

杨 芮,方治国,詹家绥,等. 马铃薯晚疫病病菌在贵州和云南的交配型分布与卵孢子生物学特性分析[J]. 江苏农业科学,2014,42(7):122-124.

# 马铃薯晚疫病病菌在贵州和云南的交配型分布与卵孢子生物学特性分析

杨 芮,方治国,詹家绥,祝 雯,潘 贤

(福建农林大学植物病毒研究所,福建福州 350002)

**摘要:**贵州省与云南省是我国重要的马铃薯种植区,为了明确马铃薯晚疫病病菌在这 2 个省份的交配型分布情况和致病疫霉菌卵孢子的生物学特性,采用对峙培养的方法对 2010—2012 年采集自贵州省和云南省的马铃薯晚疫病病菌菌株进行了交配型测定,并采用 MTT 染色法和隔膜培养法研究马铃薯晚疫病病菌自育型菌株的卵孢子生物学特性。结果表明:在测菌株中,自育型为优势菌株,比例高达 91%,2 个省间并没有显著性差异;贵州省和云南省 2 个群体的致病疫霉菌卵孢子平均活性率均随培养时间的增加而下降;同时自育型菌株更容易诱导 A1 交配型产生卵孢子。

**关键词:**马铃薯晚疫病病菌;交配型;自育型;卵孢子

**中图分类号:** S432.1;S435.32

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1002-1302(2014)07-0122-03

致病疫霉 [*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary] 是马铃薯晚疫病的病原菌,由该菌引起的马铃薯晚疫病是一种全球普遍发生、造成马铃薯严重损失的毁灭性病害<sup>[1]</sup>,曾在 19 世纪 40 年代造成过举世震惊的“爱尔兰饥饉”。目前我国马铃薯种植面积已达世界第一位,马铃薯晚疫病的大面积暴发严重制约了我国马铃薯产业<sup>[2-3]</sup>。致病疫霉是一种异宗配合的卵菌,1956 年 Niederhauser 在墨西哥中部首次发现 A2 交配型以及大量卵孢子<sup>[4]</sup>。在 1984 年之前,A2 交配型一直被认为仅存在于墨西哥中部,其他地区仅有 A1 交配型,只通过游动孢子与孢子囊进行无性生殖<sup>[5-6]</sup>。直到 1984 年在瑞士首次检测到 A2 交配型后<sup>[7]</sup>,在欧洲、美洲、非洲、亚洲包括中国在内的许多国家先后发现了 A2 交配型。Fry 等指出致病疫霉 A2 交配型菌株的出现和迁移是近些年全球晚疫病再度大规模暴发的直接原因<sup>[8]</sup>。当致病疫霉群体在同一个地方同时出现 A1 交配型与 A2 交配型或者存在自育型时,有性生殖就有可能发生,有性生殖不仅会产生具厚壁抗逆性强的卵孢子作为初侵染源,还提供了遗传重组的机会,导致出现致病力更强的生理小种<sup>[9]</sup>,从而增加了病害防治的难度。

马铃薯晚疫病病菌交配型的研究一直以来都是研究其群体遗传的主要内容之一,尤其是自育型菌株的发现预示着马铃薯晚疫病病菌的生殖过程出现了新规律,因此卵孢子在晚疫病流行病学中的存在机理和作用机制成为目前植物病理学家关注的焦点<sup>[10]</sup>。本研究旨在明确我国贵州省与云南省马铃薯主产区的交配型分布和自育型菌株卵孢子的生物学特性,推测马铃薯晚疫病病菌的主要生殖方式和有性生殖可能发生的概率,为进行科学规范施药与合理选用抗性品种相结合的

防治方针提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试菌株

用来进行交配型鉴定的供试菌株采自 2010—2012 年贵州省和云南省的 4 个群体共 398 株,采集地点与时间见表 1。标准菌株 A1 交配型和 A2 交配型由福建省农科院提供。

用来研究卵孢子活性的供试菌株的 18 株自育型菌株,采集自贵州病(编号为 AS)与云南病(编号为 YN)。在马铃薯晚疫病病菌自育型菌株诱导 A1、A2 产生卵孢子的研究中,供试菌株中自育型主要来源于贵州、云南 2 省群体,A1 交配型菌株主要来源于湖南、广西、福建群体(编号分别为 HN、GN 和 F),2 个标准 A2 交配型(编号为 FP082001 和永泰 6)由福建省农科院提供。

### 1.2 马铃薯晚疫病病菌的交配型测定

将待测菌株与标准菌株以 2 cm 间隔对峙培养在黑麦琼脂培养基上,在 18 ℃ 的黑暗条件下培养 2 周后,用光学显微镜观察是否生成卵孢子。与 A1 标准菌株对峙培养后产生卵孢子,且与 A2 标准菌株对峙培养不产生卵孢子的菌株称为 A2 交配型菌株,反之则为 A1 交配型菌株,不需要对峙培养就能产生卵孢子的菌株为自育型菌株。

### 1.3 马铃薯晚疫病病菌自育型卵孢子活性研究

将纯化后的供试菌株接入直径为 9 cm 的培养皿中,每个菌株重复 2 次。在 19 ℃ 黑暗条件下培养,分别在 12、15、18、21 d 之后收集菌丝,每次用接种针刮取菌丝,加入 400 μL 0.05% MTT 染液,37 ℃ 水浴 48 h。在光学显微镜下统计不同颜色卵孢子的数量,并计算卵孢子活性率。卵孢子被染为蓝色说明卵孢子处在度过休眠期进入萌发的状态;玫瑰红或者紫色说明卵孢子具有活性,但处于休眠期;黑色或未染色表示卵孢子已经丧失活力<sup>[11]</sup>。

### 1.4 马铃薯晚疫病病菌自育型诱导 A1、A2 型产生卵孢子研究

将纯化后的供试菌株接入直径为 9 cm 的培养皿中,上层

收稿日期:2014-03-18

基金项目:国家现代农业马铃薯产业技术体系(编号:CARS-10);福建省教育厅项目(编号:JA12126)。

作者简介:杨 芮(1988—),女,河南洛阳人,硕士研究生,主要从事植物病理学方向的研究。E-mail:yangrui8891@163.com。

通信作者:潘 贤,女,硕士,助理实验师,主要从事植物病理学方面的研究。E-mail:panxian218@163.com。

接自育型菌丝块,下层接 A1 或者 A2 菌丝块,中间放置 1 张微孔滤膜(滤膜直径为 9 cm,孔径为 0.22 μm)。在 19 ℃ 黑暗条件下培养 20 d,用光学显微镜观察 A1 交配型、A2 交配型、自育型菌株是否产生卵孢子。

1.5 统计分析

运用 Excel 2007 和 SPSS 21.0 软件对研究结果进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 马铃薯晚疫病病菌交配型频率与分布

如表 1 所示,分离自贵州、云南群体中的 431 个马铃薯晚疫病病菌菌株绝大多数为自育型,比例高达 91%,其中 2010 年云南会泽群体的 97 个菌株、2011 年贵州安顺群体的 117 个菌株与 2012 年云南昆明群体的 90 个菌株交配型均为自育型,2012 年贵州安顺群体的 127 个菌株中也发现 70% 的自育型菌株,余下的 30% 为 A1 交配型。本研究未发现 A2 交配型菌株。2012 年贵州群体中 A1 交配型与自育型的同时出现表明马铃薯晚疫病病菌交配型的组成复杂化。

表 1 不同群体的马铃薯晚疫病交配型分布

采集地点	采集年份	总菌株数(株)	交配型			
			A1 交配型(株)	A2 交配型(株)	自育型(株)	自育型比率(%)
云南会泽	2010	97	0	0	97	100
贵州安顺	2011	117	0	0	117	100
贵州安顺	2012	127	38	0	89	70
云南昆明	2012	90	0	0	90	100
总计		431	38	0	393	91

2.2 马铃薯晚疫病病菌卵孢子活性

图 1 为通过光学显微镜观察到的马铃薯晚疫病病菌卵孢子 MTT 染色图,未检测到被染成蓝色的卵孢子。不同群体之间马铃薯晚疫病自育型病菌在不同时间下检测卵孢子的活性研究结果见表 2(表 2 中数据为 2 次重复的平均值)。贵州群体马铃薯晚疫病自育型菌株的卵孢子活性率为 12.83%,云南群体马铃薯晚疫病自育型菌株的卵孢子活性率为 13.81%。利用 SPSS 21.0 软件分别对不同群体之间的马铃薯晚疫病自育型菌株卵孢子活性率进行多重比较(新复极差法),结果表明:贵州与云南这 2 个群体之间没有显著性差异( $P>0.05$ ,表中未列)。

不同培养时间的马铃薯晚疫病自育型菌株卵孢子活性率的多重比较结果如表 3 所示:除卵孢子培养 15 d 与 18 d 之间没有显著性差异、卵孢子培养 18 d 与 21 d 之间有显著性差异外,其他培养天数之间的比较均有极显著差异。此外研究结果还表明贵州和云南 2 省的马铃薯晚疫病自育型菌株的卵孢子平均活性率与培养天数成反比,尤其到培养 21 d 时,卵孢子的平均活性率在 5% 之下。

2.3 马铃薯晚疫病自育型病菌诱导 A1、A2 型产生卵孢子

马铃薯晚疫病自育型病菌诱导 A1 和 A2 交配型产生卵孢子研究结果如表 4 所示:60 个马铃薯晚疫病自育型菌株与 A1 型菌株组合中有 28 个组合检测到了卵孢子,比例为 47%;12 个自育型与 A2 型菌株组合中有 3 个组合检测到了卵孢子,比例为 25%。研究结果说明自育型能够分别诱导 A1 交配型、A2 交配型产生卵孢子,并且在自育型的诱导下,A1 交

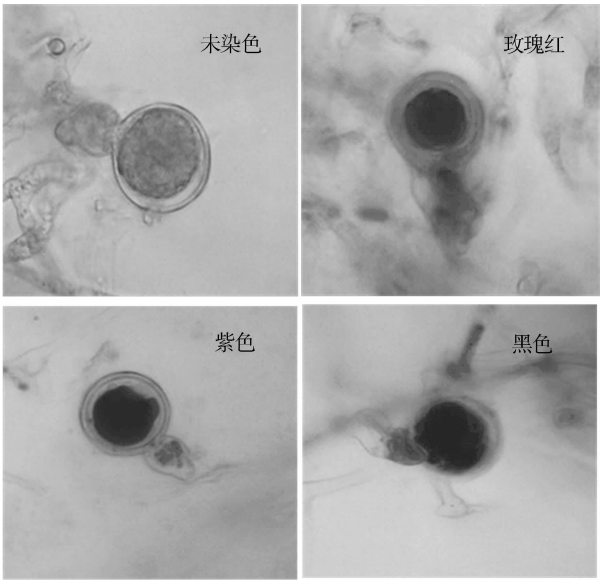


图 1 马铃薯晚疫病病菌卵孢子的 MTT 染色

表 2 不同群体之间马铃薯晚疫病自育型病菌在不同培养时间下的卵孢子活性率

菌株编号	采集地点	有活性的卵孢子数(个)				平均活性率(%)
		12 d	15 d	18 d	21 d	
AS1	贵州	4	3	0	2	12.83
AS2	贵州	64	30	17	20	
AS6	贵州	4	3	1	4	
AS8	贵州	33	31	7	10	
AS29	贵州	22	7	0	0	
AS38	贵州	55	17	17	14	
AS41	贵州	9	5	0	3	
AS45	贵州	39	18	4	5	
AS115	贵州	19	0	0	3	
YN1	云南	—	14	11	2	
YN8	云南	—	3	10	5	13.81
YN9	云南	12	9	17	4	
YN11	云南	82	15	6	6	
YN16	云南	—	2	5	2	
YN17	云南	22	40	13	13	
YN21	云南	41	6	13	4	
YN78	云南	22	12	10	8	
YN93	云南	—	0	9	2	

注:“12 d、15 d、18 d、21 d”表示培养 12、15、18、21 d 后进行观察。“—”表示没有观察到卵孢子。

表 3 不同培养时间的马铃薯晚疫病自育型菌株卵孢子活性率的多重比较结果

培养时间(d)	平均活性率(%)
12	33.25aA
15	10.23bB
18	8.75bBC
21	4.20cC

注:同列数据后标有不同大、小写字母者分别表示差异极显著( $P<0.01$ )、显著( $P<0.05$ )。

配型的菌株产生卵孢子的概率较 A2 交配型菌株产生卵孢子的概率大,而且不同菌株组合产生卵孢子的能力不一样。此外不同自育型诱导菌株产生的卵孢子能力也不一样,这可能

是由菌株活力不同造成的,例如 YN20 自育型菌株仅诱导 2 个菌株产生了卵孢子;而 AS29 自育型菌株与 A1 交配型与 A2 交配型的 12 个组合中有 9 个组合产生了卵孢子。

表 4 不同自育型对诱导 A1 和 A2 型菌株产生卵孢子的影响

类型	菌株编号	自育型					
		AS6	AS29	AS116	YN5	YN7	YN20
A1 型	HN1	+	+	+	+	+	+
	HN2	-	+	-	-	-	-
	HN6	+	+	+	+	+	-
	HN20	-	+	-	+	+	+
	GN1	+	-	+	-	+	-
	GN33	-	+	+	-	-	-
	GN13	-	+	-	-	-	-
	F43	-	-	-	-	-	-
	F9	+	+	-	+	N	-
	F52	+	+	+	+	N	-
A2 型	FP082001	-	-	-	+	-	-
	永泰 6	-	+	-	+	-	-

注:“+”表示检测到卵孢子,“-”表示没有检测到卵孢子。

3 结论与讨论

本研究对 2010—2012 年贵州与云南 2 省马铃薯主产区的马铃薯晚疫病病菌进行交配型测定,结果表明自育型菌株为优势菌株(共 431 个菌株,自育型比例为 91%),近年来也有许多同类研究结果表明自育型菌株在中国马铃薯种植区出现:黄河早在 1964 年就曾发现过同宗配合菌株<sup>[12]</sup>;2001 年和 2007 年,赵志坚等在云南分离到自育型菌株<sup>[13]</sup>;Han 等<sup>[14]</sup>与王英华等<sup>[15]</sup>分别在 2007 年与 2003 年在甘肃省发现自育型菌株;2008 年,李本金等在福建连城发现自育型菌株<sup>[16]</sup>;2008 年,杨继峰等在内蒙古发现 13 株马铃薯晚疫病自育型病菌,占被测菌株的 13.8%<sup>[17]</sup>;2009 年,马云芳等在宁夏 1 个马铃薯种质资源圃中发现了发生频率为 18.1%的马铃薯晚疫病自育型菌株<sup>[18]</sup>;2011 年李洪浩等在检测四川省马铃薯晚疫病病菌的交配型时发现自育型的发生频率为 18.4%<sup>[19]</sup>。自育型的出现有可能会影响现有的马铃薯晚疫病防治措施。本试验对马铃薯晚疫病自育型病菌卵孢子的研究主要从自育型产生的卵孢子活性和自育型是否能诱导 A1、A2 型产生卵孢子 2 个方面进行。值得一提的是在本次研究中没有观察到染色为蓝色的卵孢子,卵孢子被染为蓝色说明卵孢子已经度过休眠期,正处于萌发状态。这种现象可能的原因为培养时间相对较短,或者是培养时间过长导致卵孢子完全失去活力。2010 年 Widmer 对栎树脂溃疡病疫霉菌卵孢子的活性研究结果表明,卵孢子活性率在培养 4~6 周时最高,培养时间延长至 14 周时,菌株的卵孢子活性率降到最低,一般在 10% 以下<sup>[20]</sup>,这与本研究中卵孢子活性率随着培养时间的增加而下降这一趋势相吻合。

在本研究中检测到大量自育型马铃薯晚疫病菌株,但自育型菌株诱导 A1、A2 交配型产生卵孢子的数量相对较少,推测田间条件下有性生殖发生的可能性很低。有性生殖产生的卵孢子是否能在田间条件下萌发,萌发后是否具有侵染力等问题也有待解决。综上所述,应对马铃薯晚疫病病菌群体进行更全面的群体遗传分析来进一步预测疫霉菌有性生殖出现的概率以及对致病疫霉进化机制产生的影响,从而为制定晚疫病防治策略提供科学依据。

参考文献:

[1] Fry W. *Phytophthora infestans*: the plant (and R gene) destroyer [J]. Molecular Plant Pathology, 2008, 9(3): 385-402.

[2] Guo L Y, Zhu X Q, Hu C H, et al. Genetic structure of *Phytophthora infestans* populations in China indicates multiple migration events [J]. Phytopathology, 2010, 100(10): 997-1006.

[3] Li Y, de Vries R, Slaghek T, et al. Preparation and characterization of oxidized starch polymer microgels for encapsulation and controlled release of functional ingredients [J]. Biomacromolecules, 2009, 10(7): 1931-1938.

[4] S N J. The blight, the blighter and the blighted [J]. Transactions of the New York Academy of Science, 1956, 19(1 Series II): 55-63.

[5] Fry W E, Goodwin S B, Dyer A T, et al. Historical and recent migrations of *Phytophthora infestans*: chronology, pathways and implications [J]. Plant Disease, 1993, 77: 653-661.

[6] Spielman L J, D. L. C. A second world-wide migration and population displacement of *Phytophthora infestans* [J]. Plant Pathology, 1991, 40(3): 422-430.

[7] Cárdenas M, Grajales A, Sierra R, et al. Genetic diversity of *Phytophthora infestans* in the Northern Andean region [J]. BMC Genetics, 2011, (12): 23.

[8] Fry W E, Goodwin S B. Re-emergence of potato and tomato late blight in the United States [J]. Plant Disease, 1997, 81(12): 1349-1356.

[9] Scofield S R, Tobias C M, Rathjen J P, et al. Molecular basis of gene-for-gene specificity in bacterial speck disease of tomato [J]. Science, 1996, 274(5295): 2063-2065.

[10] 杨宇红, 冯兰香, 谢丙炎, 等. 致病疫霉有性生殖在晚疫病流行中的意义 [J]. 植物保护, 2003, 29(5): 51-54.

[11] 郭明浩, 李 华. 葡萄霜霉病原卵孢子的越冬存活及其影响因素 [J]. 中国农学通报, 2005, 21(9): 358-361, 451.

[12] 黄 河. 同宗配合的马铃薯晚疫病病菌曾在中国被发现 [J]. 植物病理学报, 2002, 32(4): 347-350.

[13] 赵志坚, 曹继芬, 李灿辉, 等. 云南致病疫霉交配型、甲霜灵敏感性、mtDNA 单倍型及其群体演替研究 [J]. 中国农业科学, 2007, 40(4): 727-734.

[14] Han M, Liu G, Li J P, et al. *Phytophthora infestans* field isolates from Gansu Province, China are genetically highly diverse and show a high frequency of self fertility [J]. Journal of Eukaryotic Microbiology, 2013, 60(1): 79-88.

[15] 王英华, 国立耘, 梁德霖, 等. 马铃薯晚疫病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.

[16] 李本金, 吕 新, 兰成忠, 等. 福建省致病疫霉交配型、甲霜灵敏感性及其生理小种组成分析 [J]. 植物保护学报, 2008, 35(5): 453-457.

[17] 杨继峰, 朱小琼, 国立耘, 等. 内蒙古西部地区马铃薯晚疫病病菌的交配型分布及对 3 种杀菌剂的敏感性 [J]. 华北农学报, 2011, 26(5): 16-20.

[18] 马云芳, 孙洁平, 马丽杰, 等. 一个马铃薯种质资源圃致病疫霉菌群体的分析 [J]. 菌物学报, 2013, 32(5): 802-811.

[19] 李洪浩, 彭化贤, 席亚东, 等. 四川马铃薯晚疫病病菌交配型、生理小种、甲霜灵敏感性及其 mtDNA 单倍型组成分析 [J]. 中国农业科学, 2013, 46(4): 728-736.

[20] Widmer T L. *Phytophthora kernoviae* oospore maturity, germination, and infection [J]. Fungal Biology, 2010, 114(8): 661-668.