

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2021)05-0432-06

病虫害防治

DOI: 10.19918/j.cnki.1672-3635.2021.05.007

## 黑龙江省马铃薯晚疫病菌线粒体DNA单倍型分析

郭梅<sup>1</sup>, 杨帅<sup>1\*</sup>, 王文重<sup>1</sup>, 魏琪<sup>1</sup>, 董学志<sup>1</sup>, 毛彦芝<sup>1</sup>, 王玲<sup>2</sup>,  
李学敏<sup>3</sup>, 李学峰<sup>3</sup>, 刘雅萍<sup>3</sup>, 刁琢<sup>4</sup>, 闵凡祥<sup>1</sup>

(1. 黑龙江省农业科学院马铃薯研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086; 2. 黑龙江省农业科学院耕作栽培研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086;  
3. 牙克石森峰薯业有限公司, 内蒙古 牙克石 022150; 4. 大兴安岭地区农业林业科学研究院, 黑龙江 加格达奇 165000)

**摘要:** 为明确黑龙江省马铃薯晚疫病菌线粒体DNA单倍型组成和分布情况, 采用PCR-RFLP方法分析了2015~2020年采自黑龙江省7个马铃薯种植区的193份马铃薯晚疫病菌株的线粒体DNA单倍型及频率分布。结果表明, IIa单倍型为优势线粒体DNA单倍型, 占比89.12%, Ia和Ib两种单倍型也均有发现, 分别占比9.84%和1.04%, 所有样品中未发现IIb单倍型。与前人研究相比较, 黑龙江省线粒体DNA单倍型存在动态变化, 因此, 加强对晚疫病菌群体遗传结构的监测, 对更好地进行马铃薯晚疫病防控具有重要意义。

**关键词:** 马铃薯; 晚疫病菌; 线粒体DNA; 单倍型

## Identity of mtDNA Haplotypes of *Phytophthora infestans* Isolates in Heilongjiang Province

GUO Mei<sup>1</sup>, YANG Shuai<sup>1\*</sup>, WANG Wenzhong<sup>1</sup>, WEI Qi<sup>1</sup>, DONG Xuezhi<sup>1</sup>, MAO Yanzhi<sup>1</sup>, WANG Ling<sup>2</sup>,

LI Xuemin<sup>3</sup>, LI Xuefeng<sup>3</sup>, LIU Yaping<sup>3</sup>, DIAO Zhuo<sup>4</sup>, MIN Fanxiang<sup>1</sup>

(1. Potato Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086, China;

2. Institute of Crop Cultivation and Tillage, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086, China;

3. Senfeng Potato Industry Co., Ltd., Yakeshi, Inner Mongolia 022150, China;

4. Daxinganling Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Jiagedaqi, Heilongjiang 165000, China)

**Abstract:** One hundred and ninety three isolates of *Phytophthora infestans* isolates collected from seven different potato growing regions of Heilongjiang Province from 2015 to 2020 were detected by PCR-RFLP in order to understand the distribution of mitochondrial DNA haplotypes of *P. infestans* in the province. The IIa haplotype was the dominant mtDNA haplotype, accounting for 89.12%. And Ia and Ib haplotypes were also found, accounting for 9.84% and 1.04%, respectively. No IIb haplotype was found in all the samples. Compared with previous studies, there were dynamic changes in mtDNA haplotypes in Heilongjiang Province. Therefore, it is of great significance to strengthen the monitoring on the genetic structure of *P. infestans*, which would be beneficial for the control of potato late blight.

**Key Words:** potato; *Phytophthora infestans*; mtDNA; haplotype

收稿日期: 2021-08-26

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFE0115700); 黑龙江省自然科学基金优秀青年基金(JJ2019YX0977)。

作者简介: 郭梅(1968-), 女, 硕士, 研究员, 从事马铃薯真菌病害研究。

\*通信作者(Corresponding author): 杨帅, 副研究员, 从事马铃薯病原与寄主互作研究, E-mail: yangshuai20000@163.com。

由致病疫霉菌 (*Phytophthora infestans*) 引起的马铃薯晚疫病是马铃薯生产上最具威胁的毁灭性病害<sup>[1]</sup>, 其病原菌可通过游动孢子对马铃薯实施侵染, 引起生长季植株叶片出现水浸状软化进而萎蔫、枯死, 同时还能传导至薯块并潜存其中引起腐烂, 成为下一年马铃薯晚疫病大发生的主要初侵染源<sup>[2]</sup>。自 1845 年马铃薯晚疫病在爱尔兰引起骇人听闻的“大饥荒”事件至今, 该病始终威胁着全球马铃薯健康生产, 并造成巨大的经济损失<sup>[3]</sup>。马铃薯晚疫病菌群体结构变化直接影响着病害的发生与流行<sup>[4]</sup>。近年来, 随着晚疫病菌表现型和基因型研究的更加深入, 国内外学者认为 A2 交配型的存在是该病能在世界范围内频繁发生和流行的主要原因<sup>[5]</sup>, 这一发现也再次引起了国际社会的极大关注<sup>[6]</sup>。

相比于核基因组, 线粒体基因组的结构简单、单亲遗传以及无组织特异性等特点, 使其在监测晚疫病菌迁移、流行及群体遗传结构动态变化的研究中发挥重要作用<sup>[7]</sup>。目前, 国内外在线粒体 DNA 多态性的研究方面主要采用 PCR-RFLP 法<sup>[8]</sup>。Griffith 和 Shaw<sup>[8]</sup>利用改进的 PCR-RFLP 方法将线粒体单倍型分为 Ia, IIa, Ib 和 IIb 四种单倍型。四种单倍型在世界的不同国家和地区的分布情况不尽相同, 但普遍认为 Ib 为旧群体, 其他三种单倍型为新群体。目前国内外主要是采用这种方法进行晚疫病菌线粒体 DNA 单倍型的检测。

中国是世界马铃薯生产第一大国, 种植面积和总产量均居世界第一位<sup>[9]</sup>。黑龙江省因兼具极佳的地理位置和得天独厚的冷凉气候, 成为中国重要的马铃薯种薯及商品薯主产区之一<sup>[10]</sup>。然而,

由于近几年黑龙江省马铃薯生长季节持续出现降雨量大且周期长等特殊天气, 马铃薯晚疫病在哈尔滨、绥化、克山等主要种植区发生十分严重。因此, 本试验通过系统分析近年来黑龙江省主产区及哈尔滨地区晚疫病菌线粒体 DNA 单倍型情况, 以期更好地了解黑龙江省晚疫病菌遗传结构组成, 监测群体变化动态, 从而为晚疫病的深入研究奠定基础, 进而为制定符合黑龙江省马铃薯生产的晚疫病防控策略提供指导。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试菌株

供试晚疫病菌分别于 2015~2020 年采自黑龙江省哈尔滨、齐齐哈尔、绥化、鹤岗、伊春、黑河和大兴安岭 7 个马铃薯生产区, 所选带病植株均带有明显晚疫病症状。采用常规组织分离法将带病组织接于新鲜的薯块上, 18℃ 下恒温培养约一周时间, 至薯块上长满白色菌丝后, 用无菌接种针挑取菌丝至黑麦培养基上, 18℃ 下培养以获取纯化的晚疫病菌, 实验室保存、备用。

### 1.2 菌株基因组 DNA 的提取

采用基因组 DNA 提取试剂盒提取经分离、纯化培养后获得的晚疫病菌 DNA。提取 DNA 后, 利用微量核酸蛋白浓度测定仪检测 DNA 纯度, 当 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 值大于 1.8 时, DNA 符合后续试验要求。

### 1.3 线粒体 DNA 单倍型分析

采用 Griffith 和 Shaw<sup>[8]</sup>的 PCR-RFLP 方法进行线粒体 DNA 单倍型分析, 引物信息见表 1。PCR 扩增反应采用商品化 PCR Mix 的 20 μL 体系进行。

表 1 线粒体 DNA 单倍型测定引物

Table 1 Primers for detection of mtDNA haplotype

引物 Primer	序列 Sequence	长度(bp) Length
F2	5'-TCCCTTTGTCCTCTACCHAT-3'	21
R2	5'-TACGGCGGTTTAGCACATACA-3'	22
F4	5'-GGTCATCCAGAGGTTTATGTT-3'	22
R4	5'-CGATACCGATACCAGCACCAA-3'	22

PCR反应体系为: 94℃预变性5 min; 94℃变性30 s, 54℃退火30 s, 72℃延伸1 min, 34个循环; 72℃下延伸5 min, 4℃保存。之后利用内切酶 *Msp*I 和 *EcoR*I 对5 μL的PCR产物于37℃条件下进行酶切。酶切产物于1.5%琼脂糖凝胶中电泳, 利用

凝胶成像仪在紫外光下检测并拍照。

### 1.4 线粒体单倍型的鉴定原则

马铃薯晚疫病菌 mtDNA 单倍型划分标准参照 Griffith 和 Shaw<sup>[8]</sup>, 根据相应条带在对应位置上的有无, 判断菌株的单倍型类型, 具体见表2。

表2 依据酶切片段划分致病疫霉 mtDNA 单倍型的标准

Table 2 Classification standard of mtDNA haplotypes of *P. infestans* by restriction fragment

单倍型 Haplotype	P2 酶切片段 (Length bp) P2 restriction fragment						P4 酶切片段 (Length bp) P4 restriction fragment			
	720	641	350	203	147	79	603	394	361	209
Ia	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+
Ib	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+
IIa	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-
IIb	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-

注: + 有此片段; - 无此片段。

Note: + indicates that fragment exists; - indicates that fragment does not exist.

## 2 结果与分析

### 2.1 马铃薯晚疫病菌样品采集及分离

2015~2020年在黑龙江省哈尔滨、齐齐哈尔、绥化、鹤岗、伊春、黑河和大兴安岭7个马铃薯

主产区共采集分离了193份马铃薯晚疫病菌菌株样品, 具体信息如表3所示。

### 2.2 线粒体DNA单倍型鉴定分析

由图1可知, P2扩增片段可以被 *Msp*I 酶切为720和350 bp两个片段, 或是720, 203和147 bp

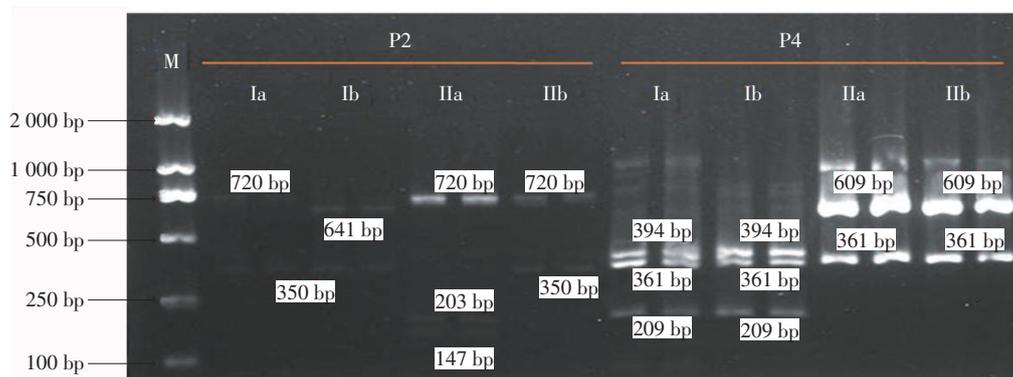
表3 2015~2020年黑龙江省晚疫病菌样品采集信息

Table 3 Information of *P. infestans* isolates collected from 2015 to 2020 in Heilongjiang Province

采集年份 Year	采集地区 Region	菌株数(No.) Isolate number
2015	哈尔滨	11
2016	哈尔滨	6
2017	哈尔滨	11
2019	哈尔滨	21
	齐齐哈尔	8
	黑河	5
	大兴安岭	23
2020	哈尔滨	20
	齐齐哈尔	30
	绥化	15
	鹤岗	3
	伊春	16
	大兴安岭	24

三个片段, 或者是 641, 350 和 79 bp 三个片段, 分别对应的 mtDNA 单倍型为 Ia 或 Ib 和 Ib 及 IIa。P4 扩增片段可以被 *EcoRI* 酶切为 609 和 361 bp 两个片段, 或者是 394, 361 和 209 bp 三个片段, 分别对应的 mtDNA 单倍型为 IIa 或 Ib 和 Ia 或 Ib。当 P2

扩增片段经 *MspI* 酶切为 720 和 350 bp 两个片段时, 使用 *EcoRI* 酶切 P4 扩增片段进行验证, 当得到 609 和 361 bp 两个片段时, 该样品的单倍型为 Ib, 当得到 394, 361 和 209 bp 三个片段时, 该样品的单倍型为 Ia。



注: M 为 DL2 000 分子量; P2 为 F2/R2 扩增片段; P4 为 F4/R4 扩增片段。

Note: M, DL2 000 marker; P2, amplified fragment by F2/R2; P4, amplified fragment by F4/R4.

图1 线粒体DNA单倍型检测结果判断电泳图

Figure 1 Electrophoresis for detection of mtDNA haplotypes

根据判定标准, 2015~2020年黑龙江省7个马铃薯种植区的193份样品中共发现3个基因型, 分别为 Ia、IIa 和 Ib。其中, 172份晚疫病样品为 IIa 单倍型, 占比 89.12%, 为优势线粒体 DNA 单倍型; 19份晚疫病样品为 Ia 单倍型, 占比 9.84%; 2份晚疫病样品为 Ib 单倍型, 占比 1.04%; 所有样品中未发现 IIb 单倍型。从采集地点分析(表4), 哈尔滨地区发现3种 mtDNA 单倍型, 齐齐哈尔地区除发现 Ia 和 IIa 两种单倍型, 其他地区样品均为 IIa 单倍型。说明哈尔滨和齐齐哈尔地区马铃薯 mtDNA 单倍型类型复杂, 其他地区马铃薯晚疫病病菌 mtDNA 单倍型结构单一。从采集年份分析, 哈尔滨地区5年来 mtDNA 单倍型变化见图2, 除2017年 Ia 单倍型占优势外, 其他年份基本都是以 IIa 单倍型为主, 同时2019年检测发现 Ib 单倍型的存在, 说明哈尔滨地区年际间晚疫病病菌的遗传结构存在动态变化。

### 3 讨论

基于线粒体DNA(mtDNA)的基因型研究是分析

微生物地理来源方面的一个很有利的工具, 利用此标记可以追溯某些微生物的起源与演变路线<sup>[11]</sup>。由于致病疫霉线粒体DNA结构相对简单且稳定性良好, 因此被广泛用于致病疫霉菌的群体起源和演化研究<sup>[12]</sup>。2000年以来, 国内学者对于线粒体DNA多态性的研究主要是采用PCR-RFLP方法<sup>[8]</sup>, 对中国各省份马铃薯主产区的晚疫病病菌的 mtDNA 基因型多样性进行了持续的研究与探讨。赵志坚等<sup>[12]</sup>监测2001年云南省晚疫病病菌 mtDNA 单倍型发现群体主要以 Ia 型为主; 郭军等<sup>[13]</sup>鉴定了内蒙古地区晚疫病病菌群体 mtDNA 的单倍型, 结果均为 IIa 型; 韩丽丽等<sup>[14]</sup>分析了2010~2012年3年间福建省晚疫病群体的 mtDNA 单倍型类型和频率分布, 检测结果为存在 Ia、IIa 和 IIb 三种单倍型, 其中 Ia 为优势基因型。

在黑龙江省马铃薯晚疫病病菌 mtDNA 研究方面, 前人对黑龙江省致病疫霉 mtDNA 单倍型进行了持续报道, 发现 Ia、IIa、Ib 和 IIb 四种线粒体单倍型<sup>[12,15-17]</sup>在黑龙江省均有存在, 虽然不同时期检测的结果有所差别, 但均得出 IIa 为优势基因型

表4 黑龙江省晚疫病病菌 mtDNA 单倍型及其分布  
Table 4 mtDNA haplotypes and distribution of *P. infestans* isolates collected in Heilongjiang Province

采样地点 Collection site	Ia		IIa		Ib		总数 Total
	菌株数(个) Isolate number (No.)	频率(%) Frequency	菌株数(个) Isolate number (No.)	频率(%) Frequency	菌株数(个) Isolate number (No.)	频率(%) Frequency	
哈尔滨 Harbin	18	26.09	49	71.01	2	2.9	69
齐齐哈尔 Qiqihar	1	2.63	37	97.37	0	0	38
绥化 Suihua	0	0	15	100	0	0	15
黑河 Heihe	0	0	5	100	0	0	5
鹤岗 Hegang	0	0	3	100	0	0	3
伊春 Yichun	0	0	16	100	0	0	16
大兴安岭 Daxinganling	0	0	47	100	0	0	47

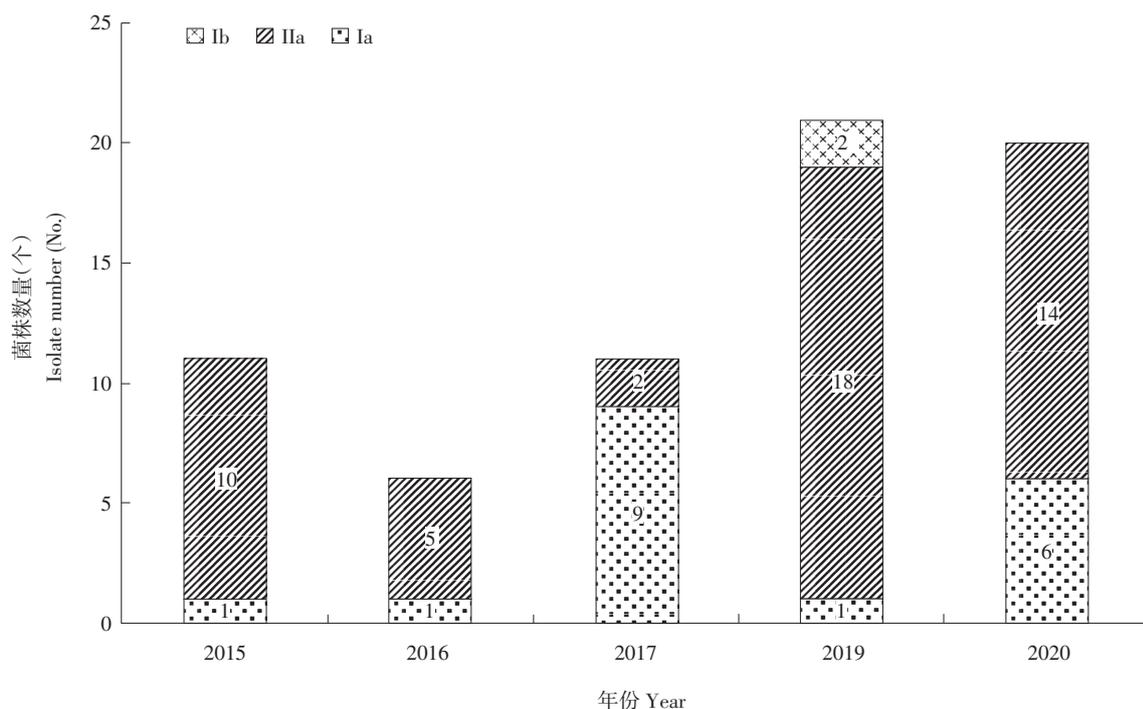


图2 哈尔滨地区晚疫病病菌线粒体DNA单倍型年度变化

Figure 2 mtDNA haplotypes of *P. infestans* isolates collected from Harbin City

的结论。本研究分别对黑龙江省多地的马铃薯晚疫病病菌株和哈尔滨地区连续多年的晚疫病菌群

体进行了线粒体DNA单倍型测定分析, 其中, 哈尔滨、齐齐哈尔、绥化、伊春和大兴安岭地区均

采集到了较为充足的样品用于mtDNA的检测, 但黑河和鹤岗两地受到当地天气、种植地块以及田间防治水平的影响, 只采集到较少的样品用于本次检测, 其在代表性上相对不足, 因此, 也将在后续年份进行持续的关注和报道。本研究结果表明哈尔滨地区有Ia、Ib、IIa三种单倍型, 齐齐哈尔有Ia、IIa两种单倍型, 其他地区mtDNA多态性单一, 均为IIa单倍型, 所有地区均未检测到Ib单倍型的存在。这一结果和前人对黑龙江省晚疫病病菌群体的测定结果基本一致。已有研究报道认为Ib单倍型是致病疫霉菌全球迁移之前的“旧”群体, 而其他三种类型则为后期衍生出来的“新”群体。多年来黑龙江省晚疫病病菌mtDNA单倍型分析结果表明, 黑龙江省已基本完成马铃薯晚疫病病菌群体的新旧群体演变过程, 但受到气候和环境变化的影响, 在马铃薯生产过程中Ib单倍型仍然可能发生, 因此, 对晚疫病病菌群体变化开展科学、精准、有效的监测, 对更好地进行马铃薯晚疫病防控具有重要意义。

#### [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] Wang X D, Guo M, Min F X, *et al.* Virulence complexity and high levels of fungicide resistance suggest population change of *Phytophthora infestans* in the Heilongjiang Province of China [J]. *Potato Research*, 2012, 55(3-4): 217-224.
- [ 2 ] Andrivon D. Biology, ecology, and epidemiology of the potato late blight pathogen *Phytophthora infestans* in soil [J]. *Phytopathology*, 1995, 85(10): 1053-1056.
- [ 3 ] Chimote V P, Kumar M, Sharma P K, *et al.* Characterization of changes in phenotype and genotype of *phytophthora infestans* isolates from India [J]. *Journal of Plant Pathology*, 2010, 92(3): 669-677.
- [ 4 ] 孙少慧, 张静华, 杨帅, 等. 马铃薯晚疫病病菌RxLR效应因子RD24基因克隆及其PVX表达载体构建与鉴定 [J]. *中国农学通报*, 2019, 35(5): 144-149.
- [ 5 ] Day J P, Wattier R A M, Shaw D S, *et al.* Phenotypic and genotypic diversity in *Phytophthora infestans* on potato in Great Britain, 1995-1998 [J]. *Plant Pathology*, 2004, 53(3): 303-315.
- [ 6 ] Fry W E, Goodwin S B. Re-emergence of potato and tomato late blight in the United States [J]. *Plant Disease*, 1997, 81(12): 1349-1357.
- [ 7 ] May L J, Ristino J B. Identity of the mtDNA haplotype (s) of *Phytophthora infestans* in historical specimens from the Irish potato Famine [J]. *Mycological Research*, 2004, 108(5): 471-479.
- [ 8 ] 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]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(10): 4007-4014.
- [ 9 ] 杨帅, 闵凡祥, 高云飞, 等. 新世纪我国马铃薯产业发展现状及存在问题 [J]. *中国马铃薯*, 2014, 28(5): 311-316.
- [ 10 ] 郑妍妍, 苏戈, 王红蕾, 等. 黑龙江省马铃薯产业发展优势、问题及对策 [J]. *黑龙江农业科学*, 2021(4): 115-118.
- [ 11 ] 朱杰华, 杨志辉, 张凤国, 等. 马铃薯晚疫病病菌群体遗传结构研究进展 [J]. *中国农业科学*, 2007, 40(9): 1936-1942.
- [ 12 ] 赵志坚, 李先平, 李成云, 等. 致病疫霉菌线粒体DNA单倍型的分子鉴别 [J]. *云南农业大学学报*, 2002, 17(4): 17-20.
- [ 13 ] 郭军, 屈冬玉, 巩秀峰, 等. 内蒙古马铃薯晚疫病病菌基因型多样性分析 [J]. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 2007, 35(4): 120-124.
- [ 14 ] 韩丽丽, 杨策, 潘贤, 等. 福建省马铃薯晚疫病病菌线粒体DNA单倍型分析 [J]. *激光生物学报*, 2014, 23(2): 165-169.
- [ 15 ] 徐生军. 马铃薯晚疫病病菌的表现型与基因型的研究 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2010.
- [ 16 ] 张铨哲, 郝璐, 李微, 等. 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 [J]. *吉林农业科学*, 2015, 40(5): 58-62.
- [ 17 ] 张铨哲, 韩晓旭, 郭衍锦, 等. 黑龙江省马铃薯晚疫病病菌的交配型和 multi-locus 基因型分析 [J]. *中国蔬菜*, 2018(4): 58-64.