

# 中国 18 省市番茄晚疫病病菌生理小种的鉴定

冯兰香 杨宇红 谢丙炎 冯东昕 杨翠荣

(中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

**摘要:** 利用 5 个含有不同单显性抗番茄晚疫病基因的番茄材料 Ts19、Ts33、W. Va700、LA1033 和 L3708 为鉴别寄主, 对我国 18 省、市、自治区的番茄晚疫病病菌 201 个纯化分离物进行了生理小种鉴定。结果共鉴定出 8 个小种, 即生理小种 T0、T1、T1,2、T1,2,3、T1,2,3,4、T1,4、T1,2,4 和 T3。其中, 小种 T1 和 T1,2 是主流小种, 地理分布最广和发生频率最高, 分别在 13 和 11 个省市出现, 占样本总数的 28.8% 和 28.4%; 其次是小种 T0 和 T1,2,3, 分别在 8 和 7 个省市出现, 分别占 18.9% 和 8.9%; 再其次是小种 T1,2,3,4, 在 4 个省市有发生, 占 7.0%; 小种 T1,2,4、T1,4 和 T3 分布均少, 仅在 1~2 个省市发生, 分别占 3.0%、2.5% 和 2.5%。这是我国的首次报道, 为番茄晚疫病的抗原材料筛选和抗病育种提供了病理学依据。

**关键词:** 番茄晚疫病; 生理小种; 鉴别寄主; 鉴定

**中图分类号:** S 641.2; S 436.412.1<sup>+</sup>2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2004) 06-0758-04

## Identification of Physiological Races of *Phytophthora infestans* on Tomato in Eighteen Provinces of China

Feng Lanxiang, Yang Yuhong, Xie Bingyan, Feng Dongxin, and Yang Cuirong

(Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

**Abstract:** Two hundred and one isolates of *Phytophthora infestans* on tomato from eighteen provinces, cities and autonomous regions were identified by using five differential tomato lines containing different resistance genes, which were Ts19, Ts33, W. Va 700, LA1033 and L3708. The result indicated that the eight different physiological races were found out. Race T1 and T1,2 were widely distributed in 13 and 11 provinces with high frequencies of 28.8% and 28.4% respectively. Followed by T0 and T1,2,3 occurred in eight and seven provinces with frequencies of 18.9% and 8.9% respectively. Then race T1,2,3,4 occurred in four provinces with 7% frequency. The race T1,2,4, T1,4 and T3 were narrowly distributed only in one or two provinces with 3.0%, 2.5% and 2.5% respectively. This is the first report in China.

**Key words:** Tomato late blight; Physiological race; Differential host; Identification

长期以来, 致病疫霉 [*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary] 引起的马铃薯晚疫病和番茄晚疫病始终是世界马铃薯和番茄生产上的重大病害之一。1845 年, Montagne 最早报道了马铃薯晚疫病, 两年后 Payen 报道了番茄晚疫病<sup>[1]</sup>。当今, 中国的番茄晚疫病不仅严重地危害南方露地番茄, 而且也极大地威胁着北方保护地番茄的生产, 引起了广大植病工作者的高度重视<sup>[2]</sup>。开展病原菌生理小种的鉴定是筛选抗原材料和培育抗病品种的前提, 然而, 目前我国尚无番茄晚疫病病菌生理小种的研究报道。自 1999 年起, 作者在亚洲蔬菜研究与发展中心泰国分中心的资助下, 对我国 18 省市的番茄晚疫病进行了病样采集、病原菌的分离纯化和生理小种的鉴定研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试菌种和鉴别寄主

1999~2001 年, 从我国内蒙、吉林、青海、陕西、河北、北京、山东、江苏、安徽、江西、湖

收稿日期: 2004-07-30; 修回日期: 2004-11-30

基金项目: 亚洲蔬菜研究与发展中心泰国分中心 (AVRDC-ARC) 资助项目

北、云南、贵州、重庆、四川、福建、广东和广西等 18 个省、市、自治区的 36 个市、地或县，于当地番茄主产区晚疫病的发生或流行时期，采集具典型症状但又是刚刚发病的病叶和病果样本 500 余份。经室内显微镜检查，选出无污染的病叶或病果，直接挑取霉层或保湿后挑取霉层，在黑麦培养基上分离培养，然后挑单菌丝的尖端进行菌种纯化。

鉴别寄主为 5 个番茄材料：Ts19、Ts33、W. Va700、LA1033 和 L3708，均由亚洲蔬菜研究与发展中心的王添成博士提供，它们分别含有不同的显性抗病基因——*Ph* 基因（表 1）。所有鉴别寄主均种植在日光温室内，所用栽培基质经高压蒸气灭菌，苗钵充分洗净，并加强栽培管理，及时防治病虫害，使幼苗生长健壮、整齐一致。

1.2 接种方法和病情调查及鉴定标准

接种工作在人工气候室内进行，当鉴别寄主幼苗 7~8 叶时接种晚疫病菌待测菌株，接种浓度为  $5 \times 10^4$  孢子囊/mL，在 12℃ 恒温箱中放置 2~3 h，以释放的游动孢子进行接种。采用喷雾接种法，每一待测菌株接种一套鉴别寄主，每一鉴别寄主 32 株，4 次重复；接种后 24 h 内，室温为  $(20 \pm 2)$ ℃、黑暗、100%HR，以后 RH 75%~95%、每天光照  $(70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1})$  14 h。

接种后第 7 天调查每一植株叶面积的被害百分率，进而确定各个鉴别寄主每一植株的病害严重程度，即单株病害等级<sup>[3]</sup>。

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 = (每个病级的植株数 × 级别数) / 调查总植株数。

依据每一鉴别寄主 4 次重复的病级指数平均值，再按下面 3 个抗性等级将不同的鉴别寄主划分成免疫、抗性和感性等不同的反应类型<sup>[3]</sup>。免疫 (I)：病级指数 = 0；抗病 (R)：0 < 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，再结合亚洲蔬菜研究与发展中心提供的番茄晚疫病病菌生理小种在鉴别寄主上的反应<sup>[4]</sup>，来确定每一纯化分离物的小种类型（表 1）。

2 结果与分析

2.1 晚疫病菌的分离和纯化

2.1.1 晚疫病菌的分离 发病初期而又症状典型的样本是成功分离此菌的关键之一，一旦染上其他病菌或杂菌，分离成功的可能性几乎为零。因此，必须及时对采集到的样本进行处理。首先挑取病样上的霉层在显微镜下观察，选出无污染的病叶或病果，然后根据具体情况采取以下 3 种途径确保分离成功：直接挑取霉层：即将无污染的晚疫病病菌霉层直接进行分离培养；保湿后挑取霉层：病叶或病果经自来水和灭菌水冲洗后，将叶背或果面（带病组织）朝上置于 2% 琼脂培养基（经高压灭菌）上保湿，2~3 d 后挑取新长出的霉层；重新接种后分离：有些样本受到其他病菌的污染，但又非用不可，就尽量地挑取晚疫病病菌霉层，制成孢子囊悬浮液，滴于经自来水和灭菌水冲洗的番茄健叶背部，

表 1 番茄晚疫病病菌生理小种的划分

Table 1 Tomato race characterization of *Phytophthora infestans* from China

生理小种	鉴别寄主 Differential host/ 基因型 Genotype designation				
Physiologic race	Ts19/ ( <i>Ph</i> + )	Ts33/ ( <i>Plr</i> 1 )	W. Va700/ ( <i>Ph</i> -1 ,2 )	L3708/ ( <i>Plr</i> 1 ,2 ,3 )	LA1033/ ( <i>Plr</i> 1 ,2 ,3 ,4 )
T0	S	R	R	R	R
T1	S	S	R	R	R
T1 ,2	S	S	S	R	R
T1 ,2 ,3	S	S	S	S	R
T1 ,2 ,3 ,4	S	S	S	S	S
T2	S	R	S	R	R
T2 ,3	S	R	S	S	R
T2 ,4	S	R	S	R	S
T2 ,3 ,4	S	R	S	S	S
T1 ,2 ,4	S	S	S	R	S
T3	S	R	R	S	R
T3 ,4	S	R	R	S	S
T1 ,3 ,4	S	S	R	S	S
T4	S	R	R	R	S
T1 ,4	S	S	R	R	S

注：S:感病型；R:抗病型。  
Note: S: susceptibility; R: resistibility.

背面朝上置于 2 %琼脂培养基上, 在 16~20 ℃、12 h 光照/12 h 黑暗的条件下培养, 4~5 d 后发病。一方面挑取霉层, 另一方面继续按上述方法接种以保证病样的保存, 直至分离成功。无论以哪种途径挑取的霉层, 均应置于选择性培养基上, 在 16~20 ℃、12 h 光照/12 h 黑暗条件下培养<sup>[5]</sup>。

2.1.2 晚疫病菌的纯化 由于番茄晚疫病菌的游动孢子在琼脂培养基上萌发困难, 而且生长缓慢和极易被杂菌污染, 因此利用单孢分离纯化该菌难度很大。我们挑取单菌丝尖端进行菌种纯化, 简便而有效。将分离出的晚疫病菌少量菌丝接种在选择性培养基上, 当菌丝呈放射状生长 2~3 d 后, 再将菌落边缘单菌丝的尖端连同培养基一起切下, 置于斜面基础培养基上, 14 d 后长满斜面, 加入灭菌石蜡油覆盖菌面, 在 16 ℃的恒温箱中长期保存<sup>[5]</sup>。共获得纯化晚疫病菌 201 个菌株。

## 2.2 生理小种的种类和地理分布

根据 201 个番茄晚疫病菌纯化分离物在 5 个番茄鉴别寄主上的症状反应, 共鉴定出 8 个不同的小种, 它们是生理小种 T0、T1、T1,2、T1,2,3、T1,2,3,4、T1,4、T1,2,4 和 T3, 不同地区生理小种差异显著, 具体结果见表 2。这表明我国番茄晚疫病菌生理小种多而复杂。从我国 18 个省市番茄主产区来说, 小种 T1 和 T1,2 地理分布最广和发生频率最高, 分别在 13 和 11 个省市出现, 占样本总数的 28.8 %和 28.4 %; 其次是小种 T0 和 T1,2,3, 分别在 8 和 7 个省市出现, 分别占 18.8 %和 8.9 %; 再其次是小种 T1,2,3,4 在 4 个省市有发生, 占 7.0 %; 小种 T1,2,4、T1,4 和 T3 分布均少, 仅在 1~2 个省市发生, 分别占 3.0 %、2.5 %和 2.5 %。从单一省市来说, 福建省和重庆市的生理小种最多且最复杂, 有 5 个小种, 特别是具有致病力极强、能侵染所有 5 个鉴别寄主的 T1,2,3,4 小种; 贵州和广西两省也有 T1,2,3,4 小种, 青海、湖北和四川 3 省的生理小种最少且最简单, 只鉴定出 1 个小种, 分别是分化层次较低的 T0、T1 和 T1,2 生理小种; 但总的来说, 北方省份的生理小种比南方省份的分化层次低。

表 2 中国 18 省市番茄晚疫病菌生理小种的种类与地理分布

Table 2 Geographical distribution of different *Phytophthora infestans* physiologic races in eighteen provinces of China

省、市 Provinces or cities	分离物数目 No. of isolates	小种 Races (%)							
		T0	T1	T1,2	T1,2,3	T1,2,3,4	T1,4	T1,2,4	T3
内蒙 Neimeng	9	22.2	44.5	33.3					
吉林 Jilin	9	44.4	55.6						
青海 Qinghai	7	100							
陕西 Shanxi	12	25.0	25.0	25.0	25.0				
北京 Beijing	20	5.0	40.0	55.0					
河北 Hebei	16	68.8							31.2
山东 Shandong	12	66.7			33.3				
江苏 Jiangsu	10		50.0	30.0	20.0				
安徽 Anhui	8	25.0	37.5	37.5					
江西 Jiangxi	11		45.5	54.5					
福建 Fujian	16		37.5		6.3	12.5	6.2	37.5	
湖北 Hubei	9		100						
云南 Yunnan	9		55.6	44.4					
贵州 Guizhou	10				30.0	70.0			
重庆 Chongqing	16		18.8	12.5	18.7	25.0	25.0		
四川 Sichuan	7			100					
广西 Guangxi	11		9.1	81.8		9.1			
广东 Guangdong	9		11.1	66.7	22.2				
总计 Total	201	18.9	28.8	28.4	8.9	7.0	2.5	3.0	2.5

## 3 结论与讨论

3.1 台湾省的番茄晚疫病菌只有 4 个生理小种——T1,2、T1,4、T1,2,3 和 T1,2,4<sup>[6]</sup>而相比之下, 中国大陆番茄晚疫病菌生理小种种类繁多并且复杂, 共鉴定出 8 个不同的小种, 不同地区生理小种差异显著, 以小种 T1 和 T1,2 地理分布最广和发生频率最高, 其次是小种 T0 和 T1,2,3; 再其次是小种 T1,2,3,4; 小种 T1,2,4、T1,4 和 T3 分布均少; 但是北方省份的生理小种比南方省份的分化层次低。究其原因, 可能是南方比北方气候温暖, 番茄可周年种植; 而且地形复杂, 小气候多样, 所以导致病

菌的生理小种也复杂多变。

3.2 生理小种的种类划分受到鉴别寄主的种类和数量的限制, 本研究的鉴别寄主是由亚洲蔬菜研究与发展中心提供的 5 个番茄材料, 分别含有 *Ph* +、*Ph*-1、*Ph*-1, 2、*Ph*-1, 2, 3 和 *Ph*-1, 2, 3, 4 基因。如果今后发现含有 *Ph*-1, 2, 3, 4, 5 基因的番茄材料, 并用作鉴别寄主, 势必有可能鉴定出 T1, 2, 3, 4, 5 和其他一系列的相关小种。此外, 不同的鉴别寄主谱也会鉴定出不同的生理小种, 如意大利的鉴别寄主谱由 9 份马铃薯材料组成<sup>[7]</sup>, 它们是 702514、800985、800987、800989、800991、800992、800993、800995、800996, 分别含有 *r*、*R*1、*R*2、*R*4、*R*6、*R*7、*R*8、*R*10 和 *R*11 基因, 将意大利的 38 个马铃薯和番茄晚疫病病菌分离物划分成 0、4、7、8、10、11 和 1.2.4.7.8.10.11 小种。我们认为用不同番茄材料组成的鉴别寄主谱更适合于鉴定番茄晚疫病病菌的生理小种。

3.3 本试验中, 番茄晚疫病病菌生理小种分化是依据亚洲蔬菜研究与发展中心制定的方法进行的, 即由 5 个不同的番茄材料在接种不同分离物后所表现的抗、感反应来确定, 这种划分方法简单易行, 并与抗病基因直接挂钩, 使用起来简便可靠。此方法中, 每一鉴别寄主植株的病害严重度 (即本试验中单株病害等级) 基本上是根据病斑面积占测定叶片总面积的百分率来计算的, 再依据每一鉴别寄主群体的病害等级平均值划分每一鉴别寄主群体的抗性等级, 这种计算和划分方法在国内、外马铃薯晚疫病病菌生理小种鉴定和品种抗病性鉴定中也广泛应用。方中达曾指出用这种计算和划分方法测定马铃薯品种对晚疫病抗性<sup>[8]</sup>。Dowley 和 Cohen 曾分别于 1991 年和 1994 年在评估马铃薯品种的晚疫病严重度时采用晚疫病病斑占叶片面积的比例的计算方法, 并根据病害严重度划分了这些品种的抗病性, 均获得了满意的试验结果<sup>[9,10]</sup>。当然, 本试验中部分省、市的番茄晚疫病病菌纯化分离物数目较少, 在一定程度上影响了鉴定结果的代表性和准确性, 今后需要继续采样和分离纯化。

3.4 从 18 省市番茄晚疫病病菌生理小种鉴定结果来看, 福建、贵州和重庆 3 省市已出现了分化层次最高的 T1, 2, 3, 4 小种, 这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, 特别是贵州省该小种的发生频率高达 70.0%, 无疑为今后的番茄抗晚疫病育种增加了很大难度, 必须在该病的综合防治上多下功夫。虽然青海、吉林和湖北 3 省的番茄晚疫病病菌生理小种的分化层次最低, 仅为 T0 和 T1 小种, 但也不能掉以轻心, 因为附近省份已有高层次的小种, 况且现在的番茄品种交流日益频繁, 如不对引进品种严格控制和管理, 含高抗病基因的番茄品种大面积、长期种植, 就会导致高层次生理小种的出现, 晚疫病的危害就会逐年加重。再者, 抗病品种并不是一劳永逸的, 一方面良种还需要良法种植, 另一方面也不能单一种植抗病品种, 生产上必须配合种植一定面积的感病品种, 才能延长抗病品种的使用寿命。20 世纪 50~60 年代, 美国南加利福利亚州番茄晚疫病十分严重<sup>[11]</sup>, 当时主要生理小种是 T0 和 T1, 以后该州很重视栽培防病和合理利用抗病品种, 到 20 世纪末, 主流生理小种仍未发生变化<sup>[12]</sup>, 这个历史经验很值得我们学习。

## 参考文献:

- 1 Jones J B, Jones J P, Stall R E, et al. Compendium of Tomato Diseases. Minnesota: The American Phytopathological Society Press, 1997. 17~18
- 2 朱桂宁, 黄福新, 秦碧霞, 等. 致病疫霉的分离培养和单孢纯化方法. 中国蔬菜, 2003, 6: 41~42
- 3 王添成. 蔬菜抗病筛选技术. 台湾省农业试验所. 蔬菜育种技术研习会专刊, 1998. 91~96
- 4 Wang T C. Determination of physiological races. Training Workshop on Tomato Late Blight Research in China. Beijing: Institute of Vegetable and Flowers of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2003. 22
- 5 田苗英, 冯兰香, 龚会芝, 等. 番茄晚疫病病菌的分离和纯化. 植物保护, 2000, 26 (5): 36
- 6 Black L L, Wang T C. Characterization of *P. infestans*. AVRDC Reporting, 1999, 11~14
- 7 Cristinzio C, Testa A, Pugliano P. Razze di *Phytophthora infestans* presenti in Italia. Informatore Fitopatologico. 1998, 48 (9): 49~51
- 8 方中达. 植病研究方法 (第三版). 北京: 中国农业出版社, 1996. 380~381
- 9 Dowley L J, O' Sullivan E K, Kehoe H W. Development and evaluation of blight resistance in potato cultivars. In JA Lucas, RC Shattock, DS Shaw, LR Cooke, eds, *Phytophthora*. Cambridge: Cambridge University Press, 1991. 373~382
- 10 Cohen Y, Niderman T, Mösinger E, et al.  $\gamma$ -Aminobutyric acid induces the accumulation of pathogenesis-related proteins in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) plant and resistance to late blight infection caused by *Phytophthora infestans*. Plant Physiol., 1994, 104: 59~66
- 11 Shref A F, MacNab A A. Vegetable Diseases and Their Control. New York: John Wiley & Sons, 1986. 728
- 12 Vartanian V G, Endo R M. Overwintering hosts, compatibility types and races of *Phytophthora infestans* on tomato in southern California. Plant Dis., 1985, 69: 516~519