

不同栽培模式下葡萄霜霉病菌遗传结构的时间动态分析

于舒怡 刘长远* 关天舒 王 辉 刘 丽 李柏宏

(辽宁省农业科学院植物保护研究所, 沈阳 110161)

摘要: 为明确不同栽培模式下葡萄霜霉病菌 *Plasmopara viticola* 的遗传结构、遗传多样性及遗传分化水平, 于2014—2015年定期采集露地和避雨2种栽培模式下的葡萄霜霉病菌菌株, 利用6对SSR引物对该病菌基因型、遗传多样性及遗传分化进行对比分析。结果表明, 露地和避雨栽培模式下葡萄霜霉病菌群体的Nei's基因多样性指数大于0.14, 香农多样性指数大于0.31, 2种栽培模式下群体具有丰富的遗传多样性, 但避雨栽培模式可显著降低群体等位基因数和等位基因频率。露地栽培模式下该病菌群体的流行模式呈现中等水平无性繁殖, 2年初侵染和再侵染对病害流行的贡献率分别约占26.1%和73.9%; 避雨栽培模式下葡萄霜霉病菌群体的流行模式则呈现高等水平无性繁殖, 初侵染和再侵染对病害流行的贡献率分别约占4.3%和95.7%。卵孢子的形成对于葡萄霜霉病菌种群遗传变异和有效越冬起着关键的作用。2014—2015年露地栽培模式下葡萄霜霉病菌群体的主效流行基因型对病害流行的贡献率分别为44.5%和51.8%; 而其在避雨栽培模式下葡萄霜霉病菌群体的贡献率分别可达84.2%和87.1%。同一年份的露地和避雨栽培模式下葡萄霜霉病菌群体的主效基因型种类相同, 2个群体间的等位基因频率呈现显著正相关性, 且二者之间存在频繁的基因交流, 推测避雨栽培模式下葡萄霜霉病的初侵染源自于避雨设施附近的露地栽培病株上再侵染形成的飞散传播孢子囊。

关键词: 葡萄霜霉病; 避雨栽培; 病害流行; 群体遗传

Temporal dynamics of the population genetic structure of grapevine downy mildew pathogen *Plasmopara viticola* under open field and rain-shelter cultivation

YU Shuyi LIU Changyuan* GUAN Tianshu WANG Hui LIU Li LI Baihong

(Institute of Plant Protection, Liaoning Academy of Agricultural Sciences, Shenyang 110161, Liaoning Province, China)

Abstract: In order to determine the genetic structure and diversity levels of grapevine downy mildew pathogen *Plasmopara viticola* populations under open field and rain-shelter cultivations, their genotypes, genetic diversity and genetic differentiation were analyzed by using the samples collected from the two cultivations in 2014—2015 with six pairs of SSR primers. The results showed that the Nei's genetic diversity index and Shannon's information index of *P. viticola* populations under open field and rain-shelter cultivations were more than 0.14 and 0.32, respectively, indicating the existence of rich genetic diversity in the two populations. Rain-shelter could significantly reduce population allele number and allele frequency. The epidemic pattern of downy mildew under open field cultivation showed moderate level of asexual reproduction. The primary and secondary infections contributed 26.1% and 73.9% to the epidemic of downy mildew, respectively. The epidemic pattern of downy mildew under rain-shelter cultivation

基金项目: 沈阳市高层次创新人才项目(RC180113), 辽宁省重点研发计划指导计划项目(2018103003), 国家重点研发计划(2018YFD0201300)

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: lcylns@163.com

收稿日期: 2019-02-26

showed high level asexual reproduction. The primary and secondary infections contributed 4.3% and 95.7% to the epidemic of downy mildew, respectively. Oospores played a key role in genetic variation and effective overwintering of grape downy mildew. From 2014 to 2015, the main epidemic genotypes contributed 44.5% and 51.8% to the disease epidemic, respectively, while the contribution rate under rain-shelter cultivation were 84.2% and 87.1%, respectively. The main epidemic genotypes of the pathogen population were the same under open field and rain-sheltered cultivation in the same year. There was a significant positive correlation in the allele frequencies and frequent gene exchange was observed between the two populations. It was speculated that the primary infection of downy mildew in grape under rain-shelter cultivation mode originated from sporangial dispersion caused by reinfection on the pathogen plants in open field cultivation near rain-shelter facilities.

Key words: grape downy mildew; rain shelter; disease epidemiology; population genetics

葡萄霜霉病是世界范围内普遍发生的一种葡萄病害,在中国、美国、欧洲等多雨潮湿地区严重流行(Gessler et al., 2011),其病原菌葡萄单轴霜霉 *Plasmopara viticola* 可侵染葡萄植株叶片,造成叶片焦枯早落,引起间接减产,亦可侵染嫩梢、花序、幼果等幼嫩组织,造成直接减产,年均减产可达20%~80%(李华, 2004)。迄今为止,葡萄霜霉病的防治以抗病品种(Caffi et al., 2013)、流行预警(Carisse, 2016)、农业防治(Wong et al., 2001)、生物防治(臧超群等, 2018)和化学防治(毕秋艳等, 2018)等为主,其中及时有效施用杀菌剂可有效地控制该病害。我国大部分葡萄产区属于大陆季风性气候区,降雨多集中于葡萄生长成熟季节,难以开展葡萄霜霉病精准防控,因此该病害已成为制约我国葡萄栽培和葡萄酒业发展的关键因素。

避雨栽培模式是以避雨为目的的将薄膜覆盖在树冠顶部的简单栽培形式(Meng et al., 2013)。该模式可有效减少叶面湿润持续时间,进而不利于病菌萌发和侵入;同时也可显著降低避雨棚内植株冠层相对湿度,减少病菌孢子囊产生数量,从而有效降低霜霉病的侵染率和菌源量(Du et al., 2015; 邓维萍等, 2017)。与露地栽培模式相比,避雨栽培模式明显影响葡萄霜霉病的流行时间动态参数,如推迟病害始发时间近30 d,降低季节最大病情指数50%,分别缩短病害逻辑斯蒂期和衰退期7 d和21 d,显著降低最大表观侵染速率和病害流行曲线下面积(area under disease progress curve, AUDPC)(Yu et al., 2017)。露地栽培模式下葡萄霜霉病空间分布型在始发期为随机分布(Seem et al., 1985),盛发期转为聚集分布(Madden et al., 1995),而避雨栽培模式下葡萄霜霉病常在避雨设施四周发生,整个生长季空间分布型始终表现为聚集分布,盛发期病株的聚集

是由病原菌本身的生物学特性和环境因素共同作用引起的(于舒怡等, 2015)。避雨栽培模式可显著改变葡萄霜霉病菌孢子囊的扩散动态,推迟首次捕孢时间40 d和缩短孢子囊飞散周期30 d。孢子囊飞散受到葡萄叶幕和避雨设施显著的阻隔效应,有效减少水平和垂直方向上孢子囊飞散数量(于舒怡等, 2016)。

对比露地和避雨栽培2种模式下空中孢子囊飞散动态差异、当地气候特点、试验区布局和病害流行特点,推测葡萄霜霉病的初侵染主要为本地露地栽培下葡萄霜霉病病株上病斑产生的孢子囊,但这一假设需要分子流行学研究的佐证。采用微卫星(simple sequence repeats, SSR)分子标记技术开展葡萄霜霉病菌群体遗传学研究,有助于量化分析和理解不同基因型与病害流行的时空动态、与不同地理种群间的遗传进化关系。Dick(1972)提出假设:少量的卵孢子成熟萌发,引起早春的初侵染,仅能起到提供病害初始菌源基数的作用;而由孢子囊引起的再侵染是葡萄霜霉病传播扩散的主要因素。Gobbin et al. (2003)、Kennelly et al. (2007)和Yin et al. (2014)根据采集病斑的初侵染基因型和再侵染基因型对病害发展的相对贡献,将葡萄霜霉病菌群体分为3种流行类型,在欧洲、美国、中国、日本等大多数葡萄园中病菌群体表现为低等或中等的无性繁殖水平,卵孢子可在葡萄生长季内持续成熟萌发,对病害流行的贡献率可达26%~78%,此研究结果与Dick(1972)的假设相悖,即前人低估了卵孢子对病害流行中所起的重要作用;然而在气候温暖、地理隔离的地区(如希腊岛、澳大利亚和南非)病菌具有高水平的无性繁殖,推测菌丝体或孢子囊可能是其主要越冬形态(Rumbou & Gessler, 2006; Koopman et al., 2007; Gobbin et al., 2010)。但目前尚未见有关避雨

栽培对葡萄霜霉病菌群体遗传变异及进化影响的研究,而且亟待开展避雨设施内病菌群体的遗传变异规律、差异动态、避雨栽培与相邻露地栽培之间病菌遗传差异动态等问题的深入研究。

本研究选择我国东北葡萄鲜食葡萄主产区——沈阳市作为病害流行监测区,2014—2015年连续2年定期采集并分离露地和避雨栽培2种模式下的葡萄霜霉病菌菌株,采用SSR分子标记方法对比分析不同栽培模式对葡萄霜霉病菌群体遗传结构时间动态的影响,明确露地栽培与相邻避雨栽培2种不同模式下病菌群体的遗传结构和时间动态差异,分析群体间遗传变异的来源,了解避雨栽培对霜霉病菌群体变异、进化的影响,探索避雨栽培模式下病菌的初侵染来源,以期为避雨栽培模式葡萄霜霉病防治及管理策略提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试葡萄:葡萄品种为无核白鸡心,1年生苗木,为沈阳市葡萄生产上的主栽感病品种。保护行种植贝达品种,1年生苗木,属于高抗霜霉病品种。感病样品均采自辽宁省农业科学院试验基地。

试剂及仪器:pH 8.0的100 mmol/L Tris-HCl、pH 8.0的20 mmol/L EDTA、1.4 mol NaCl、2% CTAB、2% PVP、1% β -巯基乙醇、RNase溶液、10% 硫酸铵、95%乙醇、5×TBE、冰乙酸、AgNO₃、NaOH、甲醛等,生工生物工程(上海)有限公司;Taq DNA聚合酶、dNTP混合液、Marker,天根生化科技(北京)有限公司;其它试剂均为国产分析纯。MM300高通量组织研磨器,德国Retsch公司;DYY-12电泳仪,北京六一仪器厂;EC3 Imaging System凝胶成像系统,美国UVP公司;2720型PCR仪,美国Applied Biosystems公司。

1.2 方法

1.2.1 试验地点及病样采集

试验地点选在辽宁省农业科学院试验基地,葡萄霜霉病属于该园区常发病害。试验区划分为露地栽培和避雨栽培2种模式小区,分别位于试验区东西两侧,两区相隔9 m,中间种植高抗霜霉病品种贝达的1年生苗作为保护行。每个模式小区长25 m,宽5 m,定株1年生苗木400株,行株距0.6 m×0.5 m。避雨棚为钢结构,顶部罩有棚膜,覆膜时间为每年5月中旬至10月上旬,高度2 m,拱高0.5 m,跨度5 m。分别于2014年4月28日和2015年4月25日栽苗,移栽后常规栽培管理,试验全程未进行任何

化学药剂防治。

参照Gobbin et al.(2003)采集方式并加以修改。采集时期从每年始见病斑产生开始直至葡萄生育末期结束,每7 d采样1次。当葡萄霜霉病病斑面积为0.5~1.0 cm²时,使用75%酒精消毒后的手术剪剪去一半病斑作为病样;另一半病斑留在叶斑上确保该基因型的病菌可以在小区内继续繁殖。记录病株的行数和株数作为采集病样在小区内的坐标。根据病害严重程度的差异,采用2种采样方式:当病害发生率较低时(单株平均病斑小于5个),则采集小区内所有可见的病斑,即全部采样方式(total sampling strategies, TSS);当病害发生率较高时(单株平均病斑大于5个),则采用部分采样方式(partial sampling strategies, PSS),即在每个发病植株上随机剪取3个单一病斑。将采集后的病斑放在1.5 mL离心管中,并置于-80℃保存。

1.2.2 葡萄霜霉病菌DNA提取及PCR扩增

参照Gobbin et al.(2003)方法对采集到的病样进行高通量研磨,并采用CTAB法提取样品的总DNA。利用Delmotte et al.(2006)设计的7对SSR引物(Pv7、Pv13、Pv14、Pv16、Pv17、Pv31和Pv39)对提取到的霜霉病菌DNA进行PCR扩增(表1),引物均由生工生物工程(上海)有限公司合成。15 μ L PCR反应总体系:模板DNA 1.0 μ L、10×PCR Buffer 1.5 μ L、25 mmol/L MgCl₂ 0.45 μ L、10 mmol/L dNTPs 0.2 μ L、5 U/ μ L Taq DNA聚合酶0.5 μ L、10 μ mol/L上下游引物各0.2 μ L,加ddH₂O补足至15 μ L。PCR反应程序为:94℃预变性5 min;95℃变性30 s,60℃退火30 s,72℃延伸30 s;35个循环;72℃延伸10 min。扩增产物用8%聚丙烯酰胺凝胶电泳,采用银染法筛选出扩增条带清晰、多态性、稳定性较好的引物进行病菌遗传结构分析。

1.2.3 葡萄霜霉病菌基因型鉴定及其贡献率的测定

基于Gobbin et al.(2003)对葡萄霜霉病菌基因型分类方法进行分类:具有相同基因型的病斑来自于同一卵孢子初侵染形成的无性繁殖后代,而呈现不同基因型的不同病斑分别来自于不同卵孢子初侵染形成的无性繁殖后代。首次检测基因型是由卵孢子引起的初侵染病斑,而后检测与其相同基因型是由该初侵染病斑上产生的孢子囊引起的再侵染病斑。参照Gobbin et al.(2005)和Koopman et al.(2007)方法,将基因型分为主效流行基因型(在单一生长季内累计出现次数高于50次的基因型)、单次流行基因型(在单一生长季内仅出现过1次的基因

型)、寡次流行基因型(在单一生长季内累计出现次数未高于 50 次的基因型)。将在单一生长季内出现频率最高前 3 个的主效流行基因型从高到低依次命名为优势基因型 G_1 、次优势基因型 G_2 和第 3 优势基因型 G_3 。本研究将葡萄霜霉病流行程度定义为可鉴定出基因型的病斑总和,任何基因型对病害流行的贡献率是在一定时间内(1 次调查时间或单一生长季内)该基因型累计病斑数所占全部基因型病斑数的百分比。

初侵染对病害的贡献率为单次流行基因型病斑数占全部基因型病斑数的百分比;再侵染对病害的贡献率为主效流行基因型和寡次基因型病斑数占全部基因型病斑数的百分比之和。参照 Rossi et al.(2009)方法,根据初侵染对病害的贡献率将葡萄霜霉病菌群体流行类型分为 3 类,贡献率 $\geq 50\%$ 为低等水平无性繁殖, $25\% < \text{贡献率} < 50\%$ 为中等水平无性繁殖,贡献率 $\leq 25\%$ 为高等水平无性繁殖。

表 1 本试验所用 7 对 SSR 引物

Table 1 The codes and the sequences of seven SSR primers in this study

引物 Primer	登录号 Accession no.	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')	重复序列 Repeat motif	退火温度 Annealing temperature/°C	片段大小 Size range of alleles/bp
Pv7	DQ217575	F: TCTTCCGAAAAGGGACGTAA R: GCGTCACTGCATCTACGAAA	(TG) ₇	60	289-297
Pv13	DQ217576	F: CGATGAAGTGGACCCTCATT R: CCGGTAGTCAATTGCACCTT	(TG) ₈	61	214-220
Pv14	DQ217577	F: CAGAAACGCACAAGGTCTGA R: AATTGCATACTGCAGCAACG	(TG) ₈	65	120-128
Pv16	DQ217578	F: TAAAAATATGGTGGCGTCAG R: CCAGCAGTCTCCGTCTCATCAG	(TGC) ₂ TGT(TGC) ₃	57	248-251
Pv17	DQ217579	F: CAGAGTCGAACAAGTACAT R: CTTTGTTCGCCTTCTAACAAC	TG(TC) ₁₂	59	160-172
Pv31	DQ217580	F: TCCCCATGCTGAAGAGTTTC R: TTCTTTCTAAGGCCGTGTGG	(CA) ₉	60	241-247
Pv39	DQ217581	F: ACGCATGGCGAACACGTAAG R: CAGACGGGAAGAAGTTGCTC	(CA) ₆	61	174-176

1.2.4 葡萄霜霉病菌群体的遗传学分析

将无法准确标识内的条带排除后,根据电泳图谱上显示条带位置确定不同等位基因位点。采用 PopGene 1.32 软件计算反映基因数量和状况的遗传参数和基因多样性水平的遗传参数,前者包括观测等位基因数 A 、有效等位基因数 A_e 、优势等位基因大小 D_{as} 和特有等位基因数量 P_s ;后者包括 Nei's 基因多样性指数 H 、观察杂合度 H_o 、预期杂合度 H_e 和香农多样性指数 I 。利用 NTSYSpc 2.1e 软件计算 SSR 位点的多态信息含量 PIC ,分析葡萄霜霉病菌群体遗传多样性。采用 FSTAT 2.9.3.2 软件计算反映葡萄霜霉病菌群体遗传分化程度的参数,包括等位基因频率 F_{st} 和基因流 N_m 。

2 结果与分析

2.1 葡萄霜霉病菌 SSR 扩增结果

从 7 对 SSR 引物中筛选出扩增条带清晰的 6 对引物,分别是 Pv7、Pv13、Pv14、Pv16、Pv17 和 Pv31,对 2014 年和 2015 年露地和避雨 2 种栽培模式下葡萄霜霉病菌的 DNA 进行 PCR 扩增,除 10% 左右采集的样品因无法获得足量的 PCR 产物或其它原因

无法进行基因型的统计分析,2014 年和 2015 年在露地栽培模式下,分别从 3 215 个和 4 182 个病样中提取获得 2 955 个和 3 749 个基因型;在避雨栽培模式下,分别从 1 806 个和 1 575 个病样中提取获得 1 615 个和 1 333 个基因型(表 2)。

2.2 葡萄霜霉病菌基因型组成及其对病害流行的贡献

2014—2015 年露地栽培模式下葡萄霜霉病菌群体中优势基因型 G_1 有 754 个和 1 120 个,分别占该群体的 25.5% 和 29.9%;次优势基因型 G_2 有 382 个和 431 个,分别占该群体的 12.9% 和 11.5%;第 3 优势基因型 G_3 有 180 个和 389 个,分别占该群体的 6.1% 和 10.4%;单次流行基因型分别占该群体的 26.6% 和 25.6%;寡次流行基因型分别占该群体的 28.9% 和 22.6%。沈阳市露地栽培模式下病菌的流行模式属于中等水平无性繁殖,其中主效流行基因型($G_1+G_2+G_3$)对病害流行的贡献率分别占 44.5% 和 51.8%,霜霉病再侵染对病害流行的贡献率分别占 73.4% 和 74.4%,2 年贡献率均值为 73.9%;而初侵染对病害流行的贡献率分别占 26.6% 和 25.6%,2 年贡献率均值为 26.1%(表 2)。

与露地栽培模式相比,2014—2015 年避雨栽培模

式下病菌群体中优势基因型 G_1 有 523 个和 566 个, 分别占该群体的 32.4% 和 48.1%; 次优势基因型 G_2 有 428 个和 303 个, 分别占该群体的 26.5% 和 25.8%; 第 3 优势基因型 G_3 有 409 个和 155 个, 分别占该群体的 25.3% 和 13.2%; 单次流行基因型分别占该群体的 3.5% 和 5.1%; 寡次流行基因型分别占该群体的 12.3%

和 18.7%。避雨栽培模式下病菌的流行模式属于高水平无性繁殖, 其中主效流行基因型 ($G_1+G_2+G_3$) 对病害流行的贡献率分别占 84.2% 和 87.1%, 霜霉病再感染对病害流行的贡献率分别占 96.5% 和 94.9%, 2 年贡献率均值为 95.7%; 而初感染对病害流行的贡献率仅占 3.5% 和 5.1%, 2 年贡献率均值为 4.3% (表 2)。

表 2 2014—2015 年露地和避雨栽培模式下葡萄霜霉病斑样品采集、病菌基因型及其时间动态变化

栽培模式 Cultivation mode	日期 Date	采集 方式 Collecting method	病斑 数量 No. of lesions	基因型 个数 No. of genotypes	优势 基因型 Dominant genotype G_1	次优势 基因型 Second domi- nant genotype G_2	第 3 优势 基因型 Third dominant genotype G_3	单次流行 基因型 Single genotype	寡次流行基 因型 Other genotypes	I
2014 露地 栽培 Open field in 2014	7-07	TSS	1	1	1(100.0%)	—	—	—	—	0.00
	7-14	TSS	52	47	4(8.5%)	3(6.4%)	2(4.3%)	38(80.9%)	0(0.0%)	0.46
	7-21	TSS	206	198	21(10.6%)	17(8.6%)	10(5.1%)	92(46.5%)	58(29.3%)	0.55
	7-28	TSS	329	287	56(16.5%)	31(10.8%)	22(7.7%)	102(35.5%)	76(26.5%)	0.62
	8-04	PSS	634	574	143(24.9%)	67(11.7%)	33(5.7%)	189(32.9%)	142(24.7%)	0.64
	8-11	PSS	908	844	235(27.8%)	114(13.5%)	51(6.0%)	150(17.8%)	294(34.8%)	0.76
	8-18	PSS	557	531	158(29.8%)	78(14.7%)	33(6.2%)	111(20.9%)	151(28.4%)	0.82
	8-25	PSS	395	357	101(28.3%)	55(15.4%)	22(6.2%)	78(21.8%)	101(28.3%)	0.58
	9-01	PSS	133	116	35(30.2%)	17(14.7%)	7(6.0%)	26(22.4%)	31(26.7%)	0.51
	合计 Total		3 215	2 955	754(25.5%)	382(12.9%)	180(6.1%)	786(26.6%)	853(28.9%)	0.63
2015 露地 栽培 Open field in 2015	7-01	TSS	1	1	1(100.0%)	—	—	—	—	0.00
	7-08	TSS	86	78	12(15.4%)	5(6.4%)	2(2.6%)	59(75.6%)	—	0.52
	7-15	TSS	335	298	38(12.8%)	17(5.7%)	15(5.0%)	132(44.3%)	96(32.2%)	0.57
	7-22	TSS	482	427	83(19.4%)	37(8.7%)	26(6.1%)	158(37.0%)	123(28.8%)	0.64
	7-29	PSS	595	518	146(28.2%)	51(9.8%)	45(8.7%)	169(32.6%)	107(20.7%)	0.69
	8-05	PSS	852	783	272(34.7%)	98(12.5%)	94(12.0%)	201(25.7%)	118(15.1%)	0.72
	8-12	PSS	1 095	982	364(37.1%)	126(12.8%)	126(12.8%)	147(15.0%)	219(22.3%)	0.79
	8-19	PSS	458	414	117(28.3%)	64(15.5%)	57(13.8%)	63(15.2%)	113(27.3%)	0.85
	8-26	PSS	195	174	62(35.6%)	25(14.4%)	18(10.3%)	21(12.1%)	48(27.6%)	0.62
	9-02	PSS	83	74	25(33.8%)	8(10.8%)	6(8.1%)	11(14.9%)	24(32.4%)	0.51
	合计 Total		4 182	3 749	1 120(29.9%)	431(11.5%)	389(10.4%)	961(25.6%)	848(22.6%)	0.71
2014 避雨 栽培 Rain shelter in 2014	7-25	TSS	3	2	—	—	2(100.0%)	—	—	0.00
	8-01	TSS	19	15	2(13.3%)	5(33.3%)	7(46.7%)	1(6.7%)	0(0.0%)	0.13
	8-08	TSS	96	88	12(13.6%)	24(27.3%)	32(36.4%)	5(5.7%)	15(17.0%)	0.28
	8-15	TSS	143	126	23(18.3%)	35(27.8%)	43(34.1%)	6(4.8%)	19(15.1%)	0.33
	8-22	TSS	275	247	85(34.4%)	59(23.9%)	65(26.3%)	11(4.5%)	27(10.9%)	0.38
	8-29	PSS	369	325	124(38.2%)	78(24.0%)	72(22.2%)	9(2.8%)	42(12.9%)	0.39
	9-05	PSS	482	439	142(32.3%)	131(29.8%)	97(22.1%)	12(2.7%)	57(13.0%)	0.43
	9-12	PSS	238	211	78(37.0%)	55(26.1%)	53(25.1%)	7(3.3%)	18(8.5%)	0.36
	9-19	PSS	181	162	57(35.2%)	41(25.3%)	38(23.5%)	5(3.1%)	21(13.0%)	0.32
	合计 Total		1 806	1 615	523(32.4%)	428(26.5%)	407(25.3%)	56(3.5%)	199(12.3%)	0.25
2015 避雨 栽培 Rain shelter in 2015	7-29	TSS	2	2	2(100.0%)	—	—	—	—	0.00
	8-05	TSS	15	11	5(45.5%)	3(27.3%)	2(18.2%)	1(9.1%)	0(0.0%)	0.21
	8-12	TSS	87	65	26(40.0%)	11(16.9%)	7(10.8%)	6(9.2%)	15(23.1%)	0.32
	8-19	TSS	158	139	57(41.0%)	35(25.2%)	18(12.9%)	12(8.6%)	17(12.2%)	0.36
	8-26	PSS	319	272	124(45.6%)	68(25.0%)	31(11.4%)	9(3.3%)	40(14.7%)	0.42
	9-02	PSS	452	394	168(42.6%)	95(24.1%)	51(12.9%)	13(3.3%)	67(17.0%)	0.48
	9-09	PSS	317	256	107(41.8%)	54(21.1%)	27(10.5%)	8(3.1%)	60(23.4%)	0.41
	9-16	PSS	225	194	77(39.7%)	37(19.1%)	19(9.8%)	11(5.7%)	50(25.8%)	0.35
	合计 Total		1 575	1 333	566(48.1%)	303(25.8%)	155(13.2%)	60(5.1%)	249(18.7%)	0.32

TSS: 全部采集策略; PSS: 部分采集策略; I : 香农多样性指数。括号内数字为各基因型所占百分比。TSS: total sampling strategy; PSS: partial sampling strategy; I : Shannon's information index. Numbers in bracket represent the percentage of each genotype.

2.3 葡萄霜霉菌基因型时间动态变化

综合 2014—2015 年 2 年数据来看,在露地栽培病害始发期(7月上旬至7月中旬),葡萄霜霉菌基因型种类和数量较少,香农多样性指数 I 相对较低,为 0~0.57;进入病害盛发期(7月下旬至8月中旬),病菌基因型种类和数量均显著增加,群体的遗传多样性丰富, I 为 0.55~0.85;病害进入衰退期(8月下旬至9月上旬),病菌基因型种类和数量均显著减少,香农多样性指数有所减少, I 为 0.51~0.58。在避雨栽培整个病害流行时期内,香农多样性指数相对偏低, I 为 0~0.48,群体的遗传多样性较低,病菌基因型种

类和数量明显小于同期露地栽培水平,其中 2 种栽培模式下的主效流行基因型(G_1 、 G_2 和 G_3) 种类相同和时间动态变化基本一致(表 2)。

2.4 不同栽培模式下葡萄霜霉菌群体遗传多样性

2014 年和 2015 年露地栽培模式下葡萄霜霉菌群体分别获得 32 个和 34 个等位基因,每个位点获得的有效等位基因数分别为 2.61~5.47 和 2.46~4.58,观察杂合度分别为 0.38~0.56 和 0.32~0.61,预期杂合度分别为 0.41~0.57 和 0.38~0.53,香农多样性指数分别为 0.51~0.82 和 0.43~0.85,Nei's 基因多样性指数分别为 0.32~0.53 和 0.27~0.49(表 3)。

表 3 2014—2015 年露地和避雨栽培模式下葡萄霜霉菌群体遗传多样性

Table 3 Genetic diversity of *Plasmopara viticola* populations under open field and rain shelter cultivations in 2014 and 2015

年度 Year	栽培模式 Cultivation mode	等位基因位点 Locus	<i>A</i>	<i>A_e</i>	<i>Das</i>	<i>P_a</i>	<i>H</i>	<i>PIC</i>	<i>H_o</i>	<i>H_e</i>	<i>I</i>
2014	露地栽培 Open field	Pv7	7	5.06	292.2	3	0.53	0.76	0.38	0.57	0.77
		Pv13	6	4.52	216.3	1	0.32	0.56	0.45	0.43	0.51
		Pv14	5	4.05	121.4	1	0.38	0.82	0.56	0.52	0.82
		Pv16	4	2.61	249.1	1	0.33	0.43	0.43	0.48	0.72
		Pv17	4	3.59	161.3	0	0.32	0.81	0.39	0.45	0.68
		Pv31	6	5.47	242.2	1	0.53	0.66	0.43	0.41	0.57
	避雨栽培 Rain shelter	Pv7	5	3.75	292.2	0	0.24	0.65	0.29	0.36	0.38
		Pv13	4	3.49	216.3	0	0.26	0.59	0.35	0.31	0.35
		Pv14	4	3.21	121.4	1	0.26	0.65	0.44	0.41	0.63
		Pv16	3	1.32	249.1	0	0.14	0.38	0.25	0.21	0.35
		Pv17	3	2.38	161.3	0	0.21	0.58	0.32	0.27	0.38
		Pv31	5	4.25	242.2	0	0.18	0.72	0.28	0.31	0.33
2015	露地栽培 Open field	Pv7	8	4.58	292.3	4	0.49	0.58	0.32	0.53	0.62
		Pv13	6	3.84	216.5	2	0.31	0.68	0.41	0.38	0.43
		Pv14	5	4.22	122.8	2	0.41	0.75	0.61	0.55	0.85
		Pv16	4	2.46	249.3	1	0.29	0.25	0.46	0.45	0.68
		Pv17	5	4.42	161.3	1	0.27	0.73	0.43	0.49	0.66
		Pv31	6	6.13	241.9	0	0.44	0.58	0.41	0.44	0.61
	避雨栽培 Rain shelter	Pv7	4	3.47	292.3	0	0.21	0.72	0.26	0.33	0.33
		Pv13	4	3.61	216.5	0	0.23	0.72	0.37	0.31	0.33
		Pv14	3	2.57	122.8	0	0.29	0.73	0.42	0.43	0.65
		Pv16	3	1.15	249.3	0	0.15	0.42	0.22	0.24	0.41
		Pv17	3	2.15	161.3	0	0.20	0.53	0.34	0.31	0.39
		Pv31	5	4.39	241.9	0	0.17	0.55	0.26	0.29	0.31

A : 等位基因数; A_e : 有效等位基因数; Das : 优势等位基因大小; P_a : 特有等位基因数量; H : Nei's 基因多样性指数; PIC : 多态信息含量; H_o : 观察杂合度; H_e : 预期杂合度; I : 香农多样性指数。 A : Number of alleles; A_e : number of effective alleles; Das : dominant allele size; P_a : number of private alleles; H : Nei's gene diversity; PIC : polymorphism information content; H_o : observed heterozygosity; H_e : expected heterozygosity; I : Shannon's information index。

2014年和2015年避雨栽培模式下葡萄霜霉病菌群体分别获得24个和22个等位基因,每个位点获得的有效等位基因数分别为1.32~4.42和1.15~4.39,观察杂合度分别为0.25~0.44和0.22~0.42,预期杂合度分别为0.21~0.41和0.24~0.43,香农多样性指数分别为0.33~0.63和0.31~0.65,Nei's基因多样性指数分别为0.14~0.26和0.15~0.29(表3)。根据对比每个位点的等位基因数、有效等位基因数、多态信息含量和香农指数可知,葡萄霜霉病菌群体中均表现出了较高的多态性,但露地栽培模式下病菌群体的遗传多样性显著高于避雨栽培模式。根据等位基因数、有效等位基因数及Nei's基因多样性指数可知,6个SSR等位基因位点间的遗传变异由高到低依次为Pv7、Pv31、Pv13、Pv14、Pv17、Pv16。

2.5 不同栽培模式下葡萄霜霉病菌群体遗传分化

2014—2015年露地栽培和避雨栽培模式下

Pv7、Pv13、Pv14、Pv16、Pv17、Pv31等位基因位点的优势等位基因大小基本一致,其中2014年优势等位基因大小分别为121.4~292.3,2015年分别为122.8~292.3。分别在2014—2015年露地栽培模式下葡萄霜霉病菌群体中检测到7个和10个特有等位基因;而在避雨栽培模式下,仅在2014年的Pv14等位基因位点上检测到1个特有等位基因,明显少于露地栽培模式(表3),说明避雨栽培模式大大降低了病菌群体遗传分化程度。

不同栽培模式对病菌群体分化有明显的影响,其中2年的露地和避雨栽培模式下葡萄霜霉病菌群体的 F_{st} 值分别为0.03和0.05,等位基因频率之间呈显著正相关;基因流 N_m 值分别为6.81和6.37,说明露地和避雨栽培模式下病菌群体间存在频繁的基因交流(表4)。

表4 2014—2015年露地和避雨栽培模式下葡萄霜霉病菌群体间遗传分化系数 F_{st} (对角线下方)和基因流 N_m (对角线上方)
Table 4 Estimation of pair-wise F_{st} (below diagonal) and gene flow values N_m (above diagonal) averaged over six microsatellite loci in four *Plasmopara viticola* populations under open field and rain shelter cultivations in 2014 and 2015

群体 Population	2014年露地栽培 Open field in 2014	2015年露地栽培 Open field in 2015	2014年避雨栽培 Rain shelter in 2014	2015年避雨栽培 Rain shelter in 2015
2014年露地栽培 Open field in 2014		∞	6.81	4.08
2015年露地栽培 Open field in 2015	0.25 ^{ns}		4.52	6.37
2014年避雨栽培 Rain shelter in 2014	0.03*	0.16 ^{ns}		∞
2015年避雨栽培 Rain shelter in 2015	0.05*	0.02*	0.11 ^{ns}	

: 在0.05水平下显著相关; ns: 0.05水平下不显著相关; ∞ : 无穷大。: Significant correlations at 0.05 level; ns represents no significant correlations at 0.05 level; ∞ : infinity.

3 讨论

本研究采用6对SSR引物探究露地和避雨栽培模式下葡萄霜霉病菌遗传结构及其时间动态变化,结果表明上述引物均能扩增出清晰条带,说明选用的引物具有较高的多态性,可用于葡萄霜霉病菌群体遗传分析。本试验结果表明,沈阳市露地栽培模式下病菌群体遗传多样性水平较高,葡萄霜霉病菌具有较强的变异潜力,为该病的精准防治带来了一定难度。Rumbou & Gessler(2006)、Koopman et al.(2007)、Li et al.(2016)推测卵孢子可在土壤中存活1年以上,这对欧洲、南非及中国地区葡萄霜霉病流行起到了主导作用。通过连续2年

基因型时间动态分析表明,未发现任何葡萄霜霉病菌基因型可跨年出现,这可能是由于沈阳地区漫长寒冷的冬季致使葡萄霜霉病菌无法以孢子囊和菌丝的方式顺利越冬,仅能以卵孢子完成越冬(Gobbin et al., 2005),说明沈阳市葡萄霜霉病菌无法通过孢子囊和菌丝的方式越冬,仅能以卵孢子完成越冬。

本试验结果表明,2014—2015年露地栽培模式下葡萄霜霉病菌流行模式属于中等水平无性繁殖,仅有少数基因型(G_1 、 G_2 和 G_3)可在田间反复侵染上百次以上(包括对同一病株上和临近病株的健株上),此结果与Gobbin et al.(2010)关于欧洲地区的研究报道基本吻合,即在欧洲大多数葡萄园中,仅有1~2个基因型可在单一生长季内出现多次的再侵

染,该基因型对病害流行的贡献率为4%~95%。Li et al.(2016)研究表明我国大多葡萄产区霜霉病菌种群属于低水平无性繁殖,与本研究结果存在一定差异,造成这种差异的主要原因是由葡萄园的环境条件、杀菌剂、栽培品种等因素不同所造成,特别是夏季持续高温、紫外线照射和霜霉菌专用杀菌剂频繁施用均可有效降低葡萄霜霉病菌孢子囊的形成、萌发及产孢,显著减少葡萄霜霉病菌再侵染的程度,大大降低无性繁殖水平(Kennelly et al.,2007)。本研究结果显示,避雨栽培模式下病菌流行模式属于高等水平无性繁殖,初侵染和再侵染对病害流行的贡献率分别约占4.3%和95.7%,说明避雨栽培模式可明显降低霜霉病菌群体遗传多样性水平和遗传分化程度,其原因主要是避雨栽培模式下的植株冠层微环境改变,不利于病菌完成其生活史,仅能在避雨棚两侧边行可以形成有效侵染,该结果与Hug(2005)和Koopman et al.(2007)的研究结果一致,即特殊环境(气候温暖和地理隔离)和人为干预(杀菌剂使用)可改变葡萄霜霉病菌群体的遗传结构。

葡萄霜霉病菌群体的主效流行基因型(G_1 、 G_2 和 G_3)是病害流行的重要动力,可能通过多倍体和异倍性增加群体的杂合度(Dick,1972),亦可通过霜霉病菌染色体数目的增加提高病菌的适应性(Yin et al.,2014)。同一年露地和避雨栽培模式下葡萄霜霉病菌群体的等位基因频率呈显著正相关,且二者之间存在频繁的基因交流;结合露地和避雨栽培模式下葡萄霜霉病流行时间动态特点(避雨栽培模式下霜霉病始发时间较露地栽培晚近1个月),推测避雨栽培模式下霜霉病的初侵染源主要来自于附近露地栽培模式下霜霉病病株上产生的孢子囊飞散所致,同时也证实了孢子囊可作为病害近程传播载体。根据葡萄霜霉病的发生特点和传播规律,制定如下防治策略:选择在露地栽培模式下葡萄霜霉病始发期(6月下旬至7月上旬),采取早期化学药剂防治,以始发病株为中心,喷洒半径为10~20 m,可以达到有效铲除本地区露地和避雨栽培模式下病菌源基的效果;若在春夏多雨年份,在避雨栽培模式下病害始发期(7月下旬至8月上旬)前10 d针对避雨棚两侧边行植株集中喷施保护性杀菌剂,以达到有效预防霜霉病的目的。

参 考 文 献 (References)

- BI QY, HAN XY, MA ZQ, ZHAO JJ, JIA HM, WANG WQ. 2018. Inhibitory effect of *Pythium oligandrum* interaction with dimethomorph and the application of chemical decrement on grape downy mildew. *Acta Phytopathologica Sinica*, 48(5): 675–681 (in Chinese) [毕秋艳, 韩秀英, 马志强, 赵建江, 贾海民, 王文桥. 2018. 寡雄腐霉与烯酰吗啉互作防治葡萄霜霉病和替代部分化学药剂减量用药应用. *植物病理学报*, 48(5): 675–681]
- CAFFI T, GILARDI G, MONCHIERO M, ROSSI V. 2013. Production and release of asexual sporangia in *Plasmopara viticola*. *Phytopathology*, 103(1): 64–73
- CARISSE O. 2016. Development of grape downy mildew (*Plasmopara viticola*) under northern viticulture conditions: influence of fall disease incidence. *European Journal of Plant Pathology*, 144(4): 773–783
- DELMOTTE F, CHEN WJ, RICHARD-CERVERA S, GREIF C, PAPURA D, GIRESE X, MONDOR-GENSON G, CORIO-COSTET F. 2006. Microsatellite DNA markers for *Plasmopara viticola*, the causal agent of downy mildew of grapes. *Molecular Ecology Notes*, 6(2): 379–381
- DENG WP, YANG M, HE XH, LI P, WANG HN, ZHU SS, DU F. 2017. Impacts of rain-shelter cultivation on the development of grape downy mildew and its relation with grape canopy microclimate. *Plant Protection*, 43(3): 76–82 (in Chinese) [邓维萍, 杨敏, 何霞红, 李沛, 王海宁, 朱书生, 杜飞. 2017. 避雨栽培对葡萄霜霉病发生的影响与葡萄冠层微气象因子的关系. *植物保护*, 43(3): 76–82]
- DICK MW. 1972. Morphology and taxonomy of the oomycetes, with special reference to Saprolegniaceae, Leptomataceae, and Phthiaceae. *New Phytologist*, 71(6): 1151–1159
- DU F, DENG WP, YANG M, WANG HN, MAO RZ, SHAO JH, FAN JX, CHEN YD, FU Y, LI CY, et al. 2015. Protecting grapevines from rainfall in rainy conditions reduces disease severity and enhances profitability. *Crop Protection*, 67(1): 261–268
- GESSLER C, PERTOT I, PERAZZOLLI M. 2011. *Plasmopara viticola*: a review of knowledge on downy mildew of grapevine and effective disease management. *Phytopathologia Mediterranea*, 50(1): 3–44
- GOBBIN D, JERMINI M, LOSKILL B, PERTOT I, RAYNAL M, GESSLER C. 2005. Importance of secondary inoculum of *Plasmopara viticola* to epidemics of grapevine downy mildew. *Plant Pathology*, 54(4): 522–534
- 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. 2010. Population genetic structure of *Plasmopara viticola* after 125 years of colonization in European vineyards. *Molecular Plant Pathology*, 7(6): 519–531
- HUG F. 2005. Genetic structure and epidemiology of *Plasmopara viticola* populations from Australian grape-growing regions. Master Thesis. Switzerland: ETH Zurich
- KENNELLY MM, GADOURY DM, WILCOX WF, MAGAREY PA, SEEM RC. 2007. Primary infection, lesion productivity, and survival of sporangia in the grapevine downy mildew pathogen *Plas-*

- mopara viticola*. *Phytopathology*, 97(4): 512–522
- KOOPMAN T, LINDE CC, FOURIE PH, MCLEOD A. 2007. Population genetic structure of *Plasmopara viticola* in the Western Cape Province of South Africa. *Molecular Plant Pathology*, 8(6): 723–736
- LI H. 2004. Rational protection of vineyard. Xi'an: Shaanxi People's Press, pp. 22–27 (in Chinese) [李华. 2004. 葡萄病虫害的合理防治. 西安: 陕西人民出版社, pp. 22–27]
- LI XL, YIN L, MA LJ, ZHANG YL, AN YH, LU J. 2016. Pathogenicity variation and population genetic structure of *Plasmopara viticola* in China. *Journal of Phytopathology*, 164(11/12): 863–873
- MADDEN LV, HUGHES G, ELLIS MA. 1995. Spatial heterogeneity of the incidence of grape downy mildew. *Phytopathology*, 85(3): 269–275
- MENG JF, NING PF, XU TF, ZHANG ZW. 2013. Effect of rain-shelter cultivation of *Vitis vinifera* cv. Cabernet Gernischet on the phenolic profile of berry skins and the incidence of grape diseases. *Molecules*, 18(1): 381–397
- ROSSI V, GIOSUÈ S, CAFFI T. 2009. Modelling the dynamics of infections caused by sexual and asexual spores during *plasmopara viticola* epidemics. *Journal of Plant Pathology*, 91(3): 615–627
- RUMBOU A, GESSLER C. 2006. Particular structure of *Plasmopara viticola* populations evolved under Greek island conditions. *Phytopathology*, 96(5): 501–509
- SEEM RC, MAGAREY PA, MCCLOUD PI, WACHTEL MF. 1985. A sampling procedure to detect grapevine downy mildew. *Phytopathology*, 75(11): 1252–1257
- WONG FP, BURR HN, WILCOX WF. 2001. Heterotallism in *Plasmopara viticola*. *Plant Pathology*, 50(4): 427–432
- YIN L, ZHANG YL, HAO Y, LU J. 2014. Genetic diversity and population structure of *Plasmopara viticola* in China. *European Journal of Plant Pathology*, 140(2): 365–376
- YU SY, LIU CY, FU JF, WANG H, GUAN TS, LIU L. 2015. Spatial distribution pattern and sampling technique for grapevine downy mildew in grape seedling under open air and rain-shelter cultivations. *Journal of Fruit Science*, 32(4): 720–726 (in Chinese) [于舒怡, 刘长远, 傅俊范, 王辉, 关天舒, 刘丽. 2015. 露地和避雨栽培条件下葡萄苗木霜霉病病株空间分布型及其抽样技术. 果树学报, 32(4): 720–726]
- YU SY, LIU CY, LIANG CH, ZANG CQ, LIU L, WANG H, GUAN TS. 2017. Effects of rain-shelter cultivation on the temporal dynamics of grape downy mildew epidemics. *Journal of Phytopathology*, 165(5): 331–341
- YU SY, LIU CY, WANG H, LIU L, GUAN TS. 2016. Effect of rain-shelter cultivation on temporal and spatial dynamics of airborne sporangia of *Plasmopara viticola*. *Scientia Agricultura Sinica*, 49(10): 1892–1902 (in Chinese) [于舒怡, 刘长远, 王辉, 刘丽, 关天舒. 2016. 避雨栽培对葡萄霜霉病菌孢子囊飞散时空动态的影响. 中国农业科学, 49(10): 1892–1902]
- ZANG CQ, BAI YJ, ZHANG HD, XIE JH, LIN Y, LIANG CH. 2018. Study on bioactive metabolite of *Streptomyces atratus* PY-1 and the field control efficiency against grapevine downy mildew. *Journal of Plant Protection*, 45(4): 864–870 (in Chinese) [臧超群, 白元俊, 张海东, 谢瑾卉, 林英, 梁春浩. 2018. 暗黑链霉菌 PY-1 活性产物分析及其对葡萄霜霉病田间防效评价. 植物保护学报, 45(4): 864–870]

(责任编辑:王璇)