

马铃薯晚疫病病菌生理小种的异质性研究

袁军海¹, 姚裕琪², 张爱香¹, 孟兆军³

(1. 张家口农业高等专科学校农学系, 河北 宣化 075131; 2. 内蒙古农科院, 内蒙古 呼和浩特 010031;
3. 张家口市坝上农科所马铃薯室, 河北 张北 076640)

摘要: 在马铃薯晚疫病生理小种的鉴定中, 经常出现结果不合理的现象, 这时应通过单基因和复合基因鉴别寄主的发病情况反复相互验证, 并增加重复次数, 才能得出正确的结论。试验证实马铃薯晚疫病病菌的生理小薯不是异质的, 而是同质的。

关键词: 马铃薯; 晚疫病病菌; 生理小种; 异质性; 同质性

中图分类号: S532, S435 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0092 (2001) 04-0200-04

Чумакова^[1]的研究认为, 马铃薯晚疫病病菌的生理小种在遗传上是异质的, 即通过单孢分离产生的各新小种, 大多与原小种不完全相同, 而且再以第一代新小种为原始材料进行单孢分离产出的第二代新小种, 大多仍与第一代新小种不完全相同。作者据此认为, “目前研究人员手中没有稳定的马铃薯晚疫病病菌纯系小种, 他们使用的是遗传复杂的、总是变异者的生理小种”。笔者对此非常怀疑, 因为如果真是这样的话, 就相当于否定了所有有关马铃薯晚疫病病菌生理小种的科研工作, 这显然是不可能的, 肯定是 Чумакова 的工作出了问题。为验证这一点, 特进行了如下试验。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

生理小种选择 1.3.4 和 1.2.3.4 两个, 由内蒙古农科院提供。鉴别寄主选择 r、R₁、R₂、R₃、R₄、R₁R₂、R₁R₃、R₁R₄、R₂R₃、R₂R₄、R₃R₄、R₁R₂R₄、R₁R₃R₄、R₁R₂R₃R₄ 等 14 个, 由云南师大提供, 引入后于 2000 年冬季播于温室中, 管理同马铃薯原种生产。

1.2 生理小种的单孢分离

首先制备游动孢子或游动孢子囊悬浮液。进行

单游动孢子分离的, 其悬浮液需在室温下静置 8~12 h, 使游动孢子形成静止孢子并萌发产生芽管。单孢分离在显微镜下进行, 先将载玻片置于载物台上, 载玻片上放一片盖玻片。取医用 1 ml 注射器, 吸入一定悬浮液, 在盖玻片上滴一滴, 约 10~15 μL, 然后镜检, 确认这滴悬浮液中只有 1 个游动孢子囊或游动孢子 (即具有一段芽管的静止孢) 后即可进行培养。培养在马铃薯片上进行, 将载有含 1 个游动孢子或游动孢子囊悬浮液的盖玻片翻转, 扣在马铃薯片上, 然后置于 18~20℃ 条件下, 约 5~7d 后, 即可产生白色绒球状霉层, 最后挑入利马豆培养基保存。以上均在无菌操作的条件下进行。生理小种 1.3.4 的分离物分别记作 A-1、A-2、A-3……, 生理小种 1.2.3.4 的分离物分别记作 B-1、B-2、B-3……。

1.3 生理小各及其单孢子分离物的鉴定

2001 年春季鉴定, 在方磁盘内进行, 先在方磁盘内铺一层消毒的卫生纸, 然后分别剪取各鉴别寄主中部某复叶顶端的 3 个小叶, 背面向上, 依次摆放在卫生纸上, 每个方磁盘放一套鉴别寄主, 鉴定一个生理小种或单孢子分离物。将待鉴定物制成游动孢子囊悬浮液, 用滴管分别滴加在各小叶背面中央 (相当于重复 3 次), 以灭菌蒸馏水为对照。接种完毕后喷洒一定量蒸馏水, 盖膜保湿, 置于 18~20℃ 条件下发病, 约 5~7d 后症状明显时记载发病情况, 然后以 “至少有少量孢子囊产生” 作为侵染的标准, 按照 Black^[2] 等的分类命名系统判断

收稿日期: 2001-07-28

作者简介: 袁军海 (1969—), 男, 河北无极县人, 张家口农业高等专科学校讲师, 硕士学位, 主要从事马铃薯晚疫病研究

生理小种的致病基因型。

选两个单孢分离物 A-1 和 B-1, 按上述方法重新鉴定 6 次, 比较总共 7 次的鉴定结果。

2 结果与分析

2.1 生理小种 1.3.4 和 1.2.3.4 及其单孢分离物的鉴定

结果见表 1 和表 2。

由表 1 和表 2 可知, 用灭菌蒸馏水接种的鉴别

寄主均不发病, 说明鉴别寄主本身不带病。根据 Black 等的分类命名系统, 小种 1.3.4 和 1.2.3.4 在各鉴别寄主上的表现是合理的, 有些单孢分离物, 如 A-6、A-9、A-11、A-14、A-15 和 B-2, 表现也是合理的, 可以推导出它们的致病基因型分别是 1.3.4 和 1.2.3.4, 与原小种一致。但也有相当一部分的单孢分离物表现不合理, 主要表现为应当发病的没有发病(可通过其它鉴别寄主的发病情况推导, 如 A-1 能侵染 R₁ R₃ R₄, 说明

表 1 生理小种 1.3.4 及其单孢分离物的鉴定结果

待鉴定物	鉴别寄主发病情况														备注
	r	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₁ R ₂	R ₁ R ₃	R ₁ R ₄	R ₂ R ₃	R ₂ R ₄	R ₃ R ₄	R ₁ R ₂ R ₄	R ₁ R ₃ R ₄	R ₁ R ₂ R ₃ R ₄	
1.3.4	+++	+++	0;	+-	+++	-	+-	+++	-		+-	0;	+-	0;	?
A-1	+-	+++	-	+++	+++	-	+-	+++	0;		0;	0;	+-	++++	B
A-2	+++	+++	-	+++	+++	-	+-	+++	0;		0;	0;	-	0;	B
A-3	+-	+++	-	+++	+++	-	+-	+-	0;		0;	0;	+-	0;	N
A-4	+++	++++	0;	+++	+++	-	+-	+-	0;		+	0;	+-	+++	B
A-5	+++	++++	-	+++	+++	-	+-	+-	0;	-	+-	0;	-	0;	?
A-6	+++	+++	0;	+++	++++	--	+-	+-	-		+-	0;	+-	0;	B
A-7	++	+++	0;	++++	+++	--	+-	+-	-		-	-	+-	+-	B
A-8	+++	++++	-	++++	+++	-	+-	+-	-		-	---	+-	0;	?
A-9	+++	+++	-	++++	+++	-	+-	+-	-		+-	--	+-	0;	N
A-10	++	+++	-	+++	+++	-	+-	+++	-		+-	0;	-	0;	B
A-11	+++	+++	0;	+++	+++	-	+-	++	+		+-	--	--	0;	B
A-12	+++	+-	-	+++	+++	0;	-	+-	-		0;	--	+-	0;	N
A-13	+++	+++	0;	+++	+++	-	+-	++	-		--	---	+-	0;	N
A-14	+++	+++	-	+++	+++	-	++	++	-		+-	0	+	0;	?
A-15	+++	+++	0;	+++	+++	-	+-	+++	0		-	+-	0;	0	?
灭菌蒸馏水	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

注: 空白: 未测定; 0: 无病; 0;: 仅接种点处有坏死斑, 不产孢; -: 坏死斑占小叶面积 1/3, 不产孢; --: 坏死斑占小叶面积 2/3, 不产孢; ---: 坏死斑几乎布满整个小叶, 不产孢; +: 坏死斑占小叶面积 1/3, 少量产孢; ++: 坏死斑占小叶面积 2/3, 产孢量较多; +++: 坏死斑几乎布满整个小叶, 霉层明显; ++++: 坏死斑布满整个小叶, 霉层厚而白; +-: 坏死斑占小叶面积 2/3, 少量产孢; +--: 坏死斑几乎布满整个小叶, 少量产孢; +- -: 坏死斑几乎布满整个小叶, 产孢量较多。B: 单游动孢子分离; N: 单游动孢子囊分离; ?: 未知。表中发病情况取 3 次重复中发病最重的。下同。

表 2 生理小种 1.2.3.4 及其单孢分离物的鉴定结果

待鉴定物	鉴别寄主发病情况														备注
	r	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₁ R ₂	R ₁ R ₃	R ₁ R ₄	R ₂ R ₃	R ₂ R ₄	R ₃ R ₄	R ₁ R ₂ R ₄	R ₁ R ₃ R ₄	R ₁ R ₂ R ₃ R ₄	
1.2.3.4	+-	+++	+++	+-	+++	+++	+++	+++	+++		+-	+-	+++	+-	?
B-1	++	+++	+++	++++	++++	++++	-	+-	+-		+-	+-	+++	-	B
B-2	+-	+++	++	+++	+++	+-	++	+-	+-		+-	+-	+++	++	B
B-3	+++	+++	+	+++	+++	---	++	+-	-		+	-	--	-	?
B-4	+++	+++	+++	+++	+++	+-	-	+-	+-	++	+-	+-	+-	+-	?

1.3.4 三个致病基因连在一起, 则此生理小种应能侵染 R₃R₄, 但实际 R₃R₄ 并未发病), 如 A-1 对 R₃R₄、A-2 对 R₁R₃R₄、A-12 对 R₁R₃、B-1 对 R₁R₃ 及 B-3 对 R₁R₂、R₂R₃、R₁R₂R₃、R₁R₃R₄、R₁R₂R₃R₄ 等; 而不应当发病的反而发病, 如 A-1、A-4 和 A-7 对 R₁R₂R₃R₄, A-11 对 R₁R₃ 等。从鉴别寄主看, 表 1 中 R₃R₄ 和 R₁R₃R₄ 及表 2 中 R₁R₃ 和 R₁R₂R₃R₄ 等应当明显发病却表现不发病或发病较轻, 而表 1 中 R₂R₃ 和 R₁R₂R₃R₄ 不应当发病却表现发病, 甚至较重发病。

表现不合理的原因可能是多方面的。笔者曾以较低浓度接种, 结果多数应当发病的鉴别寄主未发病, 已发病的也比较轻。由此可也推断不同鉴别寄主所要求的最低接种浓度可能不同, 这时应加大接种浓度。其次, 鉴别寄主其实也是不

同的品种, 严格讲应当是不含水平抗性的高抗的垂抗品种, 但在鉴别寄主的选育过程中, 水平抗性很难完全消除 (测定时也会因外界条件的影响而出现较大偏差), 而且垂直抗性程度的高低也是相对的, 有时很难达到最高, 这些都会影响发病程度的高低, 甚至使不应当发病的轻度发病。至于表 1 中 R₁R₂R₃R₄ 的严重发病, 后来证明是鉴别寄主混杂所致。另处, 根据 Чумакова 的观点, 还可能是形成了新的生理小种, 但这些新小种在鉴别寄主上的表现是不合理的, 因为不能相互验证。如 A-1 能侵染 R₁R₂R₃R₄, 说明可能有小种 1.2.3.4 产生, 但 R₂、R₁R₂、R₂R₃、R₁R₂R₄ 都不发病, 不合理。

2.2 单孢分离物 A-1 和 B-1 重复鉴定结果比较
结果见表 3、4。

表 3 单孢分离物 A-1 重复鉴定结果比较

鉴定次数	鉴别寄主发病情况													
	r	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₁ R ₂	R ₁ R ₃	R ₁ R ₄	R ₂ R ₃	R ₂ R ₄	R ₃ R ₄	R ₁ R ₂ R ₄	R ₁ R ₃ R ₄	R ₁ R ₂ R ₃ R ₄
初次鉴定	++-	+++	-	+++	+++	-	++-	+++	0;		0;	0;	+-	++++
重复 I	+++	+++	-	+++	+++	-	++-	++-	0;	-	++-	0;	+-	0;
重复 II	+++	++-	0;	+++	+++	-	+++	+++	-	-	0;	0;	+-	0;
重复 III	+++	+++	-	++++	+++	-	++-	+++	-	-	+-	-	++-	0;
重复 IV	+++	+++	-	+++	+++	0;	++-	+++	-	-	--	--	---	0;
重复 V	+++	+++	0;	+++	+++	-	+-	++-	0;	-	++-	0;	++-	-
重复 VI	+++	+++	-	+++	+++	-	+++	++	0;	-	+	-	+-	0;

表 4 单孢分离物 B-1 重复鉴定结果比较

鉴定次数	鉴别寄主发病情况													
	r	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₁ R ₂	R ₁ R ₃	R ₁ R ₄	R ₂ R ₃	R ₂ R ₄	R ₃ R ₄	R ₁ R ₂ R ₄	R ₁ R ₃ R ₄	R ₁ R ₂ R ₃ R ₄
初次鉴定	++	+++	+++	++++	++++	++++	-	++-	++-		+-	++-	+++	-
重复 I	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+-	++-	+++	-
重复 II	+++	+++	+++	+++	+++	++-	++	+++	++-	++-	+-	+++	+++	++-
重复 III	++-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	++-	+-	+	++-	+++	++-
重复 IV	+++	+++	++	+++	+++	++-	++-	++-	-	+++	++-	++-	++-	++-
重复 V	+++	+++	+++	+++	+++	++-	+++	+++	+++	++-	+++	++-	++-	+++
重复 VI	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	+++	++-	+++	++	++-	+++	++-

由表 3 和表 4 可见, 单孢分离物 A-1 和 B-1 各共鉴定 7 次, 两两之间的鉴定结果都不完全一致, 但将这些结果结合起来看, 就会得出正确的结论。如表 3 中, 初次鉴定时, A-1 不侵染 R₃R₄, 但再重复 6 次, 在总共 7 次的鉴定中, 有 4 次能侵

染 (即使产孢量不大), 总体来讲应视为能侵染。其它鉴别寄主, 如表 3 中的 R₁R₃R₄ 和 R₁R₂R₃R₄, 表 4 中的 R₁R₂、R₂R₃ 和 R₁R₂R₃R₄ 等也是这样。由于鉴定的是同一分离物, 如果假设此分离物已包含多个生理小种, 每次重复鉴定时只表现其中一个

或几个生理小种的致病情况, 而不表现其它生理小种的致病情况, 因而造成每次鉴定结果都不一致, 显然不合理。所以经过单孢分离, 没有产生新的生理小种, 形成的都是与原小种一致的生理小种, 同时说明原小种不是异质而是同质的。

表 3 和表 4 还可发现, 鉴定结果的不一致可通过增加重复次数消除, 说明这种不一致是试验误差造成的 (具体见 2.1 中的分析)。由此也可推知, 表 1 和表 2 中其它表现不合理的生理小种的情况也是类似的。

对比 Чумакова 的试验, 作者并未严格区分大量产孢和少量产孢, 有产孢时均记作“+”, 当同一小种在鉴别寄主上表现不合理 (即相互不能验证) 时, 未见进行重复鉴定, 只是武断地认为产生了新小种, 并据此推想原生理小种是异质的。这显然是错误的。

生理小种的概念于 1917 年由 Stakman 提出, 多年来一直作为病毒原菌“种”以下的重要分类单元, 应当具有相对稳定性, 如果仅仅单孢分离就能使之发生改变, 结果将是不可想象的。

3 结论与讨论

综上所述, 马铃薯晚疫病菌的生理小种不是异质的, 而是同质的。

正如黄河等^[3]所指出的, Black 等所提出的鉴定系统划分侵染与否明确而不含糊, 且有复合基因寄主和单基因寄主相互验证, 所以根据发病情况就可初步判断结果是否合理。

用鉴别寄主鉴定生理小种实际是垂抗基因与毒性基因的互作, 这种互作是 0 或 1 的关系, 即不亲合时表现完全不发病 (最多表现过敏性坏死反应), 亲合时则发病很严重。但这是理想状态, 在实际操作中, 常因接种方法、接种浓度、环境条件及鉴别寄主抗性变化等方面的原因而出现较大误差, 甚至是错误。因此, 将判断侵染与否的标准定为“至少有少量孢子囊产生”是合理的, 这时更应增加重复次数, 反复鉴定, 才能得出正确结论。因此规律性的事件是可以重复出现的, 而偶然事件不具有规律性, 不能重复出现。

参 考 文 献

- [1] Чумакова А И. 马铃薯晚疫病菌生理小种变异性研究 [俄]. 张爱香译. 马铃薯, 1985 (4): 41—46, 57.
- [2] Balack W, Mastenbroek C, Mills W R et al. A proposal for an international nomenclature of races of *Phytophthora infestans* and of genes controlling immunity in *Solanum demissum* derivatives. *Eurphytica*, 1953, 2 (3): 173—179.
- [3] 黄河, 程汉清, 徐天宇等. 我国北部马铃薯晚疫病菌生理小种的发生和变化. 植物病理学报, 1981, 11 (1): 45—49.

STUDIES ON THE HETEROGENEITY OF PHYSIOLOGICAL RACES OF PHYTOPHTHORA INFESTANS

YUAN Jun-hai¹, YAO Yu-qi², ZHANG Ai-xiang¹, MENG Zhao-jun³

(1. Department of Agronomy of Zhangjiakou Agricultural College, Heibi Xuanhua 075151;

2. Academy of Agricultural Science of Inner Mongolia, Inner Mongolia Huhhot 010031;

3. Potato Office of Bashang Agricultural Institute of Zhangjiakou, Hebei Zhangbei 076640)

ABSTRACT: On the identification of physiological races of *Phytophthora infestans*, some unreasonable results usually occurred. True conclusions would be made if we mutual-verified repeatedly by the disease case between monogenes identical host and multigenes identical host, and increase the repeats. This results showed that the physiological races of *Phytophthora infestans* was homogeneity, not of heterogeneity.

KEY WORDS: potato; *Phytophthora infestans*; physiological races; heterogeneity; homogeneity