

黑龙江省马铃薯晚疫病菌的交配型和 multi-locus 基因型分析

张铨哲 韩晓旭 郭衍锦 李璐 李媛媛

(东北农业大学农学院, 黑龙江哈尔滨 150030)

摘要: 2015~2017年在黑龙江省哈尔滨市、绥化市和齐齐哈尔市各马铃薯主产区共采集分离了126株马铃薯晚疫病菌菌株,测定交配型、mtDNA单倍型、SSR基因型并进行multi-locus基因型分析。结果显示,126株菌株中发现了A1、A2、自育型3种交配型,分别占分离菌株总数的88.1%、6.3%和5.6%。126株菌株中共鉴定出Ia和IIa两种mtDNA单倍型,分别占分离菌株总数的17.5%和82.5%。126株菌株中共鉴定出7种SSR基因型,分别为F-01、F-02、F-03、F-05、F-06、D-03和G-02,其中F-01基因型(77.8%)为优势基因型。根据马铃薯晚疫病菌的mtDNA单倍型和SSR基因型,共划分了9种multi-locus基因型,其中multi-locus基因型A(65.1%)是黑龙江省发现的优势基因型。2015~2017年黑龙江省马铃薯晚疫病菌群体结构逐年复杂,绥化市马铃薯晚疫病菌群体结构最为复杂。

关键词: 马铃薯晚疫病菌; 交配型; mtDNA单倍型; SSR基因型; multi-locus基因型

中国是马铃薯生产大国,马铃薯已成为继小麦、玉米之后的第三大作物,种植面积和产量居于世界首位(王立等,2013)。黑龙江省因得天独厚的凉爽气候和地理条件,成为我国马铃薯主产区之一(关红颖,2011)。然而,近几年由于黑龙江省降雨量大等天气原因,马铃薯晚疫病发生十分严重。

马铃薯晚疫病是由致病疫霉 *Phytophthora infestans* 引起的马铃薯毁灭性病害,可造成巨大的经济损失(金光辉等,2017)。马铃薯晚疫病菌通过不同交配型菌株之间异宗配合进行有性生殖,有性生殖可产生卵孢子,卵孢子可在土壤中越冬,成为翌年的初侵染源。不同交配型同时存在时说明马铃薯晚疫病菌适应性和变异性增强(闵凡祥等,2010)。Gallegly和Galindo(1958)在墨西哥中部首先发现了A1和A2交配型。张志铭等(1996)首次在国内报道了A2交配型菌株。朱杰华(2004)首次在黑龙江采集分离的菌株中鉴定出A2交配

型,其出现频率仅为2.2%。王腾等(2016)对2011~2013年在黑龙江采集的菌株进行交配型测定,A1交配型占菌株总数的51.63%,其余为A2交配型。这些研究表明晚疫病菌由于不同交配型的出现,可以在田间进行有性生殖和无性繁殖,导致晚疫病菌群体结构发生变化。晚疫病菌群体结构变化对晚疫病防治提出了新的挑战,因此研究马铃薯晚疫病菌群体遗传结构变化具有重要意义。

线粒体基因组具有结构简单、无组织特异性等优点,采用检测线粒体多态性方法研究晚疫病菌群体遗传结构变化效果更佳(May & Ristino, 2004)。对马铃薯晚疫病菌线粒体DNA(mtDNA)多态性进行研究,逐步成为国内外研究热点。Griffith和Shaw(1998)采用改进PCR-RFLP方法将线粒体单倍型分为Ia、IIa、Ib、IIb。Rojas和Kirk(2016)研究表明,2008~2010年在密歇根州采集分离的124株致病疫霉的mtDNA单倍型均为Ia型。Tian等(2016)鉴定了中国西北地区采集分离的马铃薯晚疫病菌mtDNA单倍型,结果检测到Ia、IIa和IIb3种单倍型,其中Ia为优势基因型。徐生军(2010)利用PCR-RFLP方法,对黑龙江省采集分离的马铃薯晚疫病菌进行mtDNA单倍型检测,共

张铨哲,男,博士,教授,硕士生导师,专业方向:植物病害综合防治,

E-mail: zhe3850@163.com

收稿日期:2017-11-13;接受日期:2018-03-06

基金项目:黑龙江省自然科学基金项目(C2016019),黑龙江省经济作物现代农业产业技术协同创新体系项目(HNWJZTX201701)

检测到I a和II a两种单倍型。可见,4种单倍型在不同国家和地区的分布具有一定差异。

SSR标记具有多态性高、重复性好、数量丰富、发生频率高、批量操作等优点(李建武,2011),近些年成为研究马铃薯晚疫病菌群体遗传多样性的主要方法。对采自黑龙江的致病疫霉进行SSR基因型分析,吴艳清等(2012)鉴定出8种基因型,F-01型所占比例最高。而王晨(2013)的鉴定结果表明,从黑龙江采集的菌株共鉴定出6种SSR基因型,F-01为优势基因型。这些研究表明,黑龙江省马铃薯晚疫病菌的SSR基因型呈现一种动态变化。

Runno-Paurson等(2016)对爱沙尼亚的马铃薯晚疫病菌进行交配型和SSR基因型测定,结果表明该地区出现不同交配型菌株,SSR基因型也趋于多样化。Rekad等(2017)通过SSR标记分析、交配型和瑞毒霉敏感性的测定,对阿尔及利亚西北部地区的致病疫霉进行系统分析,结果表明不同交配型的菌株其对应的优势SSR基因型有差异。Guo等(2010)通过交配型、同工酶基因型、mtDNA单倍型和RG57指纹的分析,发现中国地区的马铃薯晚疫病菌基因型和表现型与其他国家有差异。

我国缺少对马铃薯晚疫病菌 multi-locus 基因型的研究。本试验首先测定黑龙江省马铃薯晚疫病菌的交配型;其次,利用PCR-RFLP方法和SSR标记测定黑龙江省马铃薯晚疫病菌的mtDNA单倍型和SSR基因型;第三,利用mtDNA单倍型和SSR基因型确定黑龙江省马铃薯晚疫病菌的 muti-locus 基因型;最终,分析交配型与 muti-locus 基因型的相互关系。以期为马铃薯晚疫病菌的群体遗传研究和马铃薯晚疫病的防治提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 供试菌株及培养基

2015~2017年,在黑龙江省齐齐哈尔市、绥化市、哈尔滨市各马铃薯主产区采集具有马铃薯晚疫病主要症状的单病斑叶片,将马铃薯切成约0.5 cm的薯片,用70%酒精将切后的薯片消毒,将病叶放入灭菌后的选择性培养基中,把消毒处理后的薯片放在病叶上,加入一定的蒸馏水,用封口膜封盖,19℃黑暗培养箱中培养4~6 d。

供试培养基为20%番茄汁琼脂培养基和选择

性培养基(张铨哲和徐生军,2010)。

1.2 马铃薯晚疫病菌的交配型测定

交配型的测定采用对峙培养法,使用20%番茄汁琼脂培养基。将标准菌株A1(DN-3085日本)、A2(TBC-3韩国)与待测菌株预培养,然后将标准菌株和待测菌株菌饼分别与A1、A2标准菌株对峙培养,菌饼之间距离为3 cm。封盖,每个菌株重复测定3次,19℃恒温培养14 d,在显微镜下观察菌落交界处是否产生卵孢子。若待测菌株与A2标准菌株之间产生卵孢子,且与A1标准菌株间不产生卵孢子,说明所测菌株是A1交配型;相反,则是A2交配型。若与2个标准菌株间都产生卵孢子,且自身也可产生卵孢子,则待测菌株类型为自育型。

1.3 DNA提取

将待测菌株接种到20%番茄汁琼脂培养基中,每株菌株接种3皿,19℃黑暗培养箱中培养14 d左右,用灭过菌的滤纸吸干菌丝上的水分,装入1.5 mL EP管中,-20℃下保存用于DNA的提取。参考Goodwin等(1992)的方法提取基因组DNA。

1.4 马铃薯晚疫病菌 mtDNA 单倍型测定

1.4.1 引物序列与扩增体系 线粒体DNA单倍型分析的PCR-RFLP方法参考Griffith和Shaw(1998)的方法。引物序列:P2:F2:5'-TTCCCTTTGTCCTCTACCCAT-3',R2:5'-TTACGGCGGTTTAGCACATACA-3';P4:F4:5'-TGATCATCCAGAGGTTTATGTT-3',R4:5'-CCGATACCGATACCAGCACCAA-3'。所用引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。PCR扩增体系和程序参考Zhang等(2006)的方法。

1.4.2 酶切体系 目的片段回收采用核酸回收试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司]。P2引物扩增片段使用Msp I酶切,P4引物扩增片段使用EcoR I酶切,酶切体系为50 μL:胶回收产物10 μL,Buffer 5 μL,Enzyme 1 μL,ddH₂O补足至50 μL。反应条件为37℃水浴3 h。将酶切产物与溴酚蓝混合,采用1.5%琼脂糖凝胶电泳检测,用凝胶成像仪拍照。

1.5 马铃薯晚疫病菌 SSR 基因型测定

1.5.1 SSR引物序列与扩增体系 马铃薯晚疫病SSR基因型划分标准参考Knapova和Gisi(2002)的方法。引物序列Pi4B:

F: 5'-AAAATAAAGCCTTTGGTTA-3', R: 5'-GCAAGCGAGGTTTGTAGATT-3'; Pi4G: F: 5'-CGCTGTGTGGATGACAAGTA-3', R: 5'-TCGACCTGACATACGAGCTA-3'。SSR 扩增体系和扩增程序参考王晨(2013)的方法。

1.5.2 聚丙烯凝胶电泳检测 将扩增后的样品与同体积的 Loading Buffer 混合, 95 °C 变性 10 min, 扩增产物用 12% 的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 银染染色, 用凝胶成像系统拍照 (Gene Company Limited GBOX-CHEMI-XRQ)。

2 结果与分析

2.1 马铃薯晚疫病菌分离

2015~2017 年在黑龙江省哈尔滨市、绥化市和齐齐哈尔市各马铃薯主产区共采集分离了 126 株马铃薯晚疫病菌菌株 (表 1)。

表 1 黑龙江省马铃薯晚疫病菌菌株信息

采集年份	采集地区	菌株数
2015	齐齐哈尔	16
	绥化	2
	哈尔滨	4
2016	绥化	26
	哈尔滨	6
2017	绥化	35
	齐齐哈尔	37

2.2 马铃薯晚疫病菌交配型分析

在黑龙江省采集分离的 126 株马铃薯晚疫病菌菌株中共发现了 3 种交配型。A1、A2 和自育型菌株分别占所分离菌株总数的 88.1%、6.3% 和 5.6%。从采集年份分析结果显示, 2015 年采集的 22 株菌株中, 共鉴定出 A1 和 A2 2 种交配型, 其中, 21 株菌株为 A1 交配型 (95.5%), 仅 1 株菌株为 A2 交配型 (4.5%)。2016 年采集的 32 株菌株中共鉴定出 3 种交配型, 其中 26 株 A1 交配型菌株 (81.3%), 4 株 A2 交配型 (12.5%), 2 株自育型 (6.2%)。2017 年共分离鉴定了 72 株菌株, 3 株菌株为 A2 交配型 (4.2%), 5 株菌株为自育型 (6.9%), 其余 64 株菌株为 A1 交配型 (88.9%), 由此可见, 自育型菌株比例逐年增长, 各年份之间 A1 交配型所占比例具有差异。

从采集地区分析结果显示, 哈尔滨市采集分离的菌株均为 A1 型 (100%), 绥化市采集分离的

菌株共鉴定出 3 种交配型, 56 株为 A1 交配型菌株 (88.9%), 5 株为 A2 交配型菌株 (7.9%), 2 株为自育型菌株 (3.2%)。齐齐哈尔市采集分离的菌株共测定出 A1、A2 和自育型 3 种, 分别为 46 株 (86.8%)、2 株 (3.8%) 和 5 株 (9.4%)。以上结果显示, 哈尔滨市马铃薯主产区与其他 2 个马铃薯主产区相比晚疫病菌交配型相对单一, 各地区之间不同交配型所占百分比具有明显差异。

2.3 马铃薯晚疫病菌 mtDNA 单倍型分析

黑龙江省采集分离的 126 株马铃薯晚疫病菌菌株共鉴定出 I a 和 II a 2 种 mtDNA 单倍型, 其中 104 株菌株为 II a 单倍型 (82.5%), 22 株菌株为 I a 单倍型 (17.5%)。从采集年份分析结果显示, 2015 年测定的 22 株菌株中, 共测定出 19 株 II a 单倍型菌株 (86.4%), 3 株为 I a 单倍型菌株 (13.6%)。2016 年分离鉴定的 32 株菌株中, 24 株为 II a 单倍型菌株 (75.0%), 其余 8 株为 I a 单倍型菌株 (25.0%)。2017 年分离的 72 株菌株中, 11 株为 I a 单倍型菌株 (15.3%), 61 株为 II a 单倍型菌株 (84.7%)。2015 年所鉴定菌株中 II a 单倍型比例最高。

从采集地区分析结果显示, 哈尔滨市采集分离的菌株均为 II a 单倍型 (100%), 绥化市分离的 63 株菌株中, 共鉴定出 I a 和 II a 2 种单倍型, 分别为 15 株 (23.8%) 和 48 株 (76.2%)。齐齐哈尔市鉴定的 53 株菌株中, 46 株为 II a 单倍型 (86.8%), 7 株为 I a 单倍型 (13.2%)。可见哈尔滨市马铃薯主产区 mtDNA 单倍型单一, 各地区马铃薯晚疫病菌不同 mtDNA 单倍型所占比例具有明显差异。

2.4 马铃薯晚疫病菌 SSR 基因型分析

对黑龙江省采集分离的 126 株马铃薯晚疫病菌菌株进行 SSR 基因型分析, 共鉴定出 7 种基因型, 分别为 F-01、F-02、F-03、F-05、F-06、D-02 和 G-02。其中 F-01 基因型菌株共鉴定出 98 株 (77.8%), F-05 基因型为 12 株 (9.5%), F-03 基因型菌株为 7 株 (5.5%), D-02 基因型菌株为 4 株 (3.2%), F-06 基因型菌株为 3 株 (2.4%), F-02 基因型和 G-02 基因型分别鉴定出 1 株 (0.8%)。

从采集年份来看 (图 1), 2015 年分离鉴定的 22 株菌株中, 共鉴定出 3 种基因型, 分别为 F-01、F-05 和 F-03。2016 年共鉴定出 5 种基因型, 分别为 F01、F02、F03、F05、D02, 其中 F-01 基因型

菌株 24 株 (75.0%)，占比最高。2017 年共鉴定出 6 种基因型。可见黑龙江省马铃薯晚疫病病菌 SSR 基因型多样性逐年增加，F-01 基因型为优势基因型，各年份间 F-01 基因型所占比例存在差异 (图 1)。

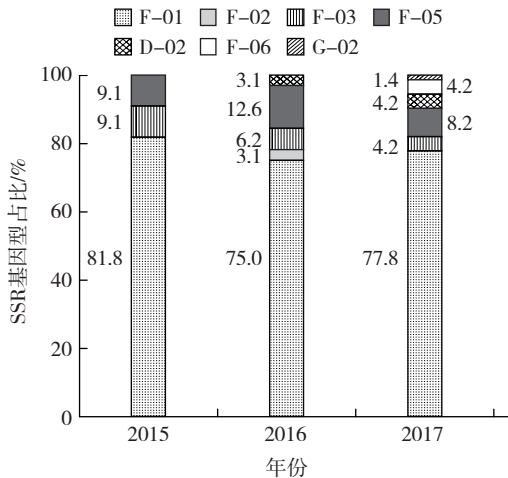


图 1 采集年份与马铃薯晚疫病病菌 SSR 基因型关系

从采集地点来看 (图 2)，哈尔滨市采集分离的菌株只有 F-01 和 D-02 2 种基因型，分别占鉴定总菌株数的 90.0% 和 10.0%。绥化市采集分离的菌株 SSR 基因型最多，有 7 种，其中 F-01 基因型 47 株 (74.6%)，占比最高。齐齐哈尔市共鉴定出 5 种 SSR 基因型 (图 2)。

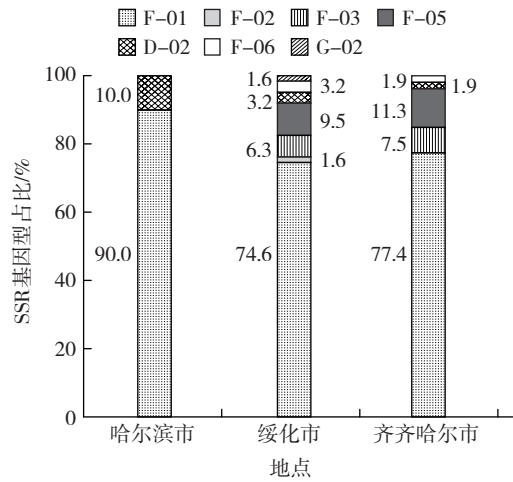


图 2 采集地区与马铃薯晚疫病病菌 SSR 基因型关系

2.5 马铃薯晚疫病病菌 multi-locus 基因型分析

根据 mtDNA 单倍型和 SSR 基因型，2015~2017 年黑龙江省采集分离的菌株共划分成 9 种 multi-locus 基因型 (表 2)，优势基因型均为 multi-locus A 基因型。其中 2015 年采集分离的马铃薯晚疫病病菌共鉴定出 4 种 multi-locus 基因型，2016 年共鉴定出 7 种 multi-locus 基因型，其中 multi-locus F 基因型只在 2016 年分离的菌株中出现。2017 年共鉴定出 8 种基因型。Multi-locus H 基因型和 multi-locus I

表 2 黑龙江省分离的马铃薯晚疫病病菌采集年份与 multi-locus 基因型分析

multi-locus 基因型	采集年份/个数 (占比)			交配型/个数			
	2015	2016	2017	A1	A2	自育型	总菌株数
A	15 (68.2%)	18 (56.3%)	49 (68.1%)	69	6	7	82
B	3 (13.6%)	6 (18.8%)	7 (9.6%)	15	1	0	16
C	2 (9.1%)	4 (12.5%)	6 (8.3%)	12	0	0	12
D	2 (9.1%)	1 (3.1%)	2 (2.8%)	4	1	0	5
E	0 (0)	1 (3.1%)	1 (1.4%)	2	0	0	2
F	0 (0)	1 (3.1%)	0 (0)	1	0	0	1
G	0 (0)	1 (3.1%)	3 (4.2%)	4	0	0	4
H	0 (0)	0 (0)	3 (4.2%)	3	0	0	3
I	0 (0)	0 (0)	1 (1.4%)	1	0	0	1

注: A—II a, F-01; B—I a, F-01; C—II a, F-05; D—II a, F-03; E—I a, F-03; F—I a, F-02; G—II a, D-02; H—I a, F-06; I—II a, G-02; 下表同。

基因型只在 2017 年分离的菌株中出现。Multi-locus 基因型多样性呈逐年增加的趋势。

从表 3 可以看出，哈尔滨市采集分离的菌株鉴定出 3 种基因型，绥化市采集分离的菌株共鉴定出 9 种基因型，其中 multi-locus F 和 multi-locus I 基因型仅在绥化市出现。齐齐哈尔市采集分离的菌株中共鉴定出 7 种基因型。表明绥化市各马铃薯主产

区的马铃薯晚疫病病菌基因型更为丰富 (表 3)。

综合上述 multi-locus 基因型和交配型结果，multi-locus 基因型为 A 基因型的马铃薯晚疫病病菌其交配型类型为 A1、A2 和自育型，基因型 B 和基因型 D 的马铃薯晚疫病病菌其交配型类型为 A1 和 A2。其余几种 multi-locus 基因型的马铃薯晚疫病病菌交配型都为 A1。

表 3 黑龙江省分离的马铃薯晚疫病菌采集地区与 multi-locus 基因型分析

multi-locus 基因型	采集地点/个数 (占比)			交配型/个数			
	哈尔滨市	绥化市	齐齐哈尔市	A1	A2	自育型	总菌株数
A	8 (80.0%)	38 (60.3%)	36 (67.9%)	67	8	5	82
B	1 (10.0%)	10 (15.8%)	4 (7.5%)	14	1	0	15
C	0 (0)	6 (9.5%)	6 (11.3%)	12	0	0	12
D	0 (0)	2 (3.2%)	4 (7.5%)	4	2	0	6
E	0 (0)	1 (1.6%)	1 (1.9%)	2	0	0	2
F	0 (0)	1 (1.6%)	0 (0)	1	0	0	1
G	1 (10.0%)	2 (3.2%)	1 (1.9%)	4	0	0	4
H	0 (0)	2 (3.2%)	1 (1.9%)	3	0	0	3
I	0 (0)	1 (1.6%)	0 (0)	1	0	0	1

3 结论与讨论

3.1 马铃薯晚疫病菌交配型

马铃薯晚疫病菌是危害马铃薯、番茄等作物的一种卵菌纲致病真菌, 2012~2013年马铃薯晚疫病在全国范围内偏重发生, 发生范围广且流行快, 对马铃薯造成严重危害(黄冲和刘万才, 2016)。

王鹤等(2012)对2009年在黑龙江省采集的菌株进行交配型检测, 结果表明鉴定菌株均为A1交配型。郭梅等(2015)研究发现, 2011~2012年在黑龙江省哈尔滨、绥化望奎县、齐齐哈尔克山等地发现大量A2交配型马铃薯晚疫病菌菌株, 2011年A2交配型占被测菌株的23.08%; 2012年占被测菌株的30%。由此可见, 黑龙江省马铃薯晚疫病菌交配型逐年复杂, 但2014年后有关黑龙江省马铃薯晚疫病菌交配型方面的报道较少。本试验对2015~2017年在黑龙江马铃薯主产区采集分离出的晚疫病菌进行交配型测定, 研究发现自育型菌株出现频率逐年增加。从采集地点上发现哈尔滨市只有A1交配型菌株, 绥化市和齐齐哈尔市出现3种交配型, 说明与其他2个地区相比, 哈尔滨市马铃薯晚疫病菌交配型较为单一。这一结论与郭梅等(2015)的研究结果基本一致。同时也说明绥化市和齐齐哈尔市马铃薯主产区有可能发生有性生殖, 并导致马铃薯晚疫病菌的遗传多样性更加复杂化。

3.2 马铃薯晚疫病菌 mtDNA 单倍型和 SSR 基因型

通过测定马铃薯晚疫病菌基因型, 可对晚疫病菌遗传变异进行探究, 为防治马铃薯晚疫病提供理论依据。本试验对2015~2017年在黑龙江各马铃薯主产区采集的马铃薯晚疫病菌进行 mtDNA 单倍

型鉴定, 鉴定出I a 和II a 两种单倍型。其中, II a 单倍型为优势基因型, 与张铨哲等(2015)的研究结果一致, 但未发现I b 单倍型菌株。同时, 本试验对晚疫病菌进行 SSR 基因型测定, 与李微(2015)对2012~2014年黑龙江省马铃薯晚疫病菌 SSR 基因型测定结果相比, 鉴定出新的基因型 F-06 基因型。从分离年份上看, 2017年黑龙江省晚疫病菌 SSR 基因型更为丰富, 从采集地区方面分析, 绥化市各马铃薯产区的马铃薯晚疫病菌 SSR 基因型更多样化。

3.3 马铃薯晚疫病菌 multi-locus 基因型

利用马铃薯晚疫病菌的交配型和 multi-locus 基因型, 对马铃薯晚疫病菌的表现型和基因型进行系统综合分析。本试验中, 2017年在黑龙江省采集分离的晚疫病菌 multi-locus 基因型最多, 说明黑龙江省马铃薯晚疫病菌群体结构逐年复杂。从分离地点分析, 绥化市采集分离的马铃薯晚疫病菌 multi-locus 基因型最为丰富。交配型与 multi-locus 基因型综合分析结果表明, multi-locus A 基因型、multi-locus B 基因型和 multi-locus D 基因型与交配型没有相关性, 其余 multi-locus 基因型与交配型相关。

哈尔滨市各马铃薯主产区马铃薯晚疫病菌 multi-locus 基因型多样性较低, 说明该地区马铃薯晚疫病菌遗传结构较为简单; 而绥化市采集的马铃薯晚疫病菌 multi-locus 基因型最多, 表明该地区马铃薯晚疫病菌群体遗传结构更具多样性。总体来说, 2015~2017年黑龙江省各马铃薯主产区的晚疫病菌群体结构逐年复杂, 给黑龙江省马铃薯晚疫病的防治带来了新的挑战。绥化市可能是黑龙江省马铃薯晚疫病的起源中心, 未来该地区应加强对马铃薯晚疫病的监控。

参考文献

- 关红颖. 2011. 黑龙江省马铃薯晚疫病的发生与防治. 中国马铃薯, 25 (3): 173-174.
- 郭梅, Vincent C, 闵凡祥, 吕军, 高云飞, 杨帅, 王晓丹, Jean-louis R. 2015. 黑龙江省发现马铃薯晚疫病菌 (*Phytophthora infestans*) A2 交配型. 中国马铃薯, (3): 171-174.
- 黄冲, 刘万才. 2016. 近几年我国马铃薯晚疫病流行特点分析与监测建议. 植物保护, 42 (5): 142-147.
- 金光辉, 李学湛, 王玉成, 王腾. 2017. 年际间干旱对晚疫病菌生理小种复杂性的影响. 植物保护, (4): 167-173.
- 李建武. 2011. SSR 标记技术在马铃薯遗传育种研究中的应用. 中国蔬菜, (20): 1-8.
- 李微. 2015. 黑龙江省马铃薯晚疫病菌群体结构的研究 [硕士学位论文]. 哈尔滨: 东北农业大学.
- 闵凡祥, 王晓丹, 胡林双, 魏琪, 董学志, 刘伟婷, 郭梅. 2010. 黑龙江省马铃薯晚疫病菌交配型的研究. 中国马铃薯, 24 (1): 47-49.
- 王晨. 2013. 马铃薯晚疫病菌的表现型和 SSR 基因型分析 [硕士学位论文]. 哈尔滨: 东北农业大学.
- 王鹤, 朱杰华, 杨志辉, 韩彦卿, 王宇, 徐小虎. 2012. 2009 年黑龙江和吉林省马铃薯晚疫病菌表型结构研究. 植物保护, 38 (1): 151-154.
- 王立, 惠娜娜, 李建军, 马永强, 周天旺, 李继平, 朱小琼, 国立耕. 2013. 甘肃省马铃薯主产区晚疫病菌生理小种组成与分布. 中国蔬菜, (11): 70-74.
- 王腾, 闵凡祥, 郭梅, 杨帅, 高云飞, 金光辉. 2016. 黑龙江省马铃薯晚疫病菌交配型及对甲霜灵敏感性测定. 植物保护, 42 (1): 180-183.
- 吴艳清, 蒋继志, 郑旭, 桂春爽, 张紫肖, 赵磊. 2012. 中国东北部与河北省致病疫霉 SSR 基因型的组成与分析. 中国农学通报, 28 (15): 170-174.
- 徐生军. 2010. 马铃薯晚疫病菌的表现型与基因型的研究 [硕士学位论文]. 哈尔滨: 东北农业大学.
- 朱杰华. 2004. 中国马铃薯晚疫病菌群体遗传结构研究 [硕士学位论文]. 保定: 河北农业大学.
- 张铨哲, 徐生军. 2010. 黑龙江省和吉林省马铃薯晚疫病菌 multi-locus 基因型分析. 中国马铃薯, 24 (2): 97-102.
- 张铨哲, 郝璐, 李微, 候思宇, 赵博, 韩晓旭. 2015. 黑龙江省马铃薯晚疫病菌交配型、瑞毒霉敏感性及 mtDNA 单倍型分析. 吉林农业科学, (5): 58-62.
- 张志铭, 李玉琴, 田世民. 1996. 中国发生马铃薯晚疫病菌 (*Phytophthora infestans*) A2 交配型. 河北农业大学学报, 19 (4): 63-65.
- Gallegly M E, Galindo J. 1958. Mating types and oospores of *Phytophthora infestans* in nature in Mexico. Phytopathology, 48: 274-277.
- Goodwin S B, Spielman L J, Matuszak J M, Bergeron S N, Fry W E. 1992. Clonal diversity and genetic differentiation of *Phytophthora infestans* populations in northern and central Mexico. Phytopathology, 82 (9): 955-961.
- Griffith G W, Shaw D S. 1998. Polymorphisms in *Phytophthora infestans*: four mitochondrial haplotypes are detected after PCR. Applied & Environmental Microbiology, 64: 4007-4014.
- Guo L, Zhu X Q, Hu C H, Ristaino J B. 2010. Genetic structure of *Phytophthora infestans* populations in China indicates multiple migration events. Phytopathology, 100 (10): 997-1006.
- Knapova G, Gisi U. 2002. Phenotypic and genotypic structure of *Phytophthora infestans* populations on potato and tomato in France and Switzerland. Plant Pathology, 51 (5): 641-653.
- May L J, Ristaino J B. 2004. Identity of the mtDNA haplotype (s) of *Phytophthora infestans* in historical specimens from the Irish potato Famine. Mycological Research, 108 (5): 471-479.
- Tian Y E, Yin J L, Sun J P, Ma Y F, Wang Q H, Quan J L, Shan W X. 2016. Population genetic analysis of *Phytophthora infestans* in northwestern China. Plant Pathology, 65 (1): 17-25.
- Rekad F Z, Cooke D E, Puglisi I, Randall E, Guenaoui Y, Bouznad Z, Evoli M, Pane A, Lio G M, Cacciola S O. 2017. Characterization of *Phytophthora infestans* populations in northwestern Algeria during 2008-2014. Fungal Biology, 5: 385-392.
- Rojas A, Kirk W W. 2016. Phenotypic and genotypic variation in Michigan populations of *Phytophthora infestans* from 2008 to 2010. Plant Pathology, 65 (6): 1022-1033.
- Runno-Paurson E, Kiiker R, Joutsjoki T, Hannukkala A. 2016. High genotypic diversity found among population of *Phytophthora infestans* collected in Estonia. Fungal Biology, 120: 385-392.
- Zhang X Z, Kim H Y, Kim B S. 2006. Analysis of genetic diversity of *Phytophthora infestans* in Korea by using molecular markers. Journal of Microbiology & Biotechnology, 16 (3): 423-430.

Analysis of Mating Type and Multi-locus Genotypes of *Phytophthora infestans* Collected from Heilongjiang Province

ZHANG Xuan-zhe, HAN Xiao-xu, GUO Yan-jin, LI Lu, LI Yuan-yuan

(School of Agriculture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang, China)

Abstract: A total of 126 *Phytophthora infestans* isolates were collected from Harbin, Suihua and Qiqihar Cities of Heilongjiang Province from 2015 to 2017. Analysis on their mating types, mtDNA haplotypes, SSR genotypes and multi-locus genotypes were carried out. The results indicated that 3 mating types of A1, A2 and

QuEChERS 法动态监测及评价山西省韭菜中 12 种农药残留

郭丽丽¹ 花锦^{2*}

(¹山西中医药大学制药与食品工程学院, 山西晋中 030619; ²山西出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 山西太原 030024)

摘要: 采用乙腈超声提取, 经 PSA、C₁₈ 基质分散净化, 通过液质联用及气质联用建立了韭菜中吡虫啉、敌敌畏、毒死蜱、多菌灵、腐霉利、甲胺磷、甲氰菊酯、克百威、六六六、氯丹、(高效) 氯氟氰菊酯、阿维菌素等 12 种农药的 QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged, safe) 快速检测方法, 并对山西省市售韭菜的农药残留状况进行了动态监测和评价。结果表明: 山西省韭菜中农药残留的总检出率为 80%, 超标率为 20%, 使用比较多的农药为吡虫啉、敌敌畏、多菌灵、腐霉利、甲氰菊酯和 (高效) 氯氟氰菊酯, 腐霉利超标是韭菜产品不合格的主要因素。8 月后太原及周边地区韭菜中的农药残留水平较高, 且该地区农贸市场与超市韭菜中农药残留的检出率相近, 但前者超标率 (27.3%) 明显高于后者 (9.1%)。

关键词: QuEChERS; 韭菜; 农药残留; 监测; 评价

韭菜是我国的特色蔬菜, 味道鲜美、香味独特, 具有丰富的营养价值。韭菜含有 VC、VB₁ 等多种维生素及矿物质, 还含有丰富的纤维素, 可以促进肠道蠕动。韭菜中硫化物的独特辛香味具有一定的杀菌消炎作用, 有助于提高人体免疫力 (商飞飞,

郭丽丽, 女, 讲师, 专业方向: 食品安全与检测, E-mail: cauguolili@163.com

* 通讯作者 (Corresponding author): 花锦, 女, 工程师, 专业方向: 食品安全, E-mail: hua-jin1986@163.com

收稿日期: 2017-12-12; 接受日期: 2018-02-01

基金项目: 国家认监委检验检疫行业标准项目 (2012B131), 山西中医药大学博士科研启动项目 (2015BK11)

2012)。然而韭菜生产中韭蛆、灰霉病等病虫害多发, 种植过程中需要适量使用农药以减少病虫害损失 (Farha et al., 2017)。但是一些菜农为了追求产量, 经常采用灌根的方法将一些高毒农药用于韭蛆的防治 (宋丹等, 2016), 造成韭菜中农药残留超标, 中毒事件频频发生 (王文娇等, 2011)。2017 年 11 月 1 日起, 山东省全面启动实施韭菜产品“双证制”管理, 严禁无《合格证》和《市场销售凭证》的韭菜产品进入食用农产品市场、生产加工、餐饮服务环节。这一举措反映出韭菜农药残留问题的日益严重性, 相关部门应加强韭菜中农药残留的监测

self-fertility were found in 126 strains isolated, accounting for 88.1%, 6.3% and 5.6% of the total isolates, respectively. Two mtDNA haplotypes, I a and II a, were identified, accounting for 17.5% and 82.5% of the total number of isolates, respectively. Seven SSR genotypes, F-01, F-02, F-03, F-05, F-06, D-03 and G-02, were identified from 126 isolates tested. Among them, the F-01 genotype (77.8%) was dominant genotype. A total of 9 multi-locus genotypes were identified by systematic analysis of *P. infestans*, and the multi-locus genotype A (65.1%) was the dominant genotype found in Heilongjiang Province. These results indicated that from 2015 to 2017, the population structure of *P. infestans* in Heilongjiang Province was very complicated year by year. And the population structure of *P. infestans* in the Suihua City was the most complex.

Key words: *Phytophthora infestans*; Mating type; mtDNA haplotype; SSR genotype; Multi-locus genotype