

46份野生葡萄株系对霜霉病的抗性鉴定及其相关基因的表达

赵 惠^{1,2} 刘崇怀² 姜建福² 樊秀彩² 张 颖² 房玉林^{1*}

(1. 西北农林科技大学葡萄酒学院, 陕西 杨陵 712100; 2. 中国农业科学院郑州果树研究所, 郑州 450009)

摘要: 为明确不同野生葡萄株系对霜霉病的抗性差异, 以18个种的46份野生葡萄株系为试材, 采用叶盘法鉴定其对霜霉病的抗性, 并利用实时荧光定量PCR (real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR) 技术对部分关键基因进行定量分析, 探讨其不同抗病株系中的表达模式差异。结果表明, 46份野生葡萄株系的病情指数为0~34.72, 其中17份为感病株系, 病情指数在25.93~34.72; 21份为抗病株系, 病情指数在5.32~24.35; 5份圆叶葡萄株系均表现为免疫, 病情指数为0.00; 云南-元谋2、云南-2和木扎岭-3为高抗株系, 病情指数分别为1.81、4.40和1.62。当被霜霉病菌侵染后, 抗病株系和感病株系中的 *PAL*、*PR1*、*TLP* 和 *NPR1* 基因的诱导表达模式不同; 与感病株系相比, 抗病株系中的 *TLP*、*PR1* 和 *NPR1* 基因有强烈的诱导表达, *PAL* 基因在感病株系比在抗病株系中表达量高。在免疫株系普莱德和高抗株系云南-元谋2中, *NPR1* 与其它3个基因的表达模式差异最大; *TLP* 在抗病株系蓼蓼-林县中与其它3个基因的表达模式差异最大; 在感病株系秋-嵩县中, *NPR1* 与 *TLP* 表达模式相近, *PAL* 和 *PR1* 表达模式相近。研究表明, 在中国野生葡萄种质中, 云南-元谋2、云南-2和木扎岭-3对霜霉病有良好的抗性, 可作为抗病育种的原始材料; 抗性基因可能在抗病株系中发挥着重要作用。

关键词: 葡萄; 霜霉病; 抗病性; 鉴定; 定量分析

Resistance identification and expression of related genes of downy mildew in 46 wild grape strains

Zhao Hui^{1,2} Liu Chonghuai² Jiang Jianfu² Fan Xiucui² Zhang Ying² Fang Yulin^{1*}

(1. College of Enology, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi Province, China; 2. Zhengzhou Fruit Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450009, Henan Province, China)

Abstract: In order to determine the resistance of different wild grape strains to downy mildew, the leaf discs inoculation test was used to identify the resistance. There were 46 wild grape strains sampling which from 18 grape varieties and real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) was performed to evaluate the relative expression levels of key genes, such as *PAL*, *PR1*, *TLP* and *NPR1*, to explore the differences in expression patterns among different resistant strains. The result showed that the disease index of 46 wild strains were 0–34.72, of which 17 were susceptible with the disease index of 25.93–34.72, and 20 of all were resistant strains, the disease index was 5.32–24.35. The *Vitis rotundifolia*, including Pride, Jumbo, Fry, Summit and Triumph, was immune to downy mildew, the disease index was 0. Interestingly, Chinese wild strains Yunnan-Yuanmou 2, Yunnan-2 and Muzhaling-3 were highly resistant and the disease index was 1.81, 4.40 and 1.62, respectively. The expression patterns of *PAL*, *PR1*,

基金项目: 宁夏葡萄与葡萄酒产业十三五重点研发项目(2016BZ0602), 国家现代农业(葡萄)产业技术体系建设专项(CARS-29-zp-6)

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: fangyulin@nwsuaf.edu.cn

收稿日期: 2017-10-17

TLP and *NPR1* after *P. viticola* infection in resistant and susceptible strains were different. The expression levels of *TLP*, *PR1* and *NPR1* were higher in resistant strains after inoculating *P. viticola* compared with susceptible strains. In contrast, the expression level of *PAL* in the susceptible strains was higher compared with resistant strains. In the immune strain Pride and the high resistant strain Yunnan-Yuanmou 2, the expression patterns of *NPR1* and the other three genes were the most different. The expression pattern of *TLP* was the most different from the other three genes in the resistant strain Yingyu-Linxian. In the susceptible strain Qiu-Songxian, the expression patterns of *NPR1* and *TLP* were similar, and the expression patterns of *PAL* and *PR1* were similar. The results indicated that a number of wild grape strains showed highly resistant to downy mildew, such as Yunnan-Yuanmou 2, Yunnan-2 and Muzhaling-3, which could be used as original materials for the breeding of disease resistance and the resistance genes may play a significant role in resistance to downy mildew in grapevines.

Key words: grape; downy mildew; disease resistance; identification; quantitative analysis

葡萄 *Vitis vinifera* 是世界上种植最广泛的作物,具有重要的经济价值,但在栽培过程中,其易受病原菌的侵染,主要病害为霜霉病,该病由葡萄生轴霜霉菌 *Plasmopara viticola* 引起。霜霉病遍及世界各地,尤其在温暖湿润的地区,其破坏性极强,可危害葡萄叶、卷须、新梢、芽、花序和果实等幼嫩组织,主要危害葡萄叶片,使叶片干枯脱落,导致果实发育不良,产量降低(This et al., 2006)。不同葡萄品种对霜霉病的抗性存在差异。欧亚种群一般不抗霜霉病,而美洲种群对霜霉病有显著抗性(刘会宁和李华, 2004; Boso & Kassemeyer, 2008),起源于美洲的沙地葡萄 *V. rupestris* 和河岸葡萄 *V. riparia* 对霜霉病有中等抗性,而圆叶葡萄 *V. rotundifolia* 则表现为免疫(Jürges et al., 2009; Yin et al., 2017)。传统的霜霉病防治措施是施用杀菌剂,但其药效甚微(Gisi & Sierotzki, 2008)。另一种预防或减轻霜霉病的措施是使用抗病品种(Brun et al., 2003),中国野生葡萄对许多病害有高抗性(Wan et al., 2007),探讨不同野生葡萄株系对霜霉病的抗性及其抗性基因表达模式的差异,对培育葡萄抗病品种有重要意义。

许多抗病物种均通过激活先天防御系统来抵御霜霉病菌的侵染。研究表明水杨酸、茉莉酸和脱落酸在植物病害防御中发挥着重要作用(Bari & Jones, 2009)。当植物受到病原菌侵染后,水杨酸含量大幅增加,诱导 *NPR1* 基因活化,从而诱导 *PR* 基因的下游表达(Dong, 2004; Loake & Grant, 2007)。国内外关于葡萄抗性基因和霜霉病相关性的报道较多,如 Liu et al. (2016) 研究结果表明,基因 *EDS1* 和 *PAD4* 表达与抗病性无正相关关系,但 *EDS1*、*PAD4*、*PAL*、*NPR1* 和 *PR1* 基因在高抗葡萄品种中表达较高;Marchive et al. (2013) 发现葡萄 *WRKY1* 基因的过表达可诱导

茉莉酸途径中相关基因的表达,使葡萄对霜霉病有更高的耐受力;Li et al. (2017) 从高抗霜霉病的山葡萄叶片中克隆出 *VaRGAI* 基因,结果表明在霜霉病菌侵染初期, *VaRGAI* 基因的表达量显著提高;He et al. (2017) 通过根癌农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* 将类甜蛋白基因 *TLP* 转入到汤普森无核胚性愈伤组织中,采用实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, RT-qPCR) 技术在转基因葡萄中检测到 *TLP* 基因的表达量较高,表明 *TLP* 基因的积累增强了转基因葡萄霜霉病的抗性。已有对霜霉病抗性的研究大多集中在鲜食葡萄上,如刘丽等(2017) 探究了 65 份鲜食葡萄对霜霉病的抗性,表明欧美杂种相对欧亚品种抗病;李宝燕等(2016) 通过分析 40 份鲜食葡萄对葡萄霜霉病的抗性,发现活性氧通路、水杨酸信号通路参与了葡萄对霜霉病的抗性;乔宝营等(2014) 以 24 份葡萄品种为试验材料,测定气孔数量、叶片保水力等指标,表明叶片保水力与发病程度呈负相关。近年来,野生葡萄的研究和利用备受关注,越来越多的研究表明中国野生葡萄中蕴含着丰富的抗性基因,某些野生葡萄种对霜霉病表现出良好抗性(林玲等, 2013),可作为优良的抗病育种材料。

本试验通过室内离体叶圆片接种法对 46 份野生葡萄株系进行霜霉病抗性鉴定,利用 RT-qPCR 技术对相关的抗性基因 *PAL*、*PR1*、*TLP* 和 *NPR1* 进行定量分析,筛选出抗病性较强的株系,以期为我国葡萄抗病育种提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试植物:46 份野生葡萄株系均取自中国农业

科学院郑州果树研究所国家种质(葡萄)资源圃,其中4份山葡萄 *V. amurensis* 株系、5份蓼萼 *V. bryoniaefolia* 株系、4份刺葡萄 *V. davidii* 株系、3份变叶葡萄 *V. piasezkii* 株系、3份华东葡萄 *V. pseudoreticulata* 株系、3份秋葡萄 *V. romanteii* 株系、1份武汉葡萄 *V. wuhanensis* 株系、1份网脉葡萄 *V. wilsonae* 株系、3份云南葡萄 *V. yunnanensis* 株系、3份桦叶葡萄 *V. betulifolia* 株系、1份腺枝葡萄 *V. adenoclada* 株系、5份圆叶葡萄株系、3份沙地葡萄株系、2份河岸葡萄株系、1份小叶葡萄 *V. sinocinerea* 株系、2份分类地位未知的野生葡萄株系、1份美丽葡萄 *V. bellula* 品种和1份菱叶葡萄 *V. hnaocckii* 品种;沙地葡萄株系分别为 Rupestris、沙地葡萄(0904)和 LN33,河岸葡萄株系为巴莱特 50(0917)和哥洛尔 A(0915)。采集病叶的葡萄品种为赤霞珠。葡萄株、行距分别为 1.0 m、2.5 m,树龄为 8 年,单干双臂树形。

试剂及仪器:RNAprep Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司;ReverTra Ace qPCR RT Kit,日本 ToYoBo 公司;10 000× Ultra GelRed、PCR Related Products,美国 Biotech 公司;Roche LightCycler 480、LightCycler 480 SYBR Green I Master 04887352001、LightCycler 480 Multiwell Plate 96,瑞士罗氏公司;其它试剂均为国产分析纯。1645050 电泳仪电源和 Sub-Cell® GT Cell 电泳槽,美国 Bio-Rad 公司;ND-1000 微量紫外可见分光光度计,美国 Thermo Fisher Scientific 公司;Mastercycler PCR 仪,德国 Eppendorf 公司。

1.2 方法

1.2.1 葡萄霜霉病菌孢子悬浮液的制备

在西北农林科技大学葡萄酒学院酿酒葡萄资源圃霜霉病发病盛期,采集发病的新鲜赤霞珠葡萄叶片,用无菌水冲洗掉叶片表面的发病区域。将叶片装入密封袋,避免叶片重叠。放入温度 22℃、相对湿度 90% 的光照培养箱内培养 24 h。待新的孢子囊长出,用无菌毛笔将孢子囊刷进无菌蒸馏水中配制孢子囊悬浮液,利用血球计数板统计孢子囊数量,将其调至浓度为 1×10^5 个/mL 的孢子囊悬浮液,备用。

1.2.2 46份葡萄株系的室内离体接种试验

采用叶盘法。2017 年 7 月 1 日在郑州果树研究所国家种质(葡萄)资源圃内,采集不同葡萄株系第 4~6 节完全展开(从顶点算)的成熟叶片,每个野生葡萄株系选 3 株,每株平均选 30 个叶片。叶片用蒸馏水冲洗后,用内径 15 mm 的打孔器,避开主叶脉和伤口打取约 80 片圆形小叶,即叶盘。直径 90 mm

培养皿底铺 2 层无菌滤纸,用移液器向培养皿中加入 4 mL 无菌蒸馏水,将叶盘背朝上放到培养皿中,每皿随机放入 16 个叶盘,每个株系重复 3 次,设置 1 个清水对照。用移液器吸取稀释好的孢子囊悬浮液滴加在叶盘中央,每个叶盘接种 30 μ L(约 300 个孢子囊)葡萄霜霉病菌悬浮液,对照培养皿内的叶盘上接种 30 μ L 无菌蒸馏水。接种后用封口膜密封培养皿放于温度 22℃、相对湿度 90%、光照黑暗各 12 h 的人工气候培养箱内交替培养。

1.2.3 葡萄霜霉病情的调查及抗性分级

待接种霜霉病菌 24 h 后,用无菌滤纸吸去叶盘上的接种悬浮液,在相同条件下继续培养。霜霉病菌接种 168 h 后,统计发病叶数,计算发病率,发病率=发病叶数/被调查总数 $\times 100\%$;利用数码相机对发病叶片进行拍照,用 Photoshop CS5 计算叶片发病面积。按叶片感病面积占整个叶圆片的百分率分级,分级标准:0 级:无病斑;1 级:0.1%~5.0%;3 级:5.1%~25.0%;5 级:25.1%~50.0%;7 级:50.1%~75.0%;9 级:75.1%~100.0%。根据病害级别及各级病叶数计算病情指数,病情指数= Σ (各级病叶数 $\times$ 相应病害级别)/调查总叶数 $\times 9 \times 100$ 。根据原国际植物种质委员会标准(Wang et al., 1998),划分抗性等级和抗病类型,即 1 级:免疫,病情指数为 0;2 级:高抗,0<病情指数 ≤ 5 ;3 级:抗病,5<病情指数 ≤ 25 ;4 级:感病,25<病情指数 ≤ 50.0 ;5 级:高感,50<病情指数 ≤ 100.0 。

1.2.4 不同抗性株系室内离体接种试验

为了进行不同抗性葡萄株系中抗性基因表达模式的分析,根据 46 份野生葡萄株系室内离体接种结果选取对霜霉病不同抗性的 4 份葡萄株系,即感病株系、抗病株系、高抗株系和免疫株系。对 4 份不同抗性葡萄株系采用室内离体叶盘法接种葡萄霜霉病菌,同时设置 1 个清水对照。分别在接种霜霉病菌 0、72、120 和 160 h 利用数码相机对其拍照,记录接种霜霉病菌后不同抗性株系的侵染情况。

1.2.5 RNA 提取及基因表达分析

接种霜霉病菌 0、2、6、12、18、24、72、120 和 168 h 时,对 4 份不同抗性葡萄株系进行采样(Li et al., 2017),用于与抗病相关的部分关键基因的定量分析。参考 RNAprep Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒说明书进行 4 份不同抗性葡萄株系样品 RNA 的提取,用分光光度计检测其浓度及纯度,选取吸光值 OD₂₆₀/吸光值 OD₂₈₀ 在 1.8~2.2 之间的 RNA 进行后续试验,同时用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的纯

度及完整性。按照 ReverTra Ace qPCR RT Kit 合成荧光定量 PCR 的第一链 cDNA, 利用分光光度计检测 cDNA 样品的浓度, 将其稀释至 50 ng/μL, 置于 -20℃ 冰箱备用。

为了分析关键基因在不同抗性葡萄株系中的表达水平, 以葡萄 *actin* 基因 (Reid et al., 2006) 作为内源参照基因、合成的 cDNA 用作模板进行反应。利用普通 PCR 进行引物的特异性检测, 选取特异性好的引物进行 RT-qPCR 扩增, 试验中所用引物如下: *actin* 基因 (登录号 EC969944) 引物为 F (5'-CTTG-CATCCCTCAGCACCTT-3') 和 R (5'-TCCTGTG-GACAATGGATGGA-3')、*PAL* 基因 (登录号 XM_002268220) 引物为 F (5'-CTGCTGACTGGTGAAA-AGGT-3') 和 R (5'-CCAAGCACTGAGACAATC-CA-3')、*PR1* 基因 (XM_002273752) 引物为 F (5'-GCACTCCTTTGTTTCATGGG-3') 和 R (5'-AATC-GCCAATCCTCTGGTTAG-3')、*TLP* 基因 (XM_002282952.4) 引物为 F (5'-GCTACAACTTACTCCGA-GTTT-3') 和 R (5'-TTCATAATTGGTCCCGAAG-3')、*NPR1* 基因 (XM_002281439) 引物为 F (5'-TT-GCCCCAAGAAATGGTGAA-3') 和 R (5'-ATGC-CACAGCATAGTGAAGG-3'), 所有引物均委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成。20 μL RT-qPCR 扩增反应体系: LightCycler 480 SYBR Green I Master Mix 10 μL、cDNA 2 μL、上下游引物各 0.5 μL、ddH₂O 7 μL。RT-qPCR 反应条件: 95℃ 预变性 5 min; 95℃ 变性 15 s, 60℃ 退火 10 s, 72℃ 延伸 15 s, 共 45 个循环。每个样品重复 3 次, 计算平均循环阈值 *C*_t 和标准差。根据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析霜霉病菌不同接种时间, 4 份不同抗性葡萄株系抗性基因的相对表达量 (Livak & Schmittgen, 2001)。相对定量分析中, 每个基因均以每个样品的第 1 个时期作为校准样本进行归一化分析。采用 Origin 9 软件对抗性基因的定量结果进行柱形图分析, 使用 R 语言的 Gplots 安装包进行抗性基因定量结果的热图聚类分析。

1.3 数据分析

利用 SPSS 20.0 软件进行数据统计分析, 采用 Duncan 氏新复极差法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 46份野生葡萄株系室内离体接种鉴定结果

46 份野生葡萄株系对霜霉病的抗性类型存在差异, 病情指数为 0~34.72, 其中哈桑葡萄、刺-湖南、华东-双溪和 Rupestris 等 17 份为感病株系, 病情指

数为 25.93~34.72, 占供试样品的 36.96%; 云南-元谋 2、云南-2 和木扎岭-3 三份为高抗株系, 病情指数分别为 1.81、4.40 和 1.62, 占供试样品的 6.52%; 北冰红、华东-湖南、变叶-灵宝和桦叶-嵩县 2 等 21 个为抗病株系, 病情指数为 5.32~24.35, 占供试样品的 45.65%; 普莱德 (0599)、朱姆博 (0880) 和弗莱 (0238) 等 5 份圆叶葡萄均表现为免疫, 病情指数为 0.00, 占供试样品的 10.87% (表 1)。病情指数与发病率呈显著正相关, 相关系数为 0.840。

2.2 接种霜霉病菌后不同抗性株系的侵染情况

接种霜霉病菌后, 不同抗性葡萄株系表现出不同的侵染特征 (图 1)。圆叶葡萄普莱德对霜霉病免疫, 叶片没有坏死斑点也没有可见的霜状霉层 (图 1-A); 接种 168 h, 高抗株系云南-元谋 2 叶片有可见的坏死斑点, 相比免疫株系有少量的霜状霉层 (图 1-B); 接种 120 h 后, 抗病株系夔夔-林县叶片有可见的坏死斑点, 长有比高抗株系较多的霜状霉层 (图 1-C); 接种 72 h 后, 感病株系秋-嵩县叶片开始出现轻微的绒毛状物质, 快速产生霜状霉层, 在接种 168 h 后, 叶片有大量霜霉层 (图 1-D)。

2.3 4份不同抗性株系中抗性基因的表达模式分析

2.3.1 抗性基因表达差异的柱形图分析

在 4 份不同抗性葡萄株系中, *PAL*、*PR1*、*TLP* 和 *NPR1* 基因的相对表达量不同, 但均呈现先上调后下调的表达趋势, 表明霜霉病菌侵染可以诱导抗性基因的表达, 不同抗性葡萄株系相对表达量达到峰值的时间不同, 存在显著差异。接种霜霉病菌 12 h 后, 抗病株系夔夔-林县和高抗株系云南-元谋 2 中 *PAL* 基因的相对表达量最大, 分别为 10.63 和 7.66, 显著大于其它 2 份葡萄株系 ($P<0.05$); 接种 24 h, 免疫株系普莱德和感病株系秋-嵩县中 *PAL* 基因的相对表达量最大, 分别为 15.08 和 35.85, 显著大于其它 2 份葡萄株系 ($P<0.05$, 图 2-A)。接种 6 h, 抗病株系夔夔-林县中 *PR1* 基因的相对表达量达到最大值, 为 4.31, 且与其它葡萄株系存在显著差异 ($P<0.05$); 接种 18 h 后, 免疫株系普莱德和感病株系秋-嵩县中 *PR1* 基因的相对表达量达到最大值, 分别为 7.64 和 4.68, 但高抗株系云南-元谋 2 中 *PR1* 基因的相对表达量较低 (图 2-B)。接种 24 h 后, 抗病株系夔夔-林县和免疫株系普莱德中 *TLP* 基因的相对表达量达到最大值, 分别为 382.73 和 26.73, 且与其它葡萄株系有显著差异 ($P<0.05$); 接种 12 h 后, 高抗株系云南-元谋 2 中 *TLP* 基因的相对表达量达到最大值, 为 27.10; 接种 18 h 后, 感病株系秋-嵩县中 *TLP* 基因的

相对表达量达到最大值,为 70.20(图 2-C)。接种 18 h 后各葡萄株系中 *NPR1* 基因的相对表达量存在显著差异 ($P<0.05$),免疫株系普莱德、高抗株系云南-元谋 2 和抗病株系夔夔-林县中 *NPR1* 基因的相对表达

量达到最大值,分别为 34.41、209.88 和 43.12,且云南-元谋 2 的相对表达量较大,为 209.87;接种 6 h 后,感病株系秋-嵩县的相对表达量达到最大值,为 51.06(图 2-D)。

表 1 46 份野生葡萄株系的发病情况和对葡萄霜霉病的抗性等级
Table 1 The incidence of 46 wild grape strains and the resistance grade to *Plasmopara viticola*

编号 Code	株系 Strain	发病率 (%) Incidence	病情指数 Disease index	抗性类型 Resistance category
1	北冰红 Beibinghong	20.83	6.71	抗病 Resistance
2	哈桑葡萄 Hasanskii	39.58	25.93	感病 Susceptible
3	左优红 Zuoyouhong	79.17	32.28	感病 Susceptible
4	山葡萄-2 Shanputao-2	72.92	32.79	感病 Susceptible
5	刺-湖南 Ci-Hunan	100.00	32.80	感病 Susceptible
6	刺-洪江双溪 Ci-Hongjiangshuangxi	100.00	29.38	感病 Susceptible
7	高山 2 Gaoshan 2	100.00	24.35	抗病 Resistance
8	黑珍珠 Heizhenzhu	100.00	33.33	感病 Susceptible
9	华东-湖南 Huadong-Hunan	27.08	14.35	抗病 Resistance
10	华东-广西 Huadong-Guangxi	33.33	16.67	抗病 Resistance
11	华东-双溪 Huadong-Shuangxi	41.67	29.38	感病 Susceptible
12	夔夔-林县 Yingyu-Linxian	54.17	23.61	抗病 Resistance
13	夔夔 WT-7 Yingyu WT-7	20.83	9.26	抗病 Resistance
14	夔夔-南召 1 Yingyu-Nanzhao 1	45.83	16.20	抗病 Resistance
15	夔夔-武汉 A13 Yingyu-Wuhan A13	16.67	11.11	抗病 Resistance
16	夔夔-青要山 1 Yingyu-Qingyaoshan 1	31.25	8.80	抗病 Resistance
17	网脉-卢氏 1 Wangmai-Lushi 1	62.50	28.70	感病 Susceptible
18	变叶-灵宝 Bianye-Lingbao	58.33	8.79	抗病 Resistance
19	变叶-亚武山 8 Bianye-Yawushan 8	52.08	5.56	抗病 Resistance
20	变叶-卢氏 Bianye-Lushi	85.42	20.37	抗病 Resistance
21	秋-灵宝 Qiu-Lingbao	27.08	5.32	抗病 Resistance
22	秋-嵩县 Qiu-Songxian	54.17	29.17	感病 Susceptible
23	秋-青要山 Qiu-Qingyaoshan	70.83	31.91	感病 Susceptible
24	云南-元谋 2 Yunnan-Yuanmou 2	6.25	1.81	高抗 High resistance
25	云南-湖南 Yunnan-Hunan	12.50	6.42	抗病 Resistance
26	云南-2 Yunnan 2	4.17	4.40	高抗 High resistance
27	腺枝-广西罗城 Xianzhi-Guangxiluocheng	16.67	6.42	抗病 Resistance
28	武汉-2 Wuhan-2	10.42	6.48	抗病 Resistance
29	桦叶-嵩县 2 Huaye-Songxian 2	64.58	34.72	感病 Susceptible
30	桦叶-王相岩 2 Huaye-Wangxiangyan 2	77.08	14.35	抗病 Resistance
31	桦叶-老君山 5 Huaye-Laojunshan 5	86.67	19.62	抗病 Resistance
32	小叶-长沙 Xiaoye-Changsha	89.47	14.29	抗病 Resistance
33	木扎岭-3 Muzhaling-3	14.58	1.62	高抗 High resistance
34	木扎岭-6 Muzhaling-6	33.33	9.26	抗病 Resistance
35	菱叶葡萄(0945) Lingyeputao (0945)	66.67	22.73	抗病 Resistance
36	美丽葡萄(1104) Meiliputao (1104)	83.33	33.33	感病 Susceptible
37	普莱德(0599) Pride (0599)	0.00	0.00	免疫 Immune
38	朱姆博(0880) Jumbo (0880)	0.00	0.00	免疫 Immune
39	弗莱(0238) Fry (0238)	0.00	0.00	免疫 Immune
40	特里尤木夫(0707) Triumph (0707)	0.00	0.00	免疫 Immune
41	萨米特(0646) Summit (0646)	0.00	0.00	免疫 Immune
42	Rupestis	95.83	30.86	感病 Susceptible
43	沙地(0904) Shadi (0904)	70.83	30.56	感病 Susceptible
44	LN33	100.00	33.33	感病 Susceptible
45	巴莱特 50(0917) Barrett 50 (0917)	91.67	31.48	感病 Susceptible
46	哥洛尔 A(0915) Gloire A (0915)	87.50	28.70	感病 Susceptible

2.3.2 抗性基因表达差异的热图聚类分析

免疫株系普莱德和高抗株系云南-元谋2中 *PAL*、*PR1*、*TLP* 和 *NPR1* 基因的表达趋势一致,均呈现先上调后下调的趋势,其中 *NPR1* 与其它3个基因的表达模式差异最大(图3-A~B);抗病株系夔夔-林县中 *TLP*、*NPR1*、*PR1* 和 *PAL* 基因的表达趋势一致,均呈现先上调后下调的趋势,其中 *TLP* 与其它3个基因的表达模式差异最大(图3-C);感病株系秋-嵩县中 *PAL*、*PR1*、*TLP* 和 *NPR1* 基因均呈现先上调后下调的趋势,其中 *NPR1* 与 *TLP* 表达模式相近,*PAL* 和 *PR1* 表达模式相近(图3-D)。

3 讨论

检测葡萄品种对霜霉病抗性的常用方法有田间自然发病调查法、田间接种鉴定法和叶盘鉴定法(刘天明等, 2001; 房玉林等, 2007; Blasi et al., 2011)。本研究采用叶盘法对46份野生葡萄株系进行霜霉病抗性鉴定,结果表明不同野生葡萄株系对霜霉病的抗性存在差异,且同种内不同株系间也存在较大差异,这一现象与 Wan et al. (2007) 的研究结果一致,秋葡萄留坝-6和留坝-7对霜霉病表现感病,而留坝-8和留坝-9对霜霉病则表现高抗,可能是育种过程中人工选择、起源地不同或功能基因不同作用导致个体间的差异(Pandey & Somssich, 2009),因此

利用野生葡萄种质资源作抗病育种材料时,应该先研究个体间的基因型与抗病表型间的对应关系,以便后期利用分子技术更方便地筛选育种材料。为验证郑州果树研究所从国外引进的圆叶葡萄对霜霉病的抗性与国内外研究结果是否一致,本研究对资源圃内的圆叶葡萄各株系进行抗性鉴定,结果表明圆叶葡萄各株系均表现为免疫,但河岸葡萄和沙地葡萄则表现为感病,这与贺普超和王国英(1986)、Staudt & Kassemeyer(1995)的研究结果不完全一致,后两者的研究结果表明圆叶葡萄对霜霉病免疫,河岸葡萄和沙地葡萄对霜霉病表现为高抗;林玲等(2013)也通过田间自然鉴定法表明圆叶葡萄对霜霉病免疫,这种现象可能是由于接种病原菌的致病力不同所导致的差异。已有研究表明不同葡萄霜霉病菌的致病力存在差别,如张眉等(2015)对山东省的13株霜霉病菌菌株进行研究,发现13株菌株的致病性不同,分为强、中、弱3种致病类型,且菌株间致病力差异与菌株的地域来源无明显相关性;刘丽等(2017)采用田间调查法和室内离体叶圆片接种法调查不同葡萄品种对霜霉病的抗性,结果表明室内离体叶片接种的霜霉病发病程度一般都比田间调查结果重,可能是田间环境较复杂,而室内温度、湿度更适合于霜霉病菌的侵染,从而影响病害的严重程度。



图1 接种霜霉病菌0、72、120和168 h后不同抗性葡萄株系的侵染特征

Fig. 1 Infection characteristics of different resistant grapevines after inoculating *Plasmopara viticola* for 0, 72, 120 and 168 h

A: 免疫株系普莱德(0599); B: 高抗株系云南-元谋2; C: 抗病株系夔夔-林县; D: 感病株系秋-嵩县。A: Immune strain Pride (0599); B: high resistant strain Yunnan-Yuanmou 2; C: resistant strain Yingyu-Linxian; D: susceptible strain Qiu-Songxian.

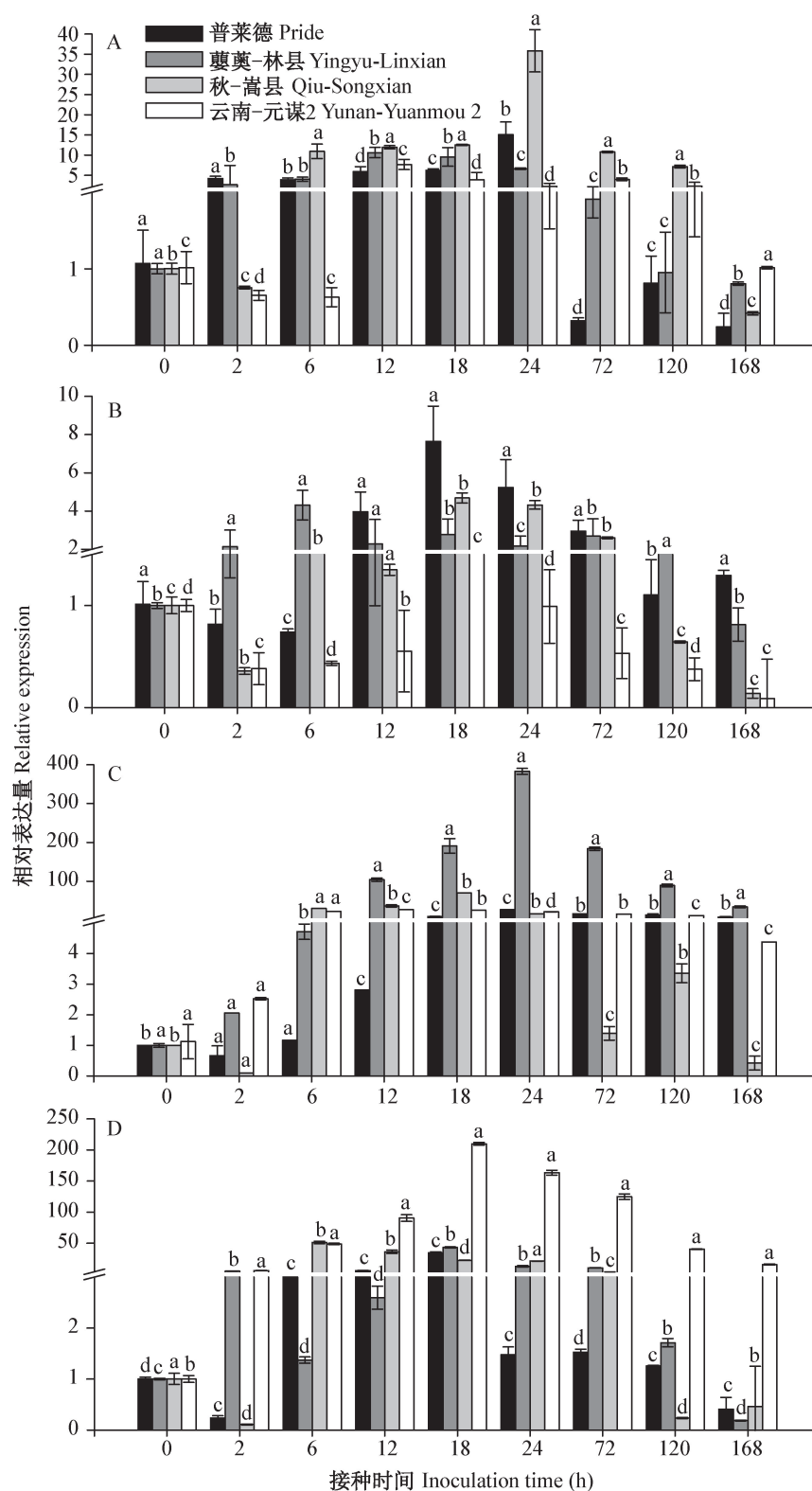


图2 接种霜霉病菌后不同抗性葡萄株系 *PAL* (A)、*PRI* (B)、*TLP* (C) 和 *NPR1* (D) 基因的相对表达量

Fig. 2 Relative expression of *PAL* (A), *PRI* (B), *TLP* (C) and *NPR1* (D) genes in different resistant grape strains after *Plasmopara viticola* inoculation

图中数据为平均数±标准差。不同字母表示同一接种时间不同抗性株系经Duncan氏新复极差法检验在 $P < 0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SD. Different letters on the bars indicate significant difference of different grape strains at the same inoculation time at $P < 0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

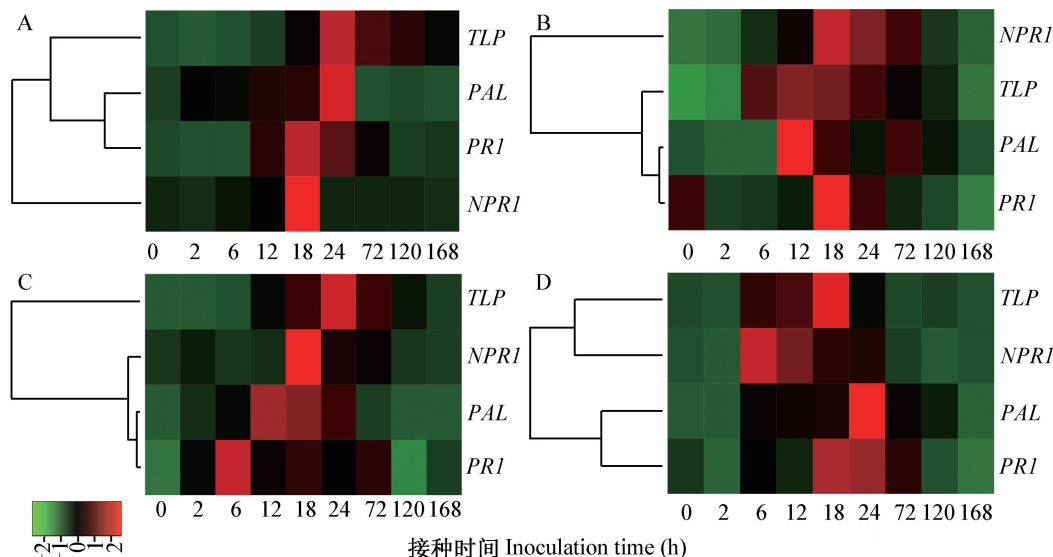


图3 不同抗性葡萄株系中 *PAL*、*PRI*、*TLP* 和 *NPR1* 基因的相对表达量差异的热图聚类分析

Fig. 3 Heatmap cluster analysis of relative expression of *PAL*, *PRI*, *TLP* and *NPR1* genes in different resistant grape strains

A: 免疫株系普莱德(0599); B: 高抗株系云南-元谋2; C: 抗病株系夔夔-林县; D: 感病株系秋-嵩县。A: Immune strain Pride (0599); B: high resistant strain Yunnan-Yuanmou 2; C: resistant strain Yingyu-Linxian; D: susceptible strain Qiu-Songxian.

Yan & Dong(2014)研究结果表明,当病原菌侵染植物时,植物叶片中的水杨酸含量会迅速上升,从而诱导系统性获得抗性(systemic acquired resistance, SAR)的发生, *PAL*、*PRI* 和 *NPR1* 基因被认为是 SAR 激活的重要基因。本研究通过 RT-qPCR 分析关键基因在不同野生葡萄株系中的相对表达量差异,结果显示 *PRI* 基因在免疫株系普莱德中有更高的表达量, *NPR1* 基因在高抗株系云南-元谋2中有更高的表达量,这与 Figueiredo et al.(2012)研究结果一致,由于水杨酸含量的增加, *PRI* 和 *NPR1* 基因在抗病株系中有更高的表达,而在感病株系中,由于 *PAL* 基因的抑制导致水杨酸积累很少,从而可能导致 SAR 通路激活失败。抗病株系夔夔-林县、高抗株系云南-元谋2和免疫株系普莱德中 *PRI* 基因的相对表达量却较少。 *PRI* 基因在这3个抗病株系中表达量较低,其可能是 *NPR1* 和 *PAL* 基因在控制,也可能是其它抗病基因在起作用,仅是本试验未检测到。抗病株系夔夔-林县中 *TLP* 基因的相对表达量是感病株系秋-嵩县的6倍,这与 He et al.(2017)研究结果一致,表明 *TLP* 基因的积累可以增强葡萄对霜霉病的抗性。

本研究以郑州果树研究所46份野生葡萄株系为试材进行霜霉病抗性鉴定,结果表明60.87%野生葡萄株系对霜霉病表现出良好抗性,其中云南-元谋2、云南-2和木扎岭-3均表现为高抗。后续研究需进一步对表现良好抗性的野生葡萄株系进行重复

验证,另外需通过DNA分子标记技术对这些抗性葡萄株系进行抗性鉴定,以期将对霜霉病表现良好抗性的中国野生葡萄品种列入育种计划。同时对关键抗性基因进行功能验证,并确定与其相互作用的激素信号途径。由于本研究试材均采用避雨栽培,未进行田间自然调查,而田间接种鉴定又可能会引起其它葡萄种质资源感染霜霉病,还需进行重复验证以确定良好抗性株系的抗病性。

参 考 文 献 (References)

- Bari R, Jones JDG. 2009. Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology*, 69(4): 473-488
- Blasi P, Blanc S, Wiedemann-Merdinoglu S, Prado E, Rühl EH, Mestre P, Merdinoglu D. 2011. Construction of a reference linkage map of *Vitis amurensis* and genetic mapping of *Rpv8*, a locus conferring resistance to grapevine downy mildew. *Theoretical and Applied Genetics*, 123(1): 43-53
- Boso S, Kassemeyer HH. 2008. Different susceptibility of European grapevine cultivars for downy mildew. *Vitis*, 47(1): 39-49
- Brun LA, Le Corff J, Maillet J. 2003. Effects of elevated soil copper on phenology, growth and reproduction of five ruderal plant species. *Environmental Pollution*, 122(3): 361-368
- Dong X. 2004. *NPR1*, all things considered. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(5): 547-552
- Fang YL, Song SR, Zhang YF, He JL, Chen SX. 2007. Relationship of downy mildew resistance with leaf POD and PPO activities of different grapevine varieties. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 27(2): 392-395 (in Chinese) [房玉林, 宋士任, 张艳芳, 何建林, 陈书霞. 2007. 不同品种葡萄抗霜霉病特性与叶片

- POD、PPO活性关系的研究. 西北植物学报, 27(2): 392–395]
- Figueiredo A, Monteiro F, Fortes AM, Bonow-Rex M, Zyprian E, Sousa L, Pais MS. 2012. Cultivar-specific kinetics of gene induction during downy mildew early infection in grapevine. *Functional & Integrative Genomics*, 12(2): 379–386
- Gisi U, Sierotzki H. 2008. Fungicide modes of action and resistance in downy mildews. *European Journal of Plant Pathology*, 122(1): 157–167
- He PC, Wang GY. 1986. Studies on the resistance of wild *Vitis* species native to China to downy mildew, *Plasmopara viticola* (Berk. et Curtis) Berl. et De Toni. *Acta Horticulturae Sinica*, 13(1): 12–21 (in Chinese) [贺普超, 王国英. 我国葡萄野生种霜霉病抗性的调查研究. 园艺学报, 13(1): 12–21]
- He RR, Wu J, Zhang YL, Agüero CB, Li XL, Liu SL, Wang CX, Walker MA, Lu J. 2017. Overexpression of a thaumatin-like protein gene from *Vitis amurensis* improves downy mildew resistance in *Vitis vinifera* grapevine. *Protoplasma*, 254(4): 1579–1589
- Jürges G, Kassemeyer HH, Dürrenberger M, Düggelein M, Nick P. 2009. The mode of interaction between *Vitis* and *Plasmopara viticola* Berk. & Curt. Ex de Bary depends on the host species. *Plant Biology*, 11(6): 886–898
- Li BY, Wang PS, Ni SS, Liu XQ, Wang YZ. 2016. Resistance identification and biochemistry of resistance of different grape varieties to downy mildew. *Journal of Fruit Science*, 33(2): 217–223 (in Chinese) [李宝燕, 王培松, 倪寿山, 刘学卿, 王英姿. 2016. 不同葡萄品种对霜霉病的抗性鉴定及相关生理生化研究. 果树学报, 33(2): 217–223]
- Li XL, Zhang YL, Yin L, Lu J. 2017. Overexpression of pathogen-induced grapevine TIR-NB-LRR gene *VaRGAI* enhances disease resistance and drought and salt tolerance in *Nicotiana benthamiana*. *Protoplasma*, 254(2): 957–969
- Lin L, Huang Y, Lu J, Zhou YM, Zhang Y. 2013. The downy mildew resistance of different variety of grape cultivar in southern China. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, 22(2): 136–140 (in Chinese) [林玲, 黄羽, 卢江, 周咏梅, 张瑛. 2013. 南方湿热地区不同葡萄品种霜霉病抗性鉴定. 西北农业学报, 22(2): 136–140]
- Liu HN, Li H. 2004. The resistance heredity of *Vitis vinifera* to *Uncinula necator* and *Plasmopara viticola*. *Journal of Plant Protection*, 31(1): 57–62 (in Chinese) [刘会宁, 李华. 2004. 欧亚种葡萄自交F₁代对白粉病和霜霉病的抗性遗传. 植物保护学报, 31(1): 57–62]
- Liu L, Liu CY, Wang H, Guan TS, Yu SY, Li BH. 2017. Resistance of different grape cultivars to downy mildew. *Plant Protection*, 43(2): 177–182 (in Chinese) [刘丽, 刘长远, 王辉, 关天舒, 于舒怡, 李柏宏. 2017. 不同葡萄品种对霜霉病的抗性. 植物保护, 43(2): 177–182]
- Liu SL, Wu J, Zhang P, Hasi G, Huang Y, Lu J, Zhang YL. 2016. Response of phytohormones and correlation of SAR signal pathway genes to the different resistance levels of grapevine against *Plasmopara viticola* infection. *Plant Physiology and Biochemistry*, 107: 56–66
- Liu TM, Li H, Zhang ZW. 2001. Table grapevine resistance to *Plasmopara viticola* and the resistance mechanism. *Journal of Plant Protection*, 28(2): 118–122 (in Chinese) [刘天明, 李华, 张振文. 2001. 鲜食葡萄品种对霜霉病的抗性及其抗病机理研究. 植物保护学报, 28(2): 118–122]
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25(4): 402–408
- Loake G, Grant M. 2007. Salicylic acid in plant defence: the players and protagonists. *Current Opinion in Plant Biology*, 10(5): 466–472
- Marchive C, Léon C, Kappel C, Coutos-Thévenot P, Corio-Coster M, Delrot S, Lauvergeat V. 2013. Over-expression of *VvWRKY1* in grapevines induces expression of jasmonic acid pathway-related genes and confers higher tolerance to the downy mildew. *PLoS ONE*, 8(1): e54185
- Pandey SP, Somssich IE. 2009. The role of *WRKY* transcription factors in plant immunity. *Plant Physiology*, 150(4): 1648–1655
- Qiao BY, Huang HF, Liu CH, Song SW, Li DD. 2014. Research on the factors influencing grape resistance to downy mildew. *Journal of Fruit Science*, 31(5): 901–905 (in Chinese) [乔宝营, 黄海帆, 刘崇怀, 宋尚伟, 李道德. 2014. 几种理化因素与葡萄霜霉病抗性的关系. 果树学报, 31(5): 901–905]
- Reid KE, Olsson N, Schlosser J, Peng F, Lund ST. 2006. An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development. *BMC Plant Biology*, 6(1): 27
- Staudt G, Kassemeyer HH. 1995. Evaluation of downy mildew resistance in various accessions of wild *Vitis* species. *Vitis*, 34(4): 225–228
- This P, Lacombe T, Thomas MR. 2006. Historical origins and genetic diversity of wine grapes. *Trends in Genetics*, 22(9): 511–519
- Wan YZ, Schwaninger H, He PC, Wang YJ. 2007. Comparison of resistance to powdery mildew and downy mildew in Chinese wild grapes. *Vitis*, 46(3): 132–137
- Wang Y, Liu Y, He P, Lamikanra O, Lu J. 1998. Resistance of Chinese *Vitis* species to *Elsinoë ampelina* (de Bary) shear. *HortScience*, 33(1): 123–126
- Yan SP, Dong XN. 2014. Perception of the plant immune signal salicylic acid. *Current Opinion in Plant Biology*, 20: 64–68
- Yin X, Liu RQ, Su H, Su L, Guo YR, Wang ZJ, Du W, Li MJ, Zhang X, Wang YJ, et al. 2017. Pathogen development and host responses to *Plasmopara viticola* in resistant and susceptible grapevines: an ultrastructural study. *Horticulture Research*, 4: 17033
- Zhang M, Xin XQ, Wu B, Wang SJ, Guo X, Zhao JH. 2015. Study on virulence different and genetic relationship of *Plasmopara viticola* in Shandong. *Shandong Agricultural Sciences*, 47(4): 95–99 (in Chinese) [张眉, 辛相启, 吴斌, 王升吉, 郭霞, 赵玖华. 2015. 山东葡萄霜霉病菌致病力分化及亲缘关系研究. 山东农业科学, 47(4): 95–99]

(责任编辑:张俊芳)