

# 海南橡胶树暹罗刺盘孢菌群体遗传结构分析

曹学仁, 车海彦, 罗大全\*

(中国热带农业科学院环境与植物保护研究所, 农业部热带作物有害生物综合治理重点实验室, 海口 571101)

**摘要** 暹罗刺盘孢菌 *Colletotrichum siamense* 是引起海南橡胶树炭疽病的重要病原之一, 为了明确海南橡胶树暹罗刺盘孢菌群体的遗传结构, 本研究对海南 5 个市(县)的橡胶树暹罗刺盘孢菌的 ITS 序列进行分析。结果表明, 58 个病菌样品可推导出 11 种单倍型, 其中单倍型 H11 包含样品数最多且在 5 个市(县)均有分布, 其次为单倍型 H4, 在 4 个市(县)有分布。遗传分化指数(*F<sub>st</sub>*)表明保亭种群与其他种群的遗传分化较大。AMOVA 分析显示, 遗传变异主要发生在种群内, 占总变异的 93.9%。对所有地理种群病原菌 ITS 序列的核苷酸不配对进行分析, 表明病菌未经历过大规模的种群扩张。系统发育分析表明, 来自相同地区的病菌单倍型并没有聚在一起。研究结果表明海南橡胶树暹罗刺盘孢菌种群具有丰富的遗传多样性。

**关键词** 橡胶树炭疽病; 暹罗刺盘孢菌; ITS 序列; 群体遗传结构

**中图分类号:** S 435.76 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2018075

## Population genetic structure of *Colletotrichum siamense* from rubber tree in Hainan Province

CAO Xueren, CHE Haiyan, LUO Daquan

(Environment and Plant Protection Institute, China Academy of Tropical Agricultural Sciences, Key Laboratory of Integrated Pest Management on Tropical Crops, Ministry of Agriculture, Haikou 571101, China)

**Abstract** *Colletotrichum siamense* is one of the main anthracnose pathogen of rubber tree in Hainan. To clarify the population genetic structure of *C. siamense* from rubber tree in Hainan Province, ITS sequences of 58 *C. siamense* strains from rubber tree in five counties were analyzed in this study. The results showed that 11 haplotypes were identified. The haplotype 11 was the most one and distributed in all sampled counties, and the next was haplotype 4 distributed in 4 of 5 sampled counties. The genetic differentiation index, *F<sub>st</sub>*, revealed significant genetic differentiation between Baoting populations and the others. AMOVA test showed that the genetic differentiation was mainly occurred within population which accounted for 93.9% of the total genetic differentiation. Mismatch distribution analysis suggested there is no population expansion for *C. siamense* from rubber tree. Phylogenetic analysis showed that the haplotypes from the same counties were not clustered together. The results showed that the natural population of *C. siamense* from rubber tree in Hainan had rich genetic diversity.

**Key words** rubber tree anthracnose; *Colletotrichum siamense*; ITS sequence; population genetic structure

天然橡胶是我国四大战略物资之一。炭疽病是橡胶树上的一种重要叶部病害, 该病于 1906 年在斯里兰卡被首次报道, 目前在亚洲和非洲等橡胶种植国广泛发生<sup>[1]</sup>。该病害早期在我国只在苗圃和新植幼树上少量发现, 自 1962 年首次在海南大丰农场开割胶树上发现后, 各植胶区陆续有其发生危害的报道<sup>[2-3]</sup>。近年来炭疽病的发生日趋严重, 是农业部橡

胶树“两病”春防工作的防治对象之一。

一直以来胶孢炭疽菌 *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. 被认为是引起我国橡胶炭疽病的病原菌<sup>[4-5]</sup>。2010 年李继锋等报道引起海南橡胶炭疽病的病原菌除胶孢炭疽菌外, 还包括尖孢炭疽菌 *C. acutatum* Simmonds<sup>[6]</sup>。随着分子系统学的发展, 发现 *C. gloeosporioides* 和 *C. acutatum* 均是复合种<sup>[7-8]</sup>。作

收稿日期: 2018-02-06

修订日期: 2018-03-01

基金项目: 中央级科研院所基本科研业务费专项(2016hzz1J039); 中国热带农业科学院基本科研业务费专项资金(1630042017003, 1630042016029)

\* 通信作者 E-mail: luodaquan@163.com

者通过研究发现,目前海南橡胶树炭疽病病原以 *C. gloeosporioides* 复合种为主<sup>[9]</sup>。通过分子系统学研究进一步表明,暹罗刺盘孢菌 *C. siamense* 是 *C. gloeosporioides* 复合种中的优势种。目前关于橡胶树炭疽菌的研究主要集中在复合种及种的鉴定方面<sup>[5-6,10]</sup>,尚未见关于其种内的遗传多样性的研究报道。因此本研究对海南省橡胶树 *C. siamense* 群体的遗传结构、群体遗传多样性及单倍型地理分布进行了研究,从而为制定可持续控制该病害策略提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品来源

2017 年 4—8 月,从海南保亭、儋州、海口、琼海和屯昌等 5 个市县的橡胶种植园中随机采集炭疽病病叶,室内进行病原菌的分离和纯化,经形态和多基因分子鉴定,确定为暹罗刺盘孢菌 *C. siamense* 的菌株 58 个,具体分布为:保亭 12 个、儋州 10 个、海口 12 个、琼海 15 个和屯昌 9 个。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 样品 DNA 提取

用灭菌的牙签将在 PDA 平板上培养 7 d 的菌丝刮下,采用 TIANGEN 新型植物基因组提取试剂盒(天根生化科技(北京)有限公司)提取病原菌 DNA,提取方法参见试剂盒说明书。

#### 1.2.2 PCR 扩增

采用真菌核糖体内转录间隔区(ITS)通用引物 ITS1 和 ITS4 扩增 ITS1、ITS2 和 5.8S rDNA 全序列及 18S rDNA 和 28S rDNA 的部分序列。PCR 反应体系(25  $\mu$ L):12.5  $\mu$ L TaKaRa Premix Taq,引物各 1  $\mu$ L(5  $\mu$ mol/L),模板 DNA 1  $\mu$ L,ddH<sub>2</sub>O 9.5  $\mu$ L。PCR 反应条件:95℃变性 4 min;95℃变性 30 s,52℃退火 30 s,72℃延伸 45 s,共 35 个循环;72℃延伸 7 min;4℃保存。

#### 1.2.3 测序

PCR 产物分别用正反向引物进行双向测序,以保证测序的准确率。测序委托北京诺赛基因组研究中心有限公司完成。

#### 1.2.4 数据分析

原始双向序列,采用 DNASTAR 中 Seqman 拼接

序列。应用 MEGA version 6.0<sup>[11]</sup> 对拼接序列进行比对分析。利用 DnaSP 5.0<sup>[12]</sup> 计算多基因片段组合序列的标准多样性指数,如单倍型数  $H$  (number of haplotypes)、单倍型多样性  $Hd$  (haplotype diversity)、核苷酸多样性  $Pi$  (nucleotide diversity),并进行 Tajima's  $D$  中性检验,以及绘制核酸错配分布图 (mismatch distribution of nucleotide) 等。使用 TCS1.21<sup>[13]</sup> 构建暹罗刺盘孢菌单倍型的网络图。采用 Arlequin 3.5.2.2<sup>[14]</sup> 软件进行分子变异分析 (analysis of molecular variance, AMOVA)。采用 MEGA 6.0 构建系统发育树,使用 Kimura 双参数模型,构建分子系统发育树 (N-J tree),利用自展法 (bootstrap, 1 000 次重复) 检验各分支的置信度。

## 2 结果与分析

### 2.1 海南橡胶树暹罗刺盘孢菌单倍型地理分布及其多样性

利用 ITS 通用引物 ITS1/ITS4 对海南 58 个橡胶树暹罗刺盘孢菌 *C. siamense* 扩增、测序、拼接和序列比对后,得到的 ITS 序列长度为 591 bp,核苷酸组成分析结果表明:碱基 A、T、G、C 的平均含量分别为 24.10%、24.24%、26.47% 和 25.2%,A+T 含量为 48.34%,G+C 含量为 51.66%。共发现多态性位点 10 个,其中简约信息位点 8 个,单碱基变异位点 2 个。58 条 ITS 序列共检测到 11 种单倍型 (haplotype, H) (表 1),其中单倍型 H11 包含样品数最多,达 16 个,且在 5 个市(县)均有分布,其次为单倍型 H4,有 12 个样品在 4 个市(县)有分布,说明各地种群间存在频繁的基因交流。从地区来看,海口单倍型最多,为 7 种;琼海最少,为 4 种;保亭、儋州和屯昌分别有 5 种、6 种和 5 种。保亭和儋州有自己独特的单倍型,其中保亭独特的单倍型有 2 种,说明各地区的病原菌存在一定的遗传分化现象。

海南橡胶树暹罗刺盘孢菌不同地理种群的单倍型多样性在 0.724~0.889 之间,其中儋州种群的单倍型多样性最高,为 0.889;琼海种群的单倍型多样性最低,为 0.724。核苷酸多样性 ( $Pi$ ) 也处于较高的水平,在 0.002 55~0.003 77 之间(表 1),结果表明,海南地区橡胶树暹罗刺盘孢菌具有丰富的遗传多样性。

表 1 海南橡胶树暹罗刺盘孢菌样品的分布及单倍型多样性

| 地区<br>Site  | 样品数<br>Number | 单倍型(数量)<br>Haplotype (Number)                                             | 单倍型多样性<br>Haplotype diversity | 核苷酸多样性<br>Nucleotide diversity |
|-------------|---------------|---------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| 保亭 Baoting  | 12            | H1(4);H3(3);H7(1);H9(1);H11(3)                                            | 0.818                         | 0.002 93                       |
| 儋州 Danzhou  | 10            | H2(3);H4(2);H5(2);H6(1);H8(1);H11(1)                                      | 0.889                         | 0.003 77                       |
| 海口 Haikou   | 12            | H1(1);H2(1);H3(1);H4(4);H6(1);H10(1);H11(3)                               | 0.864                         | 0.003 60                       |
| 琼海 Qionghai | 15            | H4(2);H5(4);H6(2);H11(7)                                                  | 0.724                         | 0.002 55                       |
| 屯昌 Tunchang | 9             | H1(1);H2(1);H4(4);H10(1);H11(2)                                           | 0.806                         | 0.003 30                       |
| 合计 Total    | 58            | H1(6);H2(5);H3(4);H4(12);H5(6);H6(4);<br>H7(1);H8(1);H9(1);H10(2);H11(16) | 0.855                         | 0.003 45                       |

2.2 单倍型网络分析及种群扩张分析

利用 TCS 软件绘制单倍型网络结构图(见图 1),可以看出病原菌发生了一定的遗传分化,各单倍型并没有依采样地点形成各自的分支,而是呈现一个非典型星状的发散图。单倍型 H11 处于辐射中心,推测为原始单倍型。此外,由核苷酸不配对分布图(图 2)可以看出,分布曲线呈双峰形式。另外 Tajima's D 中性检验结果为-0.164 55,无显著性,这些结果均表明海南橡胶树暹罗刺盘孢菌种群历史上未经历明显的扩张,其种群大小整体保持稳定。

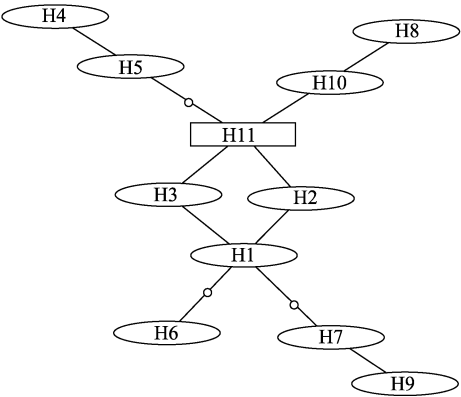


图 1 海南橡胶树暹罗刺盘孢菌单倍型网络图

Fig.1 Parsimony network of the haplotypes of *Colletotrichum siamense* from rubber tree in Hainan

2.3 遗传分化分析

58 个菌株 ITS 序列数据的 AMOVA 分析结果

表 2 海南橡胶树暹罗刺盘孢菌种群内和种群间的分子变异分析

| 变异来源<br>Source         | 自由度<br>df | 平方和<br>Sum of squares | 变异成分<br>Variance components | 总变异百分比/%<br>Percentage of variation | 统计<br>Stat | 数值<br>Value | 概率<br>Prob |
|------------------------|-----------|-----------------------|-----------------------------|-------------------------------------|------------|-------------|------------|
| 群体间 Among populations  | 4         | 2.840                 | 0.026 39 Va                 | 6.1                                 |            |             |            |
| 群体内 Within populations | 53        | 21.539                | 0.406 39 Vb                 | 93.9                                | <i>Fst</i> | 0.061       | 0.023      |
| 合计 Total               | 57        | 24.379                | 0.432 78                    |                                     |            |             |            |

表明,海南橡胶树暹罗刺盘孢菌种群变异主要发生在种群内,占总变异的 93.9%;而群体间遗传差异较小,占总变异的 6.1%,说明病菌群体间基因交流频繁。种群内的遗传分化指数(*Fst*)值为 0.061,说明海南橡胶树暹罗刺盘孢菌群体产生了遗传分化,这和单倍型的简约网络图分析结果一致。

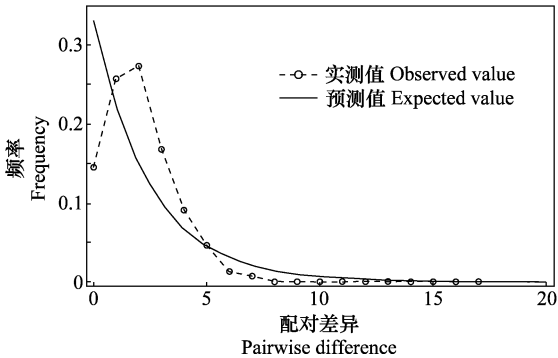


图 2 海南橡胶树暹罗刺盘孢菌群体核苷酸不配对分布  
Fig.2 Mismatch distribution of *Colletotrichum siamense* from rubber tree in Hainan

不同地理种群间的遗传分化 *Fst* 见表 3。保亭病菌样品与其他四市(县)之间的遗传分化较大,*Fst* 在 0.215 74~0.324 8 之间;琼海病菌样品与除保亭外的其他三市(县)之间的 *Fst* 都小于 0.05,说明这些群体间遗传分化很弱,基因交流十分频繁;海口与儋州、海口与屯昌之间的 *Fst* 均小于 0.1,表明这些种群间存在一定程度的遗传分化。

表 3 海南橡胶树暹罗刺盘孢菌不同地理种群间遗传分化值  
Table 3 Pairwise *Fst* value between geographical population of *Colletotrichum siamense* from rubber tree in Hainan

| 群体<br>Population | 保亭<br>Baoting | 儋州<br>Danzhou | 海口<br>Haikou | 琼海<br>Qionghai | 屯昌<br>Tunchang |
|------------------|---------------|---------------|--------------|----------------|----------------|
| 保亭<br>Baoting    | 0             |               |              |                |                |
| 儋州<br>Danzhou    | 0.260 09      | 0             |              |                |                |
| 海口<br>Haikou     | 0.215 74      | −0.064 27     | 0            |                |                |
| 琼海<br>Qionghai   | 0.324 80      | −0.042 59     | −0.035 15    | 0              |                |
| 屯昌<br>Tunchang   | 0.317 12      | −0.065 51     | −0.083 01    | −0.023 62      | 0              |

2.4 基于 ITS 序列的系统发育关系分析

系统发育分析结果表明,来自同一地区的单倍型并没有聚在一个分支内,而是分布在系统树的不同分支中,不同地区菌株的单倍型交叉共存,说明其间存在有效的基因流,没有呈现出明显的地理差异,部分地理种群虽然具有独特的单倍型,但各单倍型的差异不大。

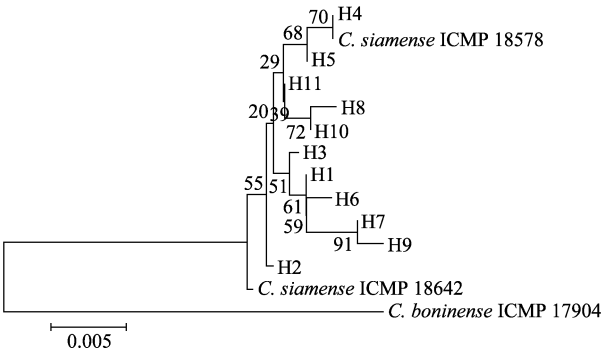


图 3 采用邻接法构建的基于 ITS 序列的海南橡胶树  
暹罗刺盘孢菌系统树

Fig. 3 Neighbour-joining tree based on ITS sequences of *Colletotrichum siamense* from rubber tree in Hainan

3 讨论

遗传多样性是评价一个物种的进化潜能和抵御自然界各种生存压力的重要遗传学指标。核糖体 DNA 内转录间隔区 ITS(internal transcribed spacer)承受的选择压力较小,进化速率快,能提供比较丰富的核苷酸变异位点和信息位点,已经证实可用于研究真菌种内遗传多样性和群体遗传结构,如李河等<sup>[15]</sup>利用 ITS 序列对引起油茶炭疽病的胶孢炭疽菌种群的遗传结构进行了研究,朱丹雪等<sup>[16]</sup>利用 ITS 序列研究了果生刺盘孢菌 *C. fruticola* 的群体遗传结构。

本研究利用 ITS 序列,分析了海南橡胶树暹罗刺盘孢菌的种群遗传结构,结果发现该病菌单倍型多样性较丰富,病菌种群历史上并没有发生显著的种群扩张,来自同一个地区病菌的单倍型未能聚在一起,这与海南省油茶及其他寄主植物果生刺盘孢菌群体和暹罗炭疽菌群体遗传结构分析的结果一致<sup>[17-18]</sup>。

11 种单倍型中,除了 3 种单倍型由于只有一个样品而仅在一个市(县)分布外,其余 8 种单倍型都在 2 个或 2 个以上市(县)有分布,说明病菌在各地种群间存在频繁的基因交流。而遗传分化指数结果说明海南橡胶树暹罗刺盘孢菌群体产生了一定的遗传分化,其中以保亭病菌样品与其他四市(县)之间的遗传分化较大,这可能与保亭位于海南省南部,有五指山山脉与其他 4 市(县)隔离,环境气候条件与其他市(县)区别较大。另外暹罗炭疽菌最早在泰国的咖啡浆果上发现<sup>[19]</sup>,随后在草莓、油茶、可可、番木瓜、辣椒、葡萄等多种寄主植物上均有发现<sup>[8]</sup>,而有研究发现不同寄主种群间的暹罗炭疽菌有一定的遗传分化<sup>[18]</sup>,而海南不同地区作物种植存在一定差异,病菌为了适应寄主而产生变异,从而导致病菌具有丰富的遗传多样性。

参考文献

[1] 蔡志英,黄贵修. 巴西橡胶树炭疽病研究进展[J]. 西南林业大学学报,2011,31(1):89-93.  
[2] 冯淑芬,刘秀娟,郑服丛,等. 橡胶树炭疽菌生物学和侵染特征研究[J]. 热带作物学报,1998,19(2):7-12.  
[3] 罗大全,郑作飞,范鸿雁,等. 海南垦区橡胶炭疽病菌对多菌灵抗性的室内测定[J]. 热带农业科学,2003,23(1):8-10.  
[4] 刘秀娟,杨业铜,冷怀琼. 我国植胶垦区橡胶树炭疽病菌的种型鉴定[J]. 热带作物学报,1987,8(1):93-101.  
[5] 崔昌华,郑肖兰,刘洪平,等. 橡胶树炭疽病菌 rDNA-ITS 序列分析[J]. 热带作物学报,2006,27(4):41-45.  
[6] 李继锋,刘先宝,蔡吉苗,等. 橡胶树炭疽病菌的鉴定及 rDNA-ITS 序列分析[J]. 中国农学通报,2010,26(12):221-226.  
[7] DAMM U, CANNON P F, WOUDEBERG J H C, et al. The *Colletotrichum acutatum* species complex [J]. Studies in Mycology, 2012, 73: 37-113.  
[8] WEIR B S, JOHNSTON P R, DAMM U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex [J]. Studies in Mycology, 2012, 73: 115-180.  
[9] CAO X R, XU X M, CHE H Y, et al. Distribution and fungicide sensitivity of *Colletotrichum* species complexes from rubber tree in Hainan, China [J]. Plant Disease, 2017, 101(10): 1774-1780.

disease of *Curcuma wenyujin* caused by *Trichoderma koningloopsis* in China [J]. Journal of Plant Pathology, 2013, 95 (4): 77.

- [11] 孙广宇, 宗兆锋. 植物病理学实验技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002: 142-144.
- [12] 谢昌平, 李博勋, 文衍堂, 等. 龙血树根腐病原菌的鉴定[J]. 植物保护, 2015, 41(1): 129-132.
- [13] 方中达. 植病研究方法[M]. 第3版. 北京: 中国农业出版社, 1998: 152.
- [14] BUTLER E J, BISBY G R. The fungi of India [M]. Calcutta: Government of India Central Publication Branch, 1931: 153.

- [15] DAMM U, WOUDEBERG J H C, CANNON P F, et al. *Colletotrichum* species with curved conidia from herbaceous hosts [J]. Fungal Diversity, 2009, 39: 45-87.
- [16] PALARPAWAR M Y, GHURDE V R. Some new hosts of *Colletotrichum curcumae* [J]. Indian Journal of Mycology and Plant Pathology, 1988, 18: 220-221.
- [17] CANNON P F, DAMM U, JOHNSTON P R, et al. *Colletotrichum*-current status and future directions [J]. Studies in Mycology, 2012, 73: 181-213.

(责任编辑: 田 喆)

(上接 73 页)

- [10] 林春花, 董琰, 刘文波, 等. 多基因序列比较分析海南橡胶树炭疽病菌遗传种群[J]. 热带作物学报, 2016, 37(5): 943-951.
- [11] TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 [J]. Molecular Biology and Evolution, 2013, 30(12): 2725-2729.
- [12] LIBRADO P, ROZAS J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data [J]. Bioinformatics, 2009, 25: 1451-1452.
- [13] CLEMENT M, POSADA D, CRANDALL K A. TCS: a computer program to estimate gene genealogies [J]. Molecular Ecology, 2000, 9: 1657-1660.
- [14] EXCOFFIER L, LISCHER H E. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows [J]. Molecular Ecology Resources,

2010, 10: 564-567.

- [15] 李河, 朱丹雪, 徐建平, 等. 引起油茶炭疽病胶孢炭疽菌种群遗传结构研究[J]. 植物病理学报, 2014, 44(6): 620-628.
- [16] 朱丹雪, 周国英, 徐建平, 等. 果生刺盘孢菌 *Colletotrichum fructicola* 群体遗传结构研究[J]. 菌物学报, 2015, 34(3): 366-374.
- [17] 李河, 李杨, 徐建平, 等. 海南省油茶及其他寄主植物果生刺盘孢菌群体遗传结构分析[J]. 林业科学, 2016, 52(10): 80-88.
- [18] 蒋仕强, 李杨, 周国英, 等. 海南4个地区暹罗炭疽菌群体遗传结构分析[J]. 热带作物学报, 2016, 37(11): 2204-2209.
- [19] PRIHASTUTI Z Y, SHIVAS R G, MCKENZIE E H C, et al. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum* [J]. Fungal Diversity, 2009, 39: 183-204.

(责任编辑: 田 喆)

## 沉痛悼念吴钜文先生

北京市农林科学院植物保护环境保护研究所研究员吴钜文先生于2018年5月29日因病在北京逝世,享年77岁。吴钜文先生出生于1940年8月19日,中共党员。1963年毕业于北京林学院(现名北京林业大学)林学系森林保护专业,在浙江省林业科学研究所工作。1979年调入北京市农林科学院植保环保所,2001年退休。曾任北京市农林科学院植物保护环境保护研究所室主任、副所长、所学术委员会主任、院学术委员会委员、院职称评审委员会委员。曾兼任北京市农业技术推广奖评委,中国植物保护学会常务理事,中国昆虫学会理事,北京昆虫学会常务理事、秘书长,中国林学会森林昆虫分会常务理事,《植物保护学报》《植物保护》《中国生物防治学报》编委,国家自然科学基金同行评议专家。退休后任中国农业科学院客座研究员。吴钜文先生长期从事森林昆虫、农业昆虫及其生物防治研究。曾主持科技部/农业部“七五”、“八五”、“九五”国家科技攻关项目专题、子专题,北京市科委重点科研项目及中试基地项目,北京市科委/农委推广项目,北京市自然科学基金重点项目,取得科研成果及获奖十余项,发表论文及译文40余篇。参加撰写的《中国农业百科全书·林业卷》获全国优秀科技图书一等奖,《中国蔬菜病虫原色图谱》获北方十省市优秀科技图书一等奖。1993年荣获国务院政府特殊津贴。曾被北京市科协评为“最佳秘书长”,1997年荣获中国科学发展基金、中国昆虫学会奖励基金首届学会工作奖一等奖。

吴钜文先生长期担任《植物保护》编委、栏目复审专家,为《植物保护》做了大量认真、细致、严谨的稿件复审工作,对本刊学术质量的提高做出了突出贡献。他还常对编辑部的工作给予指导和点拨,指出存在的问题和不足,指明努力的方向。对于编辑部工作人员也关怀备至,犹如家人。他的离去使我们痛失一位德高望重、学识渊博、学风严谨、为人正直、热心助人、无私奉献、令人尊敬的前辈、老师、慈父,使我们深感悲痛!我们将深切缅怀吴钜文先生,牢记先生的教诲,学习他严谨求实的工作态度,踏实工作,继续努力办好《植物保护》。

吴钜文先生,我们永远怀念您!

《植物保护》编辑部  
2018年6月5日