

# 葡萄种质资源对叶片白腐病的抗性鉴定及评价

张颖,樊秀彩,孙海生,姜建福,刘崇怀\*

(中国农业科学院郑州果树研究所,郑州 450009)

**摘要:**【目的】葡萄白腐病是葡萄生产中导致重大损失的主要原因之一,挖掘抗病种质,阐明抗病机制,以期抗病育种提供种质资源储备。【方法】利用离体接种的方法系统评价了中国野生葡萄种质、欧亚种及部分杂交种对葡萄白腐病的抗性,并以葡萄抗病中的关键基因为指示基因,探讨抗病种质和感病种质的不同抗病模式。【结果】对78株葡萄属17个种进行离体接菌评价后,对不同来源的种质进行了抗性分类,其中刺葡萄♂(*Vitis davidii*)是最抗白腐病种质,欧亚种‘美人指’(*Vitis vinifera* ‘Manicure Finger’)最为感病。5个WRKY基因已经验证在葡萄抗病中起作用,笔者以最抗病的刺葡萄和最感病的‘美人指’进行基因型表达分析。以WRKY基因为指示性基因,检测了其介导的抗性途径中的关键基因PR、NPR1等在抗性葡萄刺葡萄和感病葡萄‘美人指’中的表达,并探讨WRKY基因及关键基因对病原菌的响应机制。WRKY基因及病程相关基因在刺葡萄和‘美人指’分别受到葡萄白腐病病原菌侵染诱导后,具有不同的时空表达差异和量化差异,WRKY基因和相关基因在刺葡萄中表达迅速且上调倍数高,但在‘美人指’中表达迟缓,且上调程度低。【结论】经过系统的鉴定评价筛选到一批抗性种质,可作为潜在育种材料。通过抗病基因表达分析检测,发现抗病基因在刺葡萄中反应迅速,从而使刺葡萄具备高抗病性。

**关键词:** 葡萄;抗病;葡萄白腐病;转录因子;抗病基因

中图分类号: S663.1

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2017)09-1095-11

## Identification and evaluation of resistance to white rot in grape resources

ZHANG Ying, FAN Xiucui, SUN Haisheng, JIANG Jianfu, LIU Chonghui\*

(Zhengzhou Fruit Research Institute, CAAS, Zhengzhou 450009, Henan, China)

**Abstract:** 【Objective】Grape is one of the most important fruit crops. *Vitis vinifera* is widely grown because of its high fruit quality and its capacity to grow in a wide range of climatic conditions. However, *V. vinifera* is susceptible to many pathogens such as phytoplasmas, viruses, bacteria, and fungi. White-rot (*Coniothyrium diplodiella*) is a severe disease to *V. vinifera* cultivars in warm and humid climates in China, causing great loss of fruit production. It is extremely important to select new varieties of grape resistant to white rot. Digging germplasm with resistance is prerequisite for breeding new cultivar. The aim of this study was to identify and evaluate the resistance of grape germplasms and reveal the mechanism of resistance of grape plants. 【Methods】The identification and evaluation of the resistance of *Vitis* species and hybrids were made using inoculation of pathogen *in vitro*. The transcription factor WRKY was used as indicating gene to detect the different resistance models of the resistant and susceptible resources. 【Results】78 strains of 20 *Vitis* species were evaluated *in vitro*. *V. davidii* Ciputao ♂ was the most resistant resources to white rot. Resistance of different permplasms to *C. diplodiella* varied widely. Among the Chinese grapevines tested, no species was immune to the disease. Ciputao ♂ and Ciputao ♀ exhibited strong resistance to the disease, while Guangximao, Jiuligousangye, Sangye 943, Sangye 946, Sangye 1099, Shuangxixianzhi 01, Shuangxixianzhi 03, Duolieyingyu, Qingyaoshanyingyu, Huadong 1058, Huajia 8, and Lingbaoqi

收稿日期: 2016-08-19 接受日期: 2017-04-14

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金(No. 31201599);中国农业科学院科技创新工程(CAAS-ASTIP-2016-ZFRI);中央级科研院所基本科研业务费(1610192016202);农业部作物种质资源保护项目(NB2012-2130135-34)

作者简介: 张颖,女,副研究员,博士,研究方向为果树资源与育种。Tel:0371-65330966, E-mail: zhangying05@caas.cn

\*通信作者 Author for correspondence. Tel:0371-65330966, E-mail: liuchonghui@caas.cn

iu were highly susceptible. European grapes were less resistant than the Chinese wildgrapes. There were no highly resistant species (resistance rating II) in European grapes. ‘Red Globe’ ‘Manicule Finger’ ‘Olympia’ ‘Fenghuang 51’ ‘Khoussaine Blanc’ ‘Munage’ ‘Amilia’ ‘Pinot Noir’ and ‘Ribier’ were very susceptible to the disease. American and Seibel grapevines varied in resistance from III to IV, belonging to moderately resistant to moderately susceptible species, Ciputao ♂ was the most resistant species and thus was singled out for further investigation. After inoculation with *C. diplodiella*, the expressions of *WRKY*, *PR*, *NPR1* were significantly different between the susceptible and the resistant grapevines. *WRKY1*, 2, 3, 11, and 70 were up-regulated and *WRKY32* were down-regulated in ‘Manicule Finger’. In Ciputao ♂, *WRKY1* and *WRKY32* was down-regulated, *WRKY2*, 3, 11, and 70 were up-regulated, and the expression of *WRKY1* was unchanged. *WRKY1* and *WRKY32* were differentially expressed in Ciputao ♂ and ‘Manicule Finger’. The expressions of *PR1*, *PR2*, *NPR1* were scaled 9, 12, 24, 30 and 48 h following inoculation. *PR1* and *NPR1* were up-regulated and *PR2* were down-regulated in ‘Manicule Finger’. *PR1*, *PR2*, *NPR1* were up-regulated in Ciputao ♂. 【Conclusion】 Disease resistance in Chinese wild *Vitis* varied among species and genotypes. Variation in resistance, even within the same species, was not related to geographic distribution. Therefore, Chinese wild *Vitis* present an essential germplasm resource for breeding new varieties resistant to white rot. Disease resistance mechanisms were very different in Chinese wild grapes. Further investigation is needed for clarifying the mechanism of resistance to white rot in grapes.

**Key words:** Grape; Resistance; Grape white-rot; Transcription factor; Resistant gene

葡萄是世界上重要的水果作物,因其口感醇美、营养物质丰富,而被广泛种植,用于鲜食及酿酒、制汁和制干等深加工生产,受到全世界人民的喜爱。但葡萄易受许多病原体如细菌、病毒、植原体、真菌的侵染,葡萄白腐病[*Coniothyrium diplodiella* (Speg.) Sacc.]<sup>[1]</sup>是其中危害最严重的病害之一,葡萄白腐病导致生产园减产 25%~75%,在世界范围内该病也在大多数葡萄的种植区被发现<sup>[2]</sup>。葡萄白腐病危害葡萄时,叶片发病多发生在叶缘部,初生褐色水浸状不规则病斑,逐渐扩大略成圆形,有褐色轮纹;果粒变褐变软,果穗腐烂,病果干缩时呈褐色或灰白色僵果。目前生产上对葡萄白腐病主要是药剂防治,药剂防治严重危害环境及食品安全,而选育抗病品种是解决该问题的有效途径之一,而发现和利用抗性种质和挖掘抗性基因是其中最重要的工作。

全世界葡萄约有 70 个种,其中有 38 个种起源于中国,由于其多呈野生状态存在而少被利用。近年来,野生资源的研究和利用越来越受到重视,越来越多的研究表明中国野生葡萄资源中蕴含着丰富的抗性基因,在抗白粉病和霜霉病的研究和利用中发挥了重要的作用<sup>[3]</sup>。笔者团队所在资源圃收集到的中国野生种达到了 35 个,并对其进行了调查和研究<sup>[4-5]</sup>,建立了室内鉴定的标准方法,为系统鉴定葡萄种质资源奠定了基础<sup>[6]</sup>,在本研究中对 74 份长势

整齐的资源进行了鉴定,为筛选抗性种质奠定基础。

随着葡萄基因组测序的完成<sup>[7-8]</sup>,葡萄全基因组中 58 个家族的 867 个转录因子被预测,其中 80 个属于 *WRKY* 家族<sup>[9]</sup>,*WRKY* 类转录因子因其 N 端含有保守的 *WRKYGQK* 氨基酸序列而得名,*WRKYGQK* 又称为模体。*WRKY* 转录因子往往同时激活病程相关基因(*PR*)的表达<sup>[10]</sup>,在拟南芥系统获得性抗性(SAR)的研究中,W-box 盒显著地出现在 *PR1* 调控元基因的启动子区域,而 *PR1* 基因的启动子区域存在 1 个 *WRKY* 蛋白结合的负调控元件 *LS4*<sup>[11]</sup>。葡萄 *WRKY* 转录因子的抗病功能研究起步较晚,截止到目前葡萄 *WRKY* 家族中,只有 *VvWRKY1*、*VvWRKY2*、*VvWRKY11*、*VpWRKY1* 和 *VpWRKY2* 得到了克隆和功能验证。*VvWRKY11* 和 *VvWRKY2* 受葡萄霜霉菌诱导;*VvWRKY1* 和 *VvWRKY2* 基因受盐和低温胁迫以及信号物质水杨酸和茉莉酸的诱导,并介导拟南芥中 *AtPR10* 和 *AtNPR1* 抗性基因的表达<sup>[12]</sup>;转基因试验结果显示,*VvWRKY1* 和 *VvWRKY2* 基因能够提高烟草对烟草灰霉病、腐霉病、赤星病 3 种真菌病害的抗性;同时 *VvWRKY2* 还参与提高植物固有抗性;*VpWRKY1* 和 *VpWRKY2* 基因表达受葡萄白粉病菌诱导,并对葡萄抗白粉病呈正调控<sup>[12-16]</sup>。

笔者以鉴定获得的最抗种质刺葡萄 ♂ 和最感

病种质‘美人指’为试材,通过检测已经确定与葡萄其他抗病紧密相关的 *WRKY* 基因及其途径上的关键基因在白腐病菌诱导下的表达模式,检测刺葡萄抗病中 *WRKY* 基因的作用,并探讨其抗病机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

供试的78份葡萄种质均采自中国农业科学院郑州果树研究所国家种质(葡萄)资源圃,编号为资源圃编号。选材包括中国野生种、欧亚种核心种质及Seibel系统的葡萄种质等17个种。

### 1.2 人工接菌鉴定

供试葡萄株系为圃内10 a(年)树龄的成年葡萄树,叶片采自当年生枝条上第3到第5片成龄叶片,每个植株选取20枚叶片。葡萄白腐病病原菌 [*Colletotrichum diplodiella* (Speg) WR01] 来自中国农业科学院植物保护研究所,病原菌采用PDA培养基,28℃黑暗培养3~5 d,菌丝块接菌到葡萄叶片并保湿,每个叶片设2~4个接种点,3 d后进行病斑大小的统计,并用双十字交叉法统计<sup>[6]</sup>。

### 1.3 统计及分析方法

病斑大小采用十字交叉法进行统计,病症等级

根据病斑面积占叶面面积的百分比分为等级0~7<sup>[17-19]</sup>:0,无病症;1级,0.1%~5.0%;2级,5.1%~15.0%;3级,15.1%~30.0%;4级,30.1%~45.0%;5级,45.1%~65.0%;6级,65.1%~85.0%;7级,85.1%~100.0%。叶面积用叶面积仪测量,型号AWOS-YMJ1,病症等级转化为病情指数(DI),计算公式如下:

$$DI = \frac{\sum (\text{病症等级} \times \text{本等级的叶片数})}{\text{供试叶片总数} \times \text{最高病症指数}} \times 100$$

根据病情指数DI,抗性分为5级:免疫(ER),DI=0.0;高抗(HR),DI=0.1~5.0;抗病(R),DI=5.1~25.0;感病(S),DI=25.1~50.0;高感(HS),DI=50.1~100.0。

病斑大小利用SPSS 19软件进行系统聚类分析,验证抗病级别的结果。所有数据均采用方差分析进行统计学分析(ANOVA)检验( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。

### 1.4 病菌诱导

刺葡萄和‘美人指’叶片采自当年生枝条上第3到第5片成龄叶片,接菌0、9、12、24、48 h后采样,立即放入液氮中,3次重复,并于-80℃保存备用。

### 1.5 RNA提取和RT-PCR分析

采用改进的SDS/酚法<sup>[22]</sup>提取葡萄的总RNA。以 *EF1γ* 基因为参照基因进行RT-PCR扩增,引物如表1所示。实时定量PCR仪为罗氏480,结果采用

表1 实时定量引物表

Table 1 Primer sequence of real time-PCR

基因 Gene	同源基因 Homologous gene ( <i>Vitis vinifera</i> )	同源基因(华东葡萄) Homologous gene ( <i>Vitis pseudoreticulata</i> )	编号 Accession number	引物序列 Primer sequence
<i>NPR1</i>	<i>NPR1</i>		GSVIVT00016536001 <sup>a</sup>	Forward: GGAATTTCGATGTTGGGTACG Reverse: GCAACCTTGTCAAGAATGTCC
<i>PR1</i>	<i>PR1</i>		XM_002273752 <sup>b</sup>	Forward: GGAGTCCATTAGCACTCCTTTG Reverse: CATAATTCTGGGCGTAGGCCAG
<i>PR2</i>	<i>PR2</i>		AJ277900 <sup>a</sup>	Forward: TGCTGTTTACTCGGCACCTTG Reverse: CTGGGGATTTCTCTGTTCTCA
<i>EF1γ</i>	<i>EF1γ</i>		AF176496 <sup>a</sup>	Forward: GAACTGGGTGCTTGATAGGC Reverse: AACCAAAATATCCGGAGTAAAAGA
<i>WRKY1</i>	<i>WRKY1</i>		AY585679 <sup>a</sup>	Forward: CCAGAGATGATTTTGTGGAGACCAG Reverse: CACTTGAGTTTGTATCTCCACCAG
<i>WRKY2</i>	<i>WRKY2</i>		AY596466 <sup>a</sup>	Forward: GTAAGCATGTTGAGAGGG Reverse: GATAACTTGCAATTTCCACCAG
<i>WRKY3</i>	<i>WRKY3</i>	<i>VpWRKY3</i>	JF500755 <sup>a</sup>	Forward: TGGACCTCAAGCCTAATCCTCCTG Reverse: CTCTTCTACCAAACCACCACTGTCTTCT
<i>WRKY11</i>	<i>VvWRKY11</i>		AM886167 <sup>a</sup>	Forward: CGCATGCTGTCTCATCAGACCAATC Reverse: GAGCTGGAGTACTTTCCGGAGATATC
<i>WRKY32</i>	<i>WRKY32</i>	<i>VpWRKY2</i>	GU565706 <sup>a</sup>	Forward: CTTTGAAGCTCCCGAAGCAGAGA Reverse: TCTCCCAACTCAGCAGCTCCAACCT
<i>WRKY70</i>	<i>WRKY70</i>	<i>VpWRKY1</i>	GQ884198 <sup>a</sup>	Forward: AATGGAGTGCACCTGGTCCGAA Reverse: TTTCGCTAGAAGATCCTGGGCC

注:a. Genbank 序列号;b. Genoscope Grape Genome Browser 数据库序列号。

Note:a. Genbank accession number; b. Genoscope Grape Genome Browser number.

2<sup>-ΔΔCt</sup>方法分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 精准抗病评价和分级

在对叶片结果统计时,采用双十字法解决病斑不规则的问题,同时把病斑大小转化为病情指数,并综合发病率和感病程度的因素。以来源不同的欧亚种、杂种和中国野生种群体作为材料,鉴定评价葡萄中白腐病抗性的分布及分级,依据病情指数分为5级,从ER(免疫)到HS(高感)。结果显示在供试的中国野生葡萄种、欧亚种及杂交群体中均不存在免疫类型;在整个供试群体的野生种质中高抗种质有2份,为刺葡萄♂和刺葡萄♀,中抗种质有3份(塘尾实生、舞钢桑叶、夔夔武汉),感病种质16份,高感种质13份;在欧亚种群体和杂交群体中不存在高抗种质,中抗15份,感病16份,高感9份,欧亚种Seibel系统的葡萄有2份属于中抗,2份属于感病种质(图1,表2)。中国野生种群体中同一个种中也包含不同的抗性类型,如刺葡萄中包括了极抗、中抗和感病类型,桑叶葡萄中包含中抗和高感类型,这一现象同样存在于欧亚种中,欧亚种中也存在中抗、易感和高感类型。

层析分析结果中,根据病斑结果可清晰分为4类,高抗(II)、中抗(III)、感病(IV)、高感(V),大体符合根据病情指数分类的类别(图2)。2种分析结果契合,说明该统计方法适用于本研究。

### 2.2 WRKY基因在高抗和高感病中的不同响应机制

在已有的研究中,WRKY转录因子通过水杨酸途径参与葡萄的抗病反应<sup>[9]</sup>,在葡萄中5个WRKY转录因子的功能已经获得了验证。为了检测在高抗种质和高感种质中抗病途径及信号传递中的区别,选取分属HR级和III群的刺葡萄♂,分属HS级和V群的‘美人指’,检测WRKY基因在白腐菌诱导后的表达(图3)。结果显示,刺葡萄♂在病原菌接种后,WRKY1,2,11,70表达上调,WRKY3,WRKY32表达下调;在‘美人指’中WRKY32表达下调,WRKY2,WRKY3,WRKY11和WRKY70表达上调,WRKY1表达量基本不变。

### 2.3 PR类基因在高抗和高感病种质中的不同响应机制

PR类基因作为转录因子的下游靶基因,执行抗

病的具体功能,为了检测基础抗性的PR类基因在高抗种质和高感种质中的作用,分别选取刺葡萄♂和‘美人指’,检测NPR1、PRI和PR2基因在白腐菌诱导后的表达(图4)。NPR1和PRI基因在刺葡萄中受病菌诱导后上调,PRI在‘美人指’中受病菌诱导后表达也上调,NPR1在‘美人指’中表达下调。PR2基因在刺葡萄♂和‘美人指’受病菌诱导后表达不同,在‘美人指’中下调,在刺葡萄感染病菌前期上调。NPR1和PRI基因上调表达与刺葡萄♂的抗病性高于‘美人指’有相关性。

## 3 讨 论

### 3.1 中国野生葡萄中存在高抗葡萄白腐病的种质

植物以多种因素、多种方式、多道防线来抵抗病原物的侵染和危害。不同植物对不同病原物的抗病机制各有不同。本试验设计时首先通过人为制造伤口刺破葡萄表皮,排除因叶片结构造成的结构抗性<sup>[20]</sup>;其次利用菌丝直接接种,避免了由孢子萌发率引起的误差,试验结果能体现植物本身的抗性机制差异。在本研究中,从试材到试验条件都做到了一致和稳定,因此结果具备可参考意义。

试验结果中叶片存在发病率问题,为了在结果中体现发病率,本研究并未单纯考量病斑大小这一因素,而是引入了病情指数这一评估方式。对20种种质的78份葡萄资源进行离体白腐病鉴定后,整个被测试群体中不存在免疫类型,其中腺枝葡萄、*V. heyneana* Roem. & Schult subsp. ficifolia (Bge.)、*V. heyneana* Roem. & Schult、华东葡萄、燕山葡萄、山葡萄和刺葡萄对葡萄白腐病的抗性较强,但是各个种内存在不同抗性的株系。在利用病情系数统计的同时,笔者采用了层序聚类分析,这一统计学方法可以打破病情指数和种质来源的限制,通过病斑的实际大小进行分群。供试材料共分为5个群(I~V),结果来源于聚类的树状图。I群标记为免疫,在本次结果中未出现;II群中只包括刺葡萄的2份资源,III群中28份资源,包括全部的R级和部分S级资源;IV群中包括部分S级和部分HS级资源;V群中为HS的15份资源。结合2者的分析结果更能清楚了解不同种质的抗性。

欧亚种葡萄在自然条件下集体表现出对*C. diploidiella*敏感,本次离体鉴定中抗性分布于HS~R,没有HR类型,大多属于S和HS型。中国野生葡萄



图1 不同种株系接菌后病症表现(部分)

Fig. 1 Lesions on grape leaves following pathogen infection

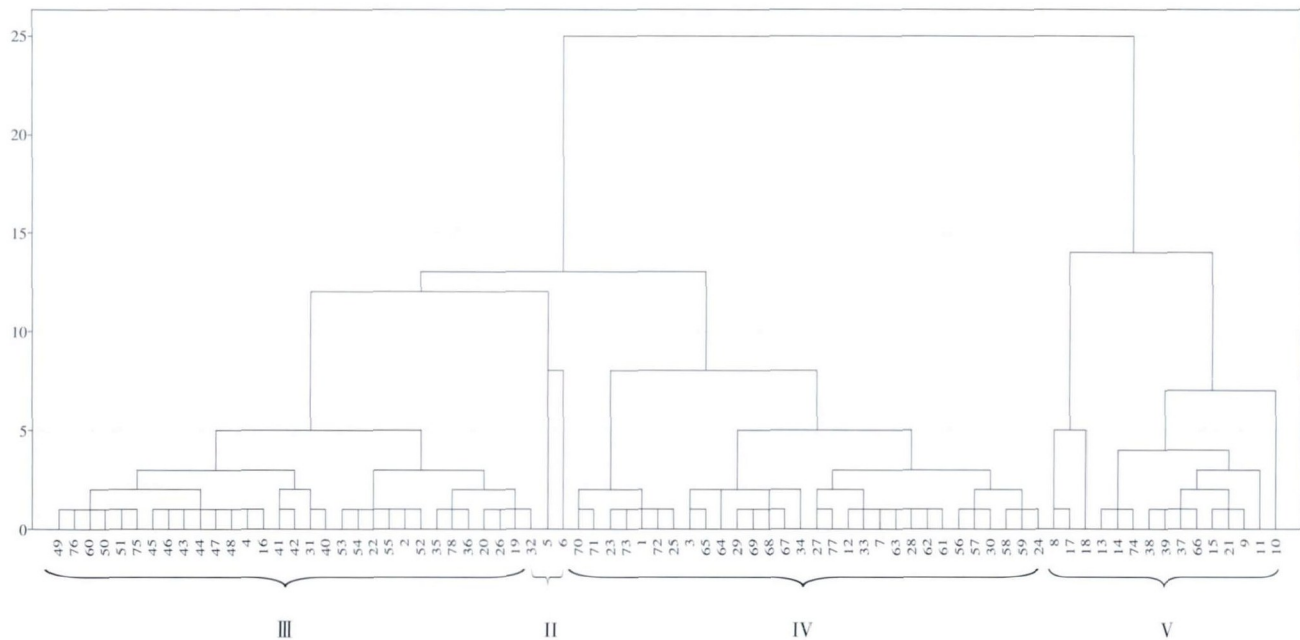
表 2 不同葡萄种质的抗病等级统计

Table 2 Susceptibility indices and levels of resistance to white rot of grape genotypes

种名 Specific name	编码 Code	种质名称 Germplasm name	病斑大小 Average diameter of necrosis/mm	病情指数 Susceptibility index	抗性级别 Resistance level
毛葡萄 <i>V. quinquangularis</i> Rhed.	1	广安毛葡萄 Guangximao	21.6±0.5	51.20	HS
	2	都安毛葡萄 Du'anmao	10.5±0.7	26.78	S
山葡萄 <i>V. amurensi</i>	3	山葡萄 01 Shanputao 01	18.1±0.3	30.67	S
刺葡萄 <i>V. davidii</i>	4	塘尾实生 Tangwei Shisheng	8.9±0.4	6.12	R
	5	刺葡萄♂ Ciputao ♂	0.5±0.3	0.31	HR
	6	刺葡萄♀ Ciputao ♀	4.9±0.6	2.01	HR
	7	湖南刺 Hunanci	16.4±0.3	42.50	S
桑叶葡萄 <i>V. ficifolia</i> Bunge	8	九里沟桑叶 Jiuligousangye	37.8±0.5	75.23	HS
	9	桑叶 0943 Sangye 0943	28.3±0.2	60.23	HS
	10	桑叶 0946 Sangye 0946	32.1±0.6	73.21	HS
	11	桑叶 1099 Sangye 1099	29.9±0.5	61.23	HS
	12	舞钢桑叶 Wugangsangye	16.7±0.8	10.08	R
腺枝葡萄 <i>V. adenoclada</i> Hand. Mazz.	13	腺枝 01 Xianzhi 01	25.9±0.2	53.2	HS
	14	腺枝 03 Xianzhi 03	26.0±0.4	55.90	HS
夔夔葡萄 <i>V. tunbergiisieb</i> EtZucc	15	多裂叶夔夔 Duolieyingye	28.7±0.6	60.12	HS
	16	夔夔武汉 A1 YingyuwuhanA1	8.8±0.2	6.21	R
	17	青要山夔夔 Qingyaoshanyingye	38.0±0.4	77.86	HS
华东葡萄 <i>V. pseudoreticulata</i> W. T. Wang	18	华东 1058 Huadong 1058	35.2±0.5	70.32	HS
	19	华东 1057 Huadong 1057	12.6±0.1	28.70	S
	20	华东 01 Huadong 01	12.7±0.7	28.76	S
杂交种(华东葡萄×欧亚种葡萄) Hybrids ( <i>V. pseudoreticulata</i> × <i>V. vinifera</i> )	21	华佳 8 Huajia 8	28.6±0.4	61.20	HS
变叶葡萄 <i>V. piasezkii</i> Maxim.	22	灵宝变叶 Lingbaobianye	10.9±0.5	26.72	S
	23	四道岭变叶 Sidaolingbianye	21.9±0.4	51.20	HS
网脉葡萄 <i>V. wilsonae</i> Veitch.	24	宝天曼网脉 Baotianman	14.7±0.7	37.98	S
秋葡萄 <i>V. romantzii</i> Foex.	25	灵宝秋 Lingbaoqiu	22.3±0.6	54.34	HS
	26	青要山秋 Qingyaoshanqiu	12.8±0.5	27.89	S
葛藟葡萄 <i>V. flexuosa</i> Thunb.	27	葛藟♀ Gelei♀	15.8±0.4	30.23	S
	28	葛藟♂ Gelei♂	16.3±0.8	32.56	S
云南葡萄 <i>V. yunnanensis</i> C. L. Li	29	云南葡萄 Yunnan	19.1±0.5	37.90	S
	30	湖南云南 Hunanyunnan	14.0±0.4	30.54	S
燕山葡萄 <i>V. yeshanensis</i> J. X. Chen	31	燕山 0947 Yanshan 0947	11.1±0.6	26.5	S
美丽葡萄 <i>V. bellula</i> (Rehd.)W. T. Wang	32	美丽葡萄 1104 Meiliputao 1104	13.0±0.3	29.56	S
桦叶葡萄 <i>V. betulifolia</i> Diels	33	嵩山桦叶 Songshanhuaye	16.7±0.5	32.34	S
	34	桦叶 Huaye	19.7±0.4	37.89	S
菱叶葡萄 <i>V. hnaocchii</i> Hnaec	35	菱叶 Lingye 0945	12.2±0.6	27.67	S
美洲葡萄 <i>V. labrusca</i>	36	康可 Concor	13.2±0.7	29.67	S
欧亚种葡萄 <i>V. vinifera</i> L.	37	红地球 Red Globe	27.7±0.6	59.45	HS
	38	美人指 Manicure Finger	27.8±0.5	60.45	HS
	39	奥林匹亚 Olympia	27.8±0.4	61.23	HS
	40	早田玫瑰香 Zaotianmeiguixiang	7.0±0.6	9.07	R
	41	紫鸡心 Zijixin	7.6±0.7	10.23	R
	42	沈阳玫瑰 Shenyang Rose	7.7±0.3	12.14	R
	43	夏白 Xiabai	8.1±0.4	15.34	R
	44	洋葡萄 Yangputao	8.2±0.6	16.41	R
	45	Macka Cuex	8.3±0.7	16.42	R
	46	Muscat Mathiasz Janosne	8.3±0.8	17.37	R
	47	Muscat of Alexandria	8.6±0.4	18.45	R
	48	意大利 Italia	8.7±0.3	18.48	R
	49	葡萄园皇后 Queen of Vineyard	9.7±0.5	18.57	R
	50	早玛瑙 Zaomanao	9.3±0.6	19.65	R
	51	Muscat Plevenski	9.5±0.4	19.93	R
	52	泽香 Zexiang	10.2±0.3	26.56	S

表2(续) Table 2(Continued)

种名 Specific name	编码 Code	种质名称 Germplasm name	病斑大小 Average diameter of necrosis/mm	病情指数 Susceptibility index	抗性级别 Resistance level
	53	莎巴珍珠 Pearl of Csaba	10.8±0.2	26.70	S
	54	瑰宝 Guibao	10.8±0.4	26.78	S
	55	郑果大无核 Zhengguodawuhe	11.0±0.8	27.82	S
	56	郑州早玉 Zhengzhouzaoyu	14.2±0.4	29.35	S
	57	太妃玫瑰 Taifi Rose	14.2±0.2	30.01	S
	58	紫丰 Zifeng	15.0±0.4	34.54	S
	59	无核白 Thompsons Seedless	15.3±0.6	35.67	S
	60	Muscat Super	9.8±0.5	8.09	R
	61	芳香 Fangxiang	15.2±0.2	37.02	S
	62	郑果6号 Zhengguo 6	16.2±0.2	38.02	S
	63	京秀 Jingxiu	16.5±0.3	39.21	S
	64	87-1	17.2±0.5	30.12	S
	65	京早晶 Jingzaojing	17.9±0.4	30.23	S
	66	黑比诺 Pinot Noir	28.0±0.2	65.21	HS
	67	白鸡心 Baijixin	18.5±0.5	40.32	S
	68	保尔加爾 Baoerjiaer	18.8±0.6	42.23	S
	69	Irsay Oliver	19.0±0.7	43.02	S
	70	凤凰51 Fenghuang51	20.7±0.4	44.32	HS
	71	Khoussaine Blanc	20.8±0.5	44.21	HS
	72	Munage	21.4±0.7	45.34	HS
	73	Amilia	21.8±0.4	46.01	HS
	74	Alphonse Lavallee	25.6±0.6	53.01	HS
杂交种(沙地葡萄×林氏葡萄) Hybrids ( <i>V. rupestris</i> × <i>V. lincecumii</i> Buckl)	75	Seibel8745	9.1±0.7	9.23	R
	76	Seibel5279	9.7±0.6	9.56	R
	77	Seibel5813	15.7±0.8	40.27	S
	78	Seibel Noir	12.1±0.5	37.74	S

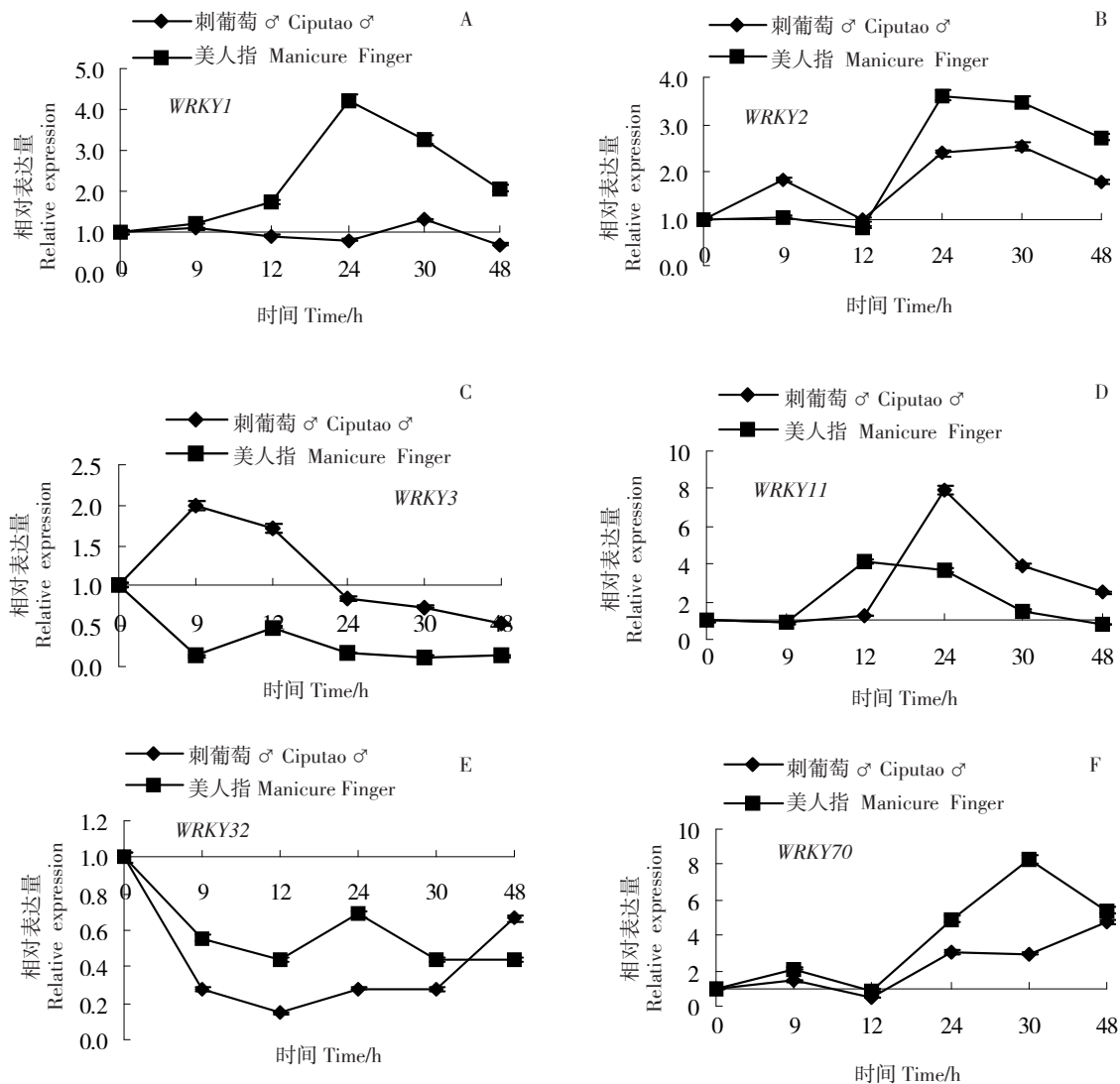


系树使用平均距离法。I. 免疫;II. 高抗;III. 敏感;IV. 中度敏感;V. 严重敏感。编号与表 2 一致。

Dendrogram using average linkage. I. Immunity; II. Strong resistance; III. Susceptible; IV. Moderately susceptible; V. Severely susceptible. The number is the same as Table 2.

图 2 层序聚类分析

Fig. 2 Hierarchical cluster analysis



各个平均值和标准差通过 6 个独立的生物学重复计算获得。下同。

Mean values and standard deviations were obtained from samples taken from 6 independent repeats. The same below.

图 3 刺葡萄 ♂ 和 ‘美人指’ 在白腐病菌诱导后的 *WRKYs* 基因的表达

Fig. 3 *WRKYs* gene expression in Ciputao ♂ and ‘Manicure Finger’ subsequent to *C. diplodiella* infection

资源在自然条件下均不感染 *C. diplodiella*, 不表现葡萄白腐病的症状<sup>[4, 23]</sup>, 在离体鉴定中抗性分级分布于 HS~HR 的各个级别, 刺葡萄雄株和雌株属于高抗, 雄株比雌株抗性更为显著。

无论中国野生葡萄还是欧亚种葡萄, 其种间和种内的抗性都有很大的差异, 其外在原因可能是地理分布和人工选择, 其内在因素推测是由于基因的细微调控造成了不同株系的抗病差异<sup>[18, 24]</sup>。

### 3.2 转录因子 *WRKY* 在葡萄抗病和感病种质中的表达模式分析

植物 *WRKY* 转录因子在植物抗病分子反应过程中起着重要作用<sup>[25]</sup>。WRKY 蛋白的功能已在拟南

芥中获得广泛的研究, 拟南芥中 72 个表达的 *WRKY* 基因中 49 个对病菌或水杨酸处理有响应<sup>[26-29]</sup>。水稻中被检测的 45 个 *WRKY* 基因中 15 个受病菌诱导, 7 个受水杨酸或茉莉酸信号物质诱导<sup>[10]</sup>。*WRKY3* 基因在 ‘美人指’ 受到白腐病菌诱导后先有一个表达上调的过程, 但是在 24 h 后表达量下降; 而在刺葡萄中 *WRKY32* 基因受白腐病菌表达下调, 但是表达量变化较小。对于白腐病的诱导, *WRKY* 基因家族中存在着不同的调控表达模式, 这与 *WRKYs* 在调控植物抗病过程中所起的复杂作用一致, *WRKYs* 在植物抗病基因网络中扮演正负调控的角色<sup>[30-31]</sup>, 甚至有的 *WRKY* 对特定的病菌抗性起正调控或负调控, 如



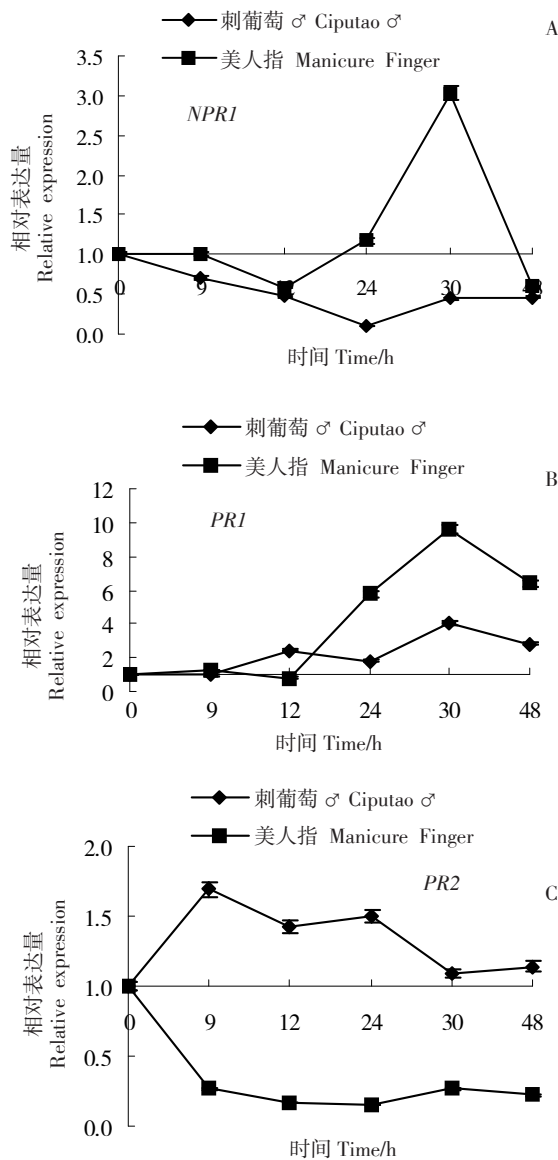


图4 刺葡萄♂和‘美人指’在白腐病菌诱导后的NPR和PR基因的表达

Fig. 4 NPR and PR genes expression in Ciputao♂ and ‘Manicure Finger’ following *C. diplodiella* infection

WRKY53对*Pseudomonas syringae*起正调控作用,但是对*Ralstonia solanacearum*起负调控作用<sup>[32]</sup>。

*VvWRKY1*和*VvWRKY2*基因受盐和低温胁迫以及信号物质水杨酸和茉莉酸的诱导,转基因试验结果显示*VvWRKY11*和*VvWRKY2*基因能够提高烟草对烟草灰霉病、腐霉病、赤星病3种真菌病害的抗性,同时*VvWRKY2*还参与提高植物固有抗性<sup>[12]</sup>,而*WRKY1*基因在刺葡萄中受白腐病菌和水杨酸诱导表达,但是在‘美人指’中基本不受诱导;*WRKY11*基因在刺葡萄和‘美人指’中都受白腐病菌的诱导,在

刺葡萄中*WRKY11*基因在诱导9h后进入高表达模式,但是在‘美人指’中在诱导12h后进入高表达模式,存在一个相对延迟的现象,可能不同种质对处理后的信号接收与传导途径相关。

### 3.3 NPR1和PR类基因在葡萄抗病和感病种质中的表达模式分析

WRKY转录因子往往同时激活病程相关基因(PR)的表达<sup>[1]</sup>,在拟南芥系统获得性抗性(SAR)的研究中,W-box盒显著地出现在PR1调控元件的启动子区域,而PR1基因的启动子区域存在一个WRKY蛋白结合的负调控元件LS4<sup>[2]</sup>。拟南芥At-WRKY18的表达受病原的诱导,超表达后提高了植物的抗病性,持续激活病程相关基因(PR)的表达;*NPR1*、*PR1*、*PR2*(*BGL2*)被认为是系统获得性抗性激活的标志基因<sup>[33]</sup>。在本研究中,*NPR1*基因在‘美人指’中受诱导后表达变化不大,刺葡萄中受白腐病菌诱导后在36h有较高度度的表达上调;*PR1*和*PR2*基因在‘美人指’中受诱导后表达量提高均不显著,而在刺葡萄中*PR1*基因在诱导12h后表达量显著提高,但*PR2*基因的表达量显著下降。推测在刺葡萄中存在某种区别于‘美人指’的抗性机制,实现了刺葡萄抗性的提高。

已有的数据表明,刺葡萄中WRKY基因或及时表达(WRKY11),迅速感应上游信号,调控下游PR类基因,或以较高的表达量(WRKY1,2,32,70)影响下游基因,从而达到抗病的目的。刺葡萄中PR类基因在上游调控基因作用下,*NPR1*和*PR1*基因高表达与刺葡萄的抗病相关。

## 4 结论

以抗病种质刺葡萄和感病种质‘美人指’为试材,处于调控中心位置的WRKY转录因子呈现出不同的应激响应机制和表达量变化,表明在抗病种质刺葡萄中存在特异的抗病调控网络,影响WRKY转录因子的表达,进而调控刺葡萄的免疫系统,最终调控PR类蛋白,从而显示出抗病的性状。

### 参考文献 References:

[1] AKKURT W L, MAULE E, TÖPFER R, ZYPRIAN E. Development of SCAR markers linked to powdery mildew (*Uncinula necator*) resistance in grapevine (*Vitis vinifera* L. and *Vitis* sp.) [J]. Molecular Breeding, 2007, 19(2): 103-111.  
 [2] ALI K, MALTESE F, ZYPRIAN E, REX M, CHOI Y H, VER-

- POORTE R. NMR metabolic fingerprinting based identification of grapevine metabolites associated with downy mildew resistance [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57(20): 9599–9606.
- [3] 王跃进, 贺普超. 中国葡萄属野生种抗白腐病机制研究[J]. *北方园艺*, 1988(1): 1–5.  
WANG Yuejin, HE Puchao. Study of white rot disease resistant mechanism in Chinese *Vitis* wild species[J]. *Northern Horticulture*, 1988(1): 1–5.
- [4] 李峰, 樊秀彩, 刘崇怀, 张颖, 姜建福, 李民. 葡萄种质资源对葡萄白腐病抗性调查[J]. *中国果树*, 2012(3): 72–74.  
LI Feng, FAN Xiucui, LIU Chonghuai, ZHANG Ying, JIANG Jianfu, LI Min. Investigation of grape resources for grape white rot resistance[J]. *China Fruits*, 2012(3): 72–74.
- [5] 张颖, 李峰, 刘崇怀, 樊秀彩, 孙海生, 姜建福, 张国海. 中国野生刺葡萄抗白腐病 NBS-LRR 类抗病基因同源序列的分离与鉴定[J]. *中国农业科学*, 2013, 46(4): 780–789.  
ZHANG Ying, LI Feng, LIU Chonghuai, FAN Xiucui, SUN Haisheng, JIANG Jianfu, ZHANG Guohai. Isolation and identification of NBS-LRR resistance gene analogs sequences from *Vitis davidii*[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2013, 46(4): 780–789.
- [6] 张颖, 孙海生, 樊秀彩, 姜建福, 刘崇怀. 中国野生葡萄资源抗白腐病鉴定及抗性种质筛选[J]. *果树学报*, 2013, 30(2): 191–196.  
ZHANG Ying, SUN Haisheng, FAN Xiucui, JIANG Jianfu, LIU Chonghuai. Identification and evaluation of resistance of *Vitis* to grape white rot[J]. *Journal of Fruit Science*, 2013, 30(2): 191–196.
- [7] JAILLON O, AURY J M, NOEL B, POLICRITI A, CLEPET C, CASAGRANDE A, …… VEZZI A. The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla[J]. *Nature*, 2007, 449(7161): 463–467.
- [8] VELASCO R, ZHARKIKH A, TROGGIO M, CARTWRIGHT D A, CESTARO A, PRUSS D, …… MALACARNE G. A high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety[J]. *PLoS One*, 2007, 2(12): e1326.
- [9] ZHANG Y, FENG J C. Identification and characterization of the grape WRKY family[J]. *BioMed Research International*, 2014, 2014(20): 787680.
- [10] RYU H S, HAN M, LEE S K, CHO J I, RYOO N. A comprehensive expression analysis of the WRKY gene superfamily in rice plants during defense response[J]. *Plant Cell Reports*, 2006, 25(8): 836–847.
- [11] MALECK K, LEVINE A T, MORGAN A, SCHMID J, LAWTON K, DANGL J, DIETRICH R A. The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance[J]. *Nature Genetics*, 2000, 26(4): 403–410.
- [12] WANG L J, LI S H. Thermotolerance and related antioxidant enzyme activities induced by heat acclimation and salicylic acid in grape (*Vitis vinifera* L.) leaves[J]. *Plant Growth Regulation*, 2006, 48(2): 137–144.
- [13] MARCHIVE C, MZID R, DELUC L, BARRIEU F, PIRRELLO J, GAUTHIER A, CORIO-COSTET M F, REGAD F, CAILLETEAU B, HAMDI S, LAUVERGEAT V. Isolation and characterization of a *Vitis vinifera* transcription factor, VvWRKY1, and its effect on responses to fungal pathogens in transgenic tobacco plants[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2007, 58(8): 1999–2010.
- [14] MZID R, MARCHIVE C, BLANCARD D, DELUC L, BARRIEU F, CORIO-COSTET M F, DRIRA N, HAMDI S, LAUVERGEAT V. Overexpression of VvWRKY2 in tobacco enhances broad resistance to necrotrophic fungal pathogens[J]. *Physiologia Plantarum*, 2007, 131(3): 434–447.
- [15] GUILLAUMIE S, MZID R, MÉCHIN V, LÉON C. The grapevine transcription factor WRKY2 influences the lignin pathway and xylem development in tobacco[J]. *Plant Molecular Biology*, 2010, 72(1): 215–234.
- [16] LIU H, YANG W, LIU D, HAN Y, ZHANG A, LI S. Ectopic expression of a grapevine transcription factor VvWRKY11 contributes to osmotic stress tolerance in *Arabidopsis*[J]. *Molecular Biology Reports*, 2011, 38(1): 417–427.
- [17] 王跃进, 贺普超. 葡萄白腐病和黑痘病抗性鉴定方法[J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 1988, 16(3): 17–21.  
WANG Yuejin, HE Puchao. Identification method of resistance of *Vitis* evaluated to grape anthracnose and grape white rot[J]. *Journal of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry (Natural Science Edition)*, 1988, 16(3): 17–21.
- [18] WAN Y, SCHWANINGER H, HE P, WANG Y J. Comparison of resistance to powdery mildew and downy mildew in Chinese wild grapes[J]. *Vitis*, 2007, 46(3): 132–136.
- [19] CAI D, KLEINE M, KIFLE S, HARLOFF H J, SANDAL N N, MARCKER K A, KLEIN-LANKHORST R M, SALENTIJN E M J, LANGE W, STIEKEMA W J, WYSS U, GRUNDLER F M W, JUNG C. Positional cloning of a gene for nematode resistance in sugar beet[J]. *Science*, 1997, 275(5301): 832–834.
- [20] ÜLKER B, MUKHTAR M S, SOMSSICH I E. The WRKY70 transcription factor of *Arabidopsis* influences both the plant senescence and defense signaling pathways[J]. *Planta*, 2007, 226(1): 125–137.
- [21] 张今今, 王跃进, 王西平, 杨克强, 杨进孝. 葡萄总 RNA 提取方法的研究[J]. *果树学报*, 2003, 20(3): 178–181.  
ZHANG Jinjin, WANG Yuejin, WANG Xiping, YANG Keqiang, YANG Jinxiao. An improved method for rapidly extracting total RNA from *Vitis*[J]. *Journal of Fruit Science*, 2003, 20(3): 178–181.
- [22] AY N, IRMLER K, FISCHER A, UHLEMANN R, REUTER G, HUMBECK K. Epigenetic programming via histone methylation at WRKY53 controls leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*[J]. *The Plant Journal*, 2009, 58(2): 333–346.

- [23] LI D, WAN Y, WANG Y, HE P. Relatedness of resistance to anthracnose and to white rot in Chinese wild grapes[J]. *VITIS—Journal of Grapevine Research*, 2015, 47(4): 213–215.
- [24] PANDEY S P, SOMSSICH I E, HAWES M, RONALD P. The role of WRKY transcription factors in plant immunity[J]. *Plant Physiology*, 2009, 150(4): 1648–1655.
- [25] KIM K C, LAI Z, FAN B, CHEN Z. *Arabidopsis* WRKY38 and WRKY62 transcription factors interact with histone deacetylase 19 in basal defense[J]. *The Plant Cell*, 2008, 20(9): 2357–2371.
- [26] LIPPOK B, BIRKENBIHL R P, RIVORY G, BRÜMMER J, SCHMELZER E, LOGEMANN E, SOMSSICH I E. Expression of AtWRKY33 encoding a pathogen- or PAMP-responsive WRKY transcription factor is regulated by a composite DNA motif containing W box elements[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2007, 20(4): 420–429.
- [27] XU X, CHEN C, FAN B, CHEN Z. Physical and functional interactions between pathogen-induced *Arabidopsis* WRKY18, WRKY40, and WRKY60 transcription factors[J]. *The Plant Cell*, 2006, 18(5): 1310–1326.
- [28] ZHENG Z, MOSHER S L, FAN B, KLESSIG D F, CHEN Z. Functional analysis of *Arabidopsis* WRKY25 transcription factor in plant defense against *Pseudomonas syringae*[J]. *BMC Plant Biology*, 2007, 7(1): 2–10.
- [29] LI H, XU Y, XIAO Y, ZHU Z, XIE X, ZHAO H, WANG Y. Expression and functional analysis of two genes encoding transcription factors, VpWRKY1 and VpWRKY2, isolated from Chinese wild *Vitis pseudoreticulata*[J]. *Planta*, 2010, 232(6): 1325–1337.
- [30] MARCEL S, SAWERS R, OAKELEY E, ANGLIKER H, PASZKOWSKI U. Tissue-adapted invasion strategies of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*[J]. *Plant Cell*, 2010, 22(9): 3177–3187.
- [31] MURRAY S L, INGLE R A, PETERSEN L N, DENBY K J. Basal resistance against *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis* involves WRKY53 and a protein with homology to a nematode resistance protein[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2007, 20(11): 1431–1438.
- [32] WANG D, WEAVER N D, KESARWANI M, DONG X. Induction of protein secretory pathway is required for systemic acquired resistance[J]. *Science*, 2005, 308(5724): 1036–1040.
- [33] HENANFF G L, FARINE S, KIEFFER-MAZET F, MICLOT A S, HEITZ T, MESTRE P, BERTSCH C, CHONG J. *Vitis vinifera* VvNPR1.1, is the functional ortholog of AtNPR1, and its overexpression in grapevine triggers constitutive activation of PR, genes and enhanced resistance to powdery mildew[J]. *Planta*, 2011, 234(2): 405–417.

### 欢迎订阅2018年《果树学报》

《果树学报》是中国农业科学院郑州果树研究所主办的国家级学术期刊,分别被有关权威期刊评价机构评为中国精品科技期刊、中国农林水产类权威学术期刊、中文园艺学核心期刊、中国科技核心期刊,已被中国科学引文数据库(核心库)、美国化学文摘(CA)、英国CABI等20余种国内外重要数据库收录。2016年10月《中国科技期刊引证报告》(核心版)中本刊总被引频次2781,影响因子为1.157;12月中国科学文献计量评价研究中心(中国知网)中本刊复合影响因子为1.603,期刊综合影响因子为1.292,基础研究类影响因子为1.178。已成为国内外有影响的学术期刊之一。《果树学报》着重选发密切结合我国果树科研、教学、生产实际,反映学术水平和动向的优秀稿件,及时报道重大科研成果、阶段性成果和科研进展情况。栏目设置有种质资源·遗传育

种·分子生物学、栽培·生理·生态、植物保护·果品质量与安全、贮藏·加工、专论与综述、技术与方法、新品种选育报告等。读者对象为果树学科的科研人员、高等农业院校师生及基层果树管理技术人员。月刊,每期128页码,定价20元,全年12期共240元。邮发代号:36-93,国际代号BM/1107。欢迎投稿,欢迎订阅。

编辑部地址:河南省郑州市航海东路南 中国农业科学院郑州果树研究所

邮编:450009 电话:0371-63387308

E-mail:guoshuxuebao@caas.cn

网址:www.fruitsci.cn

在线投稿:http://gskk.cbpt.cnki.net

