内蒙古马铃薯晚疫病菌交配型和生理小种研究

郭 军[1,2],屈冬玉[2],巩秀峰[3],姚裕琪[3],梁德霖[3],康振生[1]

(1 西北农林科技大学 植保学院与陕西省农业分子生物学重点实验室,陕西 杨凌 712100;2 中国农科院蔬菜花卉研究所,北京 100081;3 内蒙古正丰马铃薯种业公司,内蒙古 呼和浩特 010031)

[摘 要] 为了了解和探讨我国内蒙古马铃薯晚疫病菌的表现型多样性,对 1997～1999 年和 2002～2003 年采自内蒙古马铃薯主栽区的 38 个马铃薯晚疫病菌株进行交配型和生理小种研究。结果表明,所有马铃薯晚疫病菌株的交配型均为 A1, A1 交配型在被测菌株中占绝对优势;在 38 个内蒙古供试菌株中,共发现 18 个马铃薯晚疫病菌生理小种,其中以小种 3a. 3b. 4. 7. 10,1. 2. 3a. 3b. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10. 11 和 3a. 3b. 4. 6. 7. 10 发生频率较高,分别占被测菌株的 21. 05 %,13. 16 %和 10. 53 %,并且发现能克服全部 12 个抗病基因的马铃薯晚疫病菌株 5 株,占被测菌株的 13. 16 %,但菌株中克服抗病基因 R2 的菌株比例很小,仅为 15. 8 %。内蒙古马铃薯晚疫病菌株的生理小种与全世界的生理小种变化趋势一致,已越来越复杂化并出现了优势生理小种。

[关键词] 马铃薯晚疫病菌;交配型;生理小种;内蒙古

[中图分类号] S435. 32 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9387(2007)11-0120-05

Investigation of mating type and physiological race of *Phytophthora infestans* from Inner Mongolia

GUO Jun[1,2], QU Dong-yu[2], GONG Xiu-feng[3], YAO Yu-qi[3],
LIANG De-lin[3], KANG Zhen-sheng[1]

(1 *College of Plant Protection and Shaanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi* 712100, *China*;
2 *Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing* 100081, *China*;
3 *Inner Mongolia Zhengfeng Seed Potato Company LTD, Huhhot, Inner Mongolia* 010031, *China*)

Abstract: The isolates of *Phytophthora infestans* were collected from Inner Mongolia from 1997 to 1999 and from 2002 to 2003. Mating type and physiological race were investigated. All thirty eight *P. infestans* isolates collected from Inner Mongolia presented mating type A1. In the 38 isolates tested from Inner Mongolia there were 18 different races. Race 3a. 3b. 4. 7. 10 showed the highest frequency of 21. 05 %, followed by 1. 2. 3a. 3b. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10. 11 3a. 3b. 4. 6. 7. 10 with frequencies of 13. 16 % and 10. 53 %, respectively. Remarkably, five *P. infestans* isolates were virulent to all 12 R genes in potato differentials, however, R2 only took up 15. 8 % of all *P. infstans* isolates. In accordance with changing tendency of *P. infestans* in the world, the physiological race of *P. infestans* in Inner Mongolia became more, and more complex and predominant races were presented.

Key words: *Phytophthora infestans*; mating type; physiological race; Inner Mongolia

[收稿日期] 2007-05-21
[基金项目] 教育部长江学者和创新团队发展计划项目(No. 200558);内蒙古自治区自然科学基金项目(200508010313);中荷联合园艺作物基因组技术实验室资助项目(2001CB711102)
[作者简介] 郭 军(1974 -),男,山东诸城人,讲师,博士,主要从事分子植物病理学研究。E-mail: guojunwgq@nwsuaf. edu. cn

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

由致病疫霉(*Phytophthora infestans*)引起的马铃薯晚疫病是马铃薯的一种毁灭性病害,全世界普遍发生,危害严重,已列为世界粮食作物第一大病害[1]。据估计,全世界范围内由马铃薯晚疫病造成的损失,以及为防治马铃薯晚疫病所需要的花费每年约在 50 亿美元左右,中国每年因马铃薯晚疫病损失近 10 亿美元[2]。内蒙古自治区作为我国重要的马铃薯种薯和商品薯产地,2004 年栽培面积约为 52 万 hm^2,居全国第一,常年鲜薯产量在 93 亿 kg 以上,马铃薯正在逐步成为内蒙古农业的重要支柱产业[3]。然而近年来,由于马铃薯晚疫病菌的频繁变异以及毒性的增强,导致马铃薯晚疫病频繁发生,这不仅给全区马铃薯生产带来严重危害,而且也严重影响了马铃薯产业的发展。

张志铭等[4]1996 年首次报道在内蒙古发现马铃薯晚疫病菌 A2 交配型;姚裕琪等[5]对 1995 年采自呼盟和呼和浩特市的马铃薯晚疫病菌生理小种进行了鉴定,在呼盟发现 1,3,1.3,2.3 等 4 种生理小种,而在呼和浩特市发现 1,3,4,1.3,3.4 等 5 种生理小种;王英华等[6]对 1997～2001 年采自内蒙古马铃薯主栽区的马铃薯晚疫病菌进行了交配型和药剂敏感性测定,结果表明内蒙古马铃薯主栽区的马铃薯晚疫病菌以 A1 交配型占绝对优势,并且普遍对甲霜灵具有抗性。以上这些研究时间较早,并且对马铃薯晚疫病菌的表现型多样性缺乏系统性研究,对目前内蒙古马铃薯晚疫病的防治几乎没有实际的理论和指导意义。

本研究对 1997～1999 年和 2002～2003 年采自内蒙古不同马铃薯主栽区的马铃薯晚疫病菌株进行交配型和生理小种组成分析,以明确近年来该病菌在内蒙古马铃薯主栽区的交配型以及生理小种组成和分布情况,以期为内蒙古地区抗马铃薯晚疫病育种以及防治马铃薯晚疫病提供理论基础和依据。

1　材料与方法

1.1　供试菌株

供试菌株的分离纯化参考文献[7]的方法。供试马铃薯菌株共 38 个,分别采自内蒙古不同马铃薯主栽区的温室或田间地块,每年采集的菌株数量不同,其中从呼和浩特市采集 24 个菌株,扎兰屯采集 3 个菌株,包头市、海拉尔和凉城各采集 2 个菌株,太旗宝昌、伊盟达旗、乌盟农科所、丰镇市和上禿亥各采集 1 个菌株。寄主品种包括巴拉克、费乌瑞它、红纹白、紫花白、内薯 3 号、郑薯 6 号、底西芮、夏波蒂、大西洋、克新 1 号等。

1.2　鉴别寄主

从国际马铃薯中心获得 12 个带有单显性基因(R1-R11)的鉴别寄主,分别为 R1(CEBECO-43154-5;CIP 800986)、R2(CEBECO-44158-4;CIP 800987)、R3a 和 R3b(CEBECO-4642-1;CIP 800988)[8]、R4(CEBECO-4431-5;CIP 800989)、R5(Black 3053-18;CIP 800990)、R6(Black XD2-21;CIP 800991)、R7(Black 2182ef(7);CIP 800992)、R8(Black 2424a(5);CIP 800993)、R9(Black 2573;CIP 800994)、R10(Black 3618ad(1);CIP 800995)、R11(Black 5008ab(6);CIP 800996)。以不含任何抗病基因的马铃薯感病品种 Bintje 为对照。

1.3　马铃薯晚疫病菌交配型的测定

标准菌株为来自荷兰的 80029(A1)和 88133(A2)[9]。将待测菌株与标准菌株在纯化的黑麦琼脂培养基上以 2 cm 间隔培养,18 ℃黑暗条件下培养 10～14 d 后,在显微镜下观察卵孢子的产生。与 A1 标准菌株产生卵孢子的为 A2 交配型,与 A2 标准菌株产生卵孢子的为 A1 交配型,不需交配即能产生卵孢子的为自育型菌株。

1.4　马铃薯晚疫病菌生理小种的鉴定

1.4.1　鉴别寄主的培育　将鉴别寄主种植在温室内的花盆中,采用蛭石、细砂土、农家肥混合土壤,生长期温室温度一般保持在 18～25 ℃,自然光照,待幼苗长到 7～10 个复叶时即可采摘叶片进行接种鉴定。

1.4.2　孢子悬浮液的准备　将待测菌株接种在马铃薯感病品种薯片上进行扩繁,同时也可恢复菌株致病力。一般接种 3～5 d 后,在薯片表面长满白色菌丝及孢子囊,用无菌水将其洗下,用不同孔径的滤网将菌丝及杂质滤掉,将收集到的孢子囊放在 4 ℃冰箱中 2～4 h 诱发游动孢子产生。游动孢子产生后用孔径为 12 μm 的钢丝网过滤得到游动孢子悬浮液,将孢子悬浮液浓度调至 2×10^4～5×10^4 mL^{-1},备用。

1.4.3　接种鉴定　采用离体叶片接种法。将离体叶片放入底部铺有湿滤纸的直径为 15 cm 培养皿中,用微量移液器在叶片背面接种,每个叶片接种 10 μL 孢子悬浮液,每个重复 4 张叶片,每个菌株重复 4 次。接种后将培养皿放在 21 ℃光照培养箱内保湿培养(每天 16 h 光照,8 h 黑暗),培养 5 d 后观察并记录试验结果。如果病斑上有菌丝和孢子囊产生即为感病型;只有坏死斑点或无症状产生即为抗

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

病型。一个菌株至少使 4 片叶中的 3 片叶发病,才能称其为有毒力;一个菌株接种后,4 片叶中只有 1 片叶发病,则不能称其为有毒力,要继续进行重复试验。准确确定菌株是否有毒力后,根据 Black 等[10]的基因对基因系统确定生理小种。

2 结果和分析

2.1 马铃薯晚疫病菌交配型的分析结果

通过待测菌株与标准菌株进行交配型测定,结果表明,所有供试的 38 个内蒙古马铃薯晚疫病菌株的交配型均为 A1 交配型,未检测到 A2 交配型菌株。说明马铃薯晚疫病菌 A1 交配型在被测菌株中占绝对优势。

2.2 马铃薯晚疫病菌生理小种的鉴定结果

在 38 个内蒙古马铃薯晚疫病菌被测菌株中,共发现 18 个生理小种,其中以小种 3a. 3b. 4. 7. 10, 1. 2. 3a. 3b. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10. 11 和 3a. 3b. 4. 6. 7. 10 发生频率较高,分别占被测菌株的 21. 05 %, 13. 16 %和 10. 53 %,表明在内蒙古已出现了优势生理小种。此外,发生比较普遍的生理小种还有 3a. 3b. 4. 6. 7. 8. 10 和 3a. 3b. 4. 6. 7. 8. 10. 11,2 个生理小种发生频率相等,均占被测菌株的 7. 89 %(表 1)。

表 1 内蒙古马铃薯晚疫病菌生理小种的组成和分布

Table 1 Composition and distribution of *Phytophthora infestans* physiological race in Inner Mongolia

生理小种 Physiological race	发生频率/ % Frequency	地区分布 Distribution	菌株数 No. of isolate	采集年份 Year	寄主品种 Variety
10	2.63	呼和浩特 Huhhot	1	1998	巴拉克 Braka
4.7	2.63	扎兰屯 Zhalantun	1	1999	扎 2 J # 2
7.8	2.63	海拉尔 Hailaer	1	1998	费乌瑞它 Favorita
3a.3b.7	2.63	伊盟达旗 Yimengdaqi	1	1998	达 4 Da # 4
3a.3b.7.8	2.63	上禿亥 Shangtuhai	1	2002	费乌瑞它 Favorita
3a.3b.7.10	5.26	包头 Baotou	1	1998	包 1 Bao # 1
		丰镇 Fengzhen	1	2002	紫花白 Zihuabai
3a.3b.4.7.10	21.05	呼和浩特 Huhhot	6	1998 ,1999 ,2002	费乌瑞它 Favorita 内薯 3 号 Neishu # 3 底西芮 Desiree 夏波蒂 Sheopdy 巴拉克 Braka
		包头 Baotou	1	1998	包 3 Bao # 3
		凉城 Liangcheng	1	2002	夏波蒂 Sheopdy
3a.3b.6.7.10	2.63	呼和浩特 Huhhot	1	1999	紫花白 Zihuabai
3a.3b.7.8.10	2.63	凉城 Liangcheng	1	2002	费乌瑞它 Favorita
3a.3b.4.6.7.10	10.53	呼和浩特 Huhhot	4	1999 ,2002 ,2003	郑薯 6 号 Zhengshu6 紫花白 Zihuabai 大西洋 Atlatic
3a.3b.4.7.8.10	5.26	呼和浩特 Huhhot	1	1999	呼 1 Hu # 1
		太旗宝昌 Taiqibaochang	1	1998	太 1 Tai # 1
3a.3b.6.7.8.10	2.63	扎兰屯 Zhalantun	1	1999	扎 5 J # 5
3a.3b.4.6.7.8.10	7.89	呼和浩特 Huhhot	3	1998	巴拉克 Braka
3a.3b.4.6.7.8.9.10	2.63	海拉尔 Hailaer	1	1998	红纹白 Hongwenbai
3a.3b.4.6.7.8.10.11	7.89	呼和浩特 Huhhot	2	1998	巴拉克 Braka
		乌盟 Wumeng	1	1998	紫花白 Zihuabai
1.2.3a.3b.4.5.6.7.8.10.11	2.63	扎兰屯 Zhalantun	1	1997	扎 1 J # 1
1.3a.3b.4.5.6.7.8.9.10.11	2.63	呼和浩特 Huhhot	1	2003	紫花白 Zihuabai
1.2.3a.3b.4.5.6.7.8.9.10.11	13.16	呼和浩特 Huhhot	5	2003	费乌瑞它 Favorita 97110; 87110; 53-109; 克新 1 号 Kexin # 1

本研究中共采用了含 12 个单基因和 1 个不含抗病基因的鉴别寄主进行了研究。值得注意的是,在被测菌株中发现能克服全部 12 个抗病基因的菌株 5 个,占被测菌株的 13. 16 %。这些菌株为 2003 年从内蒙古呼和浩特采集,研究表明,近年来内蒙古地区马铃薯晚疫病菌生理小种呈现不断变异、致病性增强的趋势,这将给我国马铃薯晚疫病的抗病育种工作带来一定困难。在鉴别寄主所有的抗病基因中,抗病基因 R7 能被 97. 4 %的病菌克服,其次为 R3a、R3b、R10,被病菌克服的比例分别为 92. 1 %,

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

92.1 %,89.5 %,结果表明在内蒙古马铃薯主栽区,含有以上 4 个抗病基因的品种已丧失了对马铃薯晚疫病的抗性。相比而言,抗病基因 R2 被马铃薯晚疫病菌克服的比例较小,仅为 15.8 %,同样,抗病基因 R1、R5、R9 也仅被 18.4 %,18.4 %,18.4 %的菌株克服(图 1)。

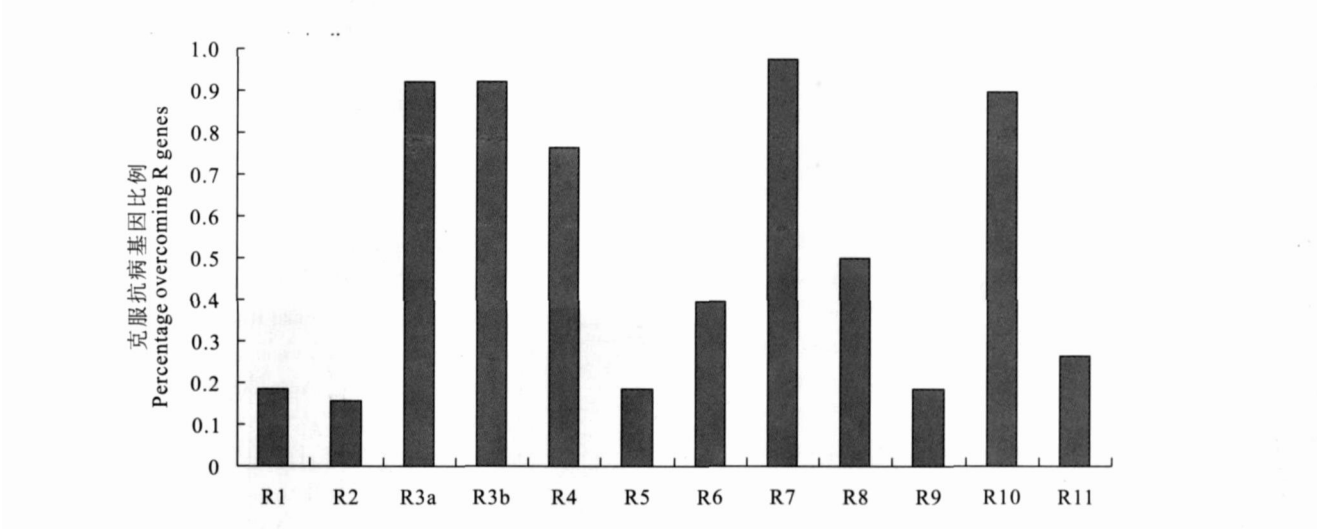

图 1　内蒙古马铃薯晚疫病菌克服鉴别寄主抗病基因的比例

Fig. 1　Percentage of *P. infestans* from Inner Mongolia overcoming R genes in differentials

3　讨　论

1956 年 Niederhauser 首次报道在墨西哥中部发现了大量马铃薯晚疫病菌卵孢子,表明在墨西哥存在 A2 交配型菌株,直到 20 世纪 70 年代初其他国家一直未发现 A2 交配型[11]。然而,1984 年 Hohl 等[12]报道在瑞士发现 A2 交配型后,欧洲、美洲、亚洲、非洲的许多国家都先后报道发现了 A2 交配型[13-15]。A2 交配型的出现意味着马铃薯晚疫病菌可以产生卵孢子,卵孢子可以在土壤中越冬成为新的初侵染来源;且其有性生殖可以顺利实现,在有性生殖过程中发生基因重组,可能形成新的致病力更强的菌系。因此,马铃薯晚疫病菌 A2 交配型的研究是全世界各国植物病理学家非常关注的课题。1996 年,我国首次报道在内蒙古和山西发现 A2 交配型[4],之后朱杰华等[7]在河北、四川、黑龙江等地陆续发现了 A2 交配型,说明马铃薯晚疫病菌 A2 交配型在我国已经存在。本研究中所有采自内蒙古的马铃薯晚疫病菌均为 A1 交配型,这与王英华等[6]的研究结果较一致,未发现 A2 交配型菌株的原因可能与本试验采集的菌株数量较少,以及采集地点未覆盖全部内蒙古地区有关。因此,要搞清楚目前内蒙古马铃薯晚疫病菌株交配型的分布情况,不仅需要加大菌株的采集数量和采样地点,而且应从不同寄主或寄主的不同部位采集以及采集年份的连续性。

关于马铃薯晚疫病菌的生理小种,国外也有一些相关报道,如 1992 年 Schober 等[16]报道在 77 个荷兰菌株中鉴定出 25 个生理小种;1994 年 Andrivon[17]报道在 1991～1993 年采集的 116 个法国菌株中鉴定出 19 个生理小种,优势小种为 1.3.4.7.11,1.3.4.7.8.11 和 1.3.4.7.10.11,未发现能克服 R2 和 R6 的菌株;2002 年 Knapova 等[18]发现在法国和瑞士已出现明显的优势小种,即 1.3.4.7.10.11,1.3.4.6.7.10.11,1.3.4.7.8.10.11 和 1.3.4.6.7.8.10.11,在被测的 134 个菌株中有 122 个菌株属于这 4 个优势小种。本研究中,内蒙古马铃薯晚疫病菌生理小种 3a.3b.4.7.10,1.2.3a.3b.4.5.6.7.8.9.10.11 和 3a.3b.4.6.7.10 为优势生理小种,说明我国内蒙古马铃薯晚疫病菌生理小种的变化趋势与全世界较一致,已越来越复杂化。比较本试验结果和我国 20 世纪 60 年代的生理小种组成情况[19]发现,马铃薯晚疫病菌小种的组成与分布较 60 年代复杂得多,不仅小种数量增多,而且供试的全部 12 个抗病基因均能被克服,特别是内蒙古马铃薯晚疫病菌生理小种在 2003 年出现 5 株能克服全部抗病基因的菌株,进一步说明近年来内蒙古马铃薯晚疫病菌的侵染能力逐步增强。本试验结果说明,一方面,可能是由于病菌的有性生殖促进了病菌生理小种组成的多样性;另一方面,随着含有不同抗病基因的抗病品种的推广,病菌中新的致病基因和新的生理小种会不断产生,这就要求育种工作者加快培育马铃薯

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

晚疫病抗病品种,特别是具有水平抗性的品种,并结合其他农业措施,从根本上综合防治马铃薯晚疫病的发生。

[参考文献]

[1] Erwin D C, Ribeiro O K. Phytophthora disease worldwide[M]. Saint Paul, MN: APS Press, 1996.

[2] Duncan J M. Phytophthora-an abiding treat to our crops[J]. Microbiology Today, 1999, 26: 114-116.

[3] 屈冬玉,谢开云,金黎平,等. 中国马铃薯产业发展与技术需求[C]// 第五届世界马铃薯大会组委会. 第五届世界马铃薯大会文集. 昆明:云南美术出版社, 2004: 84-86.

[4] 张志铭,李玉琴,田世民. 中国发现马铃薯晚疫病菌(*Phytophthora infestans*) A2 交配型[J]. 河北农业大学学报, 1996, 16(4): 63-65.

[5] 姚裕琪,梁德霖,梁东超. 内蒙古马铃薯晚疫病病菌生理小种的组成及分布[J]. 内蒙古农业科技, 1996, 1: 17-18.

[6] 王英华,国立耘,梁德霖,等. 马铃薯晚疫病菌在内蒙古和甘肃的交配型分布及对几种杀菌剂的敏感性[J]. 中国农业大学学报, 2003, 8(1): 78-82.

[7] 朱杰华,张志铭,李玉琴. 马铃薯晚疫病菌(*Phytophthora infestans*) A2 交配型的分布[J]. 植物病理学报, 2000, 30(4): 375.

[8] Huang S, Vleeshouwers V G A A, Werij J S, et al. The R3 resistance to *Phytophthora infestans* in potato is conferred by two closely linked R genes with distinct specificities[J]. Molecular Plant-Microbe Interaction, 2004, 17: 428-435.

[9] van der Lee T, De Witte I, Drenth A, et al. AFLP linkage map of the oomycete *Phytophthora infestans*[J]. Fungal Genetics and Biology, 1997, 21: 278-291.

[10] Black W, Mastenbrock C, Mills W R. A proposal for an international nomenclature of races *Phytophthora infestans* and of genes controlling immunity in *Solanum demissum* derivaties[J]. Phytopathology, 1953, 2(3): 173-179.

[11] Niederhauser J S. The blight, the blighter, and the blighted[J]. Transactions of the New York Academy of Science, 1956, 19: 55-63.

[12] Hohl H R, Iselin K. Strains of *Phytophthora infestans* with A2 mating type behaviour[J]. Transactions of the British Mycological Society, 1984, 83: 529-530.

[13] Tantius P M, Fyfe A M, Shaw D S. Occurrence of the A2 mating type and self-fertile isolates of *Phytophthora infestans* in England and Wales[J]. Plant Pathology, 1986, 35: 578-581.

[14] Deahl K L, Goth R W, Young R. Occurrence of the A2 mating type of *Phytophthora infestans* in potato fields in the United States and Canada[J]. American Potato Journal, 1991, 68: 717-725.

[15] Mosa A A, Kobayashi K, Ogoshi A. Formation of oospores by *Phytophthora infestans* in potato tissues[J]. Annuals of the Phytopathologial Society of Japan, 1991, 57: 384-388.

[16] Schober B, Turkensteen L J. Recent and future developments in potato fungal pathology[J]. Netherlands Journal of Plant Pathology, 1992, 98(Suppl. 2): 73-83.

[17] Andrivon D. Races of *Phytophthora infestans* in France, 1991 - 1993[J]. Potato Research, 1994, 100(2): 97-107.

[18] Knapova G, Gisi U. Phenotypic and genotypic structure of *Phytophthora infestans* populations on potato and tomato in France and Switzerland[J]. Plant Pathology, 2002, 51: 641-653.

[19] 黄 河,程汉清,徐天宇. 我国北部马铃薯晚疫病菌生理小种的发生和变化[J]. 植物病理学报, 1981, 11(1): 45-49.

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net