

文章编号: 1003-8701(2015)05-0058-05

# 黑龙江省马铃薯晚疫病病菌交配型、 瑞毒霉敏感性及 mtDNA 单倍型分析

张铨哲, 郝璐, 李微, 侯思宇, 赵博, 韩晓旭

(东北农业大学, 哈尔滨 150030)

**摘要:** 2012~2014年在黑龙江省各马铃薯主产区共分离了151株马铃薯晚疫病病菌,并测定了晚疫病病菌的交配型、瑞毒霉敏感性和mtDNA单倍型。交配型测定结果显示,分离的151株马铃薯晚疫病病菌中,A1交配型为103株(68.2%),自育型为33株(21.9%),A2交配型为15株(9.9%)。这说明黑龙江省马铃薯晚疫病病菌的群体结构发生了明显的变化。瑞毒霉测定结果显示,2012~2014年分离的151株菌株中敏感性菌株占3.3%,中抗菌株占6.6%,抗性菌株占90.1%,表明黑龙江省部分马铃薯主产区分离的晚疫病病菌已对瑞毒霉产生抗药性。线粒体DNA单倍型的测定结果显示在黑龙江省部分马铃薯主产区共发现了3种线粒体DNA单倍型,分别为Ia,Ib和IIa。其中,IIa mtDNA单倍型的数量最多,发生频率为86.1%。这说明IIa mtDNA单倍型是黑龙江省部分马铃薯主产区的优势种群。

**关键词:** 致病疫霉菌;交配型;瑞毒霉敏感性;线粒体单倍型

**中图分类号:** S435.32

**文献标识码:** A

## Analysis of Mating type, Metalaxyl Sensitivity and mtDNA Haplotypes of *Phytophthora infestans* Collected from Heilongjiang Province

ZHANG Xuan-zhe, HAO Lu, LI Wei, HOU Si-yu, ZHAO Bo, HAN Xiao-xu

(College of Agronomy, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

**Abstract:** Mating type, metalaxyl sensitivity and mtDNA haplotypes of 151 *Phytophthora infestans* isolates collected from Heilongjiang Province from 2012 to 2014 were determined in the study. The results of mating type showed that among the 151 *P. infestans* isolates, 103 (68.2%) isolates were A1 mating type, which account for 68.2%; 33 isolates were self-fertility type, which account for 21.9%; 15 isolates were A2 mating type, which account for 9.9%. The results suggested that the group structure of potato late blight fungus in Heilongjiang Province has changed obviously. The results of metalaxyl sensitivity showed that among the 151 *P. infestans* isolates, 3.3% isolates were sensitivity to metalaxyl, 6.6% isolates were moderate resistant to metalaxyl, and 90.1% isolates were resistant to metalaxyl. The results suggested that *P. infestans* isolates in Heilongjiang Province have been of metalaxyl resistance. The results of mtDNA haplotype showed that three mtDNA haplotypes were found in the main potato planting areas in Heilongjiang Province. The three mtDNA haplotypes were Ia, Ib and IIa, respectively. Of which, the IIa type with the occurrence frequency of 86.1% was the most. The result suggested that IIa mtDNA haplotype was the dominant population in the main potato planting areas in Heilongjiang Province.

**Key words:** *Phytophthora infestans*; Mating type; Metalaxyl sensitivity; Mitochondria haplotype

近年来,晚疫病在全世界马铃薯主产区发生频率逐年升高,危害程度也在不断增大,这与其

群体结构改变和遗传变异有直接关系。马铃薯晚疫病病菌为了完成有性生殖需要两种不同交配型(A1和A2)或自育型,并通过有性生殖产生卵孢子<sup>[1-4]</sup>。到1980年为止,只有墨西哥中部同时存在A1和A2两种交配型,除墨西哥以外的其他地区只发生A1交配型。1984年Hohl<sup>[5]</sup>等在瑞士首次报

收稿日期:2015-04-27

基金项目:哈尔滨市科技攻关计划项目(2011AA613BN072-1)

作者简介:张铨哲(1970-),男,教授,博士,硕士生导师,研究方向为真菌病害的综合防治。

道发现 A2 交配型,随后欧洲、美洲、亚洲、非洲<sup>[6-9]</sup>的许多国家都先后报道发现了 A2 交配型。在中国,1996 年张志铭等<sup>[10]</sup>首次在内蒙古和山西发现了 A2 交配型。1999 年赵志坚等<sup>[11]</sup>在云南田间马铃薯叶片内发现了卵孢子。A2 交配型出现将会导致初侵染源结构的变化和由有性重组改变基因型结构变化。

目前防治马铃薯晚疫病的主要手段是化学防治,其中瑞毒霉是一种具有保护和治疗作用的内吸性杀菌剂,该药对晚疫病有特效,但极易产生抗药性。在 1981 年 Davidse 和 Dowley 首先报道了爱尔兰和荷兰地区发现了马铃薯晚疫病病菌对瑞毒霉产生抗性的植株<sup>[12]</sup>。1997~2004 年,国内陆续发现对瑞毒霉产生抗性的马铃薯晚疫病病菌。马铃薯晚疫病病菌对瑞毒霉的抗药性问题日渐突出,晚疫病病菌的交配型及瑞毒霉抗性也成为测定晚疫病菌群体遗传变异的重要指标。

研究马铃薯致病疫霉菌应用线粒体 DNA 方法分析开始于 20 世纪 90 年代,根据线粒体 DNA 的单倍型和其表现型之间存在的一定关系,有利于分析晚疫病菌群体之间的遗传结构及其分化规律。*P. infestans* 的线粒体 DNA 单倍型是单亲本遗传的,它可以用于马铃薯晚疫病病菌的遗传多态性研究<sup>[13]</sup>。Griffith<sup>[14]</sup>利用改进的 PCR-RFLP 方法将线粒体单倍型分为 Ia, IIa, Ib 和 IIb 4 种单倍型。近些年来,随着各国家和地区马铃薯品种和资源的引用与交换,马铃薯晚疫病病菌的群体结构发生了变化,致使晚疫病发病程度不断加重,严重妨碍了马铃薯的生产<sup>[15]</sup>。本研究通过马铃薯晚疫病病菌的交配型、瑞毒霉抗性和线粒体 DNA 单倍型的测定,了解了黑龙江省马铃薯晚疫病病菌的群体遗传结构组成,为马铃薯晚疫病病菌的群体遗传结构的研究工作奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试菌株

2012~2014 年,在黑龙江省佳木斯市、克山、拜泉等几个马铃薯大规模产区采集具有典型症状的马铃薯晚疫病的单病斑叶片,带回实验室分离培养。用健康洗净的马铃薯,切约 0.5 cm 厚的薯片,对薯片进行消毒处理。将病叶放入已灭菌的培养皿中,选取大小基本一致的所需数量的薯片放在病叶上,加入一定量蒸馏水,封盖,19℃ 黑暗培养箱中培养 4~6 d。

### 1.2 马铃薯晚疫病病菌的交配型测定

采用菌落对峙培养的方式来测定病菌菌株交配型所属类型。首先将标准菌株 A1(DN3085)、

A2(TBC-3)与所要测定的菌株预培养,然后将所要测定的菌株菌饼( $\phi=7$  mm)放置于 20% 番茄汁培养基平板中央,再将标准菌株 A1、A2 的菌饼( $\phi=7$  mm)接种于所测菌株菌饼的两侧,两菌饼之间距离为 3 cm,封盖,每个测定菌株重复做 3 次,在黑暗条件下,19℃ 恒温培养 2 周左右,并在显微镜下检测两菌落之间交界的地方是否有卵孢子的存在。如果所测定的菌株与 A1 菌株之间产生卵孢子,与 A2 菌株间不产生卵孢子,说明所测菌株是 A2 交配型;相反,则是 A1 交配型。若与两个标准菌株间都产生有卵孢子,且自身也可产生卵孢子,则判定所测菌株类型为自育型。

### 1.3 马铃薯晚疫病病菌的瑞毒霉敏感性分析

分离得到的 151 株马铃薯晚疫病病菌对瑞毒霉(韩国化学研究所提供)敏感性采用生长速率法进行测定。试验设定 0 $\mu$ g/mL、5 $\mu$ g/mL、10 $\mu$ g/mL、100 $\mu$ g/mL 4 个瑞毒霉质量浓度梯度。8 d 左右当对照菌落直径在 30 mm 以上时,利用交叉法测定不同浓度瑞毒霉处理的各菌落增长直径,菌落增长直径为菌落所测出的直径与菌饼直径的差值。菌落直径体现的是不同瑞毒霉浓度对菌株的抑制比率。参考的标准为:5 $\mu$ g/mL 与 0 $\mu$ g/mL 比值划分待测马铃薯晚疫病病菌菌株对瑞毒霉的抗性类型。其中,测定比值 $<0.2$ ,菌株判定为高度敏感菌株(HS),比值在 0.2~0.4 区间的菌株判定为敏感菌株(S),比值处于 0.4~0.8 的菌株判定为中抗菌株(R),比值 $\geq 0.8$ 的菌株为高抗菌株(HR)。此外,以浓度为 10 $\mu$ g/mL 和 100 $\mu$ g/mL 的比值作为待测菌株对瑞毒霉敏感性的参考<sup>[16]</sup>。

### 1.4 线粒体 DNA 单倍型的分析

分析线粒体 DNA 单倍型的 PCR-RFLP 方法参考 Griffith<sup>[17]</sup>。所用的引物由上海生工合成,序列为:F2 5'-TTCCCTTTGTCCTCTACCCAT-3', R2 5'-TTACGGCGGTTTAGCACATACA-3'; F4 5'-TGGT-CATCCAGAGGTTTATGTT-3', R4 5'-CCGATACC GATACCAGCACCAA-3'。50 $\mu$ L 体系来 PCR 扩增。利用 EcoRI、MspI 两种内切酶对 P2 和 P4 区段 PCR 扩增产物样品进行酶切,反应条件为 37℃ 恒温水浴 3 h 以上。所得酶切片段与溴酚蓝混合,1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测酶切样品。

## 2 结果与分析

### 2.1 马铃薯晚疫病病菌的交配型分化

检测 2012~2014 年黑龙江省采集分离到的 151 株马铃薯晚疫病病菌交配型,先将测定的所有

菌株单独培养观察是否有卵孢子存在,将自育型菌株选出,其余待测菌株与标准菌株采用对峙培养的方法观察菌落交界处卵孢子的产生情况。测定结果显示2012年采自于佳木斯的20株晚疫病菌株均为A1交配型。2013年采自依安、克山、兰

溪、拜泉4个地方的晚疫病菌株中A1、A2与自育型3种交配型都有存在,菌株在不同地方3种交配型的比例有所差异。其中以哈尔滨市香坊农场所得A2菌株数量最多为5株,克山所得自育型菌株最多为9株。详细结果如表1所示。

表1 2012~2014年黑龙江省部分地区采集的马铃薯晚疫病菌株交配型分布

年份	分离菌株数	采集地区	交配型		
			A1	自育型	A2
2012	20	佳木斯	20(100)	0(0)	0(0)
2013	91	依安	11(12.1)	1(1.1)	4(4.4)
		依安新发	13(14.3)	5(5.5)	2(2.2)
		克山	9(9.9)	9(9.9)	1(1.1)
		兰溪	12(13.2)	5(5.5)	1(1.1)
		拜泉	10(11.0)	6(6.6)	2(2.2)
小计			55(60.4)	26(28.6)	10(11.0)
2014	40	香坊农场	28(70.0)	7(17.5)	5(12.5)
总计	151		103(68.2)	33(21.9)	15(9.9)

## 2.2 马铃薯晚疫病菌株瑞毒霉敏感性分析

对2012~2014年分离的151株菌株进行瑞毒霉的抗药性测定,结果表明高抗性菌株占总数的90.07%,高度敏感性菌株、敏感性菌株、中抗菌株分别占1.32%、1.99%、6.62%(表2)。2012年所测的20个菌株中,高抗性菌株17个,占总菌株数的85.00%,高度敏感型菌株0株,敏感性菌株1个,中抗菌株2个,分别占所测菌株数的0%、5.00%、

10.00%。2013年采集的91个菌株中,高抗菌株82个,占总数的90.11%,高度敏感型菌株2株,敏感性菌株1个,中抗菌株6个,分别占所测菌株数的2.20%、1.10%、6.59%。2014年测定的40个菌株中高抗性菌株37个,占总数92.50%,未测到高度敏感型菌株,敏感性菌株1个,中抗菌株2个,分别占所测菌株数的0%、2.50%、5.00%(表2)。

表2 2012~2014年黑龙江省采集的马铃薯晚疫病菌株对瑞毒霉抗药性测定结果

年份	采集地区	菌株数	瑞毒霉抗药性			
			高度敏感(HS)	敏感(S)	中抗(R)	高抗(HR)
2012	佳木斯	20	0(0)	1(5.00)	2(10.00)	17(85.00)
2013	依安	16	1(6.25)	0(0)	1(6.25)	14(87.50)
	依安新发	20	0(0)	1(5.00)	1(5.00)	18(90.00)
	克山	19	0(0)	0(0)	1(5.26)	18(94.74)
	兰溪	18	1(5.56)	0(0)	2(11.12)	15(83.32)
	拜泉	18	0(0)	0(0)	1(5.56)	17(94.44)
小计		91	2(2.20)	1(1.10)	6(6.59)	82(90.11)
2014	香坊农场	40	0(0)	1(2.50)	2(5.00)	37(92.50)
总计		151	2(1.32)	3(1.99)	10(6.62)	136(90.07)

## 2.3 马铃薯晚疫病菌株的基因型分析

对分离出的151个晚疫病菌株基因组DNA进行基因型检测,结果显示151个菌株中IIa型分布最广,数量也是最多,占所测定菌株数的86.1%,为优势mtDNA单倍型。2012年测定的20个菌株中

IIa型19株(95.0%)、Ib型1株(5.0%)。2013年测定的91个菌株中Ia型18株(19.8%)、IIa型73株(80.2%)。2014年测定的40个菌株中Ia型2株(5.0%)、IIa型38株(95.0%)(表3)。

表3 2012~2014年黑龙江省部分地区采集的马铃薯晚疫病病菌的线粒体DNA基因型

年份	分离地区	菌株数	不同线粒体DNA单倍型数		
			I a	II a	I b
2012	佳木斯	20	0(0)	19(95.0)	1(5.0)
2013	依安	16	8(50.0)	8(50.0)	0(0)
	依安新发	20	10(50.0)	10(50.0)	0(0)
	克山	19	0(0)	19(100.0)	0(0)
	兰溪	18	0(0)	18(100.0)	0(0)
	拜泉	18	0(0)	18(100.0)	0(0)
小计		91	18(19.8)	73(80.2)	0(0)
2014	香坊农场	40	2(5.0)	38(95.0)	0(0)
总计		151	20(13.2)	130(86.1)	1(0.7)

### 3 讨论

我国于2002年首次报道曾在甘肃发现晚疫病病菌自育型菌株的存在<sup>[17]</sup>。随后,在我国多个地区均检测到自育型菌株<sup>[18-19]</sup>,但出现的频率都特别低。对交配型的鉴定结果显示2012年采自佳木斯的菌株全部为A1交配型这与王晨<sup>[20]</sup>报道的2008年采集的菌株均为A1交配型这一结论一致。说明在交配型类型方面2008~2012年间黑龙江省马铃薯晚疫病病菌菌株群体结构未出现较大差异。但2013~2014年所测菌株交配型均有A1、A2和自育型出现。这与姚国胜<sup>[21]</sup>、沈江卫<sup>[22]</sup>所测克山等地方交配型结果不一致。基于何种原因导致近几年黑龙江省晚疫病病菌交配型类型有所差异还有待进一步研究。本试验所测自育型菌株在群体中所占比例为21.9%,与前人报道的研究结果差异很大,这可能是外来菌种入侵的结果,具体原因还需进一步研究。

对瑞毒霉敏感性与菌株交配型测定是监测马铃薯晚疫病病菌群体结构、组成和变异变化的重要内容之一。它们也是研究人员对病害预测、选择防治方法的重要依据之一。本研究测定了151个采自黑龙江省七个不同地点的晚疫病病菌株,分别从待测菌株对瑞毒霉敏感性和交配型所属类型两个方面对不同地点的晚疫病病原菌群体进行了测定评估。

晚疫病病原菌群体对瑞毒霉敏感程度与对该病害的防治方法有密切关系。抗病性菌株在群体中比例的不断升高对病菌的化学防治和马铃薯的生产都有很大威胁。本研究中,2012~2014年高抗菌株占总数的90.07%,居绝对优势,且有很高的抗性水平。高度敏感及敏感性菌株为3.31%、中抗菌株占6.62%。本研究的测定结果与徐生

军<sup>[23]</sup>的结果部分一致,说明近几年间在瑞毒霉抗性方面黑龙江省晚疫病病菌菌株群体呈现上升趋势,群体结构有所改变。

由于线粒体DNA与核DNA相比它本身结构较简单、分子量很小,且属于母性遗传和无组织特异性,本身属于一种核外遗传物质,是作为致病疫霉群体起源、演变路线、系统发育等遗传分化研究的首选参考依据。目前我们所用的鉴别线粒体DNA单倍型的方法仍是沿用Griffith等<sup>[14]</sup>、Fry等<sup>[24]</sup>通过分析得出Ib菌系可能为马铃薯致病疫霉菌最古老菌系的结论,在第二次全球迁移之前其所代表的致病疫霉菌“旧”群体就已经广泛分布,对于Ia、IIa和IIb这3种单倍类型为出现的“新”群体。本研究对黑龙江省多地的马铃薯晚疫病病菌菌株群体进行了线粒体DNA单倍型测定分析,发现了Ia、Ib、IIa 3种单倍型,未检测到IIb单倍型的存在。这表明采集地区已基本完成马铃薯晚疫病病菌群体的新旧群体演变过程。这一结果和我国其他地区对晚疫病病菌群体的测定结果基本一致,但由于缺少晚疫病病菌该检测方面的早期数据资料,因此具体群体迁移的替代时间难以判定。

#### 参考文献:

- [1] Turkensteen L J. Durable resistance of potatoes against *Phytophthora infestans*[J]. Durability of disease resistance, 1993(18): 283-300.
- [2] 金光辉. 黑龙江省马铃薯晚疫病病菌群体结构及抗源评价[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2007.
- [3] 商鸿生,王凤葵. 马铃薯病虫害防治[M]. 北京:金盾出版社,2001:6-14.
- [4] 林传光. 马铃薯晚疫病中心病株形成的观察[J]. 植物病理学报,1957,3(1):19-28.
- [5] Hohl H R, Iselin K. Strains of *Phytophthora infestans* with from Switzerland A2 mating type behavior[J]. Transactions of the British Mycological Society, 1984, 83(3): 529-530.
- [6] Lehtinen A, Hannukkala A, Rantanen T, et al. Phenotypic and

- genetic variation in finnish potato late blight populations, 1997–2000[J]. *Plant Pathology*, 2007, 56(3): 480–491 .
- [ 7 ] Chacón M, Adler N, Jarrin F, et al. Genetic structure of the population of *Phytophthora infestans* attacking *Solanum ochranthum* in the Highlands of Ecuador[J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2006(115): 235–245 .
- [ 8 ] Zhang X Z, Kim H Y, Kim B S. Analysis of genetic diversity of *Phytophthora infestans* in Korea by using molecular markers[J]. *Microbiol Biotechnol*, 2006(16): 423–430 .
- [ 9 ] Achbani E H, Haifidi M, Abdellatif B, et al. Potato late blight in Morocco: characterization of *Phytophthora infestans* populations (virulence and mating type)[J]. *Commun Agric Appl Biol Sci*, 2005(20): 247–252 .
- [ 10 ] 张志铭,李玉琴,田世民,等. 中国发现马铃薯晚疫病菌 A2 交配型[J]. *河北农业大学学报*, 1996(19): 63–65 .
- [ 11 ] 赵志坚,王淑芬,李成云,等. 云南省马铃薯晚疫病菌交配型分布及发生频率[J]. *西南农业学报*, 2001, 14(4): 55–57 .
- [ 12 ] 朱杰华,张志铭,李玉琴. 马铃薯晚疫病(*Phytophthora infestans*)A2 交配型的分布[J]. *植物病理学报*, 2000, 30(4): 375 .
- [ 13 ] Avila-Adame C, Gomez-Alpizar L, Zismann V, et al. Mitochondrial genome sequences and molecular evolution of the Irish potato famine pathogen, *Phytophthora infestans*[J]. *Curr Genet*, 2006(49): 39–46 .
- [ 14 ] Griffith G W, Shaw D S. Polymorphisms in *Phytophthora infestans*: Four mitochondrial haplotypes are detected after PCR amplification of DNA from pure cultures or from host lesions[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64(10): 4004–4014 .
- [ 15 ] Eriwin D C, Ribeiro O K. *Phytophthora* disease worldwide[M]. USA Saint: Am Phytophthora Soc, 1996: 186–190 .
- [ 16 ] Masrhall-Farra K D, McGrath M, Jmaes R V, et al. Characterization of *Phytophthora infestans* in Wisconsin from 1993 to 1995 [J]. *Plant Disease*, 1998, 82(4): 434–436 .
- [ 17 ] 毕朝位,杜喜翠,车兴壁,等. 重庆地区马铃薯晚疫病菌对甲霜灵抗性及其抗性水平测定[J]. *中国马铃薯*, 2002, 16(2): 70–72 .
- [ 18 ] 王彦凤. 中国马铃薯主产区晚疫病菌群体结构研究[D]. 呼和浩特:内蒙古大学, 2011 .
- [ 19 ] 赵志坚. 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 .
- [ 20 ] 王 晨. 马铃薯晚疫病菌的表现型和 SSR 基因型分析[D]. 哈尔滨:东北农业大学, 2010 .
- [ 21 ] 姚国胜. 中国部分地区马铃薯晚疫病菌遗传多样性研究[D]. 保定:河北农业大学, 2006 .
- [ 22 ] 沈江卫. 马铃薯晚疫病菌 SSR 基因型分析及对啞菌酯和精甲霜灵的敏感性测定[D]. 保定:河北农业大学, 2008 .
- [ 23 ] 徐生军. 马铃薯晚疫病菌的表现型与基因型的研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学, 2010 .
- [ 25 ] Fry W E, Goodwin S B. Re-emergence of potato and tomato late blight in the United States [J]. *Plant Disease*, 1997(81): 1349–1357 .

(责任编辑:范杰英)



(上接第 41 页)

- [ 18 ] 张亚丽,沈其荣,姜 洋. 有机肥料对镉污染土壤的改良效应[J]. *土壤学报*, 2001, 38(2): 212–218 .
- [ 19 ] 梁 平. 不同来源有机肥对玉米品质及重金属吸收的调控研究[D]. 长春:吉林农业大学, 2008 .
- [ 20 ] 王 林,周启星. 农艺措施强化重金属污染土壤的植物修复[J]. *中国生态农业学报*, 2008, 16(3): 772–777 .
- [ 21 ] 孙文彬,李必琼,赵秀兰. 不同秸秆与城市污泥好氧堆肥过程中重金属质量分数及形态变化[J]. *西南大学学报*, 2012, 34(3): 90–94 .
- [ 22 ] Ko H J, Kim K Y, Kim H T, et al. Evaluation of maturity parameters and heavy metal contents in composts made from animal manure[J]. *Waste Management*, 2008, 28(5): 813–820 .
- [ 23 ] 吴清清,马军伟,姜丽娜,等. 鸡粪和垃圾有机肥对苜蓿菜生长及土壤重金属积累的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2010, 29(7): 1302–1309 .
- [ 24 ] 王开峰,彭 娜,王凯荣,等. 长期施用有机肥对稻田土壤重金属含量及其有效性的影响[J]. *水土保持学报*, 2008, 22(1): 105–108 .

(责任编辑:王 昱)