

葡萄白粉病抗性鉴定方法优化及品种抗性评价

贾静怡^{1,2}, 张 玮^{1,2}, 燕继晔^{1,2}, 徐海英³, 孙 磊³, 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. 北京市林业果树科学研究院, 北京 100093)

摘要 本研究通过对叶盘保湿方法的改进, 不同菌源接种后发病严重度的分析, 抗、感病对照品种的确定, 建立了一种更为便捷、可靠、稳定的葡萄白粉病室内抗性鉴定方法: 取葡萄藤自上而下第2~4片幼嫩叶片, 打取直径15 mm的叶盘置于1.5%水琼脂平板进行保湿, 采集田间菌源直接制备孢子浓度为 2×10^5 个/mL的孢子悬浮液接种, 选定抗、感病葡萄品种做对照, 14 d即可完成抗性鉴定。采用此方法对11个葡萄品种(品系)进行了葡萄白粉病抗性评价, 结果表明: 供试的11个品种(品系)对葡萄白粉病的抗性存在明显差异, 其中高感品种为‘巨峰’‘夏黑’和‘阳光玫瑰’等, 感病品种为‘玫瑰香’和‘马瑟兰’, 抗病品种为‘瑞都科美’和‘无核翠宝’, 高抗品种为‘北冰红’。试验结果为葡萄抗病品种的选育及利用提供了方法和基础参考数据。

关键词 葡萄白粉病; 品种; 抗性鉴定

中图分类号: S 436.631.1 文献标识码: A DOI: 10.16688/j.zwbh.2019630

Optimization of grapevine powdery mildew resistance identification methods and evaluation of variety resistance

JIA Jingyi^{1,2}, ZHANG Wei^{1,2}, YAN Jiye^{1,2}, XU Haiying³, SUN Lei³, LI Xinghong^{1,2*}

(1. *Institute of Plant Protection and Environmental Protection, Beijing Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Beijing 100097, China*; 2. *Beijing Key Laboratory for Environment Friendly Management on Fruit Diseases and Pests in North China, Beijing 100097, China*; 3. *Beijing Academy of Forestry and Pomology Sciences, Beijing 100093, China*)

Abstract Through the improvement of leaf disc moisturization methods, analysis of the severity of disease after inoculation with different strains, and identification of resistant and susceptible varieties, a more convenient, reliable and stable laboratory resistance identification method on grapevine powdery mildew was established. The method is as follows: collect the 2–4 young leaves of the vine from top to bottom, make leaf discs using a borer with 15 mm diameter, place the leaf discs on a 1.5% water agar plate for moisturizing purpose, prepare the spore suspension directly with the conidia on the diseased leaves collected from the field, inoculate at the concentration of 2×10^5 conidia/mL, select resistant and susceptible grape varieties as the control, and resistance identification could be completed within 14 days. Resistance evaluation of 11 grape varieties (lines) to grapevine powdery mildew by this method showed that the resistance of the tested 11 varieties (lines) was significantly different. The highly susceptible varieties were ‘Kyoho’ ‘Summer Black’ ‘Shine Muscat’ etc., the susceptible varieties were ‘Muscat’ and ‘Marselan’, the resistant varieties were ‘Ruidu Kemei’ and ‘Nuclear Cuibao’, the highly resistant variety was ‘Arctic Red’. The resistant evaluation results provide method and basic reference data for screening and utilization of grapevine powdery resistant varieties.

Key words grapevine powdery mildew; variety; resistance identification

葡萄是世界上种植最广泛的水果作物之一^[1]。国际葡萄与葡萄酒组织 OIV (Organisation Internationale de la Vigne et du Vin) 发布的《2017 年全球

葡萄种植面积分析及预测》显示, 截至 2017 年, 世界葡萄种植面积约为 760 万 hm^2 , 我国葡萄种植面积约为 87 万 hm^2 。而我国主要的栽培品种一般对真

收稿日期: 2019-11-18

修订日期: 2020-01-17

基金项目: 国家葡萄产业技术体系(CARS-29); 国家重点研发计划(2018YFD0201300)

* 通信作者 E-mail: lixinghong1962@163.com

菌病害的抗性表现不佳^[2]。葡萄白粉病(*grapevine powdery mildew*)是葡萄栽培中最重要的真菌病害之一,在欧洲葡萄种植历史上与葡萄霜霉病(*grapevine downy mildew*)和葡萄根瘤蚜 *Daktulosphaira vitifoliae* Fitch 并为三大病虫害,曾导致法国的葡萄酒生产减产 80%^[3]。葡萄白粉病由白粉菌 *Erysiphe necator* 引起,可危害葡萄叶片、茎、果实等,除导致大幅减产外,还会影响果实及葡萄酒的品质^[4-6]。目前化学防治仍是国内葡萄真菌病害防治的主要措施,其缺点为病原菌易产生抗药性,并且产生农药残留和污染环境。选育抗病品种等无污染防治措施是现今研究的重点课题,因其便捷、经济、有效的特点成为控制葡萄白粉病大面积暴发的有效途径^[7-8]。尽管我国主栽葡萄品种对白粉病的抗性较差,但是不同品种间存在抗、感差异,探究可靠的葡萄白粉病抗性鉴定方法可在一定程度上对抗病品种的快速选育起到重要作用^[9]。目前国内已有的抗性鉴定方法有田间自然发病鉴定、田间人工接种鉴定和室内离体叶圆片(叶盘)接种鉴定。不同鉴定方法获得的抗性结果存在显著的一致性^[9-11]。但是田间接种鉴定所需发病时间都较长,对大量葡萄品种进行快速抗病性鉴定耗时、耗力,而室内离体叶圆片接种鉴定方法稳定性较差^[12]。本试验在已有鉴定方法的基础上,对接种不同菌源后发病情况进行比较,并对试验方法的可行性及稳定性进行验证,旨在为葡萄白粉病抗性品种的评价提供一种快速和可靠的鉴定方法,从而提高抗病品种的评价和选育效率。本试验还用此方法对生产上的主栽葡萄品种和新培育品种(品系)进行了抗病性鉴定,为抗病品种的选育及利用提供了基础参考数据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试菌源

在北京市林业果树科学研究院葡萄资源圃采集感染白粉病菌的新鲜病叶带回实验室,作为接种体备用。

1.1.2 供试葡萄品种

抗、感对照筛选品种:欧亚种‘里扎马特’和‘京秀’为生产中较感病品种;欧亚种和圆叶葡萄杂交后代‘R23’‘Ms27-31’由北京市林业果树科学研究院初步确定为抗病品种。供试接种叶片采自北京市林业果树科学研究院葡萄资源圃健康植株。

抗病性鉴定品种:欧亚种有‘瑞都红玉’‘瑞都红玫’‘无核翠宝’‘早黑宝’‘玫瑰香’‘马瑟兰’‘瑞都科美’;欧美杂种有‘阳光玫瑰’‘夏黑’‘巨峰’;山欧杂种有‘北冰红’。供试接种叶片采自北京市海淀区、昌平区、延庆区、顺义区的葡萄采摘园及葡萄资源圃健康植株。

1.1.3 培养基

1.5%水琼脂培养基(WA):琼脂粉 15 g,蒸馏水定容至 1 000 mL。

1.2 试验方法

1.2.1 接种体培养方法

1.2.1.1 田间采集

田间采集葡萄白粉病新鲜病叶,在体视显微镜下观察菌斑,挑选分生孢子梗较直立、透明,分生孢子串生的病叶。用无菌水润湿的脱脂棉包裹叶柄基部,置于密封袋中室温保湿备用。待准备好叶盘后于采集当天完成接种。

1.2.1.2 离体叶片培养

从田间采集葡萄白粉病新鲜病叶,在体视显微镜下挑选出分生孢子梗较直立、透明,仅有 1~2 个分生孢子的白粉菌菌斑病叶放在长方形保鲜盒中保湿培养。培养前用 75%乙醇消毒的尼龙画笔(笔毛宽 2.5 mm)轻轻刷掉菌斑上的老熟分生孢子。在长方形保鲜盒底部铺放两层滤纸和一层卫生纸加适量无菌水润湿,将倾斜剪去叶柄基部的病叶插入润湿的卫生纸。再用喷壶向叶片上方喷雾(勿直接对准叶片喷雾),使叶片表面均匀覆盖细小雾滴,而无明显水滴。最后用保鲜膜密封,放置 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、相对湿度 $(60 \pm 10)\%$ 培养箱中培养 5~7 d,叶面长出分生孢子备用。

1.2.2 接种体(孢子悬浮液)的制备

将田间采集的菌源或离体叶片培养的菌源在体视显微镜下镜检,观察分生孢子生长情况。用尼龙画笔将菌斑上的分生孢子刷至装有无菌水的 1.5 mL 离心管,混匀,用血球计数板计数,将孢子浓度调至 2×10^5 个/mL 备用。

1.2.3 接种叶盘的制备

选取葡萄藤自上而下第 2~4 片幼嫩叶片用于白粉病菌的接种。待接种叶片首先在体视显微镜下镜检,确保叶面无白粉菌菌落或菌丝后,用 75%乙醇处理 30 s,无菌水清洗 3 遍,然后用灭菌的滤纸吸干叶片表面的水分,用打孔器打取直径 15 mm 的叶盘,均匀摆放在直径 9 cm 玻璃培养皿内的水琼脂培

培养基上。每皿摆放 10 个叶盘,叶正面朝上。

1.2.4 接种及培养

采用滴接法接种,用移液枪在每个叶盘中央接种 20 μL 孢子悬浮液,无菌水做空白对照。接种后 2~3 min 用无菌滤纸吸去叶盘表面的悬浮液,用封口膜封住培养皿,置于光照培养箱中 25℃,L//D=12 h//12 h 下培养 14 d,每个处理 3 次重复,每个重复 10 个叶盘,接种后每天观察发病情况。试验重复 2 次。

1.2.5 发病情况调查及统计

叶盘接种后 14 d,用体视显微镜观察所有接种叶盘的发病情况。按叶盘病斑面积的百分比进行病害分级^[13],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。按以下公式计算病情指数:

病情指数 = $\frac{\sum(\text{各级叶盘数} \times \text{相应级数的代表值})}{(\text{总叶盘数} \times \text{最高级数的代表值})} \times 100$ 。

1.2.6 抗病性鉴定指标

抗病性分级标准参照刘会宁等^[12]的方法,分为 5 级,即免疫:病情指数 0.00;高抗:病情指数 0.10~5.00;抗病:病情指数 5.01~25.00;感病:病情指数 25.01~50.00;高感:病情指数 50.00 以上。

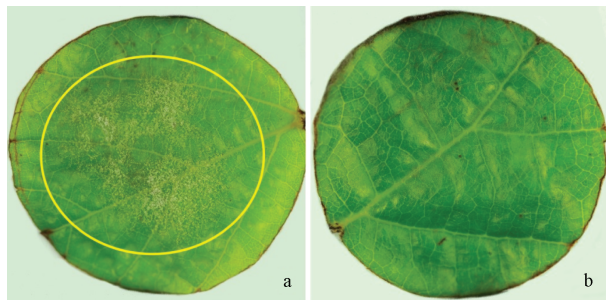
1.3 数据统计分析

试验结果采用 SPSS 21.0 进行差异显著性分析,Excel 2016 进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 对照品种的确

以田间采集菌源作为接种体,采用叶盘法对‘里扎马特’‘京秀’‘R23’和‘Ms27-31’进行抗、感对照品种的筛选。结果表明‘里扎马特’和‘京秀’病情指数分别为 75.56 和 86.67,为高感品种;‘R23’和‘Ms27-31’病情指数均为 0.00,为免疫品种,并且 4 个品种的重复性都较好。高感品种和免疫品种的发病情况有明显差异,高感品种的叶盘上可产生较大面积,明显的菌落,而免疫品种无菌落和孢子产生(图 1)。因此‘里扎马特’和‘京秀’可作为抗病性鉴定中感病对照品种,‘R23’和‘Ms27-31’为抗病对照品种。



a: 高感品种‘里扎马特’,黄圈内为葡萄白粉菌接种后产生的病斑。b: 免疫品种‘R23’
a: Highly susceptible variety ‘Rizamat’; Disease lesion in yellow circle is formed by *Erysiphe necator* inoculation. b: Immune line ‘R23’

图 1 不同品种叶盘接种白粉菌后的发病情况

Fig. 1 Incidence of leaf discs of different varieties after inoculation with *Erysiphe necator*

2.2 接种体的确定

以田间采集菌源和离体培养菌源作为接种体,分别接种感病对照品种‘里扎马特’,进行抗病性测定试验,比较接种体来源对抗性测定的影响。用田间采集菌源接种后病情指数为 74.07 ± 1.29 ,发病率为 $(100 \pm 0.00)\%$;离体培养菌源接种后病情指数为 31.13 ± 4.53 ,发病率为 $(87.83 \pm 5.27)\%$ 。结果表明离体培养菌源相较于田间采集菌源其病情指数及发病率均较低,且重复性差(图 2)。作为感病对照品种的‘里扎马特’叶盘,用离体培养菌源接种后的病情指数未能达到抗病性鉴定指标的最高分级(高感),故后续不同葡萄品种对白粉病的抗性鉴定试验中使用田间采集菌源。

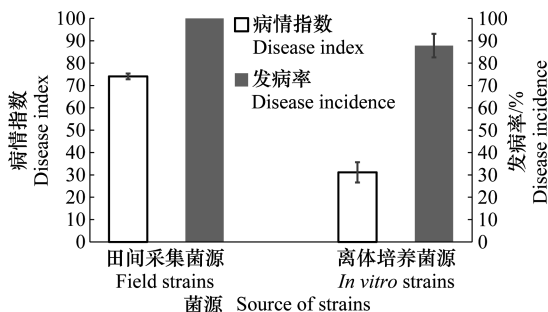


图 2 不同来源的白粉菌菌源接种叶盘的发病情况

Fig. 2 Incidence of leaf discs inoculated with *Erysiphe necator* strains from different sources

2.3 不同葡萄品种对白粉病的抗性鉴定

以田间采集菌源作为接种体,选取‘里扎马特’和‘R23’分别作感病和抗病对照品种,采用离体叶盘法对 11 个葡萄品种(品系)进行葡萄白粉病抗性鉴定。肉眼观察结合体视显微镜的观察结果表明:不同品种(品系)接种白粉病菌后叶盘发病面积存在

较大差异(图 3)。在体视显微镜下可以清晰观察到发病部位菌落的形态,以及病斑面积统计时肉眼难以观察到的病斑菌落边缘(图 4)。统计结果显示:病情指数区间为 0.00~82.10,发病率区间为 0.00%~100.00%。抗病性鉴定指标分级显示高感品种为‘巨

峰’‘夏黑’‘阳光玫瑰’‘瑞都红玉’‘早黑宝’和‘瑞都红玫’,占供试品种的 54.54%;感病品种为‘玫瑰香’和‘马瑟兰’,占供试品种的 18.18%;抗病品种为‘瑞都科美’和‘无核翠宝’,占供试品种的 18.18%;高抗品种为‘北冰红’,占供试品种的 9.09%(表 1)。

表 1 不同葡萄品种对葡萄白粉菌的抗病性¹⁾

Table 1 Resistance of different grape varieties to *Erysiphe necator*

品种 Variety	病情指数 Disease index	发病率/% Disease incidence	抗性级别 Resistance level
巨峰 Kyoho	(82.10±3.86)a	(100.00±0.00)a	高感(HS)
夏黑 Summer Black	(81.48±3.39)a	(100.00±0.00)a	高感(HS)
阳光玫瑰 Shine Muscat	(79.63±8.49)ab	(100.00±0.00)a	高感(HS)
里扎马特 Rizamat	(74.07±1.29)abc	(100.00±0.00)a	高感(HS)
瑞都红玉 Ruidu Hongyu	(66.67±11.11)bcd	(100.00±0.00)a	高感(HS)
早黑宝 Zaoheibao	(60.37±7.40)cde	(96.67±5.77)a	高感(HS)
瑞都红玫 Ruidu Hongmei	(53.09±11.31)de	(100.00±0.00)a	高感(HS)
玫瑰香 Muscat	(46.34±19.94)e	(85.00±13.23)ab	感病(S)
马瑟兰 Marselan	(28.21±3.48)f	(100.00±0.00)a	感病(S)
瑞都科美 Ruidu Kemei	(21.11±5.09)f	(76.67±15.28)b	抗病(R)
无核翠宝 Nuclear Cuibao	(14.45±2.94)fg	(56.67±5.77)c	抗病(R)
北冰红 Arctic Red	(3.89±2.42)gh	(35.00±21.79)d	高抗(HR)
R23	(0.00±0.00)h	(0.00±0.00)e	免疫(I)

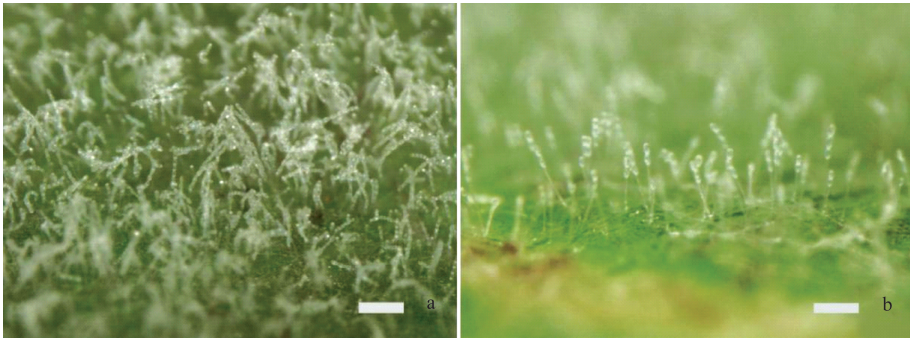
1) ‘里扎马特’为高感对照品种;‘R23’为免疫对照品种。表中数据为平均值±标准误。同列括号后不同小写字母表示不同品种之间差异显著($P<0.05$)。
‘Rizamat’ is highly susceptible control variety; ‘R23’ is immune control variety. Data in the table are mean±standard error. The small letters after parenthesis in the same column indicate the significant difference among the data of different varieties ($P<0.05$).



a: ‘R23’ (I); b: ‘北冰红’ (HR); c: ‘瑞都科美’ (R); d: ‘马瑟兰’ (S); e: ‘阳光玫瑰’ (HS)。黄圈内为葡萄白粉菌接种后发病区域
a: ‘R23’ (I); b: ‘Arctic Red’ (HR); c: ‘Ruidu Kemei’ (R); d: ‘Marselan’ (S); e: ‘Shine Muscat’ (HS). Infected area in yellow circle is caused by inoculation of *Erysiphe necator*

图 3 不同抗性级别代表品种接种葡萄白粉菌 14 d 后发病情况

Fig. 3 Incidence of varieties with different resistance level 14 days after inoculation with *Erysiphe necator*



a: ‘早黑宝’发病叶盘菌落中心; b: ‘早黑宝’发病叶盘菌落边缘。标尺 = 100 μm
a: The colony center in ‘Zaoheibao’ disc; b: The colony edge in ‘Zaoheibao’ disc. Scale bar = 100 μm

图 4 接种后第 14 天体视显微镜下‘早黑宝’发病叶盘上白粉菌菌落形态

Fig. 4 Morphology of powdery mildew colonies on leaf disc of ‘Zaoheibao’ under stereoscopic microscope on the 14th day after inoculation

3 结论与讨论

李华等^[9]曾报道可采用离体叶盘接种方法进行葡萄白粉病品种抗性的室内鉴定,但其接种发病时间较长,培养 25 d 后才进行严重度观察。刘会宁等^[12]参照此方法进行试验,两周后出现叶盘干枯现象导致室内试验无果。本研究对葡萄白粉病抗性鉴定方法进行了优化,接种后没有选取常规的滤纸保湿方法,而是用水琼脂平板对叶盘进行保湿。经对两种方法比较后发现,叶盘在水琼脂平板上连续放置两周依旧保持新鲜。本试验用肉眼观察结合体视显微镜镜检对叶盘发病等级进行调查统计。直接用肉眼观察葡萄白粉病在叶盘上的菌落较为模糊,而在体视显微镜下能清晰看到菌落的分生孢子梗及串生的分生孢子(图 4a),也能清楚观察到病斑扩展区的部分稀疏菌落(图 4b),使得调查统计结果更为准确可靠。有报道表明,葡萄霜霉病菌不同代数的菌源存在致病性差异^[13-14]。但笔者通过文献查阅并未发现有关葡萄白粉病菌的相关报道。本研究比较了田间采集菌源以及离体培养菌源的接种效果,发现用田间采集菌源直接接种后,在相同时间内发病严重度高于离体培养菌源,能较快地进行抗性测定,但并未进行更多不同培养代数间的差异研究。并且本研究在进行品种抗病性鉴定前,预先通过接种试验确定抗感病的对照品种,在对鉴定方法进行验证的同时,也能对大量品种抗病性鉴定提供更加快速、可靠的发病严重度参照标准。

本研究通过葡萄白粉病抗病性鉴定方法的优化,对 11 个生产上主栽葡萄品种和新培育品种(品系)进行了白粉病抗性鉴定。其中‘巨峰’‘瑞都红玉’‘早黑宝’‘马瑟兰’等为抗性较差品种,‘北冰红’为高抗品种,均与前人研究结果一致^[15-19]。本试验中欧美杂种‘阳光玫瑰’和‘夏黑’鉴定为高感品种,病情指数分别高达 79.63 和 81.48,田间观察也发现‘阳光玫瑰’和‘夏黑’白粉病发病严重,与室内测定结果一致。但有研究表明这两个品种为抗病品种^[19-21],分析这可能与抗性鉴定方法不同等因素有关,有待进一步研究。与此同时,在‘阳光玫瑰’‘夏黑’等白粉病高感品种的种植过程中,对白粉病的发生情况应该予以关注。

参考文献

- [1] FUJITA K, SUZUKI S, AWAAD A S, et al. Genetic engineering in grapevines: technical problems solving [J]. Mechanism & Action of Phytoconstituents, 2011, 31: 333 - 349.
- [2] 贺普超. 葡萄学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 272 - 287.
- [3] 阿格里斯. 植物病理学[M]. 沈崇尧, 译. 第 5 版. 北京: 中国农业大学出版社, 2009: 29 - 32.
- [4] RUMBOLZ J, GUBLER W D. Susceptibility of grapevine buds to infection by powdery mildew *Erysiphe necator* [J]. Plant Pathology, 2005, 54(4): 535 - 548.
- [5] WILCOX W F, GUBLER W D, UYEMOTO J K. Compendium of grape diseases, disorders, and pests [M]. Minnesota: The American Phytopathological Society Press, 2015: 75 - 83.
- [6] 张军科, 罗世杏, 李小伟, 等. 白粉菌在不同抗病性葡萄叶片上的侵染过程比较[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2008, 36(3): 161 - 165.
- [7] 白明第, 陆晓英, 张武, 等. 几种生物药剂对葡萄白粉病防治效果初报 [J]. 中国南方果树, 2019, 48(1): 69 - 71.
- [8] 刘会宁, 吴广宇. 6 个葡萄品种对白粉病和霜霉病的抗性[J]. 长江大学学报(自然科学版)农学卷, 2010, 7(4): 9 - 11.
- [9] 李华, 张振文. 欧亚种葡萄白粉病抗性及其稳定性研究[J]. 园艺学报, 1992, 19(1): 23 - 28.
- [10] 王跃进, 贺普超, 张剑侠. 葡萄抗白粉病鉴定方法的研究[J]. 西北农业大学学报, 1999, 27(5): 6 - 10.
- [11] 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.
- [12] 刘会宁, 郑琦. 葡萄对白粉病的抗性[J]. 果树学报, 2002, 19(6): 430 - 432.
- [13] 唐兴敏, 孙磊, 张玮, 等. 葡萄霜霉病抗病性鉴定方法及品种抗病性测定[J]. 植物保护, 2018, 44(1): 166 - 169.
- [14] MEGAN M K, DAVID M G, WAYNE F W, 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.
- [15] 周思泓, 张劲, 黄小云, 等. 避雨栽培下不同酿酒葡萄品种白粉病抗性调查与分析[J]. 西南农业学报, 2018, 31(5): 986 - 991.
- [16] 张瑛, 黄羽, 林玲, 等. 南方湿热地区葡萄不同品种抗白粉病调查初报[J]. 中国果树, 2007(4): 54 - 55.
- [17] 鲁会玲. 葡萄新品种里扎马特[J]. 北方园艺, 1990(4): 36.
- [18] 刘鑫铭, 陈婷, 刘锡铭, 等. 6 个鲜食葡萄品种在福建古田的引种表现[J]. 中国果树, 2018(6): 33 - 36.
- [19] 赵伟, 高美英, 罗尧幸, 等. 田间鉴定结合分子标记筛选葡萄抗白粉病材料[J]. 核农学报, 2018, 32(8): 1483 - 1491.
- [20] 黄紫乾, 韦中定. 葡萄新品种阳光玫瑰、夏黑引种比较试验初探[J]. 农业研究与应用, 2018, 31(4): 25 - 28.
- [21] 王小良, 谢世雄, 彭先苗, 等. 阳光玫瑰葡萄品种在邵阳地区种植的特征特性表现[J]. 现代园艺, 2019(18): 4 - 5.

(责任编辑: 杨明丽)