

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

赵志坚¹, 曹继芬¹, 李灿辉², 孙道旺¹, 杨明英¹, 王 军²

(¹云南省农业科学院农业环境资源研究所, 植物病理实验室, 昆明 650205; ²云南师范大学薯类作物研究所, 昆明 650092)

摘要:【目的】对致病疫霉群体特征的认识, 是控制晚疫病危害的必要前提。【方法】对云南 32 个马铃薯和番茄产区的致病疫霉群体的交配型、甲霜灵敏感性、mtDNA 单倍型进行了研究。【结果】云南马铃薯致病疫霉群体主要由 A1 交配型组成, 番茄致病疫霉全部为 A1 交配型。A2 交配型和自育型菌株总体发生频率较低, 分别为 3.4% 和 4.4%。自从 2002 年以后, 致病疫霉的群体结构发生了明显的变化, 没有检测到 A2 交配型或自育型菌株。致病疫霉对甲霜灵敏感性的离体测定显示马铃薯和番茄上均存在抗性、中抗和敏感菌株。甲霜灵抗性、中抗、敏感菌株分别占测定菌株的 13.2%、9.4% 和 77.4%。分离自番茄的甲霜灵抗性菌株比例高于分离自马铃薯的菌株。I a、II a 和 I b 三种 mtDNA 单倍型被检测到, 马铃薯致病疫霉有 I a 和 II a 两种单倍型, 全部为第二次全球迁移后出现的“新”群体。I a 单倍型在群体中的比例为 96%, 分布于所有马铃薯产区; 番茄致病疫霉则为 I a 和 I b 两种单倍型, “新”、“旧”群体共存。【结论】马铃薯和番茄致病疫霉群体的遗传结构有明显差异; 致病疫霉“新”、“旧”群体在云南已发生演替, 马铃薯致病疫霉“新”群体已成功替代了“旧”群体; 迁移和有限的有性生殖可能在云南致病疫霉群体的演替中担当了重要的作用。

关键词: 交配型; 自育性; 甲霜灵敏感性; mtDNA 单倍型; 晚疫病

Characteristics of Mating Type, Metalaxyl Sensitivity, mtDNA Haplotype and Succession of *Phytophthora infestans* Populations in Yunnan, 2000 to 2003

ZHAO Zhi-jian¹, CAO Ji-fen¹, LI Can-hui², SUN Dao-wang¹, YANG Ming-ying¹, WANG Jun²

(¹Laboratory of Plant Pathology, Agricultural Environment and Resource Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650205; ²Institute of Tuber and Root Crops, Yunnan Normal University, Kunming 650092)

Abstract: 【Objective】The study was necessary to manage the late blight disease and to characterize populations of *Phytophthora infestans*. 【Method】The characteristics of mating type, metalaxyl sensitivity and mtDNA haplotype of *P. infestans* isolates were collected from 32 potato and tomato production regions in Yunnan and were analyzed. 【Result】Most isolates from potato and all isolates from tomato were A1 mating type. Frequency of A2 mating type and self-fertility isolates were 3.4% and 4.4% respectively. They were only detected in four potato regions. The population structure of *P. infestans* had changed dramatically and A2 or self-fertility isolates had not been detected in Yunnan since 2002. *In vitro* tests of sensitivity to the phenylamide fungicide metalaxyl showed that resistant, intermediate and sensitive isolates occurred on potato and tomato with the frequency 13.2%, 9.4% and 77.4% respectively. The frequency of resistance to metalaxyl was higher in isolates from tomato than in isolates from potato. Three mtDNA haplotypes I a, II a and I b were detected from *P. infestans* populations on potato and tomato in Yunnan. Both I a and II a haplotypes of *P. infestans* from potato belonged to the ‘new’ populations that followed the second global migration of the pathogen. The frequency of I a haplotype was 96%, spreading all potato production regions. Isolates from tomato belonged to I a and I b haplotypes and showed that the ‘old’ and ‘new’ populations of *P. infestans* coexisted in Yunnan. 【Conclusion】There was obvious difference between populations of *P. infestans* from potato and tomato. The succession between ‘old’ and ‘new’ *P. infestans*

收稿日期: 2005-12-05; 接受日期: 2006-12-05

基金项目: 云南省自然科学基金项目 (2000C0096M, 2004C0024Q), 云南省“十五”科技攻关重点项目 (2002NC09)

作者简介: 赵志坚 (1972-), 男, 云南昭通人, 硕士, 副研究员, 研究方向为致病疫霉遗传学相关研究。Tel: 0871-5893975; E-mail: zhijianzhao@hotmail.com

populations had already occurred and the “new” populations had successfully replaced the “old” population on potato. Migration and limited sexual reproduction might play an important role on variation and replacement of *P. infestans* populations in Yunnan.

Key words: Mating type; Self-fertility; Metalaxyl sensitivity; mtDNA haplotype; Late blight disease

0 引言

【研究意义】近年来晚疫病在全球马铃薯和番茄产区为害严重,可能归因于致病疫霉群体遗传的改变和有性生殖的发生^[1,2]。因此系统地了解马铃薯和番茄产区致病疫霉的群体特征及其动态,可以有效地服务于抗病品种的培育及病害控制^[3]。【前人研究进展】致病疫霉 *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary 营养体是两性的二倍体生物,有 A1 和 A2 两种交配型的异宗配合的卵菌,偶有少量菌株自育 (Self-fertility) 产生卵孢子^[4]。形成卵孢子的有性生殖过程中发生遗传重组,产生对寄主有更强毒性和更高寄生适合度的后代群体^[5]。20 世纪 70 年代末期以前,致病疫霉 A1 和 A2 交配型进行有性生殖仅在墨西哥被发现,全球其它地区的致病疫霉则由非常单一的 A1 交配型“旧”群体组成^[6]。但最近的遗传学证据表明:20 多年来,始于墨西哥的第二次致病疫霉群体全球范围的迁移、替代以及有性生殖新基因型后代的产生,对全球马铃薯和番茄的安全生产造成了十分严重的威胁。包含了 A2 交配型、甲霜灵抗性菌株在内的“新”群体先后在欧洲、北美洲、南美洲、亚洲和非洲的许多国家被检测到,引起了国际社会广泛的担忧和密切关注^[7~9]。【本研究的切入点】自张志铭等^[10]1996 年报道在中国的山西和内蒙检测到 A2 交配型菌株以来,相继有针对中国马铃薯或番茄致病疫霉某一表型特征的相关报道^[11~15]。但目前对中国的这些致病疫霉群体的特征以及潜在的危害缺乏系统深入的研究。【拟解决的关键问题】本文对云南省不同生态区域内的马铃薯和番茄致病疫霉群体进行了系统的分析,旨在揭示出最近云南致病疫霉群体结构的特征及变化;追溯云南的致病疫霉群体与全球迁移的“新”群体之间的联系;为有的放矢地制定马铃薯和番茄晚疫病控制策略提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株 根据云南马铃薯主要种植区划,即:滇东北、滇西北马铃薯大春作一季种植区、滇中马铃薯多季作种植区和滇南马铃薯冬播作一季种植区的划分,从 2000 年 7 月~2003 年 11 月自云南省 32 个市县采集马铃薯和(或)番茄晚疫病病样,进行病原菌分离纯化,共获得纯培养 823 株,其中马铃薯致病疫

霉菌株 751 株,番茄致病疫霉菌株 72 株。已知 A1、A2 交配型标准菌株由晚疫病研究课题提供。

1.1.2 标准基因型菌株的基因组 DNA US-1、US-6、US-8、EC-3、PE-1 等用作参照的已知基因型标准菌株的全基因组 DNA 由国际马铃薯中心(CIP) R.J. Nelson 博士惠赠。

1.1.3 供试甲霜灵 供试 96% 甲霜灵原药由江苏宝灵化工股份有限公司提供。

1.2 试验方法

1.2.1 交配型测定 所有供试菌株均分别与 A1 和 A2 交配型标准菌株在 LB-V8A 平板上进行交配试验^[16]。与 A2 交配型配对产生卵孢子的菌株定为 A1 交配型,反之则定义为 A2 交配型,不需交配单独培养即能产生卵孢子的菌株为自育型。

1.2.2 甲霜灵敏感性测定 采用含药平板法进行^[16]。根据含药平板的菌落直径与空白对照菌落直径之比计算的相对生长率,确定供试菌株对甲霜灵的敏感性。敏感性判定标准:5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 和 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 含药平板的菌落生长量 $\geq 40\%$ 的 0 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 含药平板生长量为抗性;两者均 $\leq 40\%$ 为敏感;5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 含药平板的菌落生长量 $\geq 40\%$ 的 0 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 含药平板生长量为中度抗性。

1.2.3 mtDNA 单倍型分析 致病疫霉基因组 DNA 提取和 mtDNA 单倍型分析均按 Giffith 和 Shaw 报道的程序进行^[17]。扩增反应在 PCR 扩增仪 (PTC-200 Peltier Thermal Cycler) 上进行。mtDNA P2 和 P4 区段 PCR 扩增产物分别用 *Msp* I 和 *Eco*R I 进行消化。根据酶切产物琼脂糖凝胶电泳所得的片断大小,对比用作参照的已知单倍型,对各菌株的 mtDNA 单倍型进行分析。

2 结果与分析

2.1 云南致病疫霉交配型组成、发生频率及地理分布

2.1.1 自育型菌株的发生 经单孢分离培养及致病疫霉核糖体 DNA 的 ITS 特异性 PCR 检测,在 2000 年分离自昆明、2001 分离自嵩明、沾益、2002 年分离自陆良等地的致病疫霉菌株中检测到了 36 个自育型菌株。自育型菌株在 LB-V8A 平板上培养普遍形成聚集成簇块或紧密的絮状、纯白色、紧贴培养基生长的菌落。整个菌落不均一,凸凹不平,几乎无气生菌丝或气生菌丝很少,产生的孢囊孢子也很少,与 A1、A2 交配型菌落培养特征有显著差异(图 1)。

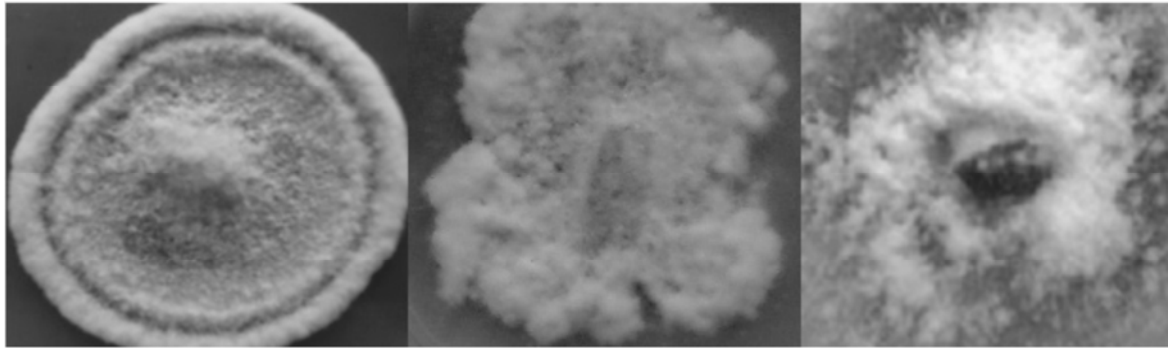


图 1 致病疫霉自育型菌株在LB-V8A上培养的菌落特征

Fig. 1 Morphological characteristics of self-fertility isolates of *P. infestans* on LB-V8A medium

2.1.2 云南致病疫霉交配型组成、发生频率及地理分布 2000~2003 年期间, 分离的 823 个菌株中, A1 交配型 759 株, 占 92.2%, A2 交配型 28 株, 占 3.4%, 自育型菌株 36 株, 占 4.4%, 表明 A1 交配型仍然为云南所有马铃薯产区和番茄产区的优势病原菌群体; A2 交配型仅局限在滇东北、滇西北大春一季作种植区的陆良、滇中多季作种植区的昆明及嵩明等地, 平均发生频率在 5.4%~9.7% 之间, 并有大量的自育型菌株发生, 这较之 1998~1999 年云南省致病疫霉交配型的组成和分布发生了很大的变化^[18]。各马铃薯产区致病疫霉交配型的组成、发生频率以及地理分布参见表 1。在 2000~2003 年晚疫病病样采集的 32 个马铃薯和番茄产区中, 除陆良、昆明和嵩明 3 个产区发现同时有自育型菌株、A1 和 A2 交配型菌株存在, 沾益分离到一个自育型菌株外, 其余 28 个马铃薯、番茄产区均只检测到 A1 一种交配型。从昭通、宣威、沾益、师宗、昆明、元谋和建水等 7 个产区的番茄上分离获得的所有 72 个致病疫霉菌株没有一个菌株是 A2 交配型, 全部为 A1 交配型。交配型测定的结果明显地揭示出: 2000 年以后, 云南省马铃薯产区交配型的组成及分布发生了戏剧性的变化, 参见图 2, A1 交配型在致病疫霉群体中的比例持续增加, 而自育型和 A2 交配型比例快速下降, 分布的范围也变得十分有限, 尤其是从 2002~2003 年期间, 除了在陆良分离到 1 株 A2 交配型外, 在其它以前分离到 A2 交配型和自育型菌株的同一地区, 没有检测到 A2 交配型和自育型菌株的发生。

2.2 云南致病疫霉甲霜灵敏感性

对云南 16 个马铃薯和(或)番茄产区获得的致病疫霉菌株中选择的 106 个菌株甲霜灵抗性测定结果显示: 抗性菌株和中抗菌株所占比例均较小, 而敏感菌株占绝对优势, 参见表 2。敏感菌株为 82 株, 占总数

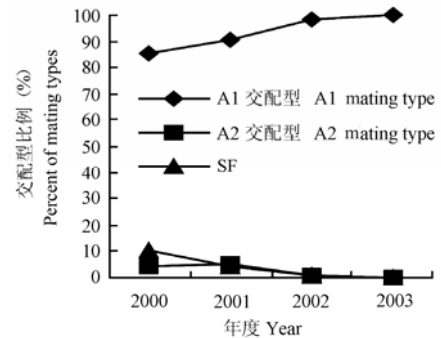


图 2 2000~2003 年云南致病疫霉群体消长动态

Fig. 2 Dynamics of *P. infestans* populations during 2000 to 2003 in Yunnan

的 77.4%, 抗性菌株为 14 株, 占 13.2%, 中抗为 10 株, 占 9.4%。从昭通、彝良、镇雄、沾益、会泽、中甸、嵩明、寻甸、楚雄、建水、盈江、陇川获得的马铃薯致病疫霉菌株全部是敏感的, 没有中抗和抗性菌株, 而在宣威、昆明、元谋等化学农药施用年限较长的地区, 则检测到中抗或抗性的致病疫霉菌株。从丽江未施药防治的马铃薯上分离的菌株中检测到 1 株中抗菌株。从表 2 可以看出, 各地致病疫霉菌株对甲霜灵的敏感性与菌株分离地的化学农药施用情况密切相关。

2.3 云南致病疫霉 mtDNA 单倍型组成及地理分布

对 2000~2003 年云南省 27 个马铃薯产区的 120 个致病疫霉菌株 mtDNA 的单倍型进行鉴定的结果表明: 云南致病疫霉 mtDNA 单倍型的构成有 I a、II a 和 I b 三个单倍型, 没有检测到 II b。马铃薯致病疫霉 mtDNA 的单倍型为 I a 和 II a, 番茄致病疫霉 mtDNA 的单倍型为 I b 和 I a。100 个分离自马铃薯的致病疫霉菌株中, 96 个菌株为 I a, 占 96%, 分布于 3 大马

表 1 2000~2003 年云南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 *P. infestans* in Yunnan during 2000 to 2003

马铃薯种植区划 Potato planting region	马铃薯产区 Potato production region	寄主 Host	菌株数 Number of isolates	交配型 Mating type			A2 发生频率 (%) Frequency of A2
				SF	A1	A2	
滇东北、滇西 北大春一季 作种植区 North-east and north-west planting zones	昭通 Zhaotong	马铃薯 Potato	47	0	47	0	0
		番茄 Tomato	4	0	4	0	0
滇中多季作 种植区 Middle multiple cropping zones	鲁甸 Ludian	马铃薯 Potato	5	0	5	0	0
	永善 Yongshan	马铃薯 Potato	3	0	3	0	0
	彝良 Yiliang	马铃薯 Potato	18	0	18	0	0
	镇雄 Zhenxiong	马铃薯 Potato	11	0	11	0	0
	曲靖 Qujing	马铃薯 Potato	3	0	3	0	0
	会泽 Huize	马铃薯 Potato	28	0	28	0	0
	宣威 Xuanwei	马铃薯 Potato	23	0	23	0	0
		番茄 Tomato	5	0	5	0	0
	陆良 Luliang	马铃薯 Potato	17	1	15	1	5.9
	沾益 Zhanyi	马铃薯 Potato	52	1	51	0	0
		番茄 Tomato	3	0	3	0	0
	马龙 Malong	马铃薯 Potato	5	0	5	0	0
	师宗 Shizong	马铃薯 Potato	6	0	6	0	0
		番茄 Tomato	1	0	1	0	0
	滇南冬播作 一季种植区 South winter planting zones	中甸 Zhongdian	马铃薯 Potato	10	0	10	0
丽江 Lijiang		马铃薯 Potato	7	0	7	0	0
宁蒗 Ningliang		马铃薯 Potato	3	0	3	0	0
昆明 Kunming		马铃薯 Potato	155	18	130	7	4.5
		番茄 Tomato	17	0	17	0	0
东川 Dongchuan		马铃薯 Potato	4	0	4	0	0
寻甸 Xundian		马铃薯 Potato	19	0	19	0	0
嵩明 Songming		马铃薯 Potato	206	15	171	20	9.7
禄劝 Luquan		马铃薯 Potato	18	1	17	0	0
楚雄 Chuxiong		马铃薯 Potato	8	0	8	0	0
总计 Total	南华 Nanhua	马铃薯 Potato	3	0	3	0	0
	元谋 Yuanmou	番茄 Tomato	40	0	40	0	0
	大理 Dalin	马铃薯 Potato	5	0	5	0	0
	祥云 Xiangyun	马铃薯 Potato	5	0	5	0	0
	鹤庆 Heqing	马铃薯 Potato	4	0	4	0	0
	个旧 Gejiu	马铃薯 Potato	12	0	12	0	0
	建水 Jianshui	马铃薯 Potato	13	0	13	0	0
		番茄 Tomato	2	0	2	0	0
	盈江 Yingjiang	马铃薯 Potato	20	0	20	0	0
	陇川 Longchan	马铃薯 Potato	14	0	14	0	0
梁河 Lianghe	马铃薯 Potato	17	0	17	0	0	
芒市 Mangshi	马铃薯 Potato	10	0	10	0	0	
总计 Total	32		823	36	759	28	3.4

铃薯种植区划内病样采集的所有产区,为优势 mtDNA 单倍型群体; 4 个菌株为 II a, 占 4%, 分离自昆明、嵩明和禄劝 3 个马铃薯产区。20 个鉴定的番茄致病疫霉菌株, 9 个菌株为 I a, 占 45%, 分布于昆明、建水和元谋, 而 11 个菌株属于 I b, 占 55%, 分离自昭通、宣威、沾益和昆明。结果还显示, 没有一个 A2 交配型菌株或自育型菌株的 mtDNA 单倍型为 I b, 这与致病疫霉 I b 谱系代表“旧”的群体的假说相符合。致

病疫霉 mtDNA 单倍型在滇东北、滇西北大春一季作种植区和滇南冬播作一季种植区的组成相对单一, 主要为 I a, 而滇中多季作种植区则组成复杂, 分布着三个单倍型, 优势谱系仍是 I a。

3 讨论

3.1 致病疫霉自育型菌株发生的意义

20 世纪 80 年代以后, 通过对各国致病疫霉菌群体

表 2 云南致病疫霉甲霜灵敏感性

Table 2 Metalaxyl sensitivity of *P. infestans* on potato and tomato in Yunnan

马铃薯或 番茄产区 Potato or tomato production region	寄主 Host	甲霜灵施用 Treatment of Metalaxyl	菌株数 Number of isolates	对甲霜灵敏感		对甲霜灵中抗		对甲霜灵抗性	
				Sensitivity		Intermediate resistance		Resistance	
				菌株数 Number of isolates	频率 (%) Frequency	菌株数 Number of isolates	频率 (%) Frequency	菌株数 Number of isolates	频率 (%) Frequency
昭通 Zhaotong	马铃薯 Potato	未用药 Untreated	5	5	100	0	0	0	0
	番茄 Tomato	用药 Treated	4	2	50	2	50	0	0
彝良 Yiliang	马铃薯 Potato	未用药 Untreated	5	5	100	0	0	0	0
镇雄 Zhenxiong	马铃薯 Potato	未用药 Untreated	5	5	100	0	0	0	0
	番茄 Tomato	用药 Treated	5	3	60	0	0	2	40
宣威 Xuanwei	马铃薯 Potato	未用药 Untreated	5	5	100	0	0	0	0
	番茄 Tomato	未用药 Untreated	5	5	100	0	0	0	0
沾益 Zhanyi	马铃薯 Potato	未用药 Untreated	5	5	100	0	0	0	0
	番茄 Tomato	未用药 Untreated	2	2	100	0	0	0	0
会泽 Huize	马铃薯 Potato	未用药 Untreated	5	5	100	0	0	0	0
丽江 Lijiang	马铃薯 Potato	未用药 Untreated	5	4	80	1	20	0	0
中甸 Zhongdian	马铃薯 Potato	未用药 Untreated	5	5	100	0	0	0	0
昆明 Kunming	马铃薯 Potato	用药 Treated	5	1	20	2	40	2	40
	番茄 Tomato	用药 Treated	8	3	37.5	2	25	3	37.5
嵩明 Songming	马铃薯 Potato	未用药 Untreated	5	5	100	0	0	0	0
寻甸 Xundian	马铃薯 Potato	未用药 Untreated	5	5	100	0	0	0	0
楚雄 Chuxiong	马铃薯 Potato	未用药 Untreated	5	5	100	0	0	0	0
元谋 Yuanmou	番茄 Tomato	用药 Treated	10	2	20	3	30	5	50
建水 Jianshui	马铃薯 Potato	未用药 Untreated	5	5	100	0	0	0	0
	番茄 Tomato	用药 Treated	2	0	0	0	0	2	100
盈江 Yingjiang	马铃薯 Potato	用药 Treated	5	5	100	0	0	0	0
陇川 Longchuan	马铃薯 Potato	用药 Treated	5	5	100	0	0	0	0

的研究, 先后在英国、荷兰、匈牙利、德国、美国、俄罗斯、日本、瑞士、挪威等国的致病疫霉群体中检测到有少量的自育型菌株的发生。黄河^[19]报道了上世纪 60 年代曾在中国发现过 2 个自育型的致病疫霉菌株。继 1998~1999 年在云南的马铃薯产区宣威、禄劝和楚雄分离到 8 个致病疫霉自育型菌株后^[18], 本研究在昆明、嵩明的致病疫霉菌株中又检测大量的自育型菌株, 是何原因导致在云南检测到较高比例的自育型菌株值得进一步的研究。据 Smart 等^[20]报道, 自育型菌株的发生可能与环境和遗传因素有关。目前对异宗配合的致病疫霉为何会出现同宗配合的自育型菌株的原因尚不十分明确, 其发生的意义、遗传与变异机理, 其自交后代对寄主植物致病性变异的影响等诸多方面的问题需作更深入的研究。但可以肯定的是: 由于自育型菌株自身可进行有性生殖产生卵孢子, 将增加致病疫霉遗传变异的途径。毒性基因的重组, 增加了居群的毒力多样性, 从而也增大了晚疫病发生、流行的风险。

3.2 云南致病疫霉交配型的组成及变化

到 20 世纪 90 年代后期, 致病疫霉 A2 交配型已分布在除大洋洲以外的众多国家^[21,22], 但是 A2 交配型在各国发生频率是极度不均衡的, 在墨西哥中部和东北部地区, 荷兰南部的 Flevoland 地区, A1 和 A2 两种交配型发生比例大致相同, 在大部分其它国家, A2 交配型仅以较低频率出现, 而在像乌拉圭、巴西、日本、韩国等少数国家, A2 交配型发生的频率则非常高, 在致病疫霉群体中所占的比例超过 80%, 而且不同年度之间交配型组成有较大的变化^[23~25]。1996 年报道在中国内蒙和山西发现 A2 交配型以来, 陆续在其它省区也发现了 A2 交配型, 表明包含 A2 交配型在内的致病疫霉“新”群体已在我国马铃薯和番茄产区传播, 但总体上 A2 交配型发生的频率较低^[11, 13~15, 18]。2000~2003 年间 A1 交配型仍旧为云南所有马铃薯产区和番茄产区的优势病原菌群体, A2 交配型仅局限在陆良、昆明及嵩明, 表明引起云南省绝大部分马铃薯和番茄产区晚疫病的优势致病疫霉群体仍是无性繁殖群体, 即使有有性生殖的发生, 其范围也是有限的并且云南省致病疫霉 A2 交配型的分布区域和发生频,

率较之1998~1999年发生了很大的变化^[11,18]。2000年从昆明和2001年从嵩明两地采集的马铃薯晚疫病病样中, A1、A2和自育型菌株被大量从同一田块中检测到, 甚至共存于同一马铃薯植株上。这就预示在田间自然条件下, 在云南省晚疫病发生、流行的有限地域内, 马铃薯致病疫霉有进行有性生殖的潜能^[12], 而番茄致病疫霉全部由A1交配型组成, 在云南进行有性生殖的潜能十分有限。

2002年以后, 云南省各个马铃薯产区致病疫霉的群体遗传结构发生了明显的变化, A1交配型比例持续增加, A2交配型和自育型菌株逐渐消失, 可能与高寄生适合度的A1交配型“新”群体在全省的迁移、演替以及有性生殖产生的“Red Queen”有关^[26]。

3.3 云南致病疫霉对甲霜灵的抗药性

甲霜灵在生产上广泛应用于马铃薯和番茄晚疫病的防治, 但是甲霜灵作用位点单一, 长期单一地使用很容易使病原菌发生突变, 产生抗药性。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^[27,28]。最近在我国马铃薯和番茄产区也发现了较高比例的甲霜灵抗性菌株^[13,15,29]。

本研究中, 除宣威、昆明、元谋、建水等地检测到有中抗和抗性菌株外, 从其它12个产区分离获得的马铃薯致病疫霉菌株全部是敏感的, 没有中抗或抗性菌株, 可能与这些马铃薯产区未用甲霜灵等苯酰胺类杀菌剂进行晚疫病防治或刚开始施用杀菌剂进行晚疫病防治相关, 没有对致病疫霉群体形成选择压力。由于马铃薯主要种植在云南的经济欠发达地区, 绝大部分马铃薯产区的生产者没有使用甲霜灵等苯酰胺类杀菌剂进行晚疫病的防治, 因此检测到的马铃薯致病疫霉菌株中抗性和中抗菌株的比例较低。而元谋、建水是云南番茄生产的重要产区, 每季喷施的甲霜灵等杀菌剂水平很高, 因此抗性菌株出现的比例较高。从丽江未施药防治的马铃薯上分离的菌株中检测到中抗菌株, 很可能是通过“新”群体的迁移从其它地区传入的。从云南检测到的甲霜灵不敏感性菌株基本上来自当地有晚疫病防治习惯的地区, 表明各地致病疫霉对甲霜灵表现的抗药性与杀菌剂的施用情况密切相关, 这可能归因于甲霜灵等苯酰胺类杀菌剂的选择压力, 加快了抗药性群体的发展。

总之, 为科学有效地制定晚疫病防治措施, 应加强在各个马铃薯或番茄产区致病疫霉抗药性的监测以及不同杀菌剂之间的交抗关系研究^[13,29,30], 指导生产者合理进行杀菌剂的轮换和使用, 避免长期施用单一

的杀菌剂, 降低抗药性产生的风险, 从而延长杀菌剂使用的年限。

3.4 云南致病疫霉“新”、“旧”群体的演替

由于致病疫霉 mtDNA 结构简单、进化速率快、且是单亲遗传, 使得它成为研究致病疫霉起源进化以及系统发育的理想研究对象。根据对致病疫霉群体线粒体 DNA (mtDNA) 多态性的研究, 全球已知的致病疫霉群体共划分出4个 mtDNA 单倍型, 即: I a、II a、I b 和 II b^[17]。Fry 等^[7,21]以及 Goodwin 等^[1,6] 提出假说, 认为 I b 代表致病疫霉群体在第二次全球迁移之前广泛分布的与 US-1 无性繁殖谱系密切相关的“旧”群体, 而 I a、II a 和 II b 则为第二次全球迁移发生后在墨西哥以外出现的“新”群体。

2000~2003 年间检测的云南马铃薯致病疫霉没有发现一个菌株的 mtDNA 单倍型属于 I b, 而全部是 I a 和 II a 两种单倍型, 尽管两者在群体中的分布差异显著, 但均属于“新”群体, 表明致病疫霉“新”群体已成功地替代了“旧”群体, 成为云南马铃薯产区的主导者, 这与 Akino 等^[31]报道的中国甘肃和河北马铃薯致病疫霉的结果、与欧洲最近分离自番茄和马铃薯的致病疫霉 mtDNA 单倍型的结果一致^[32,33]。在番茄致病疫霉群体中, 则为 I a 和 I b 两种单倍型, “新”、“旧”群体共存, 分布于滇东和滇中马铃薯主产区内的番茄致病疫霉主要是 I b 单倍型, 分布于云南南部地区的元谋、建水等番茄主产区的致病疫霉全部是 I a 单倍型, 暗示着不同群体间的番茄致病疫霉有较大的差异。令人感兴趣的是: 滇东北、滇西北大春一季作种植区内的所有马铃薯致病疫霉全部是 I a 单倍型, 而番茄致病疫霉则全部是 I b 单倍型, 但为何“新”群体的 I a 没有替代“旧”群体的 I b 单倍型? 是否因为致病疫霉对马铃薯和番茄的寄主专化性的遗传隔离降低了云南的致病疫霉在两个寄主间的交互侵染^[34]? 具体的原因有待进一步的研究。

中国 20 世纪 80 年代以前, 检测到的致病疫霉均是 I b 单倍型的 US-1 谱系^[35]。由于 20 世纪 80~90 年代中期中国致病疫霉样本以及有关马铃薯历史事件记录的缺乏, 现在已无法追溯“新”的群体何时迁移传播到云南, 也无法考证中国致病疫霉“新”、“旧”群体的演替具体从何时发生, 但有一点是可以肯定的: 我国致病疫霉群体结构的变化和“新”、“旧”群体的演替与 20 世纪 70 年代末期开始的第二次全球迁移密切相关。具 Fry^[21]推测, 在与中国毗邻的日本、韩国发现 A2 交配型时, 致病疫霉“新”群体可能也同

时传播到了中国。Gotoh 等最近的研究也证明致病疫霉的迁移可能发生在一些亚洲国家之间^[36]。

基于云南致病疫霉群体 mtDNA 单倍型的分析, 表明“新”群体已经成功替代“旧”群体成为云南马铃薯产区的优势病原菌系, 这对云南马铃薯和番茄产业的可持续发展是一个非常严重的威胁。除了要加快抗性品种选育的进程外, 有关致病疫霉群体特征的变化也需要持续地开展研究, 以便能预测晚疫病的危害和流行趋势, 科学地指导病害的合理控制。

4 结论

4.1 2000~2003 年期间云南马铃薯致病疫霉的交配型组成发生了明显的变化, 表明马铃薯致病疫霉群体的遗传结构也发生了较大的变化。

4.2 致病疫霉对甲霜灵的敏感性与各地农药施用密切相关, 番茄致病疫霉甲霜灵抗性菌株发生比例较高, 指导生产者合理进行杀菌剂的轮换和使用是必要的。

4.3 致病疫霉“新”、“旧”群体在云南已发生演替; 马铃薯致病疫霉“新”群体已成功地替代了“旧”群体, 成为云南马铃薯产区的优势菌系, 番茄致病疫霉则“新”、“旧”群体共存, 马铃薯和番茄致病疫霉群体的遗传结构有明显差异。

4.4 现存的云南致病疫霉群体与历史上致病疫霉的第二次全球迁移与演替密切相关。具有高适合度的致病疫霉“新”群体的迁移或有限范围发生的有性生殖在群体的演替中承担了重要的作用, 同时也增大了新品种培育和病害控制的难度。

References

- [1] Goodwin S B. The population genetics of *Phytophthora Phytopathology*, 1997, 87: 462-473.
- [2] Smart C D, Fry W E. Invasion by late blight pathogen: renewed sex and enhanced fitness. *Biological Invasion*, 2001, 3: 235-243.
- [3] McDonald B A, Linde C. Pathogen population genetics, evolutionary potential and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 2002, 40: 349-379.
- [4] Brasier C M. Evolutionary biology of *Phytophthora*. *Annual Review of Phytopathology*, 1992, 30: 153-200.
- [5] Drenth A, Janssen E M, Govers F. Formation and survival of oospores of *Phytophthora infestans* under natural conditions. *Plant Pathology*, 1995, 44: 86-94.
- [6] Goodwin S B, Cohen B A, Fry W E. Panglobal distribution of a single clonal lineage of the Irish potato famine fungus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994, 91: 11591-11595.
- [7] Fry W E, Goodwin S B. Resurgence of the Irish potato famine fungus. *Bioscience*, 1997, 47: 363-371.
- [8] Duncan J M. *Phytophthora*—an abiding threat to our crops. *Microbiology Today*, 1999, 26: 114-116.
- [9] Garelik G. Taking the bite out of potato blight. *Science*, 2002, 298: 1702-1704.
- [10] Zhang Z M, Li Y Q, Tian S M, Zhu J H, Wang J, Song B F. The occurrence of potato late blight pathogen (*Phytophthora infestans*) A2 mating type in China. *Journal of Agricultural University of Hebei*, 1996, 19: 65-69.
- [11] 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. *植物病理学报*, 2000, 30: 375. Zhu J H, Zhang Z M, Li Y Q. Distribution of the A2 mating type of potato late blight pathogen (*Phytophthora infestans*). *Acta Phytopathologica Sinica*, 2000, 30: 375. (in Chinese)
- [12] 赵志坚, 李成云, 王淑芬, 隋启君. 致病疫霉在中国云南的马铃薯田间形成卵孢子. *菌物系统*, 2001, 20: 578-580. Zhao Z J, Li C Y, Wang S F, Sui Q J. Formation of oospores of *Phytophthora infestans* in natural potato field in Yunnan Province of China. *Mycosystema*, 2001, 20: 578-580. (in Chinese)
- [13] 朱小琼, 车兴璧, 国立耘, 王英华. 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. Zhu X Q, Che X B, Guo L Y, Wang Y H. Mating type of *phytophthora infestans* from six provinces(cities) in China and their sensitivity to several fungicides. *Plant Protection*, 2004, 30: 20-23. (in Chinese)
- [14] 杨宇红, 谢丙炎, 冯兰香, 冯东昕. 中国番茄晚疫病菌交配型及其分布研究. *菌物学报*, 2004, 23: 351-355. Yang Y H, Xie B Y, Feng L X, Feng D X. Mating types and their distribution of *Phytophthora infestans* from tomato in China. *Mycosystema*, 2004, 23: 351-355. (in Chinese)
- [15] 陈庆河, 翁启勇, 谢世勇, 兰成忠, 卢同. 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. Cheng Q H, Weng Q Y, Xie S Y, Lan C Z, Lu T. Distribution of mating type and metalaxyl-resistance of *Phytophthora infestans* in Fujian. *Acta Phytophylacica Sinica*, 2004, 31(2): 151-156. (in Chinese)
- [16] Forbes G A. Laboratory manual for *Phytophthora infestans* work at CIP-Quito, CIP, 2001: 1-41.
- [17] 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64: 4007-4014.
- [18] 赵志坚, 王淑芬, 李成云, 李先平, 何云昆. 云南省马铃薯晚疫病菌交配型分布及发生频率. *西南农业学报*, 2001, 14(4): 55-57.
- Zhao Z J, Wang S F, Li C Y, Li X P, He Y K. Distribution and occurrence frequency of mating type of *Phytophthora infestans* from potato in Yunnan. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2001, 14(4): 55-57.(in Chinese)
- [19] 黄河. 同宗配合的马铃薯晚疫病病菌曾在中国被发现. *植物病理学报*, 2002, 32: 347-350.
- Hang H. Homothallic *Phytophthora infestans* was found in China. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2002, 32: 347-350.(in Chinese)
- [20] Smart C D, Mayton H, Mizubuti E S G. Environmental and genetic factors influencing self-fertility in *Phytophthora infestans*. *Phytopathology*, 2000, 90: 987-994.
- [21] Fry W E, Goodwin S B, Dyer A T, Matsuzak J M, Drenth A, Tooley P W, Sandlan K P. Historical and recent migrations of *Phytophthora infestans*: chronology, pathways, and implications. *Plant Disease*, 1993, 77: 653-661.
- [22] Goodwin S B, Drenth A. Origin of the A2 mating type of *Phytophthora infestans* outside Mexico. *Phytopathology*, 1997, 87: 992-999.
- [23] Nishimura R, Sato K, Lee W, Singh U P, Chang T, Suryaningsih E, Suwonakenee S, Lumyong P, Chamswarng C, Tang W, Shrestha S K, Kato M, Fujii N, Akino S, Kondo N, Kobayashi K, Ogoshi A. Distribution of *Phytophthora infestans* populations in seven Asian countries. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 1999, 65: 163-170.
- [24] Deahl K L, Pagani M C, Vilaro F L, Perez F M, Moravec B, Cooke L R. Characteristics of *Phytophthora infestans* isolates from Uruguay. *European Journal of Plant Pathology*, 2003, 109(3): 277-281.
- [25] Reis A, Smart C D, Fry W E, Maffia L A, Mizubuti E S G. Characterization of isolates of *Phytophthora infestans* from southern and southeastern Brazil from 1998 to 2000. *Plant Disease*, 2003, 87: 896-900.
- [26] Gavino P D, Smart C D, Sandrock R W. Implications of sexual reproduction for *Phytophthora infestans* in the United States: Generation of an aggressive lineage. *Plant Disease*, 2000, 84: 731-735.
- [27] Gisi U, Cohen Y. Resistance to phenylamide fungicides: A case study with *Phytophthora infestans* involving mating type and race structure. *Annual Review of Phytopathology*, 1996, 34: 549-572.
- [28] Shattock R C. *Phytophthora infestans*: populations, pathogenicity and phenylamides. *Pest Management Science*, 2002, 58: 944-950.
- [29] 毕朝位, 王中康, 车兴壁. 番茄晚疫病菌 (*Phytophthora infestans*) 对甲霜灵的抗性测定及治理. *西南农业学报*, 2003, 16(1): 68-70.
- Bi C W, Wang Z K, Che X B. Resistance *Phytophthora infestans* to metalaxyl and the strategy for control. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2003, 16(1): 68-70.(in Chinese)
- [30] 王文桥, 马志强, 张小风, 张文吉, David M. 致病疫霉的抗药性、交配型和适合度. *植物病理学报*, 2002, 32: 278-283.
- Wang W Q, Ma Z Q, Zhang X F, Zhang W J, David M. Resistance to fungicides, mating types and fitness of *Phytophthora infestans*. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2002, 32: 278-283.(in Chinese)
- [31] Akino S, Gotoh K, Nishimura R, Maeda A, Naito S, Ogoshi A. Comparison of Chinese and Japanese A1 isolates of *Phytophthora infestans*. *Journal of General Plant Pathology*, 2004, 70: 212-214.
- [32] Day J P, Wattier R A M, Shaw D S. Phenotypic and genotypic diversity in *Phytophthora infestans* on potato in Great Britain, 1995-98. *Plant Pathology*, 2004, 53: 303-315.
- [33] Knapova G, Gisi U. Phenotypic and genotypic structure of *Phytophthora infestans* populations on potato and tomato in France and Switzerland. *Plant Pathology*, 2002, 51: 641-653.
- [34] Oyarzun P J, Pozo A, Ordoñez M E, Doucett K, Forbes G A. Host specificity of *Phytophthora infestans* on tomato and potato in Ecuador. *Phytopathology*, 1998, 88: 265-271.
- [35] Koh Y J, Goodwin S B, Dyer A T, Cohen B A, Ogoshi A, Sato N, Fry W E. Migrations and displacements of *Phytophthora infestans* population in east Asian countries. *Phytopathology*, 1994, 84: 922-927.
- [36] Gotoh K, Akino S, Maeda A, Kondo N, Naito S, Kato M, Ogoshi A. Characterization of some Asian isolates of *Phytophthora infestans*. *Plant Pathology*, 2005, 54: 733-739.

(责任编辑 王红艳)