

葡萄霜霉菌异核现象对致病力表现的作用*

李 华

(西北农业大学园艺系)

摘 要

对取自法国不同地区的葡萄霜霉菌群体的孢子囊的观察表明,该菌致病力的差异首先表现在其孢子囊的大小和其中所含有的细胞核数量的差异。通过连续孢子囊移种,由任意取自自然群体的一个孢子囊获得了几个致病力各异的纯系。致病力不同的纯系混合侵染,可提高混合群体的致病力,利用对 *Metalaxyl* 的抗性作标记,证明了不同菌丝体间的细胞核交换现象和异核现象。由于异核现象的作用,霜霉菌的自然群体的致病力可以通过细胞核之间的协生作用达到其最高水平。

关键词 葡萄霜霉菌;致病力;抗药性;异核现象;细胞核交换;协生现象;品种抗病性

一个世纪以来,主要存在于美洲种葡萄中的抗病性被大量用于葡萄抗病育种,并且已经获得很多既抗根瘤蚜又抗真菌病害的欧美杂种。由于这些杂种在很多国家都表现出对霜霉菌 (*Plasmopara viticola* Berl. et de Toni) 的高度抗性,所以在现在的抗霜霉病育种程序中常被用作抗病亲本。但是, Boubals^[1] 的实验表明:葡萄霜霉菌不同群体之间存在着“毒力”的差异。最近发现的对 ANILIDE 系内吸性农药具有抗性的菌系^[6], 进一步证明了葡萄霜霉菌变异的潜在势能。

为了确定葡萄霜霉菌致病力的差异是否能导致病力更强、更能侵染抗病品种菌系的发展,从而克服抗病品种的抗性,作者于1982~1985年在法国波尔多农业研究中心病理研究所就葡萄霜霉菌的致病力和引起群体间致病力差异的原因进行了研究。

材 料 和 方 法

1. 植物材料:离体欧亚种葡萄品种 (*Vitis vinifera* cv. Muscadelle) 幼叶小圆片 (直径12mm)。该葡萄品种的扦插苗栽种于温室营养钵内,株龄为两月左右。

2. 真菌材料:取自法国不同葡萄产区的葡萄霜霉菌的8个自然群体。其孢子囊悬浮液由用无离子水冲洗接种后六天的幼叶圆片上的孢子囊而获得。

3. 接种鉴定技术:将取自三片幼叶的30个圆片置于垫有三层用无离子水浸透的消

本文于1986年4月3日收到。

*M. Clerjeau 提供了研究条件,魏宁生、贺普超教授审阅了全文并提出修改意见,在此一并致谢。

毒滤纸的培养皿中，叶背向上。每片上接种一滴 $25\mu\text{l}$ 含有 5 个孢子囊的悬浮液。接种 24 小时后，用真空管吸掉接种液。将接种后的培养皿在温度为 22°C ，光周期为 12 小时，光照强度为 6000Lx 的人工气候室中放置 6 天后，用 Desaymard 0 ~ 3 ~ 5 ~ 7 ~ 10 记分法^[7]观察记载每个圆片的发病情况。用这种记分法可对观察结果进行方差分析。

4. 孢子囊的显微观察：将孢子囊用醋酸铁胭脂红染色法^[2]染色后，于光学显微镜（放大 1000 倍）下直接观测其细胞核的数量和大小。孢子囊的长、宽度均在由摄影机与显微镜（放大 1000 倍）相连接的电视荧光屏上测得。

5. 单孢子囊移种：将稀释为每毫升 1000 个孢子囊的悬浮液用微吸管置于一薄层琼脂（ $15\text{g}/1$ ）的载片上，在显微镜（放大 200 倍）下用巴斯德吸管取出单个孢子囊并立即转移到置于幼叶圆片背面的水滴中（ $25\mu\text{l}$ ）。连续单孢子囊移种方法如图 1 所示。

为了研究菌系间细胞核的交换，选用了葡萄霜霉菌对内吸性农药 Metalaxyl 的抗性作为遗传标记，并采用了 Clerjeau^[5]所描述的鉴定这种抗性的方法。

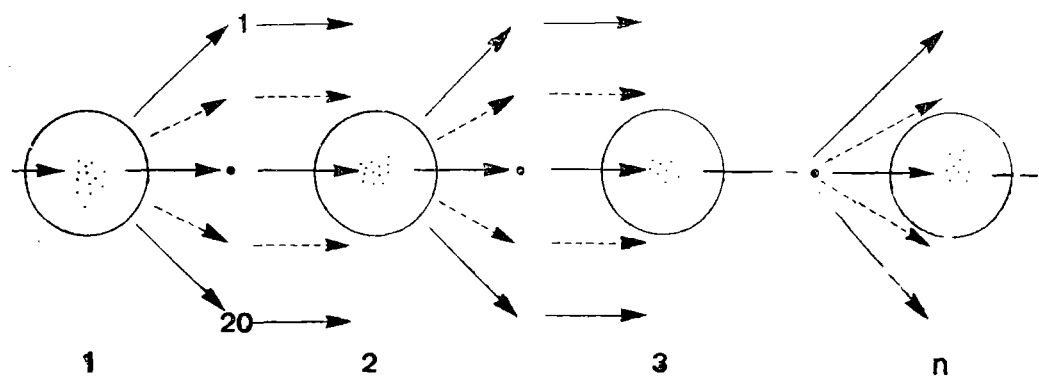


图1 连续单孢子囊移种示意图

1—20：每次移种分离孢子囊20个
n：连续单孢子囊移种次数

结 果

（一）葡萄霜霉菌孢子囊形态的差异

对来自不同地区的霜霉菌自然群体按等量混合的1000个孢子囊的形态观察结果（表 1）表明：孢子囊的大小有很大的差异，其长度在 $5.1\sim35.0\mu\text{m}$ 之间，宽度在 $5.1\sim10.0\mu\text{m}$ 之间。我们所观察到的孢子囊的大小范围比Arnaud^[1]和Nicolaev^[9]所观察到的更大。

表1 1,000个孢子囊按其大小的分布频率

分 级 界 限 (μm)							平均 (μm)
5.1~10	10.1~15	15.1~20	20.1~25	25.1~30	30.1~35		
长度(%)	12	46	28	11	2	1	14.9
宽度(%)	42	46	8	4			11.2

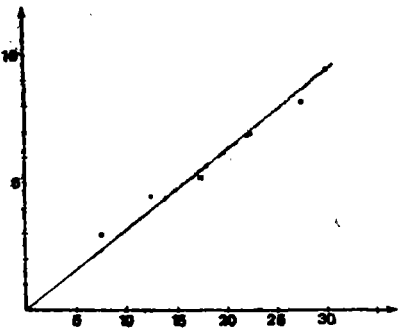


图2 孢子囊长度与细胞核数的关系

纵轴：细胞核数；横轴：孢子囊长度

通过对每个孢子囊中所含有的细胞核数目的观察，发现孢子囊中所含有的细胞核数与孢子囊的大小存在着线性关系（图2）。这与Nicolaev^[9]的研究结果相符。每个孢子囊中细胞核的直径在1~10之间，胞细核的直径在2~4 μm之间。

（二）孢子囊间致病力的差异

我们从供试的8个自然群体的每个群体中分离了20个孢子囊并分别接种到幼叶圆片上。从160个圆片得到的结果（表2）表明，多数孢子囊并不能完成侵染过程，7个自然群体的平均侵染率不超过20%，但群体Cognac 1的平均侵染率可达70%。

表2 孢子囊致病力的分布

自然群体 来 源	接种后第六天的致病力											平 均
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	侵染率(%)
Cognac 1	6	7	2	3	1	1						70
Cognac 2	17	1	1							1		15
Bordeaux	16	3	1									20
Anjou	16	2	2									20
Champagne	17	1	1	1								15
Cotes du Rhone	18	1		1								10
Alsace	17	1	1	1								15
Langue doc	16	3		1								20

注： 侵染率（%）= $\frac{\text{表现病斑的幼叶圆片数}}{\text{接种幼叶圆片数}} \times 100$

每个孢子囊的致病力也有很大的差异。它通常较低（1~3分），但在一些群体中可以较高（Cognac 1：5分：）或很高（Cognac 2：9分）。

对群体Cognac 2进行了9次连续单孢子囊移种的结果(表3)表明，从第七次单孢子囊移种开始，所有能够侵染的孢子囊具有完全相同的性质，其致病力都为7分。这个结果说明，一个群体的孢子囊细胞核可能是不同的，这就造成了由这些细胞核构成的菌系之间的致病力的差异。通过连续的单孢子囊移种可以获得细胞核较一致的孢子囊。这些孢子囊在营养繁殖过程中可以保持同样的结构和性质。

表3 自然群体 Cognac 2 的致病力在连续单孢子囊移种过程中的变化

单孢子囊 移种次数	接种后第六天的致病力											平 均
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	侵染率(%)
1	17	1	1							1		15
3	11		2	3	2	1			1			45
7	3							17				85
8	3							17				85
9	3							17				85

（三）由连续单孢子囊移种获得的菌系之间致病力的差异

我们分别在第三次和第七次单孢子囊移种时对群体Cognac 1 单孢子囊菌系间致病力的差异进行了分析。

在第三次单孢子囊移种时，利用了二个菌系。菌系A取自一个记分为8的圆片，菌系B取自一个记分为2的圆片。对这两个菌系致病力的鉴定结果（图3）表明：菌系A的致病力更强（ $F = 66.161^{**}$ ， $F_{0.005} = 8.89$ ）。此外，这两个菌系致病力的变异范围都较大，而且，菌系A的变异范围（1～9分）显著大于菌系B（0～6分）。

在第七次单孢子囊移种时，每个孢子囊的致病力都很相似（都为7分）。对取自两个不同圆片的菌系C和D致病力的分析表明，这两个菌系的致病力完全相同，而且变异范围很小、很集中（图4）。我们认为在这个时期，这两个菌系已成为单一细胞核构成的纯系。根据这种现象，在单孢子囊连续移种的不同阶段，通过选择记分不同的幼叶圆

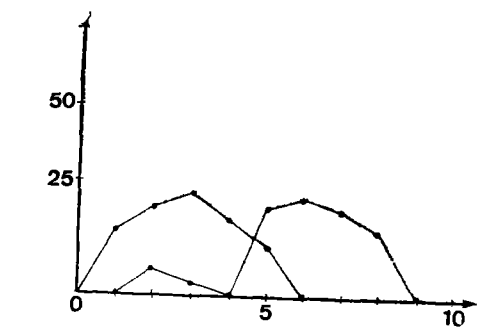


图3 在第三次单孢子囊移种后，来自群体Cognac 1的两菌系的致病力比较

纵轴：百分率(%)；横轴：致病力记分

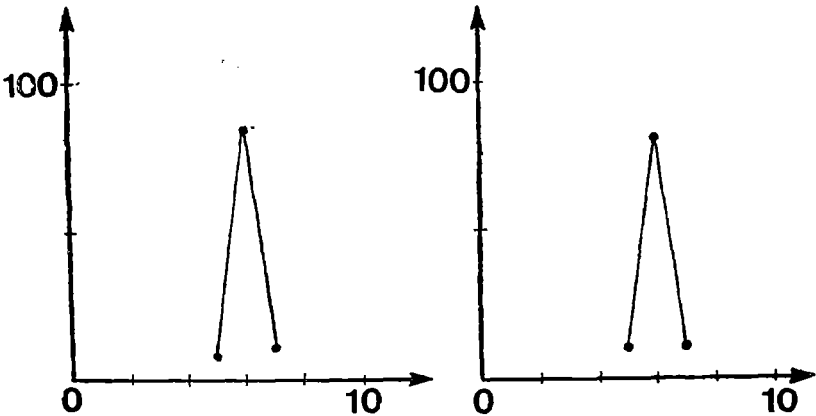


图4 在第七次单孢子囊移种后，来自群体Cognac 1的两菌系的致病力比较

纵轴：百分率(%)；横轴：致病力记分

片，获得了致病力各异的不同的霜霉菌纯系。在本试验中，必须进行6~7个无性代的连续单孢子囊移种才能使葡萄霜霉菌的致病力稳定下来，这说明孢子囊中的细胞核并不是由一个游动孢子的细胞核经有丝分裂而来。

（四）不同纯系间细胞核交换的证明

用一个对内吸性农药Metalaxyl 敏感的纯系（S）和一个抗该农药的纯系（R）等量混合获得人工混合群体（R-S）。将群体（R-S）在离体叶圆片上培养五代后，从中分离了40个孢子囊。对由这40个孢子囊经一代培养获得的40个菌系的抗药性实验表明，所有这40个孢子囊都成为抗药类型（图5A）。在这些菌系中选择一个抗药性较差的菌系（在图5A中带有箭头的菌系），又从这个菌系分离了20个孢子囊。在对由这20个孢子囊经一代培养获得的20个菌系进行抗药性鉴定时，发现其中一个菌系为敏感型（图5B：带箭头的菌系）。这表明：在构成群体（R-S）时，纯系（S）和纯系（R）之间可能存在着细胞核的交换；而通过连续单孢子囊移种又能将S型细胞核和R型细胞核分开。

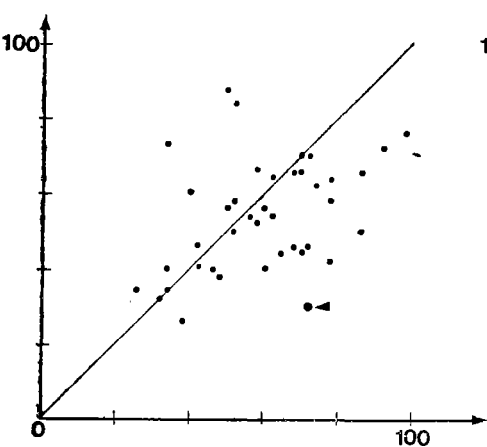


图5A 对取自群体（R-S）的40个孢子囊的抗药性鉴定
箭头表示Sp孢子囊
纵轴：Sm； 横轴：Se

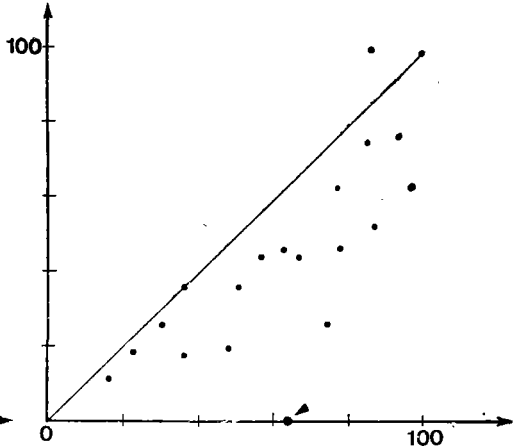


图5B 对取自自由Sp孢子囊产生的菌系的20个孢子囊的抗药性鉴定
箭头表示敏感型菌系，即S型纯系
纵轴Sm：在有 Metalaxyl 溶液条件下产孢量记分，
横轴Se：在无 Metalaxyl 溶液条件下产孢量记分

（五）葡萄霜霉菌异核现象对致病力表现的影响

以上结果表明，葡萄霜霉菌的菌丝体包含着不同的、性质各异的细胞核群体，每一种细胞核控制一定的而且稳定的致病力。为了研究异核现象对葡萄霜霉菌致病力表现的作用，我们比较了纯系A1，A2（这两个纯系由一个孢子囊经连续单孢子囊移种获得），B1，C1及由两个纯系的混合群体（A1+A2）和（B1+C1）的致病力。结果（表4）表明，由两个致病力不同的纯系按等量混合组成的混合群体的致病力高于每个纯系分别接种时的致病力。葡萄霜霉菌的这种由于纯系间的结合而提高致病力的协生现象，与细

胞核上所携带的遗传信息有关，因为纯系A₁和A₂具有相同的细胞质。

表4 纯系间和纯系混合群体间致病力的比较

孢子囊	纯系	接种液浓度 (孢子囊/ml)	平均 致病力*	L. S. D. 0.001
A	A ₁	200	4.93**	0.773
	A ₂	200	3.03**	
	A ₁ + A ₂	100 + 100	6.50**	
B	B ₁	200	6.03 **	0.340
C	C ₁	200	3.40 **	
	B ₁ + C ₁	100 + 100	7.75 **	

*纯系A₁、A₂和A₁ + A₂接种30个幼叶圆片；纯系B₁、C₁和B₁ + C₁接种60个幼叶圆片。

**差异极显著。

讨 论 和 结 语

与藻状菌纲的其他属(如*Phytophthora*、*Bremia*和*Peronospora*等)比较，对葡萄霜霉菌的遗传变异的原因至今研究甚少^[10, 11]。但葡萄霜霉菌的有性繁殖能引起染色体和基因的重组，导致新的生物型(biotype)的产生。此外，基因突变也是引起变异的原因。据Davidse^[6]报道，*Phytophthora* spp. 对 *Metaxyl* 的抗药性可能是由突变引起的。葡萄霜霉菌体细胞的单倍体状态(Bosc, 1946)能促进突变基因的表现，不管突变是显性的还是隐性的。Nicolae^[9]通过对单游动孢子菌系和单孢子囊菌系的孢子囊的显微观察提出了异核假说，和由异核现象而引起的拟性重组(Tinline, 1969)，构成了引起变异的另一因素。

以上所提到的各种引起霜霉菌变异的可能原因，为解释不同菌系或不同孢子囊致病力的差异(表1)提供了依据。研究结果表明，如果为了解释这种差异必须考虑影响细胞核(游动孢子)数的孢子囊大小的差异(图2)，就更应该首先考虑细胞核之间遗传信息的差异。实际上，利用连续单孢子囊移种的方法，可以逐渐减小自然群体变异范围，获得致病力各异但稳定的纯系。特别是，由一个随机在自然群体中取出的孢子囊，可以获得几个致病力完全不同的纯系。这些纯系的致病力，与自然群体或自然群体中的由一个孢子囊自然繁殖的菌系相反，非常稳定(表3，图4)。这些结果都说明，孢子囊中所含有的不同的细胞核，具有不同的确定一定致病力水平的遗传基础。同时，由致病力不同的纯系混合侵染，可以提高群体的致病力(表4)；可以用不同细胞核间决定致病力的遗传信息互补来解释这种纯系间的协生现象。

葡萄霜霉菌孢子囊的异核现象表明，每个孢子囊中的细胞核并不是如 Istvanffi^[8]所解释的那样，由一个原始细胞核，即形成菌丝体以前的游动孢子的细胞核，经有丝分裂后在孢子囊形成过程中进入孢子囊的。相反，我们必须承认不同纯系的菌丝体之间存在着

细胞核的交换,正如我们用对*Metaxyl*具有抗性和不具抗性的纯系的混合群体进行的实验所表明的那样(图5)。关于葡萄霜霉菌菌丝体融合现象还未曾见报道,但Nicolae^[9]提到了在侵入气孔过程中游动孢子之间融合的可能性。为了获得致病力稳定的纯系,必须进行6次以上的连续单孢子囊转移(表3,图3,图4)的事实说明:霜霉菌纯系之间的细胞核交换和由此引起的异核现象是比较频繁的。

综上所述,可将葡萄霜霉菌的自然群体看作由不同的细胞核群体构成的一个系统。在这个系统中,由于各细胞核群体间的异质性及其遗传信息的互补,使它的致病力保持在其最佳水平。所以,应进一步研究在葡萄霜霉菌这一细胞核群体中,抗病葡萄品种是否能逐渐选择致病力强的类型,从而导致致病力强的新生物型的出现和抗病基因失效的可能性。

参 考 文 献

- [1] Arnaud, G., and Arnaud, M.: *Traité de Pathologie Végétale* t. 1. Collection Encyclopédie mycologique III. Lechevalier Ed., Paris, 1931: 993.
- [2] Belling, J.: The iron-acetocarmin method of fixing and staining chromosomes. *Biol. Bull.*, 50, 1926: 160-162.
- [3] Bosc, M.: Sur la structure des noyaux et de la meiose de *Plasmopara viticola* (Berl. et de Toni). *C. R. Acad. Sci.*, Paris, 223, 1946: 584-596.
- [4] Boubals, D.: Contribution à l'étude des causes de la résistance au mildiou de la vigne (*Plasmopara viticola*) et de leur mode de transmission. Thèse Doct. Sci. Nat., Univ. Montpellier. *Ann. Amélior. Plantes*, 9, 1959: 5-233.
- [5] Clerjeau, M., and Simone, J.: Apparition en France de souches de mildiou (*Plasmopara viticola*) résistantes aux fongicides de la famille des anilides (métalaxyl, milfurame). *Prog. Agric. Vitic.*, 99 (3) 1982: 59-61.
- [6] Davidse, L. C.: Acylalanines: resistance in downy mildews, *Pythium* and *phytophthora* spp., 118-127. In J. Dekker and S. G. Georgopoulos, *Fungicide resistance in crop protection*. Wageningen, The Netherlands, 1982.
- [7] Desaynard, P.: Notations et méthodes de notation en phytopharmacie, *Phytopharm.*, 2, 1968: 163-173.
- [8] Istvanffi (de) Gy., and Palinkas Gy.: Etudes sur le mildiou de la vigne, *Rev Vitic.*, XL (1036), 1913: 482-484, 509-513, 540-543.
- [9] Nicolaev, A. V.: Etude de la variation morphologique et biologique à l'intérieur de l'espèce *Plasmopara viticola*, agent du mildiou de la vigne. These, *Inst. Agric. Fruuze* Ed., Kishinev, U. R. S. S., 1972.
- [10] Shaw, D. S.: The Peronosporales: a fungal geneticist's nightmare,

- In S. T. Buczacki: *Zoosporic plant pathogens: a modern perspective*, London, Acad. Pr., 1983: 85-121.
- [11] Shaw, D. S.: The cytogenetics and genetics of *Phytophthora*, In D. C. Erwin, S. Bartnicki-Garcia and P. H. Tsau: *Phytophthora, its biology, taxonomy, ecology and pathology*. Am. Phytopathol. Soc., St. Paul Publ., 1983: 81-94.
- [12] Tinline, R. D.: Parasexuality in plant pathogenic fungi., *Ann. Rev. Phytopath.*, 7, 1969: 149.

INFLUENCE OF PATHOGEN HETEROKARYOSIS ON THE EXPRESSION OF PATHOGENICITY OF *Plasmopara viticola*

Li Hua

(*Department of Horticulture, Northwestern Agricultural University*)

Abstract

The observation of sporocysts in natural populations of *Plasmopara viticola* taken from different vineyards in France shows that the variability of pathogenicity of the parasite is firstly expressed by a great heterogeneity both in the sporocyst size and in the numbers of nuclei (thus, the zoosporocyst numbers) per sporocyst. By means of successive single sporocyst multiplications, several clones with each very probably homokaryotic but different from others in level of aggressiveness, were obtained from one sporocyst taken randomly in a natural population of the parasite. Mixed inoculation with different clones gave a level of aggressiveness higher than that of each clone inoculated separately. Moreover, nuclear exchanges between thalli and heterokaryosis in *P. viticola* were demonstrated. Such heterokaryosis may keep the aggressiveness of the parasite at maximum level as the nuclei of different origins may carry complementary genetic information.

Key Words *Plasmopara viticola*, pathogenicity, fungicide resistance
heterokaryosis, nuclear exchange, synergism, varietal
resistance