

葡萄叶片表皮气孔与霜霉病的抗性研究

杜 蕙^{1,2}, 蒋晶晶^{1,2}, 王春明^{1,2}, 郭建国^{1,2}, 漆永红^{1,2}

(1. 甘肃省农业科学院植物保护研究所, 甘肃 兰州 730070; 2. 农业部天水作物有害生物科学观测实验站, 甘肃 甘谷 741200)

摘要: 采用室内离体接种结合田间自然发病调查, 研究了 8 个葡萄品种对霜霉病的抗性, 结果表明, 不同品种对葡萄霜霉病的抗性差异较大, 高妻、夏黑、醉人香及矢富罗莎对霜霉病表现抗病(R), 奥古斯特、红地球及贵妃玫瑰对霜霉病表现感病(S), 瑞比尔表现高感(HS)。对 8 个葡萄品种的叶片表皮气孔观察表明, 不同品种叶片气孔大小、密度不同。气孔密度由大到小依次为奥古斯特、矢富罗莎、夏黑、贵妃玫瑰、高妻、醉人香、红地球、瑞必尔。气孔的开张面积从大到小依次为醉人香、高妻、贵妃玫瑰、红地球、夏黑、奥古斯特、瑞必尔、矢富罗莎。各品种叶片气孔的密度及大小与霜霉病的抗性未表现出一定规律。

关键词: 葡萄; 叶片表皮气孔; 霜霉病; 抗性

中图分类号: S436.631.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1463(2018)12-0058-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1463.2018.12.017

Relationship between Stoma of Grape leaves and Resistance to *Plasmopara viticola*

DU Hui^{1,2}, JIANG Jingjing^{1,2}, WANG Chunming^{1,2}, GUO Jianguo^{1,2}, QI Yonghong^{1,2}

(1. Institute of Plant Protection, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou Gansu 730070, China; 2. Scientific Observing and Experimental Station of Crop Pests in Tianshui, Ministry of Agriculture, P. R. Tianshui Gansu 741200, China)

Abstract: By indoor natural disease in vitro inoculation and field survey, the resistances to downy mildew of eight grape varieties were studied. The results showed that the resistances to downy mildew differed a lot among varieties. Takqtsuma, Summer black, Zuirenxiang and Yatomi Rosa were resistant (R) to downy mildew; Auguste, Red globe and Guifeimeigui were susceptible (S) to downy mildew disease, Ribier performed high susceptible (HS). At the same time, the observation results of leaf epidermal stomata of eight grape varieties showed that the stomatal size and density of different grape varieties were different. The number of stomata per unit area is in the order from more to less: Auguste - Yatomi Rosa - Summer black - Guifeimeigui - Takqtsuma - Zuirenxiang - Red globe - Ribier. The stomatal openings range from large to small in the order of Zuirenxiang - Takqtsuma - Guifeimeigui - Red globe - Summer black - Auguste - ribier - Yatomi Rosa. The density and size of stoma did not show certain regularity with the resistance of downy mildew.

Key words: Grapevine; Epidermal stomata; *Plasmopara viticola*; resistance

葡萄霜霉病是由葡萄生单轴霉菌 [*Plasmopara viticola*] 引起的葡萄生产上最重要的病害之一, 世界

收稿日期: 2018-08-03

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(201203035); 甘肃省科技支撑计划(1204NKCA099); 甘肃省农业科学院科技支撑计划(2016GAAS08)。

作者简介: 杜 蕙 (1970—), 女, 甘肃临洮人, 研究员, 硕士, 主要从事经济作物病害及其防治技术研究工作。联系电话: (0)13993145932。Email: dh0928@163.com。

参考文献:

- [1] 高旺盛. 耕作制度改革回顾与新世纪展望[J]. 耕作与栽培, 1999(1): 1-5.
- [2] 刘春静. 浅谈西瓜与美葵套种栽培技术和优点[J]. 农业与技术, 2014, 34(1): 12.
- [3] 王桂华. 地膜西瓜套种杂交葵花高产栽培技术[J]. 现代园艺, 2012(6): 50.
- [4] 王德田, 惠军涛, 田 军, 等. 旱地膜西瓜优质高产栽培技术[J]. 西北园艺, 2008(12): 30.
- [5] 郭 峰, 王瑞华, 孟凤轩, 等. 甜瓜、棉花套种植株群体生长动态研究[J]. 中国瓜菜, 2008(6): 17-22.
- [6] 何 雄, 孟凤轩. 麦棉套种试验初报[J]. 新疆农业科学, 1996(3): 110-111.
- [7] 张西岭, 杨异超. 三一式麦套直播棉花优化配套栽培技术[J]. 棉花学报, 1994, 6(2): 114-121.

(本文责编: 杨 杰)

各地葡萄产区均有发生,是一种世界性病害^[1-2]。我国 1899 年发现该病危害^[3],目前几乎所有葡萄产区都有发生,潮湿多雨地区危害更为严重,发病严重时严重影响树势和果实品质^[4]。目前关于葡萄霜霉病的抗性研究主要集中在品种抗病性鉴定、病菌致病性分化及抗药性等方面^[5-9],有学者对与抗性有关的葡萄叶片组织结构进行了研究^[10-13],但不同学者的研究结果不同。我们以生产中主栽的鲜食葡萄品种为材料,观察了不同葡萄品种对霜霉病的抗性及其叶片表皮的气孔,以期丰富葡萄霜霉病抗性机理研究。

1 材料和方法

1.1 试验材料

植物材料为葡萄室内盆栽苗,品种有:红地球、夏黑、高妻、瑞必尔、醉人香、贵妃玫瑰、奥古斯特、矢富罗莎。普通型塑料透明胶带,宽度为 18 mm,厚度为 0.05 mm。

供试葡萄品种于 2013 年秋季扦插于甘肃省农业科学院植物保护研究所温室中。2014 年 8 月从田间采集新鲜的葡萄霜霉病的叶片,用自来水反复冲洗掉老孢子囊后,在 20 ℃ 条件下黑暗保湿培养 24 ~ 48 h。待新孢子囊长出后用毛笔刷下,用无菌水配制成浓度为 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 个/mL 孢子囊悬浮液备用。

1.2 试验方法

1.2.1 供试品种对霜霉病的抗性评价 采用室内离体叶片法结合田间自然发病调查进行品种抗性评价。室内离体叶片测定时,分别采集供测试葡萄品种新梢大小和叶龄基本一致的健康叶片,将事先准备好的孢子囊悬浮液用喉头喷雾器在叶片背面均匀喷洒 10 mL,然后将叶片正面朝下放在铺有四层无菌水浸湿灭菌纱布的瓷盘中,为避免叶片与湿纱布接触腐烂,在叶片下放置玻璃棒,叶柄用脱脂棉保湿,磁盘用保鲜膜覆盖密封,于 20 ℃ 条件下黑暗保湿培养。以喷等量清水为对照,每品种接种 10 片叶,重复 3 次。逐日观察记录发病情况,用接种后第 7 天的调查数据计算病情指数。

田间自然发病调查参考刘天明等^[13]的方法。2014 年,在甘肃省农业科学院林果花卉研究所葡萄园分别在霜霉病初发期(7月5日)、盛发期(8月16日)及发病后期(9月22日)共进行 3 次调查。每品种选取 20 个新发的枝条,每枝自上而下调查 10

个叶位相同叶片,记录发病情况,计算平均病情指数。室内及田间病害调查分级方法按 0 级,无病斑;1 级,病斑面积占叶面积 5% 以下;3 级,病斑面积占叶面积 6% ~ 25%;5 级,病斑面积占叶面积 26% ~ 50%;7 级,病斑面积占叶面积 51% ~ 75%;9 级,病斑面积占叶面积 76% 以上进行。品种抗性评价参考刘新秀等^[14]的 5 级分级法,即免疫(I),病情指数为 0;高抗(HR),病情指数为 0.1 ~ 5.0;抗病(R),病情指数为 5.1 ~ 25.0;感病(S),病情指数为 25.0 ~ 50.0;高感(HS),病情指数为 50.0 ~ 100.0。

1.2.2 不同葡萄品种叶片表皮气孔压片制作 采用透明胶带粘取法^[15]。塑料透明胶带拉开 10 ~ 15 cm,胶面朝上,平放在实验台面上。带叶柄剪取葡萄叶片(第 3 ~ 5 片新叶),用水轻轻冲洗后用滤纸迅速吸干表面水分。左手捏住叶柄,将叶片正面粘在胶带上。在粘贴过程中,先将叶尖粘在胶带上,然后将叶片向叶背面弯曲逐渐向前推移,使叶片正面与胶带充分接触。为了防止粘贴过程中叶片皱缩,应右手持解剖针,置于叶片与胶带之间进行调整,使叶片平整地粘贴在胶带上。然后剪去叶柄。将胶带对折过来平整地粘贴在叶片的背面。然后用手指对捏胶带,使胶带与叶片两面充分粘着。将对折的胶带撕开,叶片正面仍紧密粘贴在胶带上,叶片背面与胶带分离,并将叶片下表皮粘贴在胶带上。若叶面附着物较多,胶带不能与表皮紧密粘着时,可用胶带连续重复粘取叶片,直到粘去附着物后,粘取下表皮。为了防止粘取的表皮材料相互重叠,在连续重复粘取时应更换胶带新的部位粘着表皮。

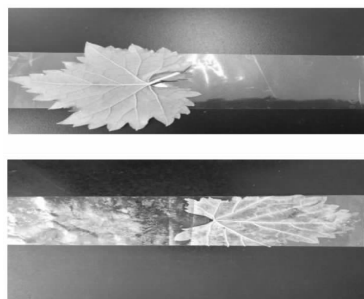


图 1 塑料透明胶带粘取葡萄叶片的下表皮

将带叶片下表皮的胶带沿表皮轮廓剪成 3 ~ 5 mm × 3 ~ 5 mm 的矩形片。在载玻片上滴 1 滴蒸馏水、1 滴 1% 的碘 - 碘化钾染液,将带叶片表皮的胶带胶面向下置载玻片上染色 0.5 ~ 1.0 min,盖上

盖玻片，压平后即制成气孔压片。

1.2.3 不同葡萄品种叶片表皮气孔测定 将制好的气孔压片在40倍光学显微镜下观察，每品种分别观察5张制片，分别量取50个气孔的纵径、横径，求其平均值。

气孔数目测定：在显微镜下数得每1视野中气孔的数目，计算10个视野的平均值。

气孔开张面积计算： $S = \text{纵径} \times \text{横径} \times 3.14 \times 0.25$ (单位 μm^2)。

气孔密度计算： $\text{气孔数}/\text{mm}^2 = \text{视野气孔数}/\text{视野面积}$ 。

视野面积计算： $S = \pi r^2$ (r 为视野半径)。

1.3 数据分析

试验数据用EXCEL2003进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 不同葡萄品种对霜霉病的抗性

通过室内离体接种结合田间自然发病调查，供试品种对葡萄霜霉病的抗性评价结果见表1，高妻、夏黑、醉人香及矢富罗莎对霜霉病表现抗病(R)，奥古斯特、红地球及贵妃玫瑰对霜霉病表现感病(S)，瑞比尔表现高感(HS)。各品种在室内接种条件下病情指数均高于田间自然发病的病情指数，可室内离体接种所提供的环境条件更有利于霜霉病的发生。

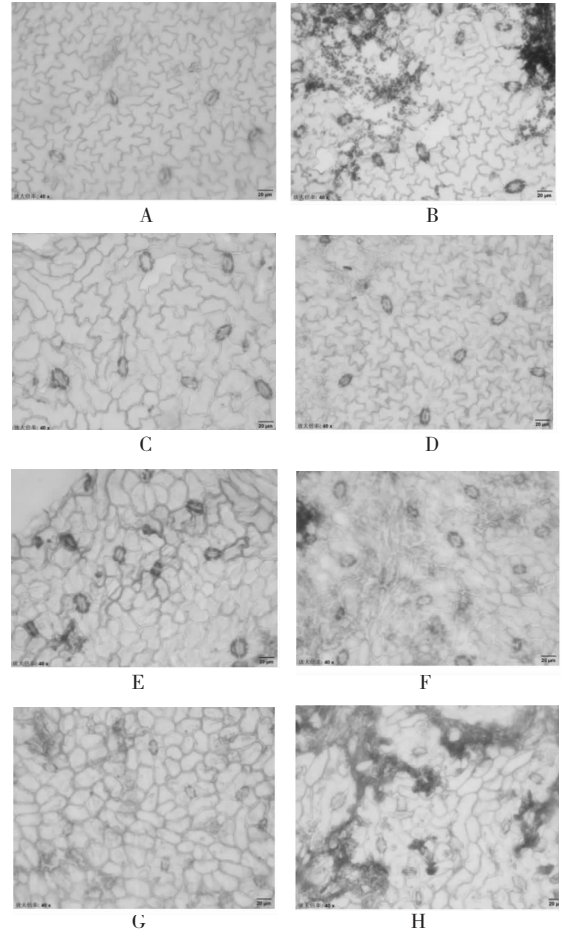
表1 不同葡萄品种对霜霉病的抗性^①

品种	室内离体测定		田间自然发病	
	病情指数	抗性	病情指数	抗性
高妻	18.61	R	6.12	R
夏黑	21.17	R	12.24	R
醉人香	23.33	R	18.16	R
矢富罗莎	24.42	R	19.91	R
奥古斯特	27.78	S	25.47	S
红地球	28.89	S	25.74	S
贵妃玫瑰	44.25	S	39.52	S
瑞必尔	64.26	HS	50.28	HS

①表中数据为3次重复的平均值。

2.2 不同葡萄品种叶片表皮气孔观察

通过对不同品种葡萄叶片表皮气孔压片的观察，发现葡萄叶片表皮有大量气孔存在。8个品种气孔密度在55~99个/ mm^2 ，不同品种叶表皮气孔数量差异较大。单位面积气孔数量由多到少的顺序为奥古斯特、矢富罗莎、夏黑、贵妃玫瑰、高妻、醉人香、红地球、瑞必尔。气孔的开张面积从大到小的顺序为醉人香、高妻、贵妃玫瑰、红地球、夏黑、奥古斯特、瑞必尔、矢富罗莎。



A为红地球，B为夏黑，C为高妻，D为瑞必尔，E为醉人香，F为贵妃玫瑰，G为奥古斯特，H为矢富罗莎

图2 不同品种的葡萄叶片表皮气孔显微观察结果($\times 40$)

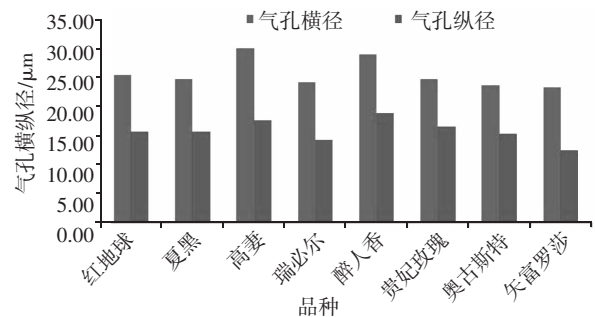


图3 不同品种的葡萄叶片表皮气孔大小

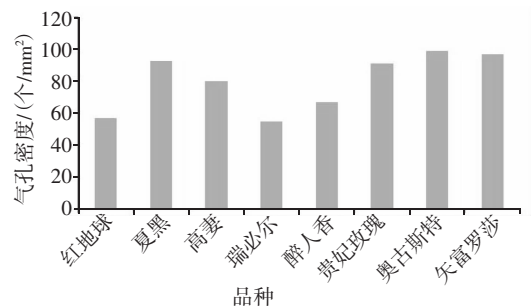


图4 不同品种的葡萄叶片表皮气孔密度

3 结论与讨论

通过室内离体接种结合田间自然发病调查, 8 个葡萄品种对霜霉病的抗性不同。高妻、夏黑、醉人香及矢富罗莎对霜霉病表现抗病, 奥古斯特、红地球及贵妃玫瑰对霜霉病表现感病, 瑞比尔表现高感。对不同品种葡萄叶片表皮气孔观察表明, 奥古斯特叶表皮气孔密度最大, 其次为矢富罗莎、夏黑、高妻、贵妃玫瑰、醉人香、红地球及瑞比尔。从气孔的大小看, 醉人香气孔最大, 其次为高妻、贵妃玫瑰、红地球、夏黑、奥古斯特、瑞必尔及矢富罗莎。

植物的一些结构特征, 如角质层、气孔、叶片茸毛等均对病原物的侵入表现出一定的抗性。关于气孔在抗霜霉病中的作用, 不同学者有不同看法。王国英^[11]的研究认为葡萄对霜霉病的抗性与其叶片气孔的密度有极显著的关系。感病类型叶片气孔密而大, 抗病类型叶片气孔少, 且气孔周围有白色堆积物。一旦病菌从气孔侵入后, 很快会产生孢囊梗和孢子囊, 气孔就不能再关闭, 从而不仅夺取寄主的营养, 还会使蒸腾作用明显增强, 这与吉丽丽^[10]的研究结果一致。但刘天明^[13]等认为气孔大小、密度及昼夜开闭程度与葡萄抗感病性无关, 且气孔密度、气孔横径、气孔纵径与病级间也无显著相关性。Boubals D.^[16]认为, 气孔在抗病性中的作用很小, 但气孔保卫细胞死亡会导致游动孢子萌发管以及菌丝体的死亡。关于气孔大小的划分界限, 不同研究者有不同的标准。我们将保卫细胞纵径大于 30 μm 的定为大气孔, 15 ~ 30 μm 的定为普通气孔, 小于 15 μm 者为小气孔。据此, 8 个品种中只有瑞比尔和矢富罗莎的气孔属于小气孔, 其他 6 个品种的气孔均属于普通气孔, 且透明胶带粘取法观察植物气孔的方法操作简单、方便, 能较好地反映气孔的大小。

本试验表明, 气孔的密度及大小与霜霉病的抗性无直接关系。如较抗霜霉病的品种高妻, 其气孔大小、气孔密度均高于高感霜霉病的品种瑞比尔, 其他品种对霜霉病的抗性与其气孔大小及密度间也无规律可循。李华^[12]认为叶片气孔对游动孢子向性引力大小, 也是构成葡萄对霜霉病抗性的主要因素。抗病品种叶片上可侵入的孢子数目显著低于感病品种, 而感病品种叶片的气孔比抗病品种对游动孢子有更大的向性引力。葡萄对霜霉病的组织结构抗性是多种多样的, 气孔仅为

葡萄霜霉病菌进入叶片组织的通道。本研究仅对 8 个葡萄品种进行了研究, 探究气孔与葡萄对霜霉病抗性的关系还需进行更多品种、更深入的研究。

参考文献:

- [1] 赵奎华, 陶承光, 刘长远, 等. 葡萄病虫害原色图谱鉴定[M]. 北京: 中国农业出版社, 2006: 6-7.
- [2] 杜 蕙, 王春明, 郑 果, 等. 不同来源葡萄霜霉病菌对 4 种杀菌剂的敏感性[J]. 甘肃农业科技, 2017(10): 41-44.
- [3] 李海强. 石河子地区葡萄霜霉病的发生规律及防治研究[D]. 石河子: 石河子大学, 2009: 1-2.
- [4] 刘 旭, 杨晓畅, 陶 怡, 等. 葡萄霜霉病拮抗细菌的筛选、鉴定及发酵条件优化[J]. 果树学报, 2015, 32(4): 681-688.
- [5] 张国军, 徐海英, 闫爱玲. 部分葡萄品种葡萄霜霉病田间调查[J]. 中国果树, 2005(4): 49-50.
- [6] 毕秋艳, 马志强, 韩秀英, 等. 葡萄霜霉病菌对甲霜灵抗药性治理及其田间抗药菌株遗传稳定性分析[J]. 植物病理学报, 2014, 44(3): 302-308.
- [7] 张艳艳, 张剑侠, 王跃进. 中国野生葡萄抗霜霉病基因 RAPD 标记的筛选[J]. 果树学报, 2008, 25(6): 816-820.
- [8] 万怡震. 中国葡萄属野生种抗病性及抗病基因 RAPD 标记作图研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2003: 5-6.
- [9] 吕秀兰. 葡萄品种遗传多样性和霜霉病抗性鉴定的生化与分子生物学研究[D]. 成都: 四川农业大学, 2005: 4-12.
- [10] 吉丽丽. 石河子地区葡萄霜霉病菌孢子囊时空扩散动态及品种抗病性研究[D]. 石河子: 石河子大学, 2011: 35.
- [11] 王国英. 葡萄叶片气孔与霜霉病抗性[J]. 果树科学, 1988, 5(3): 120-121.
- [12] 李 华. 葡萄抗病和感病品种叶片气孔对霜霉病游动孢子的向性引力比较研究[J]. 法国农业通讯, 1986(1): 27-30.
- [13] 刘天明, 李 华, 张振文. 鲜食葡萄品种对霜霉病的抗性及其抗病机理研究[J]. 植物保护学报, 2001, 28(2): 118-122.
- [14] 刘新秀, 金恭玺, 李 虎, 等. 葡萄种质资源抗霜霉病鉴定[J]. 新疆农业科学, 2013, 50(5): 857-863.
- [15] 陈佰鸿, 李新生, 曹孜义, 等. 一种用透明胶带粘取叶片表皮观察气孔的方法[J]. 植物生理学通讯, 2004, 40(2): 215-218.
- [16] BOUBALS. D. A contribution to the study of causes of the resistance of vitaceae to downy mildew and their mode inheritance[J]. Plant Breeding Abstracts, 1959, 12(30): 151.

(本文责编: 陈 珩)