

福建省致病疫霉交配型、甲霜灵敏感性 及生理小种组成分析

李本金¹ 吕 新^{1,2} 兰成忠¹ 赵 健¹ 陈庆河¹ 翁启勇^{1*}

(1. 福建省农业科学院植物保护研究所, 福州 350013; 2. 福建省农业科学院中心实验室, 福州 350003)

摘要: 为明确福建省致病疫霉的群体结构及其变化特点, 对 2001—2007 年分离自 11 个市(县)的番茄和马铃薯产区的致病疫霉菌株进行交配型、甲霜灵敏感性及生理小种测定。交配型测定的 187 个菌株中, 181 株为 A1 交配型, 1 株为 A2 交配型, 1 株为 A1, A2 交配型, 1 株为自育交配型, 其余 3 株交配型未知。对 187 个菌株的甲霜灵敏感性测定结果表明, 高抗、中抗和敏感菌株分别占 97.3%、2.1%、0.5%。生理小种测定结果表明, 供试的 11 个抗性基因均可被克服, 其毒性频率在 3.3%~100% 之间, 51 个菌株存在 30 个生理小种, 其中小种 3.7 出现频率最高, 为 13.7%, 是福建省优势生理小种类型; 其次为小种 3.4.7, 发生频率为 9.8%。

关键词: 致病疫霉; 交配型; 甲霜灵敏感性; 生理小种

Mating type, metalaxyl sensitivity and physiological races of *Phytophthora infestans* in Fujian Province

Li Benjin¹ Lüxin^{1,2} Lan Chengzhong¹ Zhao Jian¹ Chen Qinghe¹ Weng Qiyong^{1*}

(1. Institute of Plant Protection, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013, Fujian Province, China;

2. Central Laboratory, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, Fujian Province, China)

Abstract: In order to characterize population structure and its variation of *Phytophthora infestans*, the characteristics of mating type, metalaxyl sensitivity and physiological races of *Phytophthora infestans* isolates collected from tomato and potato in 11 different counties of Fujian Province during 2001–2007 were tested. Among 187 isolates tested, 181 isolates belonged to A1 mating type, 1 was A2 mating type, 1 was A1, A2 mating type, 1 was selffertil mating type, 3 isolates were unknown mating type. Among 187 isolates tested, the ratios of resistant, moderately resistant and sensitive isolates were 97.3%, 2.1% and 0.5%. Physiological races of 51 isolates of *Phytophthora infestans* were identified. The results showed all known eleven resistance genes, with different frequency from 3.3% to 100%, could be overcome. Thirty different physiological races were detected in the 51 isolates, and race 3.7 was the dominant race in Fujian population with the frequency of 13.7%, followed by 3.4.7 with frequency of 9.8%.

Key words: *Phytophthora infestans*; mating type; sensitivity to metalaxyl; physiological race

致病疫霉 *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary 是由 A1 和 A2 两种交配型进行异宗配合的卵菌, 偶有少量菌株自育产生卵孢子, 由它引起的马铃薯和

番茄晚疫病是一种毁灭性病害^[1], 我国各地均有发生。20 世纪 70 年代末以前, 除墨西哥中部发现马铃薯晚疫病菌 A2 交配型外, 世界其它地区仅存在

基金项目: 国家自然科学基金(30600401), 福建省自然科学基金(2006J0322), 福建省农业科学院科技创新团队建设基金(STIF-Y07), 农业部公益性行业(农业)科研专项(nyhyzx07-053)

作者简介: 李本金, 女, 1969 年生, 副研究员, 研究方向为植物病理及分子生物学, email: lbenjin@yahoo.com.cn, Tel: 0591-87572363

* 通讯作者(Author for correspondence), email: wengqy@faas.cn; 收稿日期: 2008-03-07

A1 交配型^[2]。80 年代初 Hohl 等^[3]在瑞士发现 A2 交配型菌株后,许多国家相继发现一系列以 A2 交配型及甲霜灵抗性菌株为表型特征的新致病群体^[4]。我国自 1996 年张志铭等^[5]首次报道在内蒙古和山西两省存在 A2 交配型后,其它地区也相继发现 A2 交配型及对甲霜灵具有抗性的菌株^[6-9]。致病疫霉新居群在全球的产生、迁移和扩散,使世界各地致病疫霉群体表型结构的组成与变化日趋复杂。

近年来研究表明,晚疫病再度流行与病菌群体结构的组成和变化有密切关系^[6],因此,明确致病疫霉的群体结构组成及变化特点,是控制晚疫病危害的必要前提。陈庆河等^[9]对 1999—2002 年福建省致病疫霉交配型及对甲霜灵抗药性进行研究,但关于福建省致病疫霉群体结构及其动态尚未见报道。为此,作者对采自福建省 11 个市(县)的番茄和马铃薯产区致病疫霉菌株的交配型、甲霜灵敏感性及生理小种进行了测定。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株:将 2001—2007 年采自福建省 11 个市(县)的番茄和马铃薯晚疫病病样进行分离纯化,共获得纯培养菌株 187 株,其中番茄致病疫霉 159 株,马铃薯致病疫霉 28 株。

标准菌株:致病疫霉 A1、A2 交配型标准菌株,由美国康奈尔大学 W E Fry 博士提供。甲霜灵抗性及敏感性标准菌株,由台湾亚洲蔬菜研究与发展中心王添成老师惠赠。

供试药剂:98% 甲霜灵(metalaxyl)原药,购自浙江禾本农药化学有限公司。原药先用丙酮溶解,然后配成浓度为 $10^4 \mu\text{g/mL}$ 的母液。

供试鉴别寄主:从黑龙江克山马铃薯研究中心引入一套完整的持有主效抗性单基因(R1 ~ R11)和无已知 R 基因感病材料(r)的鉴别寄主,均为无菌保存的试管苗。

1.2 交配型测定

供试菌株与 A1、A2 标准菌株各自培养 1~2 周后,在新鲜菌落边缘切取菌块,将 A1、A2 标准菌株分别与供试菌株对峙接种在直径 9 cm 的黑麦番茄汁^[10]培养基平板上,在 18~20 °C 黑暗条件下培养 10~15 天后,用显微镜检查两菌交界处是否有卵孢子出现。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;与

A1、A2 标准菌株均能产生卵孢子的为 A1、A2 交配型;与 A1、A2 标准菌株均不能产生卵孢子的为未知交配型;不需交配即能产生卵孢子的为自育型菌株。

1.3 甲霜灵抗性测定

从生长 1~2 周的菌落边缘切取菌龄一致、直径 5 mm 的菌块,分别移到不含甲霜灵和含甲霜灵 $10 \mu\text{g/mL}$ 的带药黑麦培养基^[11]平板中央,置 18~20 °C 黑暗条件下培养,14 天后采用垂直十字交叉法测量菌落直径,每浓度 4 次重复。抗性测定标准:含药 $10 \mu\text{g/mL}$ 平板上菌落生长量 >60% 对照生长量为高抗;<10% 对照生长量为敏感;介于 10%~60% 之间为中抗。

1.4 毒力测定

1.4.1 鉴别寄主的准备:将扩繁的完整鉴别寄主幼苗扦插于以珍珠岩为基质的花盆中,浇以营养液作为肥料,生长期温度一般保持在 20~23 °C 之间,培养 6~8 周后,取植株中部复叶用于毒性基因测定。

1.4.2 供试菌株的准备:将在黑麦培养基上培养 10~15 天的 51 个致病疫霉菌株移至经表面消毒的不携带主效基因的新鲜感病薯块上,10 天后从薯块上挑取菌丝放入装有 3 mL 灭菌水的离心管中,振荡配成孢子囊悬浮液。用血球计数器将悬浮液中的孢子囊数调至约 5×10^4 个/mL,4 °C 冰箱内静置 2~3 h 后用于接种。

1.4.3 人工接种鉴定方法:取鉴别寄主植株中部复叶的小叶片,背面朝上放置在已灭菌的 1.5% 水琼脂培养基平板上,每皿放置 4 片。用微量移液器吸取 20 μL 已配制好的孢子囊悬浮液接种在叶背上,17 °C 黑暗培养过夜,第 2 天将叶片翻转,17~18 °C 光照培养箱中进行保湿培养(每天 8 h 黑暗,16 h 光照),第 7~10 天观察菌丝体及孢子囊形成。1 个菌株至少使 4 片叶中的 3 片发病,才能称其具有毒力,否则要继续进行重复试验。准确确定菌株是否具有毒力后,根据 Black 等^[12]毒性基因与鉴别寄主基因型的关系表确定其生理小种。

2 结果与分析

2.1 致病疫霉的交配型组成、发生频率及地理分布

对 2001—2007 年期间分离自福建省 11 个不同市(县)的 187 个致病疫霉菌株交配型进行测定,结果显示(表 1):A1 交配型 181 株,占 96.8%;A2 交配型 1 株,占 0.5%;A1、A2 交配型 1 株,占 0.5%;自育交配型 1 株,占 0.5%;未知交配型 3 株,占 1.6%。

表明 A1 交配型仍是福建省番茄和马铃薯产区的优势病原菌群体。值得注意的是,2002 年福建省永泰的马铃薯产区发现了 A2 交配型菌株,2006 年福建

省连城的番茄产区又发现 A1,A2 交配型和自育交配型菌株,说明福建省致病疫霉交配型组成趋于复杂化。

表 1 2001—2007 年福建省致病疫霉交配型组成、发生频率及地理分布
Table 1 Composition, frequency and geographical distribution of mating type of
Phytophthora infestans in Fujian during 2001 – 2007

年份 Year	地点 Locality	菌株数 Isolate	A1		A2		A1,A2		自育交配型 Selffertil mating type		交配型未知 Unknown mating type	
			株数 频率(%)		株数 频率(%)		株数 频率(%)		株数 频率(%)		株数 频率(%)	
			Isolate	Frequency	Isolate	Frequency	Isolate	Frequency	Isolate	Frequency	Isolate	Frequency
2001	福州 Fuzhou	9	7	3.8	0	0.0	0	0.0	0	0.0	2	1.1
	三明 Sanming	1	1	0.5	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	长乐 Changle	1	1	0.5	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	莆田 Putian	1	1	0.5	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
2002	周宁 Zhouning	9	9	4.8	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	永泰 Yongtai	6	4	2.1	1	0.5	0	0.0	0	0.0	1	0.5
	泉州 Quanzhou	2	2	1.1	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	德化 Dehua	2	2	1.1	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
2004	连城 Liancheng	21	21	11.2	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
2005	漳平 Zhangping	27	27	14.5	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
2006	连城 Liancheng	73	71	38.0	0	0.0	1	0.5	1	0.5	0	0.0
	永福 Yongfu	29	29	15.5	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
2007	福州 Fuzhou	6	6	3.2	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
总计 Total		187	181	96.8	1	0.5	1	0.5	1	0.5	3	1.6

2.2 福建省致病疫霉甲霜灵敏感性测定

对福建省 11 个市(县)番茄和马铃薯产区采集的致病疫霉菌株进行甲霜灵敏感性测定。结果显示,高抗菌株 182 株,占 97.3%;中抗菌株 4 株,占 2.1%;敏感菌株 1 株,占 0.5%。表明福建省致病疫霉以对甲霜灵高抗菌株占绝对优势,敏感菌株和中抗菌株所占的比例均较小。研究中还发现,2001—2004 年间获得的 52 个致病疫霉菌株,高、中抗和敏感菌株的数量分别为 47 个、4 个、1 个,各占被测菌株的 90.4%、7.7% 和 1.9%,而 2004 年之后测定的 135 个菌株全部表现为高抗,说明福建省马铃薯和番茄产区的致病疫霉对甲霜灵抗性日渐增强(表 2)。

2.3 福建省致病疫霉对已知抗性基因的毒性频率及生理小种组成分析

福建省致病疫霉菌株对完整单基因鉴别寄主生理小种测定结果显示,福建致病疫霉可以克服 11 个

已知抗性基因,但致病疫霉群体对各个抗性基因的毒性频率存在差异,对 R3 的毒性频率最高,为 100%;对 R7、R6 的毒性频率分别为 73.3% 和 56.7%;对 R11、R10、R8、R4 的毒性频率在 26.7%~50.0% 之间;对 R1、R5、R9 的毒性频率相对较低,均为 6.7%;对 R2 的毒性频率最低,为 3.3%。由此可知,抗性基因 R3、R6、R7 已经丧失了福建省的可利用价值。

测定的 51 个菌株中,共检测到 30 个小种类型,每种类型含有 1~8 个毒性因子。生理小种 3.7 发生最普遍,主要分布在周宁、泉州、永泰、永福、漳平和连城,是福建省致病疫霉群体中的优势小种类型,出现频率为 13.7%;其次为 3.4.7,出现频率为 9.8%;其它小种的出现频率在 2.0%~5.9% 之间。70% 以上的被测菌株均含有多个抗性基因,其中 1 个 2006 年采自福建省连城的菌株能克服参加测试的 8 个单显性抗性基因(Race 3.4.5.6.7.8.10.11)(表 3)。

表 2 福建省致病疫霉甲霜灵敏感性

Table 2 The sensitivity of *Phytophthora infestans* from tomato and potato to metalaxyl in Fujian

年份 Year	地点 Locality	菌株数 Isolate	对甲霜灵敏感 Sensitivity		对甲霜灵中抗 Moderately resistance		对甲霜灵高抗 Resistance	
			菌株数 Isolate	频率(%) Frequency	菌株数 Isolate	频率(%) Frequency	菌株数 Isolate	频率(%) Frequency
2001	福州 Fuzhou	9	0	0.0	0	0.0	9	4.8
	三明 Sanming	1	0	0.0	0	0.0	1	0.5
	长乐 Changle	1	0	0.0	0	0.0	1	0.5
	莆田 Putian	1	0	0.0	0	0.0	1	0.5
2002	周宁 Zhouning	9	0	0.0	1	0.5	8	4.3
	永泰 Yongtai	6	0	0.0	0	0.0	6	3.2
	泉州 Quanzhou	2	1	0.5	0	0.0	1	0.5
	德化 Dehua	2	0	0.0	0	0.0	2	1.1
2004	连城 Liancheng	21	0	0.0	3	1.6	18	9.7
2005	漳平 Zhangping	27	0	0.0	0	0.0	27	14.5
2006	永福 Yongfu	29	0	0.0	0	0.0	29	15.5
	连城 Liancheng	73	0	0.0	0	0.0	73	39.0
2007	福州 Fuzhou	6	0	0.0	0	0.0	6	3.2
总计 Total		187	1	0.5	4	2.1	182	97.3

3 讨论

本研究结果表明, 2001—2007 年福建省致病疫霉总体上仍以 A1 交配型占绝对优势, A2 交配型仅在福建省永泰出现, 其发生频率与陈庆河等^[9]报道 1999—2001 年的频率相比明显下降, 这一变化趋势与 Carlisle 等^[13]报道的北爱尔兰共和国 A2 交配型发生频率从 1993—1994 年的 9%~10% 下降到 1997 年的 0% 是一致的。晚疫病在世界各地的再度流行与致病疫霉 A2 交配型的出现及迁移有关^[6]。福建省存在 A2 交配型、A1, A2 交配型和自育交配型菌株, 意味着容易发生基因重组的有性生殖成为可能, 从而产生更具有侵染力和适合度更高的生理小种以及致病力更强的菌株, 加重了病害的发生与流行, 使晚疫病的防治更加困难。因此, 应建立严格的种薯和实验材料检疫制度, 防止将致病疫霉 A2 交配型、A1, A2 交配型和自育交配型菌株传入其它未检测到上述交配型的产区。

近年来, 致病疫霉对甲霜灵的抗药性伴随着“新”群体的产生或全球迁移而日益严重, 在我国的马铃薯和番茄产区也发现了较高比例的甲霜灵抗性菌株^[4]。本研究对甲霜灵敏感性的测定结果表明, 2004 年之前分离的致病疫霉菌株中的中抗或敏感菌株比例较低, 而 2004 年后分离的菌株均对甲霜灵表现高抗。究其原因, 一方面可能因为福建省各市

(县)长期单一施用甲霜灵药剂诱发病菌产生了抗性, 另一方面, 随着近几年福建省与全国各地番茄和马铃薯品种交流日益频繁, 导致抗药性菌株的传入。因此, 建议在今后化学防治中, 暂时停止使用甲霜灵系列药剂或限制施用次数, 并在了解种薯调出地区致病疫霉抗药性情况基础上, 筛选与这类药剂无交互抗性的高效低毒的药剂进行轮换使用, 以减少病原菌选择压力, 延长药剂使用期限。

本研究利用一套分别单独携带 R1~R11 抗性基因的标准鉴别寄主, 对福建省致病疫霉的生理小种进行测定, 发现 51 个菌株中存在 30 个小种, 该结果与黄河等^[14]报道的生理小种组成相比复杂得多, 不仅小种数量增加, 而且能够克服以 R3、R6 和 R7 为主的全部抗性基因。其原因可能与福建省 A2、A1, A2、自育交配型菌株的存在, 以及近年来品种频繁调运和含有不同抗性基因抗病品种的推广有密切关系。这就要求育种工作者在着重选育水平抗性品种的基础上, 优先考虑使用 R1、R2、R5、R9 或几个基因聚合。

参 考 文 献(References)

[1] 曹继芬, 孙道旺, 杨明英, 等. 云南番茄致病疫霉的交配型、甲霜灵敏感性及毒力类型. 菌物学报, 2006, 25(3): 488-495

[2] Goodwin S B, Cohen B A, Fry W E. Panglobal distribution of a

表 3 福建省致病疫霉生理小种组成及其地理分布
Table 3 Physiological races and geographical distribution of *Phytophthora infestans* population on tomato and potato in Fujian

小种	菌株数	产区	频率(%)	小种	菌株数	产区	频率(%)
Race	Number	Production region	Frequency	Race	Number	Production region	Frequency
3	1	连城 Liancheng	3.9	2.3.4.6	1	连城 Liancheng	2.0
	1	漳平 Zhangping		3.4.6.7	1	连城 Liancheng	2.0
3.4	1	三明 Sanming	3.9	3.5.6.7	1	连城 Liancheng	2.0
	1	永福 Yongfu		3.6.7.8	1	福州 Fuzhou	5.9
3.7	1	泉州 Quanzhou	13.7		1	永福 Yongfu	
	1	永泰 Yongtai			1	连城 Liancheng	
	2	周宁 Zhouning		3.6.7.9	1	永福 Yongfu	2.0
	1	永福 Yongfu		3.7.9.11	1	福州 Fuzhou	2.0
	1	漳平 Zhangping		3.8.10.11	1	福州 Fuzhou	2.0
	1	连城 Liancheng		1.3.4.7.8	1	连城 Liancheng	2.0
3.10	1	福州 Fuzhou	5.9	3.4.6.7.8	1	福州 Fuzhou	5.9
	1	永福 Yongfu			2	连城 Liancheng	
	1	连城 Liancheng		3.4.6.7.10	2	连城 Liancheng	3.9
3.4.6	1	连城 Liancheng	2.0	3.4.7.8.10	1	连城 Liancheng	2.0
3.4.7	2	连城 Liancheng	9.8	3.6.7.8.10	1	连城 Liancheng	2.0
	2	漳平 Zhangping		3.6.7.8.11	1	连城 Liancheng	2.0
	1	永福 Yongfu		1.3.4.6.7.8	1	永福 Yongfu	2.0
3.4.10	1	连城 Liancheng	2.0	3.4.6.7.8.10	1	连城 Liancheng	2.0
3.6.7	1	连城 Liancheng	2.0	3.4.6.7.8.11	1	永福 Yongfu	2.0
3.7.8	1	福州 Fuzhou	2.0	3.6.7.8.10.11	1	永泰 Yongtai	2.0
3.7.11	1	永泰 Yongtai	5.9	3.4.6.7.8.10.11	1	永福 Yongfu	2.0
	1	周宁 Zhouning		3.4.5.6.7.8.10.11	1	连城 Liancheng	2.0
	1	永福 Yongfu		30 Race	51		
3.8.10	1	连城 Liancheng	2.0				

single clonal lineage of the Irish potato famine fungus. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1994, 91(24): 11591 – 11595

[3] Hohl H R, Iselin K. Strains of *Phytophthora infestans* from Switzerland with A2 mating type behaviour. Transactions of the British Mycological Society, 1984, 83(3): 529 – 530

[4] 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. 中国农业科学, 2007, 40(4): 727 – 734

[5] 张志铭, 李玉琴, 田世民, 等. 中国发生马铃薯晚疫病病菌 (*Phytophthora infestans*) A₂ 交配型. 河北农业大学学报, 1996, 19(4): 62 – 65

[6] 朱杰华, 张志铭, 李玉琴, 等. 河北省马铃薯晚疫病病菌 (*Phytophthora infestans*) A₂ 交配型的分布. 河北农业大学学报, 2000, 23(3): 73 – 75

[7] 朱小琼, 车兴璧, 国立耘, 等. 六省市致病疫霉交配型及其对几种杀菌剂的敏感性. 植物保护, 2004, 30(4): 20 – 23

[8] 杨宇红, 谢丙炎, 冯兰香, 等. 中国番茄晚疫病病菌交配型及其分布研究. 菌物学报, 2004, 23(3): 351 – 355

[9] 陈庆河, 翁启勇, 谢世勇, 等. 福建省致病疫霉交配型分布及对甲霜灵的抗药性. 植物保护学报, 2004, 31(2): 151 – 156

[10] Guo L Y, Yang Y L, Luo W F. Mating type and biological characteristics of *Phytophthora infestans* isolates from Yunnan, China. Acta Phytopathologica Sinica, 2002, 32(1): 49 – 54

[11] 郑小波. 疫霉菌及其研究技术. 北京: 中国农业出版社, 1997

[12] Black W, Mastenbroek C, Mills W R, et al. A proposal for an international nomenclature of races of *Phytophthora infestans* and of genes controlling immunity in *Solanum demissum* derivatives. Euphytica, 1953, 2(3): 173 – 179

[13] Carlisle D J, Cooke L R, Brown A E. Phenotypic and genotypic characterisation of Northern Ireland isolates of *Phytophthora infestans*. European Journal of Plant Pathology, 2001, 107(3): 291 – 303

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