

新疆不同地区葡萄霜霉病菌致病性分化及遗传多样性的分析

李卓 周婷婷 任毓忠 张莉* 李国英*

(石河子大学绿洲农作物病害防治重点实验室, 新疆 石河子 832000)

摘要: 为了解新疆不同地区葡萄霜霉病菌 *Plasmopara viticola* 的遗传特征, 分别采用叶盘接菌法及 SSR 分子标记技术对采自新疆吐鲁番、阿克苏、石河子等 11 个不同产区的葡萄霜霉病菌菌株的致病性进行测定, 并分析各菌株的遗传多样性。结果显示, 来自新疆不同地区的菌株种内存在着致病性分化现象, 依据其在鉴别寄主上致病性的差异, 将供试菌株划分为强、中、弱 3 类, 其中强致病性菌株为优势菌株, 且种间致病性分化与菌株的地理来源无关; SSR 标记结果表明, 供试菌株之间存在遗传变异现象, 并且菌株之间亲缘关系都较近, 在相似系数为 0.93 时, 48 株菌株聚为 4 大类, 且遗传分化与地理分布具有一定的相关性。研究表明新疆不同地区的葡萄霜霉病菌菌株之间存在致病性分化与遗传变异现象。

关键词: 葡萄霜霉病菌; 致病性分化; 遗传多样性; SSR 标记技术

Genetic diversity and pathogenicity differentiation of grapevine downy mildew causal agent *Plasmopara viticola* in different regions of Xinjiang

Li Zhuo Zhou Tingting Ren Yuzhong Zhang Li* Li Guoying*

(The Key Laboratory for Prevention and Control of Diseases and Pests of Oasis Crops, Shihezi University, Shihezi 832000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China)

Abstract: In order to find out the genetic characteristics of grape downy mildew pathogen *Plasmopara viticola* from different regions in Xinjiang, pathogenicity differentiation of strains was studied by leaf disc inoculation method, and genetic variation among different stains was analyzed with SSR molecular markers. The results showed that pathogenic differentiation was found among the strains from different regions of Xinjiang. According to its different pathogenicity in the differential host, the strains were divided into strong, medium and weak pathogenic strains. The strong pathogenic strains were dominant strains, and interspecific pathogenic differentiation had no correlation with the geographical source. The genetic variation was found between strains, and the genetic relationships between strains were close. At the similarity coefficient of 0.93, the 48 strains could be divided into four types. There was a certain correlation between genetic differentiation and geographical distribution. The results indicated that there were pathogenic differentiation and genetic variation among the grape downy mildew strains in different regions of Xinjiang.

Key words: *Plasmopara viticola*; differentiation of the pathogenicity; genetic diversity; SSR marker

葡萄霜霉病是一种世界性的葡萄病害(Delmotte et al., 2006),由卵菌门单轴霉属的葡萄霜霉病菌 *Plasmopara viticola* 引起,是危害葡萄生产最严重的病害之一。研究发现,同一葡萄品种在不同地区内发病程度有明显差异,除了环境气候条件、葡萄园管理水平等因素影响外,也可能是由于各地的葡萄霜霉病菌出现分化或变异所致,尤其对这种具有广泛地理分布的病原菌来说,种内致病性分化的可能性更大。Kast(2001)研究表明,来自瑞士和德国的不同葡萄霜霉病菌株在不同葡萄品种上存在毒力差异;Rouxel et al.(2012)认为葡萄霜霉病菌种内存在明显的致病性分化现象,且其种下可能有4种专化型。而新疆维吾尔自治区(简称新疆)作为全国最大的葡萄种植区,也是葡萄霜霉病发生较为严重的地区,因此,明确该地区葡萄霜霉病菌致病性的分化情况至关重要。

目前,几种不同类型的分子标记已被开发并用于葡萄霜霉病菌群体遗传多样性的研究。如Kump et al.(1998)利用随机扩增多态DNA(randomly amplified polymorphic DNA, RAPD)技术发现瑞士一个葡萄园中不同霜霉病病斑上的孢子囊存在高度分化现象;但RAPD标记技术的显性与重现性差(Stark-Urnau et al., 2000; Somasundaram & Kalaiselvam, 2011)。随着科技发展,微卫星(simple sequence repeats, SSR)标记技术首次被Gobbin et al.(2003)成功用于对葡萄霜霉病菌的标记中,并逐步克服了RAPD等标记的不足。随后SSR标记也被陆续用在欧洲多个地区的一些群体遗传学和葡萄霜霉病的流行病学研究中(Williams, 2005; Hug, 2006)。Gobbin et al.(2006)用4对微卫星等位基因对收集的32株葡萄园中霜霉病菌菌株进行标记,结果显示所有菌株均能高水平表达,且具有基因多样性;Delmotte et al.(2006)开发了7对SSR引物对采自美国和欧洲的150个葡萄霜霉病菌菌株进行标记;Rouxel et al.(2012)相继开发了31对特异性的葡萄霜霉病菌SSR引物对采自欧洲和美国的96株菌株进行标记,结果显示所有菌株之间存在遗传多样性。SSR标记技术也成为葡萄霜霉病菌菌株间标记的一种有力工具并得到了越来越广泛的应用,同时较RAPD技术更适合于植物病原体群体遗传的研究(Dutech et al., 2007),因此,利用该技术对新疆不同地区的葡萄霜霉病菌进行遗传分化研究是可靠而高效。

基于此,本研究采用叶盘接菌法和SSR标记技术分别对新疆吐鲁番、阿克苏、石河子等11个不同产区的葡萄霜霉病菌的致病性分化和遗传多样性进

行分析,通过比较各地区葡萄霜霉病菌的多样性,明确该病菌的遗传特征,以期为综合防治新疆葡萄霜霉病提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株:2015—2016年从新疆的主要葡萄种植产区伊犁、阿克苏、克拉玛依、石河子、五家渠等地收集获得48株葡萄霜霉病菌菌株,分别来自石河子大学实验站里扎马特(LZMT-SHZ1)、石河子145团石总场弗蕾(FL-SHZ2)、石河子143团二分场采摘园弗蕾(FL-SHZ3)、石河子145团二分厂红提(HT-SHZ4)、石河子143团二分厂红提(HT-SHZ5)、石河子145团4分场10连红提(HT-SHZ6)、石河子145团4分场10连克瑞森(KRS-SHZ7)、石河子121马管处水管2站巨峰(JF-SHZ8)、石河子145团3分厂弗蕾(FL-SHZ9)、石河子134团1连弗蕾(FL-SHZ10)、沙湾林场酿酒葡萄(NJPT-SW1)、沙湾林场红提(HT-SW2)、伊犁52团7连弗蕾(FL-YL1)、伊犁70团10连红提(HT-YL2)、伊犁160团2连红提(HT-YL3)、伊犁83团园艺5连克瑞森(KRS-YL4)、伊犁巩留县油脂厂马奶子(MNZ-YL5)、伊犁巩留县七乡红光大队里扎马特(LZMT-YL6)、伊犁70团9连3区里扎马特(LZMT-YL7)、伊犁70团9连1区里扎马特(LZMT-YL8)、伊犁霍城县清水河镇城西一村红提(HT-YL9)、伊犁霍尔果斯莫乎尔乡61团红提(HT-YL10)、伊犁70团7连红提(HT-YL11)、五家渠芳草湖一分场弗蕾(FL-WJQ10)、五家渠芳草湖四分场弗蕾(FL-WJQ2)、五家渠共青团6连红提(HT-WJQ3)、五家渠共青团6连弗蕾(FL-WJQ4)、五家渠101团4连葡萄地弗蕾(FL-WJQ5)、五家渠共青团农场观美元红提(HT-WJQ6)、博乐小营盘镇红提(HT-BL1)、博乐市达勒特镇红花队红提(HT-BL2)、博乐85团2连红提(HT-BL3)、博乐86团7连红提(HT-BL4)、奎屯130团2连弗蕾(FL-KT1)、昌吉市六工镇西五工三队红提(HT-CJ1)、塔城地区160团红提(HT-TC1)、塔城地区169团葡萄基地弗蕾(FL-TC2)、克拉玛依金龙镇红提(HT-KLMY1)、克拉玛依市农业开发区38号家院马奶子(MNZ-KLMY2)、鄯善双水磨社区葡萄研究所红提(HT-SS1)、阿克苏市红旗坡2队红提(HT-AKS1)、阿克苏依赶提88队3小队红提(HT-AKS2)、阿克苏地区12团克瑞森(KRS-AKS3)、阿尔苏地区12团弗蕾(FL-AKS5)、阿克苏地区阿拉尔农科所果园弗蕾(FL-AKS4)、阿克苏地区九团红提(HT-AKS6)、阿克苏地区10团夏

黑(XH-AKS7)、阿克苏地区六团夏黑(XH-AKS8)。

鉴别寄主:依据刘新秀等(2013)和周婷婷等(2014)对葡萄种质资源测定结果并结合新疆当地广泛种植的葡萄品种,分别选取来源于石河子大学试验站的高感品种里扎马特、红地球,感病品种无核白鸡心、葡萄园皇后,抗病品种克瑞森、信浓乐,抗病性较强品种卡托巴、北醇等抗(感)病性分化较稳定的8个品种作为鉴别寄主。

试剂及仪器:PAGE母液、10%硫酸铵、5×TBE、95%乙醇、冰乙酸、AgNO₃、NaOH、甲醛、Master Mix等,生工生物工程(上海)有限公司;其余试剂均为国产分析纯。MJMini PCR仪,美国伯乐公司;DYY-12电泳仪,北京六一仪器厂;MGC-250培养箱,上海一恒科学仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 葡萄霜霉病菌致病性分化的测定

孢子囊悬浮液的制备:从新疆不同地区采集到的典型病叶,用流水冲洗至霉层彻底干净,再用无菌水冲洗3次,在超净工作台上静置至叶片表面无明水,置于保湿缸中,于20℃培养箱中完全黑暗保湿12 h。待病部生长出新的孢子囊,即为同龄孢子囊。将上述孢子囊按菌株编号并配制成浓度为 8×10^5 个/mL的孢子悬浮液,备用。

致病性鉴定及分级标准:分别从供试8个鉴别寄主健株上采集自顶端向下第4~6片健康叶片20多片,采集的新鲜叶片先用自来水冲洗后,再用无菌水冲洗3次,用无菌滤纸吸干叶片表面的水珠,将叶片打成直径为15 mm的叶盘,叶背面向上置于放有2层湿滤纸、直径为9 cm的培养皿中,每皿10个叶盘,将浓度为 8×10^5 个/mL的孢子囊悬浮液均匀喷洒在鉴别寄主的叶盘背面,喷洒量约1 mL,每皿喷洒1种菌株的孢子悬浮液,每处理重复3次,用保鲜膜封口,置于20℃完全黑暗条件下培养7 d,调查并记录菌株在不同鉴别寄主葡萄叶盘上的发病情况。依照叶盘感病面积所占总面积的比例,采用6级分级标准调查病情(刘新秀等,2013;周婷婷等,2014;李宝燕等,2016),即0级:叶盘未发病;1级:病斑大小占叶盘面积5.0%以下;2级:病斑面积占叶盘面积5.1%~25.0%;3级:病斑面积占叶盘面积25.1%~50.0%;4级:病斑面积占叶盘面积50.1%~75.0%;5级:病斑面积占叶盘面积75.1%~100.0%。病情指数= $[\sum(\text{各级代表值} \times \text{各级病叶盘数}) / (\text{调查总叶盘数} \times \text{最高一级代表值})] \times 100$ 。

品种反应型按国际植物种质委员会的5级分类标准进行划分,病情指数0为免疫;病情指数0.1~5.0

为高抗;病情指数5.1~25.0为抗病;病情指数25.1~50.0为感病;病情指数50.1~100.0为高感。依据其在鉴别寄主上抗感反应类型不同使用SPSS 19.0软件对病原菌进行聚类分析。

1.2.2 葡萄霜霉病菌遗传多样性的分析

孢子囊的收集:用浓度为 8×10^5 个/mL孢子囊悬浮液进行扩繁,待叶片上长满霉层后用灭菌排笔刷将孢子囊刷入75%乙醇中, $8\,000$ r/min离心5 min后倒掉上清液,放在超净工作台上待酒精完全挥发后的孢子囊用于DNA提取。

葡萄霜霉病菌的DNA提取:参照Yin et al.(2010)的CTAB法对上述孢子囊进行总DNA的提取。在离心管中加适量石英砂、PVP,用研磨棒将孢子囊磨成匀浆,研磨5 s后加入CTAB再研磨5 s即可;加入约700 μ L事先65℃预热的CTAB分离缓冲液,后加入10 μ L β -巯基乙醇,盖上盖子,充分混匀,放入65℃水浴锅中45 min,每隔10 min摇晃1次;水浴结束后用氯仿-异戊醇按体积比24:1抽提2次,加入无水乙醇-20℃静置2 h,75%乙醇洗涤2次,风干,加入10 μ L RNA酶水、50 μ L TE,倒置20 min。

引物筛选:参照Gobbin et al.(2006)、Rouxel et al.(2012)、Delmotte et al.(2013)等已经公布的47对引物,由生工生物工程(上海)有限公司进行合成;从已有的47对引物中筛选出扩增条带清晰,多态性、稳定性较好的引物进行后续试验。

PCR反应:20 μ L SSR扩增体系为:模板DNA 1 μ L(含80~120 ng DNA)、10 μ mol/L上下游引物各0.8 μ L、Master Mix 10.0 μ L,加ddH₂O至20 μ L。PCR反应程序为:94℃预变性5 min;94℃变性30 s;52~65℃退火30 s;72℃延伸30 s,35个循环;72℃延伸5 min。PCR产物95℃变性5 min,冰浴10 min,在8%非变性聚丙烯酰胺凝胶迅速上样,在1×TBE电泳缓冲液中于140 V条件下电泳60~90 min。

染胶:胶块在固定液中固定8 min,无菌水冲洗3次,每次1 min;500 mL染色液中染色2 min,无菌水清洗3次,每次1 min;最后在显色液中直到胶块显色为止,无菌水清洗2次,所有过程均在振荡式脱色摇床中摇晃进行,转速30 r/min,并照相,观察不同致病性菌株孢子梗的差异。

先去除无法准确标识的条带,根据条带的有无,构建0,1二元数据矩阵。在NTSYSpc Version 2.1.0软件中采用简单匹配系数下的SHAN程序和非加权组平均法(unweighted pair-group method with arithmetic means,UPGMA)法进行聚类分析,并在Tree polt模块中生成聚类图。用POPGENE 1.32软

件计算反映基因数量和状况的遗传参数,包括等位基因数 N_a 和有效等位基因数 N_e 及基因多样性水平的遗传参数 Shannon 信息指数 I 和 Nei's 遗传多样性指数 H , 分析不同地区葡萄霜霉菌遗传多样性的关系。

2 结果与分析

2.1 不同地区葡萄霜霉菌的致病性分化

2.1.1 鉴别寄主法测定不同菌株的致病性分化

来自新疆不同地区的 48 株菌株在不同鉴别寄

主上的侵染程度存在差异,在高感寄主红提和里扎马特上的病情指数为 24.67~84.45,均较高;而在抗性寄主葡萄卡托巴、北醇上的病情指数为 0.00~5.33,均比较低;在克瑞森、信浓乐、无核白鸡心、葡萄园皇后上的病情指数为 3.33~72.67,出现多样化现象,表明同一菌株在不同鉴别寄主上的致病性不同;同一寄主上接种不同菌也表现出不同致病性。说明来自新疆不同地区的 48 株葡萄霜霉菌菌株种内致病性存在分化现象(表 1)。

表 1 新疆不同地区葡萄霜霉菌在不同鉴别寄主上的病情指数

Table 1 Disease index of different strains from different regions in Xinjiang on different differential hosts

菌株 Strain	卡托巴 Catawba		北醇 Beichun		克瑞森 Krison		信浓乐 Shinano smile		无核白鸡心 Centennial seedless		葡萄园皇后 Queen of vineyard		红提 Red globe		里扎马特 Rizazet	
	DI	RT	DI	RT	DI	RT	DI	RT	DI	RT	DI	RT	DI	RT	DI	RT
LZMT-SHZ1	0.67	HR	2.00	HR	13.00	R	15.11	R	34.33	S	40.00	S	62.11	HS	58.89	HS
FL-SHZ2	4.67	HR	3.33	HR	28.00	S	46.00	S	31.33	S	42.67	HS	30.00	S	52.67	HS
FL-SHZ3	0.00	I	1.33	HR	37.33	S	30.67	S	27.33	S	23.33	R	38.67	HS	45.33	HS
HT-SHZ4	1.00	HR	3.33	HR	9.33	R	14.67	R	32.67	S	25.33	S	34.00	S	27.33	S
HT-SHZ5	0.00	I	0.00	I	11.11	R	12.11	R	32.00	S	41.33	S	49.33	S	66.67	HS
HT-SHZ6	0.67	HR	0.00	I	60.67	HS	56.00	HS	50.67	HS	62.00	HS	58.00	HS	48.67	S
KRS-SHZ7	0.00	I	0.00	I	62.00	HS	72.67	HS	51.33	HS	57.33	HS	51.33	HS	76.00	HS
JF-SHZ8	3.33	HR	0.67	HR	54.45	HS	32.67	S	58.89	HS	51.11	HS	58.89	HS	83.33	HS
FL-SHZ9	0.00	I	2.00	HR	10.22	R	10.22	R	26.67	S	44.67	S	62.67	HS	81.22	HS
FL-SHZ10	2.67	HR	2.00	HR	42.22	S	23.44	R	36.78	S	54.22	HS	54.67	HS	61.22	HS
NJPT-SW1	0.67	HR	4.67	HR	46.67	S	64.67	HS	34.00	S	69.33	HS	30.00	HS	74.67	HS
HT-SW2	0.67	HR	3.33	HR	3.33	HR	8.00	R	9.33	R	10.00	R	27.33	S	31.33	S
FL-YL1	0.00	I	4.67	HR	22.67	R	26.67	S	65.78	HS	65.33	HS	64.00	HS	54.67	HS
HT-YL2	0.67	HR	3.11	HR	20.00	R	25.33	S	32.00	S	53.33	HS	36.67	S	84.00	HS
HT-YL3	2.00	HR	0.00	I	32.67	S	39.33	S	38.67	S	48.67	S	41.33	S	66.00	HS
KRS-YL4	0.00	I	0.00	I	55.33	HS	57.33	HS	32.00	S	56.67	HS	43.33	S	54.00	HS
MNZ-YL5	0.00	I	0.00	I	30.67	S	44.00	S	23.33	R	48.00	S	48.00	S	34.67	S
LZMT-YL6	0.00	I	0.00	I	37.33	S	46.67	S	20.00	R	47.33	S	42.00	S	24.67	R
LZMT-YL7	2.00	HR	2.00	HR	25.56	S	25.33	S	67.78	HS	51.11	S	50.00	S	83.33	HS
LZMT-YL8	2.00	HR	0.67	HR	12.22	R	20.00	R	43.33	S	46.67	S	50.00	S	84.45	HS
HT-YL9	0.67	HR	0.00	I	16.67	R	12.67	R	24.44	R	43.33	S	50.00	S	64.44	HS
HT-YL10	1.33	HR	0.00	I	18.89	R	10.00	R	25.56	R	43.33	S	48.89	S	51.11	HS
HT-YL11	1.00	HR	1.00	HR	22.56	R	23.33	R	65.78	HS	54.11	HS	48.00	S	81.33	HS
FL-WJQ1	1.33	HR	4.33	HR	30.67	S	15.33	R	21.11	R	24.44	HS	45.00	S	42.78	HS
FL-WJQ2	2.67	HR	4.00	HR	32.22	S	22.44	R	33.78	S	50.22	HS	55.67	HS	52.22	HS
HT-WJQ3	2.00	HR	3.00	HR	25.56	S	35.33	S	57.78	HS	51.11	HS	52.00	HS	80.33	HS
FL-WJQ4	1.33	HR	0.67	HR	53.45	HS	31.67	S	56.89	HS	51.11	HS	56.89	HS	81.33	HS
FL-WJQ5	0.67	HR	0.67	HR	18.67	R	17.67	R	24.44	R	40.33	S	48.00	S	61.44	HS
HT-WJQ6	1.33	HR	0.00	I	18.89	R	10.00	R	25.56	S	43.33	S	48.89	S	51.11	HS
HT-BL1	0.00	I	0.00	I	12.22	R	12.22	R	26.67	S	46.67	S	66.67	HS	82.22	HS
HT-BL2	1.00	HR	1.00	HR	22.56	R	23.33	R	65.78	HS	54.11	HS	48.00	S	80.33	HS

续表 1 Continued

菌株 Strain	卡托巴 Catawba		北醇 Beichun		克瑞森 Krison		信浓乐 Shinano smile		无核白鸡心 Centenial seedless		葡萄园皇后 Queen of vineyard		红提 Red globe		里扎马特 Rizazet	
	DI	RT	DI	RT	DI	RT	DI	RT	DI	RT	DI	RT	DI	RT	DI	RT
HT-BL3	2.00	HR	0.67	HR	11.22	R	21.00	R	42.33	S	41.67	S	48.00	S	78.45	HS
HT-BL4	0.00	I	0.00	I	10.22	R	11.22	R	30.67	S	37.67	S	62.67	HS	81.22	HS
FL-KT1	0.67	HR	3.33	HR	34.67	S	16.33	R	24.11	R	21.44	R	53.00	HS	47.78	S
HT-CJ1	1.33	HR	4.33	HR	30.67	S	15.33	R	21.11	R	24.44	R	45.00	S	42.33	S
HT-TC1	2.67	HR	4.00	HR	32.22	S	22.44	R	33.78	S	50.22	HS	55.67	HS	52.67	HS
FL-TC2	2.00	HR	0.67	HR	11.22	R	20.00	R	43.33	S	46.67	S	50.00	S	84.45	HS
HT-KLMY1	1.33	HR	5.33	HR	32.67	S	17.33	R	21.11	R	24.44	R	50.00	S	47.78	S
MNZ-KLMY2	1.67	HR	5.33	HR	26.67	S	21.33	R	20.11	R	21.44	R	25.00	R	46.78	S
HT-SS1	4.67	HR	2.00	HR	37.22	S	22.44	R	33.78	S	51.22	HS	55.67	HS	65.22	HS
HT-AKS1	4.67	HR	4.00	HR	42.22	S	24.44	R	37.78	S	52.22	HS	56.67	HS	62.22	HS
HT-AKS2	2.00	HR	2.00	HR	25.56	S	24.33	S	67.78	HS	51.11	HS	50.00	S	83.33	HS
KRS-AKS3	3.33	HR	0.67	HR	52.45	HS	32.67	S	56.89	HS	51.11	HS	52.89	HS	83.33	HS
FL-AKS4	1.67	HR	2.00	HR	13.67	R	12.67	R	36.44	S	43.33	S	51.00	HS	63.44	HS
FL-AKS5	1.33	HR	1.00	HR	14.89	R	10.00	R	22.56	R	43.33	S	41.89	S	50.11	HS
HT-AKS6	2.33	HR	3.33	HR	30.67	S	25.33	S	21.11	R	23.44	R	45.00	S	42.78	S
XH-AKS7	2.67	HR	3.00	HR	32.22	S	26.44	S	35.78	S	52.22	HS	55.67	HS	52.22	HS
XH-AKS8	1.00	HR	2.00	HR	18.56	S	19.33	R	65.67	HS	53.22	HS	48.00	S	79.33	HS

DI: 病情指数; RT: 反应型; I: 免疫; HR: 高抗; R: 抗病; S: 感病; HS: 高感。DI: Disease index; RT: reaction type; I: immune; HR: high resistance; R: resistance; S: susceptibility; HS: high susceptibility。

2.1.2 不同地区葡萄霜霉菌致病性分化的聚类分析

将供试的 48 株葡萄霜霉菌划分为强、中、弱 3 种致病类型。致病性强的菌株包括菌株 HT-YL10、HT-WJQ6、FL-SHZ9、KRS-AKS3、FL-WJQ5 等, 占总供试菌株的 50.00%; 致病性中等的菌株包括菌株 FL-WJQ2、HT-TC1、XH-AKS76 等, 占 35.40%; 致病性弱的菌株包括菌株 NJPT-SW1、KRS-SHZ7、LZMT-YL6 等, 占 14.60%(图 1)。强致病型菌株为优势菌株, 说明强致病性菌株在新疆广泛存在。

聚类图结果显示, 采自伊犁的 HT-YL3、HT-YL10 菌株, 五家渠的 FL-WJQ2、FL-WJQ5 菌株, 石河子的 LZMT-SHZ1、FL-SHZ10、HT-SHZ4 菌株, 以及阿克苏的 FL-AKS4、KRS-AKS3 菌株归为不同类, 可见来自同一地区的菌株不一定属于同类; 来自不同地区甚至地域来源相对较远的菌株可能聚为一类, 说明新疆不同地区菌株致病性分化与地区之间无明显的规律性, 即葡萄霜霉菌菌株的致病性与菌株分布地区无关(图 1)。

2.2 不同地区葡萄霜霉菌的遗传多样性

2.2.1 不同地区葡萄霜霉菌的多态性分析

试验中综合多态性、稳定性、重复性等因素分析

考虑, 从 47 对 SSR 引物中筛选出扩增条带清晰的 17 对引物(表 2), 分别对新疆不同地区 48 株供试菌株的 DNA 进行 PCR 扩增, 结果表明, 所筛选的 17 对引物能够扩增出 45 条片段大小在 0.1~2.0 kb 之间的清晰条带, 其中有 23 条是属于多态性条带, 多态性位点百分率为 51.11%, 说明供试菌株遗传多样性较丰富。不同引物扩增获得的条带数在 2~7 条之间, 平均为 3.77 条, 说明 SSR 标记的条带较丰富且多态性条带检出率较高。表明所筛选的 17 对引物能对供试的 48 株菌株进行区分。

2.2.2 不同地区葡萄霜霉菌的遗传多样性分析

48 株供试菌株种内平均每个位点计算的等位基因数 N_a 为 1.533, 计算的有效等位基因数 N_e 为 1.078, 观察的 Nei's 遗传多样性指数 H 为 0~0.304, 平均为 0.013, Shannon 信息多样性指数 I 为 0~0.483, 平均为 0.021, 表明供试菌株之间存在遗传变异。

群体间的遗传相似系数在 0.556~1.000 之间, 遗传距离在 0~0.588 之间, 表明群体间的亲缘关系较近。其中伊宁、五家渠、阿克苏等地区菌株之间

的遗传距离在0~0.251之间,说明各地区菌株之间的亲缘关系较近,而石河子地区各菌株之间的遗传距离在0~0.588之间,较其它地区的亲缘关系远一

些,主要表现在石河子大学试验站采集的菌株 LZMT-SHZ1与其它菌株的遗传相似性较低。

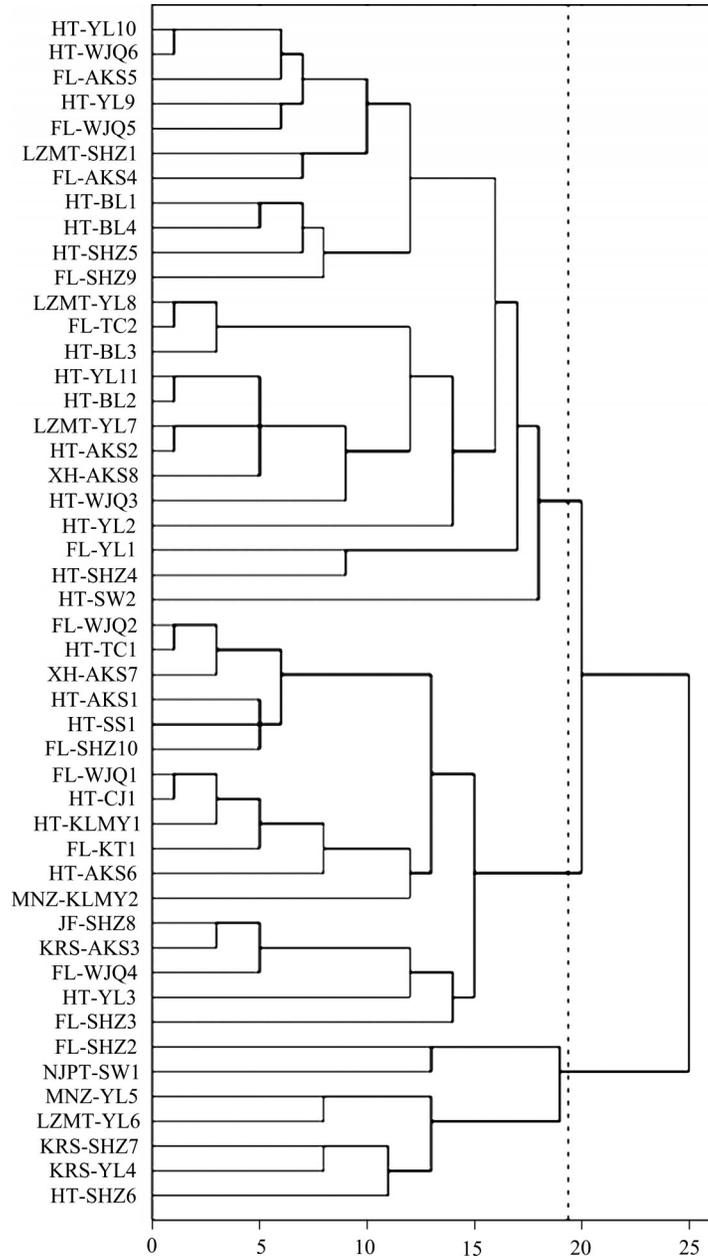


图1 新疆不同地区葡萄霜霉病菌的48株供试菌株致病性聚类分析结果

Fig. 1 The clustering analysis of pathogenicity of 48 *Plasmopara viticola* strains from different regions in Xinjiang

2.2.3 不同地区菌株间亲缘关系的聚类分析

对SSR标记结果建立系统聚类图,在相似系数为0.93时,将来自新疆地区的48株葡萄霜霉病菌菌株聚为4大类,其中来自鄯善的菌株聚为一类,来自阿克苏的菌株聚为一类,来自伊犁巩留县的菌株 MNZ-YL5、LZMT-YL6聚为一类,其它地区的为一类(图2)。表明群体间的亲缘关系与地理分布具有

一定的相关性。

本试验发现在病斑大小不明显的情况下,强致病性菌株的产孢量之间无显著性差异,但强致病性菌株的累计产孢量要比弱致病性菌株多,且在相同品种相同时间下,强致病型菌株的孢囊梗长度明显要长一些,分支也较弱致病型菌株多(图3)。

表2 本试验筛选出的17对多态性较好的引物
Table 2 Seventeen primers with good polymorphism screened in this study

引物 Primer	登录号 GenBank accession no.	引物序列 (5'-3') F and R primer sequences (5'-3')	重复序列 Repeat motif	退火温度 Annealing temperature (°C)	片段大小 Size range of alleles (bp)
Pv61	JQ219983	TCTTCAGGTAGATGCGACCA; GGTGACTCCTCGGACGAATA	(CA) ₉	54	181-187
Pv65	JQ219972	CTTTGGCCACGTCATAGTT; CGCTTTCGGTAGGTCCATTA	(TC) ₉	57	196-202
Pv74	JQ219984	GCAACGTTGTGCAAGCTTTA; GCATTATGATGGAGCTCACG	(AG) ₇	54	176-182
Pv103	JQ219981	TGACCTACCACCCATTTACCA; ACGGTCAGGTCAAAAGCAG	T(TG) ₆	54	277-299
Pv135	JQ219993	GGTGCTCTGCTTCGACACTT; CGCCACACAAGTCAACTTTC	(TTC) ₁₀	57	217-220
Pv141	JQ219999	ACGACGACATGAGCTGTACG; GAAGGTGGTGTTCATGGGTTT	(TC) ₉	57	190-192
Pv148	JQ220006	CGACCTATGTTTCGCCATTT; GAGTCGTCGTAGAAGGCGTC	(ACA) ₆	57	134-137
Pv7	DQ217575	TCTTCCGAAAAGGGACGTAA; GCGTCACTGCATCTACGAAA	(TG) ₇	60	289-297
Pv13	DQ217576	CGATGAAGTGGACCCTCATT; CCGGTAGTCAATTGCACCTT	(TG) ₈	61	214-220
Pv14	DQ217577	CAGAAACGCACAAGGTCTGA; AATTGCATACTGCAGCAACG	(TG) ₈	65	120-128
Pv16	DQ217578	TAAAAATATGGTGGCGTCAG; CCAGCAGTCTCCGTCTCATCAG	(TGC) ₂ TGT(TGC) ₃	57	248-251
Pv17	DQ217579	CAGAGTCGAACAAGTACAT; CTTTGTCGCCTTCTAACAAC	TG(TC) ₁₂	59	160-172
Pv31	DQ217580	TCCCCATGCTGAAGAGTTTC; TTCTTTCTAAGGCCGTGTGG	(CA) ₉	60	241-247
Pv39	DQ217581	ACGCATGGCGAACACGTAAG; CAGACGGGAAGAAGTTGCTC	(CA) ₆	61	174-176
Pv124	JQ219988	AACGACAGACGGATTTCTGC; GACCTCGAGCGCTTTGAC	(AGG) ₆	57	139-142
BER		AATGCAATGGTCTTCATCTCG; CTCTGCGGTA AAAAGCCTGTC	(TC) _n	52	179-185
REX		CGTGTGCGATAGCAAAACTT; TTGCATTTCGACTCCCTTAC	(TC) _n (AC) _n	54	164

3 讨论

试验中发现新疆不同产区的葡萄霜霉病菌之间存在着致病性分化和遗传分化现象,这与 Rouxel et al.(2012)的研究结果基本一致。试验中还发现来自石河子大学试验站的菌株 LZMT-SHZ1 与石河子其它地区的菌株亲缘关系较远,其主要原因可能是由

于石河子大学试验站葡萄园的近百个品种是早在 2006—2007 年陆续从各地引入,其建园时间要比大部分采样葡萄园早。葡萄霜霉病菌可随幼苗传播,品种来源地区较多,很可能将外来菌源引入,许多学者也证明了这一现象。新疆葡萄种植区域较为宽广,且新疆南北疆的气候差异很大,符合新疆葡萄霜霉病菌种群将随其寄主品种的演化及复杂的生态环

境而不断多样化。

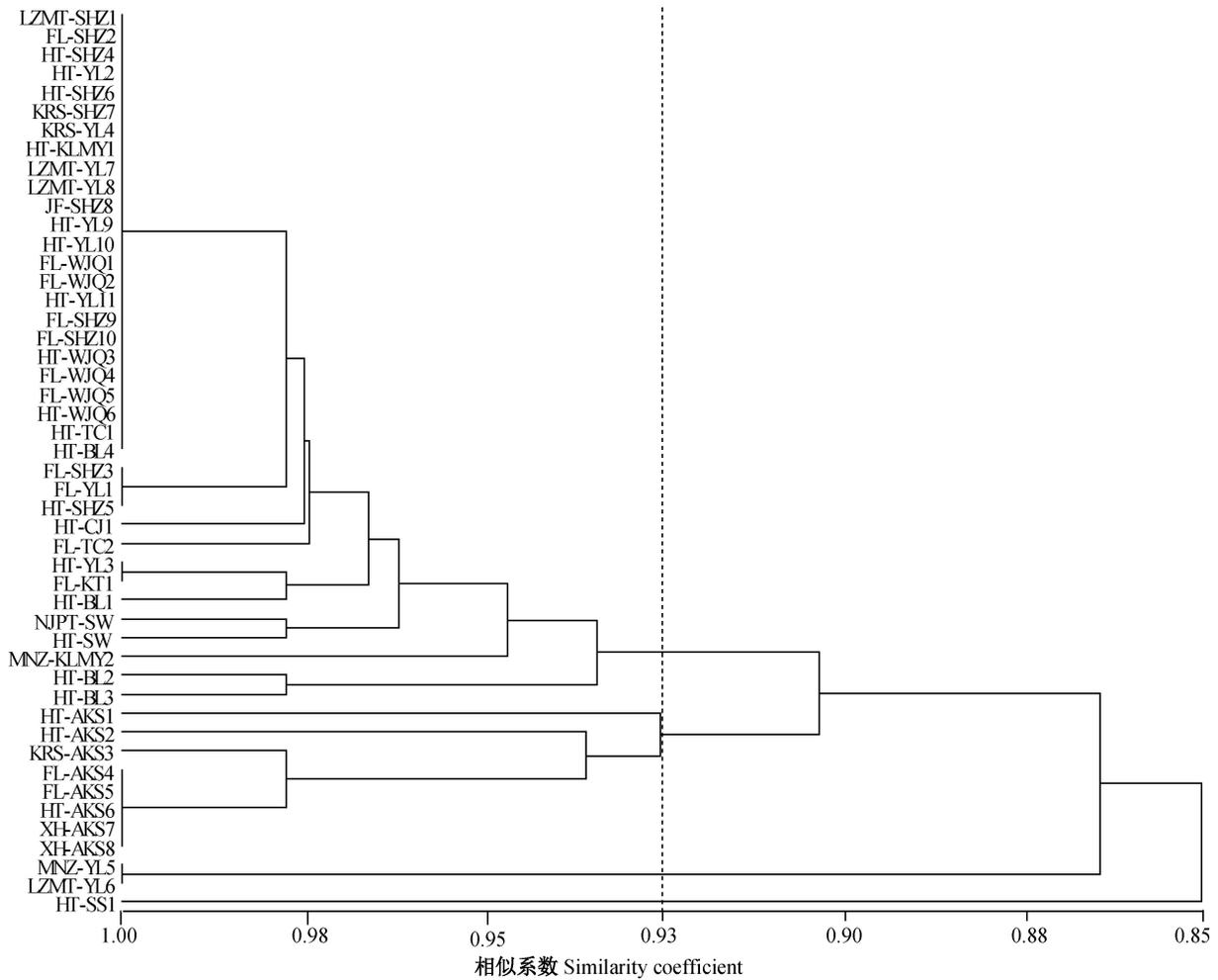


图2 新疆不同地区48株葡萄霜霉病菌菌株的亲缘关系聚类分析树状图

Fig. 2 The clustering analysis of genetic relationships between 48 *Plasmopara viticola* strains from different regions in Xinjiang

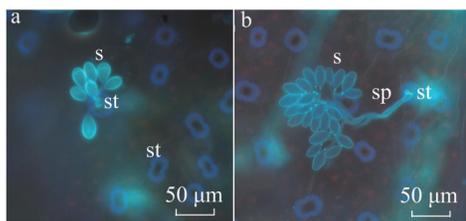


图3 新疆不同地区葡萄霜霉病菌不同致病性菌株接种7 d后的孢囊梗

Fig. 3 Sporangiophore after inoculation with different pathogenic *Plasmopara viticola* strains seven days later

a: 弱致病型菌株 FL-SHZ2; b: 强致病型菌株 LZMT-SHZ1. sp: 孢囊梗; s: 孢子囊; st: 气孔。 a: Weak pathogenic strain FL-SHZ2; b: strong pathogenic strain LZMT-SHZ1. sp: sporangiophore; s: sporangium; st:stoma.

Rouxel et al. (2012)认为,每个霜霉病病斑上都含有不同基因型的病原菌来实现异宗结合。本试验也试图采用单胞分离方法进行纯化菌株,但由于其孢子囊的萌发率较低,而需要大量的扩繁以供所需,

且试验中还发现随着继代培养时间的延长产孢量开始逐渐下降,综合多种因素,面对大量的葡萄霜霉病菌菌株则选择省去单胞分离来进行试验。

沙月霞等(2011)与于舒怡等(2016)认为葡萄霜霉病菌的致病性与潜育期、病害发展情况及产孢能力密切相关,病斑、产孢量随着叶面保湿时间的延长而增大,即致病性与环境气候条件、葡萄园管理水平等多因素相关;毕秋艳等(2014)发现致病性强弱与病原菌的寄主来源、病原菌孢囊梗的长度及分枝数量有关。本试验也得到类似结论,在病斑大小基本一致的情况下,强致病性菌株间的产孢量无显著性差异,但其累计产孢量要比弱致病性菌株多,且在相同品种相同时间下,强致病性菌株的孢囊梗长度明显要长一些,分枝也较弱致病性菌株多,但其潜育期较弱致病性菌株短。如在红地球上,强致病性菌株潜育期一般约3 d,而弱致病性菌株约6 d,说明葡萄霜霉病菌致病性分

化与地域分布相关性不显著。新疆不同地区的气候条件存在明显差异,尤其表现在天山南北,由于其不同区间环境条件的差异导致病菌基因型在空间分布多样化,使得相同地区来源的病菌的遗传相似度较高,这可能就是本试验发现新疆不同地区葡萄霜霉病菌菌株间存在遗传变异的主要原因。

参 考 文 献 (References)

- Bi QY, Ma ZQ, Zhang XF, Wang WQ, Han XY. 2014. Pathogenicity division of *Plasmopara viticola* in three provinces. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 16(2): 50–58 (in Chinese) [毕秋艳, 马志强, 张小风, 王文桥, 韩秀英. 2014. 三省份葡萄霜霉菌致病型的划分. *中国农业科技导报*, 16(2): 50–58]
- Delmotte F, Chen WJ, Richard-Cervera S, Greif C, Papura D, Giresse X, Mondor-Genson G, Corio-Costet MF. 2006. Microsatellite DNA markers for *Plasmopara viticola* the causal agent of downy mildew of grapes. *Molecular Ecology Notes*, 6(2): 379–381
- Dutech C, Enjalbert J, Fournier E, Delmotte F, Barrès B, Carlier J, Tharreau D, Giraud T. 2007. Challenges of microsatellite isolation in fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 44(10): 933–949
- Gobbin D, Pertot I, Gessler C. 2003. Identification of microsatellite markers for *Plasmopara viticola* and establishment of high throughput method for SSR analysis. *European Journal of Plant Pathology*, 109(2): 153–164
- Gobbin D, Rumbou A, Linde CC, Gessler C. 2006. Population genetic structure of *Plasmopara viticola* after 125 years of colonization in European vineyards. *Molecular plant pathology*, 7(6): 519–531
- Hug F. 2006. Genetic structure and epidemiology of *Plasmopara viticola* populations from Australian grape growing regions. Master Thesis. Switzerland: ETH Zurich, pp. 64–65
- Kast WK. 2001. Inter-isolate variation of virulence of *Plasmopara viticola* on resistant vine varieties. *Bulletin OILB/SROP*, 24(7): 45–49
- Kump I, Blaise P, Gessler C. 1998. The use of RAPD markers to estimate genetic diversity of *Plasmopara viticola* in a single vineyard. In *Third International Workshop on Grapevine Downy and Powdery Mildew*, 50(176): 72–73
- Li BY, Wang PS, Ni SS, Liu XQ, Wang YZ. 2016. Biological 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]
- Liu XX, Jin GX, Li H, Zhang L, Zhao BL, Ren YZ, Li GY. 2013. Identification of disease-resistant property of the grape germplasm resource to *Plasmopara viticola*. *Xinjiang Agricultural Sciences*, 50(5): 857–863 (in Chinese) [刘新秀, 金恭玺, 李虎, 张莉, 赵宝龙, 任毓忠, 李国英. 2013. 葡萄种质资源抗霜霉病鉴定. *新疆农业科学*, 50(5): 857–863]
- Rouxel M, Papura D, Nogueira M, Machefer V, Dezette D, Richard-Cervera S, Carrere S, Mestre P, Delmotte F. 2012. Virginie microsatellite markers for characterization of native and introduced populations of *Plasmopara viticola*, the causal agent of grapevine downy mildew. *Applied Environmental Microbiology*, 78(17): 6337–6340
- Sha YX, Wang GZ, Fan ZQ. 2011. Effect of different humidity time on occurrence of *Plasmopara viticola* in grape. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, 20(10): 196–200 (in Chinese) [沙月霞, 王国珍, 樊仲庆. 2011. 叶片湿润时间对葡萄霜霉病发生状况的影响. *西北农业学报*, 20(10): 196–200]
- Somasundaram S, Kalaiselvam M. 2011. Molecular tools for assessing genetic diversity, international training course on mangroves and biodiversity. India: Annamalai University, pp. 82–91
- Stark-Urnau M, Seidel M, Kast W, Gemmrich A. 2000. Studies on the genetic diversity of primary and secondary infections of *Plasmopara viticola* using RAPD/PCR. *Vitis Journal of Grapevine Research*, 39(4): 164–166
- Williams MG. 2005. Impact of environmental conditions on the infection behaviour of western Australian strains of *Plasmopara viticola*. causal agent of downy mildew in grapevines. Maste Thesis, Perth: University of Western Australia
- Yin L, Zhang Y L, Lu J. 2010. Comparison of different DNA extraction methods for *Plasmopara viticola*. *Sino-overseas Grapevine and Wine*, 3: 4–7
- Yu SY, Liang CH, Liu L, Liu CY, Fu JF. 2016. Correlation among grape downy mildew epidemic rate, airborne sporangium density of *Plasmopara viticola* and environmental factors in Shenyang. *Journal of Plant Protection*, 43(3): 434–441 (in Chinese) [于舒怡, 梁春浩, 刘丽, 刘长远, 傅俊范. 2016. 沈阳地区葡萄霜霉病流行速率空中孢子囊密度与环境因素的相关性. *植物保护学报*, 43(3): 434–441]
- Zhou TT, Jin GX, Yue YL, Zhang L, Li GY. 2014. Resistance identification of wine grape germplasm to downy mildew. *Xinjiang Agricultural Sciences*, 51(10): 1845–1850 (in Chinese) [周婷婷, 金恭玺, 岳永亮, 张莉, 李国英. 2014. 酿酒葡萄种质资源抗葡萄霜霉病鉴定. *新疆农业科学*, 51(10): 1845–185]

(责任编辑:王 璇)