数据统计分析

试验数据用 SPSS 19.0 软件进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 接种体的确定

不同菌株接种试验结果表明,田间混合菌株接种的叶片发病率最高,达 100%,第 2 代和第 3 代菌株接种的叶片发病率依次降低,分别为 86.67%和 30.00%。田间混合菌株侵染的叶片病情指数最高,单病斑培

养的菌株随培养代数的增加,病情指数降低,且重复性变差(图 1)。故确定在抗病性测定中使用田间混合菌株。

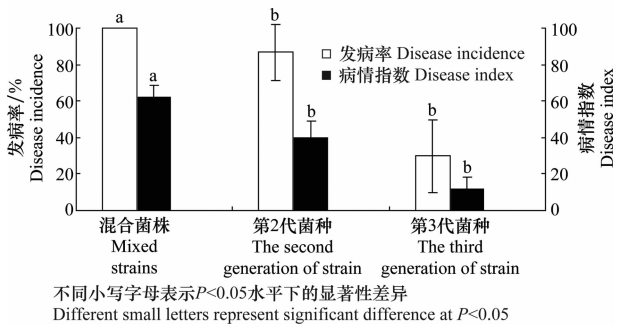


图 1 不同菌株接种叶片的发病情况

Fig.1 Disease incidence on leaves inoculated with different strains

2.2 整叶法和叶盘法两种接种方法的比较

通过整叶法和叶盘法两种接种方法的比较,结果显示(图 2),整叶法和叶盘法接种的叶片发病率整齐一致;整叶法接种的叶片病情指数为 59.63,叶盘法为 68.89,叶盘法接种发病较重,更易于发病,且本试验在调查结果时是通过肉眼结合体视显微镜进行观察统计的,叶盘法更容易定量,调查结果时更加直观,易操作。综合分析,以下试验均使用叶盘法。

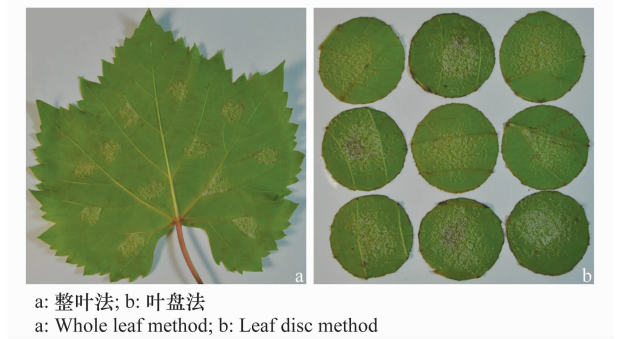


图 2 整叶法和叶盘法接种霜霉病菌后的发病情况

Fig.2 Disease incidence on leaves inoculated by whole leaves and leaf discs method with *Plasmopara viticola*

2.3 不同葡萄品种对霜霉病的抗性鉴定

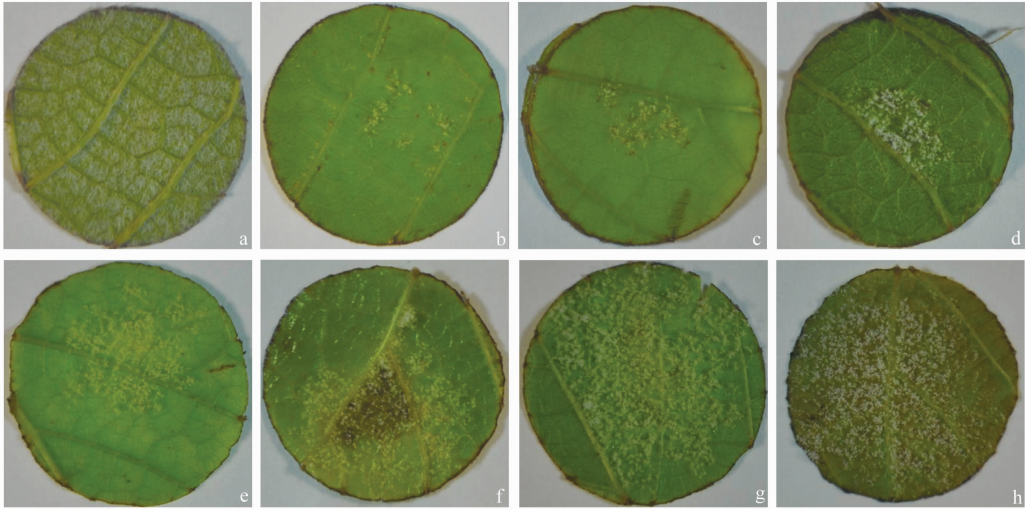
根据离体叶盘接菌试验结果,供试的 32 个品种接种霜霉病菌后,不同品种间发病率和发病指数有明显差异,如表 1,发病率为 0.00~100.00%,病情指数为 0.00~71.85。其中免疫的品种只有一个,即‘康拜尔早生’,病情指数为 0.00,占供试品种的 3.13%;高抗的品种有 5 个,如‘阳光玫瑰’、‘美乐’、‘Ms27-31’等,占供试品种的 15.63%;中抗的品种

有 6 个,如‘贝达’、‘小芒森’、‘2E-16-2’等,占供试品种的 18.75%;低抗的品种有 10 个,如‘瑞都红玉’、‘早黑宝’、‘摩尔多瓦’等,占供试品种的 31.25%;感病品种有 10 个,如‘里扎马特’、‘玫瑰香’、‘香妃’等,占供试品种的 31.25%。

表 1 不同葡萄品种对葡萄霜霉病的感病性¹⁾
Table 1 Susceptibility of different grape cultivars to *Plasmopara viticola*

品种名称 Variety	病情指数 Disease index	病叶率/% Disease incidence	抗性级别 Resistance level
玫瑰香	(71.85±4.63)a	(100.00±0.00)a	感病
6E-14-10	(71.85±3.39)a	(100.00±0.00)a	感病
美人指	(69.63±4.63)a	(100.00±0.00)a	感病
里扎马特	(69.26±5.48)a	(100.00±0.00)a	感病
夏黑	(68.89±6.67)a	(100.00±0.00)a	感病
香妃	(65.93±1.28)ab	(100.00±0.00)a	感病
瑞都红玫	(61.48±4.63)bc	(100.00±0.00)a	感病
京香玉	(59.26±2.57)c	(100.00±0.00)a	感病
0108	(58.52±4.64)c	(100.00±0.00)a	感病
红地球	(50.74±5.25)d	(100.00±0.00)a	感病
摩尔多瓦	(49.63±2.57)d	(100.00±0.00)a	低抗
无核翠宝	(47.41±7.80)de	(100.00±0.00)a	低抗
0101	(47.41±4.63)de	(100.00±0.00)a	低抗
瑞都香玉	(42.22±2.22)ef	(100.00±0.00)a	低抗
早黑宝	(42.22±3.85)ef	(100.00±0.00)a	低抗
瑞都红玉	(38.52±2.57)fg	(100.00±0.00)a	低抗
品丽珠	(33.33±0.00)g	(100.00±0.00)a	低抗
39	(32.59±1.28)g	(100.00±0.00)a	低抗
赤霞珠	(25.93±1.28)h	(100.00±0.00)a	低抗
3E-16-23	(25.93±3.39)h	(100.00±0.00)a	低抗
2E-16-2	(23.70±2.57)hi	(100.00±0.00)a	中抗
小芒森	(22.22±2.22)hi	(100.00±0.00)a	中抗
R23	(21.48±1.28)hi	(100.00±0.00)a	中抗
0105	(20.74±4.63)hi	(100.00±0.00)a	中抗
贝达	(20.37±2.80)hi	(83.33±5.77)b	中抗
3E-21-8	(17.41±2.31)ij	(90.00±10.00)ab	中抗
3W-16-14	(12.96±1.70)jk	(96.67±5.77)a	高抗
阳光玫瑰	(7.78±1.92)kl	(70.00±17.32)c	高抗
美乐	(7.04±3.21)kl	(43.33±15.27)e	高抗
河岸	(6.67±1.11)kl	(60.00±10.00)d	高抗
Ms27-31	(1.48±1.28)lm	(13.33±11.55)f	高抗
康拜尔早生	(0.00±0.00)m	(0.00±0.00)g	免疫

1) 表中数据为平均值±标准误。同列数据后不同字母代表具有显著性差异($P<0.05$)。
Data in the table are mean±SE. The different small letters in the same column indicate significant difference at 0.05 level by DMRT.



a: 康拜尔早生; b: 美乐; c: 3E-21-8; d: 贝达; e: 瑞都红玉; f: 早黑宝; g: 玫瑰香; h: 夏黑
a: Campbell Early; b: Merlot; c: 3E-21-8; d: Beta; e: Ruidu Hongyu; f: Zaoheibao; g: Muscat; h: Summer Black

图 3 不同葡萄品种接种葡萄霜霉菌后发病情况

Fig. 3 Disease incidence of different grape cultivars inoculated with *Plasmopara viticola*

3 结论与讨论

通过接种体的筛选以及接种方法的优化,发现田间混合菌株致病性强,接种后,叶片发病快且重复性好,能较快地测定葡萄品种的抗病性;叶盘法接种,叶片易于发病,调查简便快捷,易操作。采用田间混合菌接种叶盘对 32 个葡萄品种进行了霜霉病抗病性鉴定,结果表明,不同品种间对霜霉病的抗性有显著性差异。根据统计结果,共分为免疫、高抗、中抗、低抗和感病 5 类,其中多为低抗或感病品种,各占供试品种的 31.25%,免疫、高抗和中抗的品种分别占供试品种的 3.13%、15.63%和 18.75%。其中主栽品种‘香妃’、‘京香玉’、‘红地球’、‘美人指’等为感病品种,‘摩尔多瓦’为低抗品种,这与前人研究结果一致^[4,7-8];欧美杂种‘夏黑’测试为感病品种,病情指数高达 68.89,而有研究显示‘夏黑’为抗病品种^[9],这可能与菌种使用以及地区差异有关,有待进一步研究。国外有报道指出,葡萄霜霉病菌随着培养代数的增加,其产孢量下降,活性降低,至第 4 代时其活性显著降低^[10],本研究显示单病斑培养的葡萄霜霉病菌随培养代数的增加,其致病性有降低趋势,本研究结果与上述研究一致。故本研究所优化的鉴定方法,能够更加快捷、方便地在一定程度上对葡萄品种进行筛选。

一般认为接种后出现坏死斑为过敏性坏死反应,坏死斑的产生可以限制菌丝在叶片内部生长,抑制病斑的扩展,但在试验过程中发现,‘京香玉’、‘美

人指’、‘里扎马特’等感病品种接种葡萄霜霉病菌后皆不同程度出现坏死性病斑,但并未影响其病斑的扩展,有待进一步研究。

参考文献

[1] 刘新秀,张莉,任毓忠,等. 葡萄品种抗霜霉病不同鉴定方法的比较和相关性分析[J]. 新疆农业科学,2012(7):1244 - 1249.
[2] 王春明,郭建国,漆永红,等. 葡萄叶片叶绿素质量分数与其霜霉病抗性的关系[J]. 西北农业学报,2016(3):458 - 464.
[3] 李华. 欧亚种葡萄品种对霜霉病感病性的研究[J]. 园艺学报,1988,15(1):23 - 26.
[4] 沙月霞,王国珍,樊仲庆,等. 宁夏贺兰山东麓不同葡萄品种对霜霉病的抗性鉴定[J]. 果树学报,2007,24(6):803 - 809.
[5] BOSO S, KASSEMEYER H H. Different susceptibility of European grapevine cultivars for downy mildew [J]. Vitis, 2008, 47(1):39 - 49.
[6] EIBACH R, ZYPRIAN E, WELTER L, et al. The use of molecular markers for pyramiding resistance genes in grapevine breeding [J]. Vitis, 2007,46(2):120 - 124.
[7] 李宝燕,王培松,倪寿山,等. 不同葡萄品种对霜霉病的抗性鉴定及相关生理生化研究[J]. 果树学报,2016,33(2):217 - 223.
[8] 赵雪艳,张玮,严红,等. 不同葡萄品种对霜霉病的田间苗期抗性评价[J]. 植物保护,2014,40(5):172 - 175.
[9] 李荣. 湖南省葡萄霜霉病的发生规律调查及病原菌遗传多样性研究[D]. 长沙:湖南农业大学,2014.
[10] KENNELLY M M, GADOURY D M, WILCOX W F, et al. Primary infection, lesion productivity, and survival of sporangia in the grapevine downy mildew pathogen *Plasmopara viticola* [J]. Phytopathology, 2007, 97(4):512 - 522.

(责任编辑:杨明丽)