

兰成忠, 阮宏椿, 姚锦爱, 等. 福建省番茄晚疫病菌生理小种鉴定分析 [J]. 福建农业学报, 2015, 30 (7): 701-704.

LAN C-Z, RUAN H-C, YAO J-A, et al. Identification and Analysis on Physiological Races of *Phytophthora infestans* Isolated in 2014 from Tomatoes in Fujian [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2015, 30 (7): 701-704.

## 福建省番茄晚疫病菌生理小种鉴定分析

兰成忠, 阮宏椿, 姚锦爱, 吴 玮, 汪进仕

(福建省农业科学院植物保护研究所, 福建 福州 350013)

**摘要:** 为明确福建省番茄晚疫病菌生理小种组成结构, 利用5个鉴别寄主对2014年分离自福建省的78株番茄晚疫病菌的生理小种进行测定。研究结果表明, 供试的番茄晚疫病菌由 $T_1$ 、 $T_{1,2}$ 、 $T_{1,5}$ 、 $T_{1,3,4}$ 、 $T_{1,2,5}$ 、 $T_{1,2,3,4}$ 和 $T_{1,2,3,4,5}$ 共7个小种组成, 其中 $T_{1,2}$ 地理分布最广, 出现频率最高, 占鉴定总数的28.20%, 为福建省番茄晚疫病菌优势小种, 毒力频率分析显示, 对5个抗番茄晚疫病基因 $Ph-1$ 、 $Ph-2$ 、 $Ph-3$ 、 $Ph-4$ 和 $Ph-5$ 有毒性的毒性基因出现频率依次为100%、64.1%、35.09%、35.09%和26.92%, 表明 $Ph-1$ 和 $Ph-2$ 在福建省已丧失抗性。

**关键词:** 番茄; 晚疫病菌; 生理小种; 鉴定; 分析

中图分类号: S 435

文献标识码: A

### Identification and Analysis on Physiological Races of *Phytophthora infestans* Isolated in 2014 from Tomatoes in Fujian

LAN Cheng-zhong, RUAN Hong-chun, YAO Jin-ai, WU Wei, WANG Jin-shi

(Institute of Plant Protection, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350013, China)

**Abstract:** The physiological races of *Phytophthora infestans* isolated in 2014 from tomatoes in Fujian were studied. Seven physiological races from the 78 isolates were identified in 5 hosts. Among them,  $T_{1,2}$  was the most widely distributed and predominant in the province with an appearance frequency of 28.20%. The occurrence frequency of the virulent genes resistant to  $Ph-1$ ,  $Ph-2$ ,  $Ph-3$ ,  $Ph-4$  and  $Ph-5$  were 100%, 64.1%, 35.09%, 35.09% and 26.92%, respectively. It appeared that the tomato cultivars carrying  $Ph-1$  and  $Ph-2$  genes had become susceptible to the prevalent races of *P. infestans* in Fujian.

**Key words:** tomato; *Phytophthora infestans*; physiological race; identification; analysis

由晚疫病菌 *Phytophthora infestans* 侵染引起的番茄晚疫病是番茄生产上发生最普遍、危害最严重的病害之一; 无论在露地还是保护地都造成重大损失, 是一种流行性很强的毁灭性病害<sup>[1-2]</sup>。福建省番茄晚疫病主要为害春、秋两茬番茄, 3~5月和9~11月为发病高峰期, 一般年份减产20%~30%, 严重时可达40%~60%, 甚至绝收<sup>[3-4]</sup>。为避免番茄晚疫病造成重大损失, 目前生产上主要利用甲霜灵等药剂进行化学防治, 但长期用药易使病原菌产生抗药性, 影响防治效果, 污染环境, 同时也不利于番茄产业的可持续生产。选育和利用抗病品种是防治番茄晚疫病最直接有效和经济的防治措施, 而明确番茄晚疫病菌生理小种的组成及其结构是选育

和利用优良抗性品种的关键和基础<sup>[5-6]</sup>, 因此, 需要各个地区根据当地的自然环境条件进行病原菌生理小种的鉴定, 并在此基础上有针对性地开展抗性育种及抗病品种的合理布局, 对于有效防治番茄晚疫病具有重要意义。目前, 国内外对番茄晚疫病菌致病性分化已进行了较为深入的研究, 已报道存在15个生理小种, 番茄晚疫病菌的致病性分化相当复杂, 不同寄主、不同地域或生态环境均能影响其分化, 而且病原菌不时发生变异, 导致毒性、侵染力和寄主范围等特性发生改变<sup>[6-8]</sup>, 福建省地理环境和气候条件均较为复杂, 目前尚无番茄晚疫病菌生理小种的研究报道。本研究利用5个鉴别品种对福建省部分地区采集到的78株番茄晚疫病菌进行生理

收稿日期: 2015-03-18 初稿; 2015-05-09 修改稿

作者简介: 兰成忠(1979—), 男, 硕士, 副研究员, 主要从事植物真菌及卵菌病害防治技术研究(E-mail:lczhong7911@126.com)

基金项目: 国家自然科学基金项目(31400025); 福建省农业科学院青年科技英才百人计划项目(YC2015-4)

小种鉴定,初步明确番茄晚疫病菌生理小种的种群结构,为番茄晚疫病抗原材料筛选、抗病品种培育以及抗性品种的合理利用提供科学理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试培养基和生理小种鉴别品种

供试培养基:黑麦培养基,具体制备方法参照朱桂宁等<sup>[9]</sup>的方法。

番茄晚疫病菌生理小种鉴别品种 TS19、TS33、W.Va700、LA1033 和 L3708,由亚蔬-世界蔬菜研究与发展中心王添成博士提供,它们分别含有不同的显性抗病基因(*Ph*基因)。

### 1.2 供试菌株的分离、纯化和保存

2014年春、秋番茄晚疫病发生或流行时期,从福建省闽东(福安、周宁、霞浦)、闽南(龙海、泉州)、闽中(闽清、闽侯、长乐、莆田)、闽北(建瓯、顺昌)和闽西(沙县、永安)等5个地区13个市(县)的番茄种植地采集具晚疫病典型症状的病叶和病果。参照Moller等<sup>[9]</sup>和Tumwine等<sup>[10]</sup>的方法对病叶和病果中的晚疫病菌进行分离,对经显微镜初步鉴定为晚疫病菌的菌落进行挑单菌丝尖端纯化菌种,纯化好的菌株于黑麦培养基斜面上保存于13℃恒温箱中备用。

### 1.3 生理小种鉴定

**1.3.1 鉴别寄主的培育** 将供试鉴别寄主种子播于50格(每格大小为6.0 cm×6.0 cm×5.5 cm)育苗盘穴的培养土中,发芽后每穴疏苗至1株,放置于日温为25~28℃的温室中生长,植株长出约4~6片真叶时便可用于接种试验。

**1.3.2 接种体的制备与接种** 供试菌株培养于黑麦培养基平板上,置于20℃培养箱中黑暗培养,待菌丝长满整个平板后,用适量灭菌水洗下平板中晚疫病菌孢子囊,用血球计数板计算孢子囊数目,将孢子囊悬浮液的浓度调至约 $5\times10^4$ 个·mL<sup>-1</sup>,将孢子囊悬浮液移至4℃冰箱中静置0.5 h以促进游动孢子分化,然后取出置于13℃连续光照的培养箱中孵育1 h使游动孢子同时大量释放,以释放的游动孢子悬浮液作为接种体。采用喷雾接种方法将供试菌株接种于鉴别寄主的叶片上,每一供试菌株接种于一套鉴别寄主,每一鉴别寄主50株,4次重复,以清水处理为对照。接种后的植株置于接种室中,前24 h内,室温为18~20℃,黑暗,相对湿度为100%,以后相对湿度为75%~95%、温度为18~23℃,每天光照12 h。

**1.3.3 病情调查及小种鉴定** 接种后第7 d调查

每一植株叶面积的被害率,进而确定各个鉴别寄主每一植株的病害严重度,即单株病害等级,病情调查和生理小种判定参照冯兰香等<sup>[8]</sup>的方法。单株病害等级:0级-无病症;1级-病斑细小,叶面积被害率≤5%;2级-限制型病斑,5%<叶面积被害率≤15%;3级-叶部有病斑,茎部无病斑,15%<叶面积被害率≤30%;4级-茎部病斑少量,30%<叶面积被害率≤60%;5级-茎部病斑扩展型,60%<叶面积被害率≤90%;6级-茎部严重受害,叶面积被害率>90%,甚至植株死亡。群体抗性等级:根据每一鉴别寄主每一植株的单株病害等级,按如下方法计算出每一鉴别寄主4次重复的病级指数平均值。病级指数=Σ(每个病级的植株数×级别数)/调查总植株数。根据每一鉴别寄主4次重复的病级指数平均值,再按下面2个抗性等级将不同的鉴别寄主划分成抗性和感病反应类型,抗病(R):病级指数≤4.0;感病(S):4.0<病级指数≤6.0。根据病情调查结果来确定第一菌株的生理小种类型。

### 1.4 菌株对抗性基因的毒力频率分析

根据供试菌株对含抗性基因鉴别寄主是否有致病性来确定番茄晚疫病菌群体对抗性基因的毒力频率,计算公式为:毒性频率=(有毒菌株数/测试总菌株数)×100%,如供试菌株中有50%菌株对寄主TS33(*Ph*-1)具有致病性,则表示对抗性基因*Ph*-1的毒力频率为50%,其余抗性基因依此类推。

## 2 结果与分析

### 2.1 福建省番茄晚疫病菌生理小种(致病型)组成结构

通过对福建省5个地区13个县市的番茄晚疫病菌生理小种进行了测定,78株番茄晚疫病菌共鉴定出7个生理小种,即T<sub>1</sub>、T<sub>1,2</sub>、T<sub>1,5</sub>、T<sub>1,3,4</sub>、T<sub>1,2,5</sub>、T<sub>1,2,3,4</sub>和T<sub>1,2,3,4,5</sub>。其中生理小种T<sub>1,2</sub>出现频率最高,出现频率为28.20%;其次为T<sub>1,2,3,4</sub>,出现频率为17.94%;其他生理小种的出现频率为2.56%~15.38%(表1)。在供试的78株番茄晚疫病菌中,能克服3个以上抗性基因的菌株有40株,约占被测菌株的51.28%,平均每个菌株能克服2.62个抗性基因。

### 2.2 番茄晚疫病菌生理小种的地域性差异

对福建省不同地区番茄晚疫病菌生理小种组成结构差异进行了分析,在闽东发现了4个生理小种(T<sub>1</sub>、T<sub>1,2</sub>、T<sub>1,3,4</sub>和T<sub>1,2,3,4</sub>),以生理小种T<sub>1</sub>为优势小种,在闽南地区发现了4个生理小种(T<sub>1,2</sub>、T<sub>1,3,4</sub>、

$T_{1,2,5}$  和  $T_{1,2,3,4}$ ), 以  $T_{1,2}$  和  $T_{1,2,5}$  为优势小种, 阔中地区番茄晚疫病菌生理小种的组成最为丰富, 共发现了 6 个生理小种( $T_{1,2}$ 、 $T_{1,5}$ 、 $T_{1,3,4}$ 、 $T_{1,2,5}$ 、 $T_{1,2,3,4}$  和  $T_{1,2,3,4,5}$ ), 除了致病性较弱的  $T_1$  小种未在该地区出现, 其余 6 个生理小种在该地区均有出现, 其中以  $T_{1,2}$  小种为优势小种, 在闽北地区共发现了 3 个生理小种( $T_1$ 、 $T_{1,2}$  和  $T_{1,2,3,4}$ ), 以  $T_{1,2}$  和  $T_{1,2,3,4}$  为优

势小种, 出现了致病性较弱的  $T_1$ , 在闽西共发现 4 个生理小种( $T_{1,2}$ 、 $T_{1,3,4}$ 、 $T_{1,2,5}$  和  $T_{1,2,3,4}$ ), 以  $T_{1,2,5}$  为优势小种(表 2)。 $T_{1,2}$  和  $T_{1,2,3,4}$  这两个生理小种在各个地区普遍存在, 此外在被测菌株中还发现了致病性最强  $T_{1,2,3,4,5}$ , 该小种能克服所有已知的  $Ph-1 \sim Ph-5$  5 个抗病基因, 此小种只在闽中地区出现, 其余地区均未出现该小种。

表 1 2014 年福建省番茄晚疫病菌生理小种鉴定结果

Table 1 Identification of physiological races of *P. infestans* isolated in 2014 from tomatoes in Fujian

生理小种	菌株数量	出现频率 /%	鉴别寄主				
			TS19( $Ph+$ )	TS33( $Ph-1$ )	W. Va. 700( $Ph-2$ )	L3708( $Ph-3,4$ )	LA1033( $Ph-5$ )
$T_1$	9	11.53	S*	S	R*	R	R
$T_{1,2}$	22	28.20	S	S	S	R	R
$T_{1,5}$	7	8.97	S	S	R	R	S
$T_{1,3,4}$	12	15.38	S	S	R	S	R
$T_{1,2,5}$	12	15.38	S	S	S	R	S
$T_{1,2,3,4}$	14	17.94	S	S	S	S	R
$T_{1,2,3,4,5}$	2	2.56	S	S	S	S	S
总计	78	—	—	—	—	—	—

注: S 为感病; R 为抗病。

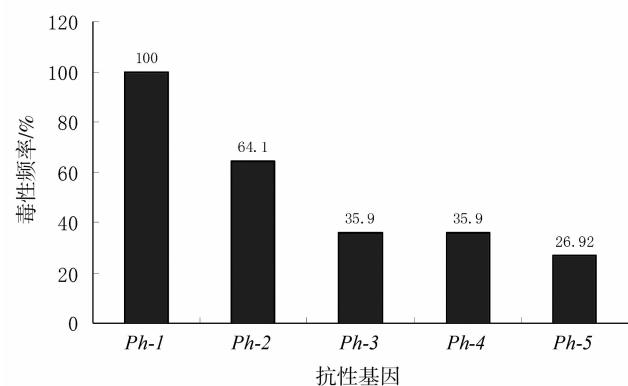
表 2 2014 年福建省番茄晚疫病菌生理小种在不同地区之间的分布

Table 2 Physiological races and distribution of *P. infestans* in various regions in Fujian in 2014

生理小种	菌株数量	闽东	闽南	闽中	闽北	闽西
$T_1$	9	7	0	0	2	0
$T_{1,2}$	22	2	4	10	3	3
$T_{1,5}$	7	0	0	7	0	0
$T_{1,3,4}$	12	1	1	8	0	2
$T_{1,2,5}$	12	0	4	4	0	4
$T_{1,2,3,4}$	14	3	3	3	3	2
$T_{1,2,3,4,5}$	2	0	0	2	0	0
总计	78	13	12	34	8	11

### 2.3 毒力频率分析

2014 年福建省番茄晚疫病菌对抗性基因毒力频率分析(图 1)显示, 福建省番茄晚疫病菌可克服所有已知的  $Ph-1 \sim Ph-5$  5 个抗病基因, 但病原菌群体对各个抗性基因的毒力频率存在差异, 对  $Ph-1$  抗性基因(载体品种为 TS33)的毒力频率最高, 为 100%, 对  $Ph-2$  抗性基因的毒力频率为 64.10%, 对  $Ph-3$ 、 $Ph-4$  和  $Ph-5$  抗性基因的毒力频率分别为 35.90%、35.90% 和 26.92%。毒力频率分析结果表明,  $Ph-1$  和  $Ph-2$  抗性基因在福建省已经丧失了可利用价值。

图 1 福建省番茄晚疫病菌居群对抗性基因  $Ph-1$ 、 $Ph-2$ 、 $Ph-3$ 、 $Ph-4$  和  $Ph-5$  的毒性频率Fig. 1 Virulence frequency in Fujian of *P. infestans* resistant to  $Ph-1$ ,  $Ph-2$ ,  $Ph-3$ ,  $Ph-4$  and  $Ph-5$  genes

### 3 讨论与结论

本试验用国际通用的 5 个鉴别品种对 2014 年福建省不同地区所采集的番茄晚疫病菌的生理小种进行了鉴定。鉴定结果表明, 福建省番茄晚疫病菌生理小种组成较为复杂, 共鉴定出了 7 个生理小种, 以  $T_{1,2}$  小种出现频率最高(28.20%), 为福建省目前的优势小种, 同时出现了致病性较强的  $T_{1,2,3,4,5}$ , 虽然该小种出现频率较低, 仅为

2.56%，但该小种出现意味着无论种植何种现有抗病基因的番茄品种均有感染晚疫病的可能，对今后番茄晚疫病抗性育种和防治增加了很大难度，因此应引起育种及生产部门的注意。

福建省不同地区番茄晚疫病菌生理小种组成结构存在较大差异，这可能与不同地区间气候环境与条件不同有关。闽中地区生理小种组成最为复杂，34株晚疫病菌共鉴定出了6个生理小种，其中以T<sub>1,2</sub>小种为优势小种，同时还出现了致病性较强的T<sub>1,2,3,4,5</sub>，闽中地区为福建省番茄主栽区，该地区不仅番茄种植面积大，而且种植的品种也较为丰富，故该地区番茄晚疫病菌的群体遗传结构在福建省具有一定的代表性。菌株对抗性基因的毒力频率分析显示，福建省60%以上的番茄晚疫病菌株对Ph-1和Ph-2抗性基因具有毒性，说明Ph-1和Ph-2抗性基因在福建省对番茄晚疫病菌的抗性已经失效，在育种中应利用其他抗性基因或多个抗性基因组合。

我国研究人员对番茄晚疫病菌生理小种研究表明，不同地区番茄晚疫病菌生理小种的组成及其优势小种存在一定的差异。罗小波等<sup>[12]</sup>报道，四川成都番茄晚疫病菌由T<sub>1</sub>、T<sub>1,2</sub>、T<sub>1,3</sub>、T<sub>1,4</sub>、T<sub>1,3,4</sub>和T<sub>1,2,3,4</sub>共6个小种组成，优势生理小种为T<sub>1</sub>；朱桂宁等<sup>[13]</sup>报道，广西番茄晚疫病菌由T<sub>0</sub>、T<sub>1</sub>、T<sub>1,2</sub>、T<sub>1,2,4</sub>和T<sub>1,2,3,4,5</sub>共5个生理小种组成，其中小种T<sub>1,2</sub>和T<sub>1,2,3,4,5</sub>是优势小种；余文贵等<sup>[14]</sup>和郝永娟等<sup>[15]</sup>分别对江苏省和天津市番茄晚疫病菌的生理小种进行了鉴定，研究结果表明，江苏省番茄晚疫病菌有T<sub>0</sub>、T<sub>1</sub>、T<sub>1,2</sub>、T<sub>1,2,3</sub>和T<sub>1,3,4</sub>共5个小种，T<sub>1,2</sub>地理分布最广，为优势小种，天津市番茄晚疫病菌共有T<sub>0</sub>、T<sub>1</sub>、和T<sub>1,2</sub>等3种类型，其中T<sub>1</sub>为优势小种。与上述省份(地区)相比，福建省番茄晚疫病菌生理小种数量更多，并且高致病菌株(T<sub>1,2,3,4,5</sub>)与弱致病菌株(T<sub>1</sub>)同时存在，表明该地区番茄晚疫病菌群体较为复杂，病原菌致病性分化层次更高，这可能是因为福建省比其他省份气候温暖、潮湿，番茄可周年种植，而且山多地形复杂，小气候环境多样，所以导致病菌分化也复杂多样。

番茄晚疫病菌生理小种鉴定在番茄晚疫病预测预报、综合防治、抗病育种以及病菌抗药性监测方面具有重要的意义。本研究首次对福建省番茄晚疫病菌的生理小种进行了鉴定，由于本试验菌种采集的地域和菌株数量有限，研究结果只能初步明确番茄晚疫病菌生理小种分化现象的总体趋势，未能连续、全面了解生理小种变化的整体动态，因此为使

番茄晚疫病菌生理小种监测更接近于生产实际需求，后继有关研究中有必要加入省内一些农业生产上应用的主要品种作为辅助鉴别品种，尽可能从现有品种中筛选出抗病品种或挖掘出新的抗性基因，同时应增加番茄晚疫病菌标样的代表性和数量，并且长期系统地对福建省番茄晚疫病菌群体结构做进一步监测和探讨。

### 参考文献：

- [1] NOWICKI M, FOOLAD M R, NOWAKOWSKA M, et al. Potato and tomato late blight caused by *Phytophthora infestans*: an overview of pathology and resistance breeding [J]. Plant disease, 2012, 96 (1): 4—17.
- [2] 余文贵, 赵统敏, 曹培生, 等. 番茄晚疫病菌研究进展 [J]. 江苏农业学报, 2008, 24 (4): 516—521.
- [3] 郑文棉. 露地樱桃番茄晚疫病的发生规律与综合防治措施 [J]. 现代农业, 2007, (7): 14.
- [4] 薛德乾. 春种番茄晚疫病的发生与防治 [J]. 长江蔬菜, 2004, (3): 29—30.
- [5] 温晓涵, 张喜春. 引进番茄品种抗晚疫病苗期鉴定及抗性品种筛选 [J]. 中国农学通报, 2010, 26 (4): 189—194.
- [6] CHEN C H, SHEU Z M, WANG T C. Host specificity and tomato-related race composition of *Phytophthora infestans* isolates in Taiwan during 2004 and 2005 [J]. Plant disease, 2008, 92 (5): 751—755.
- [7] 石延霞, 李宝聚, 薛敏菊. 番茄晚疫病症状诊断、流行规律及防治 [J]. 中国蔬菜, 2007, (2): 57—58.
- [8] 冯兰香, 杨宇红, 谢丙炎, 等. 中国18省市番茄晚疫病菌生理小种的鉴定 [J]. 园艺学报, 2004, 31 (6): 758—761.
- [9] 朱桂宁, 黄福新, 秦碧霞. 致病疫霉的分离培养和单孢纯化方法 [J]. 中国蔬菜, 2003, (6): 41—42.
- [10] MOLLER K, DILGER M, HABERMEYER J, et al. Population studies on *Phytophthora infestans* on potatoes and tomatoes in southern Germany [J]. European journal of plant pathology, 2009, 124: 659—672.
- [11] TUMWINE J, FRINKING H D, JEGER M J. Isolation techniques and cultural media for *Phytophthora infestans* from tomatoes [J]. Mycologist august, 2000, 14 (3): 137—139.
- [12] 罗小波, 帅正彬, 郭江洪, 等. 成都市番茄晚疫病菌生理小种的初步研 [J]. 西南农业学报, 2007, 20 (5): 1142—1143.
- [13] 朱桂宁, 黄福新, 冯兰香, 等. 广西番茄晚疫病菌交配型鉴定及生理小种的初步检测 [J]. 广西农业科学, 2007, 38 (3): 1142—1143.
- [14] 余文贵, 邹茶英, 赵统敏, 等. 江苏省番茄晚疫病菌小种鉴定及品种抗性筛选 [J]. 江苏农业学报, 2007, 23 (6): 618—621.
- [15] 郝永娟, 王万立, 刘春艳, 等. 天津市番茄晚疫病菌生理小种的鉴定 [J]. 植物病理学报, 2005, 35 (6): 156—158.

(责任编辑：林海清)