

马铃薯晚疫病菌的 表现型和基因型研究

张铨哲 张艳菊 著



中国农业科学技术出版社



马铃薯晚疫病菌的 表现型和基因型研究

张铨哲 张艳菊 著

中国农业科学技术出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

马铃薯晚疫病菌的表现型和基因型研究 / 张铨哲, 张艳菊
著. —北京: 中国农业科学技术出版社, 2010. 2
ISBN 978-7-80233-829-6

I. 马… II. ①张…②张… III. 马铃薯-晚疫病-研究
IV. S435.32

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2009) 第 200338 号

责任编辑 邬震坤

责任校对 贾晓红

出版者 中国农业科学技术出版社

北京市中关村南大街 12 号 邮编: 100081

电 话 (010)82106626(编辑室)(010)82109704(发行部)
(010)82109703(读者服务部)

传 真 (010)82106626

网 址 <http://www.castp.cn>

经销者 新华书店北京发行所

印刷者 北京富泰印刷有限责任公司

开 本 850 mm × 1 168 mm 1/32

印 张 7

字 数 200 千字

版 次 2010 年 2 月第 1 版 2010 年 2 月第 1 次印刷

定 价 30.00 元

—— 版权所有 · 翻印必究 ——

前 言

马铃薯 (*Solanum tuberosum* L.) 属茄科茄属双子叶植物, 是世界上仅次于水稻、小麦、玉米的第四大粮食作物, 其在中国的种植面积也很广。马铃薯是世界上重要的粮食作物之一。目前, 我国已成为国际马铃薯生产的第一大国, 2004 年栽培面积为 460 万公顷, 总产达 7505 万吨, 分别占世界的 24% 和 23% (FAO, 2004)。由于营养丰富, 增产潜力大, 被认为是人类未来的理想食品, 是着力培育的优势产业, 也是我国加工创汇的重要资源。我国已成为世界上马铃薯生产第一大国, 近来又将玉米、大豆、马铃薯列为有发展前景的国家主要作物, 马铃薯已成为富民强国的重要经济作物和工业原料作物。在限制马铃薯生产发展的诸多因素中, 晚疫病是最重要因素之一 (宋伯符, 1997)。晚疫病是我国东北、华北、西北、西南主要马铃薯产区威胁性最大的病害。据不完全统计, 20 世纪 90 年代以来我国马铃薯因晚疫病危害年损失达 10 亿美元左右, 而全球马铃薯因晚疫病年损失达 100 亿美元以上。马铃薯晚疫病在低温潮湿条件下, 几天内可毁坏整个马铃薯田地 (Fry 等, 1992; Goodwin 等, 1992a)。由于 1845 年 (Austin Bourke, 1964) 晚疫病在人类历史上曾引起著名的“爱尔兰饥荒”, 其后在世界各地马铃薯主产区均有发生和流行 (Goodwin 等, 1994a; Zhang 和 Wang, 2001), 严重威胁着马铃薯的生产 (Erwin 和 Ribeiro, 1996), 特别是进入 20 世纪 80 年代以来, 晚疫病在世界各地马铃薯主产区的频频发生及其所造成危害的严重程度, 因此其再度严重的爆发和流行, 引起了国际社会普遍的担忧和密切关注 (Fry 和 Goodwin, 1997; Dun-

can, 1999; Davidse 等, 1981), 人们对晚疫病防治研究给予了极大的重视, 对其病原菌生物学、发生条件、流行规律、预测预报和综合防治等方面均进行了较系统的研究(王军和宋伯符, 1996; Hooker, 1981)。目前马铃薯晚疫病已被列为马铃薯生产中最严重的病害(Robertson, 1991; 张志铭和宋伯符, 1993), 给世界粮食生产造成巨大损失, 严重制约着全球马铃薯生产。因此, 马铃薯晚疫病的防治成为当前世界马铃薯生产和育种中优先考虑的目标之一。

马铃薯晚疫病是由 *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary 引起的毁灭性病害, 它可以危害马铃薯、番茄和其他茄科植物。疫霉菌大多存活于土壤中, 潜育期短, 传播速度快, 侵染力强, 对植物破坏性大。病菌侵入寄主植物后在很短的时间内产生大量的孢子囊并释放游动孢子, 成为再侵染源, 病害难以控制, 常给农业生产造成巨大损失。当晚疫病严重时, 叶背面产生白色菌丝和恶臭味。马铃薯晚疫病的初侵染源是被感染的薯块。虽然被感染的种薯在储藏期容易腐烂, 但轻微感染的薯块做下一年种薯后成为初侵染源。在田间, 以无性繁殖产生的游动孢子囊或游动孢子侵染叶片和薯块。

目前种植的大部分马铃薯品种缺乏水平抗性。因此, 很多栽培农家在马铃薯晚疫病的防治中主要依靠化学防治。马铃薯晚疫病菌具有较高的遗传变异能力、对杀菌剂的适应能力和克服抗病寄主植物的耐受特征。目前很多国家在疫霉属的生物学和分子遗传学领域开展研究, 尤其通过疫霉属的基因组序列进行发病机制、抗药性和遗传变异机制的研究。但目前为止在国内晚疫病的研究大多集中在杀菌剂抗性、交配型变化和生理小种的研究方面, 缺乏对遗传变异的研究。因此, 研究晚疫病的遗传变异机制是建立晚疫病综合防治策略上亟待解决的问题之一。

选用抗性品种是防治马铃薯晚疫病的最有效、最经济、最方

便的途径,但 20 世纪 80 年代后在世界各地陆续出现了许多甲霜灵抗性菌株和毒力更强的复合生理小种菌株。在马铃薯晚疫病菌的抗性上几种主要基因已在马铃薯品种中鉴定过。马铃薯晚疫病菌的遗传变异中最重要的问题是对寄主的致病性和毒性。马铃薯晚疫病菌的群体中毒性变异被认为是在马铃薯栽培品种的抗性上缺失而产生生理小种特异性基因的出现。由于复合生理小种的出现,过去垂直抗性的马铃薯品种逐渐丧失对晚疫病菌的抗病性,这直接导致了马铃薯晚疫病的再次大发生。为了培育抗病品种,必须查明病原菌的生理小种组成,毒性变异和遗传变异规律。因此,研究马铃薯晚疫病菌的毒性变异对于检测小种组成的时空变化、布局抗病品种和晚疫病的综合防治具有重要指导意义。

由无性繁殖产生的游动孢子在适合的环境条件下几分钟内可以侵入植物体,并完成无性生活史,从而大量形成第二次侵染源。真菌无性繁殖的后代较稳定地保持原有性状。但在许多仅有无性繁殖而没有有性生殖的真菌中,还普遍存在着遗传变异现象。这说明经过无性繁殖也可以发生变异。因此利用单游动孢子菌系分析晚疫病菌的生理小种分化和遗传多态性对群体遗传变异的研究具有重要意义。由于马铃薯晚疫病的第一侵染源是游动孢子,因此,研究马铃薯晚疫病菌的游动孢子特异性表达基因对晚疫病的发病机制和流行病学具有重要的研究意义和科学意义。

P. infestans 是雌雄异体配合卵菌,其有性生殖需要两种不同的交配型 A1 和 A2。目前为止已发现马铃薯晚疫病菌的交配型有 A1, A2 和 self-fertile。由有性生殖产生的卵孢子在无寄主的条件下能在土壤中存活,而且它是马铃薯晚疫病菌遗传变异的主要原因之一。随着 A2 交配型的迁移,欧洲、北美洲和亚洲等地区的极少数国家在自然条件下发现了卵孢子,从而出现了很多甲霜灵抗性菌株和毒力更强的复合生理小种,并增大了马铃薯晚疫病菌致病性变异,加重了病害。因此卵孢子在晚疫病菌流行

中所起的作用正成为植物病理学家研究的热点。但是由于有性生殖产生的卵孢子壁很厚，萌发率低等原因，有性生殖的研究还处于初步阶段。

本书的出版，得到了教育部留学回国人员基金（210150）“马铃薯晚疫病菌的群体遗传多样性的研究”、中国博士后基金（20070410884）“马铃薯晚疫病菌的生理小种分化及毒性变异的研究”、东北农大博士科研基金“马铃薯晚疫病菌的长期保存与致病性的相关性研究”的资助，特此感谢。

由于笔者经验不足，书中难免有不妥之处，敬请有关专家、同行、广大读者批评指正和谅解。

张铨哲，张艳菊

2009年12月

目 录

第一章 马铃薯晚疫病的国内外研究现状及发展	
动态分析	(1)
第一节 马铃薯晚疫病菌的研究现状及生物学特性的	
研究进展	(3)
一、马铃薯晚疫病的发生历史	(3)
二、马铃薯晚疫病的症状	(4)
三、马铃薯晚疫病病原—— <i>Phytophthora infestans</i> ...	(4)
四、马铃薯晚疫病菌的生物学特性研究	(8)
第二节 马铃薯晚疫病的发生与流行研究进展	(17)
第三节 马铃薯晚疫病菌的分子标记研究进展	(19)
一、同工酶标记	(19)
二、DNA 分子标记	(20)
三、马铃薯晚疫病菌的遗传多样性	(30)
第四节 马铃薯晚疫病菌的毒性变异与遗传变异的	
研究进展	(40)
一、无性繁殖后代中毒性变异和遗传变异的研究	(40)
二、马铃薯晚疫病菌的有性生殖后代中毒性变异	
和遗传变异	(41)
三、马铃薯晚疫病菌游动孢子表达基因的筛选	(42)
第五节 马铃薯晚疫病菌长期保存的研究进展	(42)
第六节 马铃薯晚疫病的综合防治	(44)
一、抗病育种	(44)
二、化学防治	(47)

三、生物防治	(49)
四、农业防治	(49)
五、研究的目的和意义	(50)
第二章 马铃薯晚疫病菌的生物学特性分析	(51)
第一节 马铃薯晚疫病菌的交配型分化	(53)
一、实验材料与方法	(53)
二、结果	(54)
三、讨论	(61)
四、小结	(62)
第二节 马铃薯晚疫病菌的抗药性分析	(63)
一、实验材料与方法	(63)
二、结果	(66)
三、讨论	(84)
四、小结	(87)
第三节 马铃薯晚疫病菌的生理小种分化	(87)
一、实验材料与方法	(87)
二、结果	(88)
三、讨论	(90)
四、小结	(101)
第三章 马铃薯晚疫病菌的遗传多样性分析	(103)
第一节 马铃薯晚疫病菌的同工酶基因型分析	(105)
一、实验材料与方法	(105)
二、结果	(107)
三、讨论	(110)
四、小结	(112)
第二节 马铃薯晚疫病菌的线粒体 DNA 单倍型和 RAPD 的分析	(112)
一、实验材料与方法	(112)

二、结果	(116)
三、讨论	(131)
四、小结	(138)
第四章 在马铃薯晚疫病菌中 A1 表达基因的克隆 与 SCAR 标记的开发	(139)
一、实验材料与方法	(141)
二、结果	(146)
三、讨论	(150)
四、小结	(154)
第五章 马铃薯晚疫病菌的长期保存与致病性的 相关性研究	(157)
一、实验材料与方法	(159)
二、结果	(160)
三、讨论	(167)
四、小结	(169)
第六章 无性繁殖后代中马铃薯晚疫病菌的毒性变异	(171)
一、实验材料与方法	(173)
二、结果	(173)
三、讨论	(180)
四、小结	(183)
参考文献	(185)

第一章

马铃薯晚疫病的国内外研究现状及发展动态分析

马铃薯晚疫病菌的表现型和基因型研究

第一节 马铃薯晚疫病菌的研究现状及生物学特性的研究进展

一、马铃薯晚疫病的发生历史

19 世纪 30 年代 Readick 提出马铃薯晚疫病病原菌 *Phytophthora infestans* 可能起源于墨西哥 (Goodwin 等, 1992a)。19 世纪末利用同工酶、RFLP 等分子标记对墨西哥中部的晚疫病病原菌进行遗传多样性分析。研究表明, 当地的晚疫病菌具有多样性, 该地区的晚疫病菌群体含有全部已知的同工酶基因型和所有的 RFLP 指纹 (Reddick, 1943), 以上结果证实 Readick 的假设, 即墨西哥中部是马铃薯晚疫病菌的发源地。晚疫病菌大约在 19 世纪 30 年代沿着海路从南美洲传入欧洲 (李克来, 1984)。1830 年在德国首先发现了马铃薯晚疫病, 但当时并未引起人们的重视。1845 年, 比利时首次报道了晚疫病的发生, 随后该病在欧洲迅速传播到荷兰、丹麦、芬兰、法国、意大利、英格兰、苏格兰等国, 特别是在爱尔兰, 晚疫病的流行传播造成马铃薯几乎无收, 引起广大居民的饥荒 (Austin Bourke, 1964)。正如恩格斯所描述: 1847 年由于晚疫病传播引起的饥荒, “使专吃或差不多专吃马铃薯的一百万爱尔兰人死亡, 使二百万逃亡海外”。

在我国晚疫病大流行起始于 1950 年 (林传光等, 1955), 当时山西、察哈尔、绥远等地损失过半, 其后晚疫病不断流行蔓延, 内蒙古、黑龙江、甘肃、福建、四川等地先后大发生, 给生产造成了很大的经济损失。目前, 晚疫病分布在世界各地, 凡是种植马铃薯的地区, 均有晚疫病的发生。由于晚疫病对马铃薯生产的危害日渐严重, 1996 年国际马铃薯中心召集成立了 GILB, 即“全球马铃薯晚疫病防治倡议组织”。同时国际马铃薯中心也

将马铃薯晚疫病的研究列为优先研究项目。

二、马铃薯晚疫病的症状

马铃薯的根、茎、叶、花、果、块茎和匍匐茎等各个部位皆可发生晚疫病，但是最显而易见的是叶和块茎上的病斑。叶上的病症多从叶尖或叶缘开始，先发生不规则的小斑点，随着病斑的扩大愈合而变成暗褐色，感病的品种叶面全部或大部被病斑覆盖。气候潮湿时，病叶呈水浸状软化腐败，蔓延极快，在叶背面的健康与患病部位的交界处出现一层似绒毛的白色霉层，有时叶面和叶背的整个病斑上也可形成此种霉轮孢囊梗和游动孢子囊。茎和叶柄上的病害，常表现纵向发展的褐斑。

茎部很少直接受到侵染，但病斑可沿叶柄扩展到茎部。虽非晚疫病的典型症状，也能造成叶丛的凋萎与枯死，气候潮湿或重露之后，也可在病斑上产生白色霉层。病害严重时，干旱条件下表现全株枯死，多雨条件下整株腐败而变黑。块茎感病时形成大小不等、形状不规则、微凹陷的病斑。病斑下面的薯肉呈深度不同的褐色坏死，田间受侵染的病薯入窖后往往大批腐烂。带病薯往往是第二年晚疫病发病的初侵染源。

三、马铃薯晚疫病病原——*Phytophthora infestans*

1. *Phytophthora infestans* 属于卵菌

P. infestans 现被划分在 Chromista 界，Oomycota 门，Peronosporales 目，Pythiaceae 科，*Phytophthora* 属。虽然卵菌有很多类似真菌的特性，但是它不再划分为真菌（Barr, 1983; Dick, 1995），根据真菌词典第八版 Cavalier - Smith (1988, 1989) 的八界分类系统，卵菌归入真核生物总界中的假菌界。根据细胞壁组成（Bartnicki - Garcia & Wang, 1983），新陈代谢（Vogel 等, 1964; Pfyffer 等, 1990），rRNA 序列研究表

明, 卵菌与金藻, 硅藻, 黄褐藻的亲缘关系较近, 而与真菌有较远的亲缘关系。同一般的植物真菌相比, 卵菌具有能够直接侵入寄主植物的能力。这表明卵菌具有与真菌截然不同的遗传和生化互作机制。更加有趣的是, 同真核真菌相比, 许多卵菌的生物学特点是特有的 (Zentmyer, 1983; Griffith 等, 1992)。卵菌的生活史主要以二倍体存在, 而真菌却是以单倍体的形式存在。具有多核的 *Phytophthora* 营养体 (菌丝体) 没有隔膜。*Phytophthora* 属的病菌的细胞壁由纤维素和葡聚糖组成, 没有几丁质, 然而几丁质是组成真菌细胞壁的组成成分 (Bartnicki - Garcia & Wang, 1983)。游动孢子具有双鞭毛, 鞭毛具有鞭绳和金色的鞭鞘 (Hemmes, 1983)。*Phytophthora* 物种的病菌由于自己不能合成甾酮, 所以它们必须从外界获得外源 β -羟基甾酮用于孢子形成 (Hendrix, 1970; Elliott, 1983)。同时, *Pythiaceae* 科的成员对多烯抗生素如匹马菌素和制霉菌素具有独特抗性 (Eckert & Tsao, 1962)。

Phytophthora 属另外一个有趣的特征是它有双核孢子囊和菌丝细胞, 但是游动孢子是单核的 (Erwin & Ribeiro, 1996)。*Phytophthora* 的病菌小种每个细胞有两个或多个不同的核, 称之为多核体。当具有两种不同基因型菌株的菌丝融合后, 接着它们的核合在一起, 这样就形成了多核体 (Layton & Kuhn, 1990)。是否这种通常称之为拟有性生殖的繁殖方式能够产生马铃薯晚疫病菌新的致病生理小种目前尚未可知。试图通过病菌在植株上生长过程中获得菌丝融合目前没有成功的报道 (Judelson, 1997; Judelson & Yang, 1998)。然而, 通过把两种不同生理小种的游动孢子混合在一起, 就能够获得异核和多核的生理小种 (Judelson & Yang, 1998)。所有这些研究结果表明拟有性生殖是马铃薯晚疫病菌产生遗传多样性的重要生殖方式。

2. *P. infestans* 的形态学特征

马铃薯晚疫病由致病疫霉 [*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary] 引起。致病疫霉属活体营养型, 侵染马铃薯、番茄等 60 多种茄科植物。*P. infestans* 在个体发育的不同时期, 可以产生菌丝体、孢子囊梗、孢子囊、游动孢子、卵孢子。菌丝分枝, 无色无隔, 较细, 多核, 在寄主间隙生长, 以少量的丝状吸器吸收寄主养分, 在寄主细胞间扩展, 形成吸器伸入细胞内吸取营养。其孢子囊梗从寄主的气孔伸出, 上部常有 3~4 个分枝, 孢囊梗顶端膨大形成游动孢子囊, 游动孢子囊一般呈柠檬状, 具乳突。第一个游动孢子囊形成后, 孢囊梗继续生长, 将游动孢子囊推向侧位, 孢囊梗顶端再形成第二个游动孢子囊。这种生长方式使孢囊梗粗细不均, 呈节结状。当条件适宜时, 游动孢子囊萌发, 并从其顶端的乳突处释放出 6~12 个游动孢子。游动孢子呈肾形, 在凹入的一侧着生两根异质鞭毛。游动孢子可在水中游动一定时间, 随后鞭毛消失而转变为静止的休止孢, 休止孢在合适条件下萌发产生芽管, 常通过寄主植物表面的气孔侵入植株体内。孢囊梗无色, 单根或多根成束从气孔长出, 具 3~4 个分枝, 无限生长, 孢囊梗膨大呈节状, 顶端尖细, 顶端形成游动孢子囊。游动孢子囊单胞无色, 卵圆形, 顶端有乳状突起, 大小 $(22.5 \sim 40) \mu\text{m} \times (17.5 \sim 22.5) \mu\text{m}$ 。温度 15°C 以上时, 游动孢子囊不产生游动孢子, 直接产生芽管侵入寄主, 低温下释放游动孢子, 游动孢子肾形, 双鞭毛, 水中游动片刻后静止, 鞭毛收缩, 变为圆形休止孢, 休止孢萌发产生芽管侵入寄主。

温度对 *P. infestans* 影响很大, 菌丝生长温度范围为 $10 \sim 25^{\circ}\text{C}$, 最适为 $20 \sim 23^{\circ}\text{C}$ 。游动孢子囊形成温度为 $7 \sim 25^{\circ}\text{C}$, 最适为 $18 \sim 22^{\circ}\text{C}$, 相对湿度为 97% 以上。游动孢子囊萌发产生游动孢子的温度为 $6 \sim 15^{\circ}\text{C}$, 最适温度为 $10 \sim 13^{\circ}\text{C}$ 。游动孢子囊及游动孢子都需要在水滴或水膜中才能萌发。

P. infestans 有性生殖方式为异宗配合, 即该病原菌具备两种在形态上完全相同但性别上却有明显差异的菌体 A1 交配型和 A2 交配型。单一基因型的所有无性繁殖个体称为无性系, 只有当 A1 和 A2 交配型共同培养才能完成有性生殖。该菌最初报道出现在马铃薯病株上, 后来出现在番茄病株上, 但番茄晚疫病病菌已被证实为马铃薯晚疫病病菌同种的不同生理小种。

3. 病原菌生活史

P. infestans 属于活体营养性 (Biotrophy) 致病卵菌 (Robertson, 1991) 寄主范围狭窄, 侵染马铃薯、番茄和其他 60 个茄科属 (*Solanum*) 植物 (Turkenatten, 1993)。 *P. infestans* 在这些寄主上通常以无性生殖方式繁殖, 当存在两种交配型 (A1 和 A2) 时, 也通过有性的孢子繁殖。晚疫病病菌其生活史的大部分只能通过显微镜才可以看见。

无性繁殖: 由于环境条件不一样, 菌丝侵染寄主后 3~10 天, 孢囊梗将成丛地从叶背气孔伸出, 叶背面气孔比叶表分布得多, 因而叶背面更容易观察到游动孢子囊。游动孢子囊成熟后很容易碎裂, 并随风飘散, 大多数游动孢子囊飘出几米后即落下来, 也有的游动孢子囊能飘出 30km 以外。病菌侵染后 3~10 天, 孢子囊梗便从气孔中伸出来。游动孢子囊能直接萌发和间接萌发。20℃ 以上 (最适 24℃), 游动孢子囊直接萌发, 就像单个的孢子一样, 先形成萌发管, 然后萌发管刺入植物组织, 进行再侵染。自然条件下, 直接萌发意义不大。12~16℃ 时, 孢子囊间接萌发, 每一游动孢子囊释放出 6~12 个游动孢子, 每个游动孢子着生两根鞭毛, 游动孢子依靠鞭毛, 可以游动几分钟到几小时。因为病菌不能在寄主组织外长期生存, 如果没有适当的寄主, 游动孢子就会死亡。

有性繁殖: *P. infestans* 也能经过有性方式进行繁殖。它是异宗配合卵菌, 具有 A1 和 A2 两种交配型。这两种交配型具有