

海南橡胶树白粉菌的群体遗传结构研究

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, 农业农村部热带作物有害生物综合治理重点实验室, 海口 571101)

摘要 白粉病是海南橡胶树上发生最严重的叶部病害, 为了明确海南橡胶树白粉菌群体的遗传结构, 本研究对海南 7 个市(县)的橡胶树白粉菌的 ITS 序列进行分析。结果表明, 95 个病菌样品可推导出 5 种单倍型, 其中单倍型 H1 包含样品数为 88 个, 且在 7 个市(县)均有分布; 三亚种群的单倍型多样性和核苷酸多样性最高。总体和各地理群体的中性检验结果显示, 群体扩张遵循中性进化, 群体大小保持相对稳定。遗传分化指数(F_{st})表明三亚种群与白沙、儋州、海口和琼中等四市(县)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 89.66%。因此海南橡胶树白粉菌菌株间虽存在一定的遗传分化, 但整体遗传多样性偏低。

关键词 橡胶树白粉病; 橡胶树粉孢; 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.2018187

Population genetic structure of *Oidium heveae* from rubber tree in Hainan Province

CAO Xueren, CHE Haiyan, LUO Daquan

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

Abstract Powdery mildew, caused by *Oidium heveae*, is the most serious leaf disease of rubber tree in Hainan. To clarify the population genetic structure of *O. heveae* from rubber tree in Hainan Province, ITS sequences of 95 *O. heveae* strains from rubber tree in seven counties were analyzed in this study. The results showed that 5 haplotypes were identified. Eighty-eight strains were considered to be Haplotype 1 which was distributed in all sampled counties. Strains sampled from Sanya had the highest haplotype diversity (H_d) and nucleotide diversity (P_i). Neutrality test on all samples for each population showed that population expansion followed the neutral theory of molecular evolution and the population size remained relatively stable. The genetic differentiation index, F_{st} , revealed significant genetic differentiation between Sanya and Baisha, Danzhou, Haikou, and Qiongzong populations. AMOVA test showed that the genetic differentiation mainly occurred within populations, which accounted for 89.66% of the genetic differentiation. Therefore, genetic differentiation has taken place to some extent in *O. heveae* from Hainan, but the genetic diversity of *O. heveae* from Hainan was still not high.

Key words rubber tree powdery mildew; *Oidium heveae*; ITS sequence; population genetic structure

天然橡胶是重要的国家战略物资, 我国天然橡胶种植面积已超过 113 万 hm^2 , 其中海南和云南的种植面积占全国的 95% 以上。由专性寄生的橡胶树粉孢 *Oidium heveae* Steinm. 引起的白粉病是我国橡胶树上危害最严重的病害, 也是最受海南和云南两地胶农关注的生物灾害^[1]。病原菌只侵染橡胶树嫩叶、嫩芽、嫩梢和花序, 因此病害主要流行于橡胶

树大量抽嫩叶的春季。该病在中国于 1951 年在海南发现, 1959 年病害在海南第一次大流行, 自此以后, 每年均有发生, 而且重病年发生频率越来越高^[23]。病害发生严重时可导致产胶量减少 30%~45%^[4-6]。

由于尚未发现橡胶树白粉菌的有性世代, 所以一直认为橡胶树白粉病的病原是粉孢属的橡胶粉孢 *Oidium heveae*。但是近年来分子生物学研究结果

收稿日期: 2018-05-01 修订日期: 2018-05-16

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFD0201100); 国家自然科学基金(31701731); 中国热带农业科学院基本科研业务费专项资金(1630042017003)

* 通信作者 E-mail: luodaquan@163.com

表明,橡胶树白粉病的病原菌应该是 *Erysiphe quercicola* 的无性态^[4, 6]。目前尚未有关于橡胶树白粉菌群体遗传结构的研究报道。ITS(internal transcribed spacer)(包括 5.8S)区是介于 18S 和 26S 之间的非编码转录间隔区,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,再加上 ITS 序列片段大小适中,易于测序和分析,已应用于包括油茶胶孢炭疽菌、果生刺盘孢菌和玉蜀黍黑粉菌等植物病原菌的遗传多样性和群体遗传结构^[7-9]。本研究利用 ITS 序列作为 DNA 分子标记分析了海南不同地区橡胶树白粉菌 *O. heveae* 的遗传多样性和群体遗传结构,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

2018 年 2—3 月,从海南橡胶种植园中随机采集白粉病病叶,室内进行单病斑分离纯化后,接种到‘热研 7-33-97’品种的古铜期叶片上扩繁,共得到 95 个白粉菌菌株,具体为:海口 16 个、琼海 8 个、三亚 11 个、乐东 15 个、白沙 14 个、琼中 15 个和儋州 16 个。

1.2 白粉菌 DNA 提取

收集扩繁后的白粉菌菌株的孢子粉,按照 Fungal DNA Kit(购于 Omega 公司)的 DNA 提取步骤进行,提取后的 DNA 置于 4℃ 冰箱中备用。

1.3 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 μ L):12.5 μ L TaKaRa Premix Taq,引物各 1 μ L(5 μ mol/L),模板 DNA 1 μ L,ddH₂O 9.5 μ 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。

1.4 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。

1.5 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^[10]对拼接序列进行比对分析。利用 DnaSP 5.0^[11]计算多基因片段组合序列

的标准多样性指数,如单倍体数 H (number of haplotypes)、单倍体多样性 Hd (Haplotype diversity)、核苷酸多样性 Pi (nucleotide diversity),并进行中性进化检测,计算 Tajima's D 、Fu's $\&$ Li's D 和 Fu's $\&$ Li's F 。等。采用软件 Arlequin 3.5.2.2^[12]进行分子变异分析(analysis of molecular variance, AMOVA)。采用 MEGA 6.0 使用 Kimura 双参数模型计算群体间的 Nei's 遗传距离,并根据群体间的 Nei's 遗传距离采用非加权平均组法(UPGMA)构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 单倍型和遗传多态性分析

利用 ITS 通用引物 ITS1/ITS4 对海南 95 个橡胶树白粉病菌扩增、测序、拼接和序列比对后,得到目的序列长度大小为 659 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 22.2%、24.0%、27.4%和 26.4%,A+T 含量为 46.2%,G+C 含量为 53.8%。共发现多态性位点 4 个,其中简约信息位点 2 个,单碱基变异位点 2 个。单倍型分析结果表明,供试 95 个菌株共有 5 种单倍型,其中单倍型 H1 有 88 株,占供试菌株的 92%以上,说明各地理种群间存在频繁的基因交流。从地区来看,白沙、儋州、海口和琼中均只有 1 种单倍型,而琼海有 2 种,乐东和三亚分别有 3 种和 4 种,且琼海和三亚有自己独特的单倍型,说明病原菌存在一定的遗传分化现象。

供试白粉菌菌株的单倍型多样性为 0.142,核苷酸多样性为 0.000 31,从不同地区来看,以三亚种群的单倍型多样性和核苷酸多样性最高,分别为 0.6 和 0.001 44,其他县市的单倍体多样性和核苷酸多样性较低,分别小于 0.26 和 0.000 6,表明各地区白粉菌遗传多样性较低。

2.2 中性进化检测

由于白沙、儋州、海口和琼中均只有 1 种单倍型,所以利用 DnaSP 5.10 对仅乐东、琼海和三亚及海南省的橡胶树白粉菌菌株的 ITS 基因序列进行中性检测(见表 2)。结果表明,95 个样品整体及各种群的参数 Tajima's D 、Fu's $\&$ Li's D 和 Fu's $\&$ Li's F 均为负值,表明存在大量的低频等位基因位点,可能是由于负向作用或群体扩张存在瓶颈效应,但都不显著偏离零,说明橡胶树白粉菌的 ITS 序列在进化上遵循中性进化模型。

表 1 海南橡胶树白粉菌不同种群的遗传多样性指数

Table 1 Genetic diversity indexes of different geographical populations of *Oidium heveae* from rubber tree in Hainan

地区 Site	样品数/个 Sample number	多态位点 Polymorphic sites	单倍型数 No. of haplotypes	单倍型多样性(<i>Hd</i>) Haplotype diversity	核苷酸多样性(<i>Pi</i>) Nucleotide diversity	核苷酸平均差异数(<i>k</i>) Average number of nucleotide difference
乐东 Ledong	15	2	3	0.257	0.000 58	0.381
琼海 Qionghai	8	1	2	0.250	0.000 38	0.250
三亚 Sanya	11	3	4	0.600	0.001 44	0.945
白沙 Baisha	14	0	0	0	0	0
儋州 Danzhou	16	0	0	0	0	0
海口 Haikou	16	0	0	0	0	0
琼中 Qiongzong	15	0	0	0	0	0
总体 Total	95	4	5	0.142	0.000 31	0.205

表 2 海南橡胶树白粉菌不同种群的中性检验

Table 2 Neutrality test of different geographical populations of *Oidium heveae* from rubber tree in Hainan

地区 Site	Tajima's <i>D</i>	显著性 Statistical significance	Fu's & Li's <i>D</i>	显著性 Statistical significance	Fu's & Li's <i>F</i>	显著性 Statistical significance
乐东 Ledong	-1.001 61	$P > 0.10$	-0.476 19	$P > 0.10$	-0.697 21	$P > 0.10$
琼海 Qionghai	-1.054 82	$P > 0.10$	-1.126 39	$P > 0.10$	-1.203 53	$P > 0.10$
三亚 Sanya	-0.263 31	$P > 0.10$	0.126 72	$P > 0.10$	0.033 85	$P > 0.10$
总体 Total	-1.475 93	$P > 0.10$	-1.451 68	$P > 0.10$	-1.715 46	$P > 0.10$

2.3 群体遗传结构

95 个白粉菌菌株 ITS 序列数据的 AMOVA 分析结果表明(表 3),海南橡胶树白粉菌种群变异主要发生在种群内,占总变异的 89.66%;而群体间遗传差异较小,占总变异的 10.34%,说明病菌群体间基因交流频繁。95 个菌株间的遗传分化指数(*Fst*)值为 0.103 37,说明海南橡胶树白粉菌群体产生了一定的遗传分化。

不同地理种群间的遗传分化 *Fst* 见表 4。三亚种群与白沙、儋州、海口和琼中等四市(县)之间的遗传分化较大,*Fst* 大于 0.21;琼海种群与白沙、儋州、海口和琼中等四市(县)之间的 *Fst* 均大于 0.05 小于 0.1,表明这些种群间存在一定程度的遗传分化;乐东与白沙、儋州、海口和琼中等四市(县)之间以及白沙、儋州、海口和琼中四市(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。

表 3 海南橡胶树白粉菌种群内和种群间的分子变异分析

Table 3 AMOVA analysis of genetic variation within and among populations of *Oidium heveae* from rubber tree in Hainan

变异来源 Source	自由度 <i>df</i>	平方和 Sum of squares	变异成分 Variance components	总变异百分比/% Percentage of variation	统计 Stat	数值 Value	概率 Probability
群体间 Among populations	6	0.988	0.007 44 Va	10.34			
群体内 Within populations	88	5.675	0.064 49 Vb	89.66	<i>Fst</i>	0.10	0.004
合计 Total	94	6.663	0.071 92				

表 4 海南橡胶树白粉菌不同地理种群间遗传分化值(对角线下方)和遗传距离(对角线上方)¹⁾

Table 4 Pairwise *Fst* values (below diagonal) and genetic distances (upper diagonal) between geographical populations of *Oidium heveae* from rubber tree in Hainan

群体 Population	白沙 Baisha	儋州 Danzhou	海口 Haikou	乐东 Ledong	琼海 Qionghai	琼中 Qiongzong	三亚 Sanya
白沙 Baisha	—	0	0	0.000 3	0.000 2	0	0.00 08
儋州 Danzhou	0	—	0	0.000 3	0.000 2	0	0.000 8
海口 Haikou	0	0	—	0.000 3	0.000 2	0	0.000 8
乐东 Ledong	0.030 02	0.041 07	0.041 07	—	0.000 5	0.000 3	0.001 0
琼海 Qionghai	0.074 38	0.093 12	0.093 12	-0.049 96	—	0.000 2	0.001 0
琼中 Qiongzong	0	0	0	0.035 71	0.083 97	—	0.000 8
三亚 Sanya	0.210 93 *	0.232 *	0.232 *	0.014 93	0.025 37	0.221 7 *	—

1) * 表示在 $P < 0.05$ 水平差异显著。
* indicates significant difference at $P < 0.05$ level (AMOVA test).

2.4 群体间的亲缘关系及聚类分析

采用 MEGA 6.0 计算了 7 个群体间的 Nei's 遗传距离(表 4),并基于该遗传距离采用 UPGMA 方法构建了系统树(图 1),结果发现海口、琼中、儋州和白沙种群由于均只存在同一种单倍型,首先聚在一起,随后与琼海种群聚为一支,再与乐东群体聚为一支,最后与三亚群体聚为一支;表明三亚群体与其他群体的亲缘关系最远,其次为乐东。

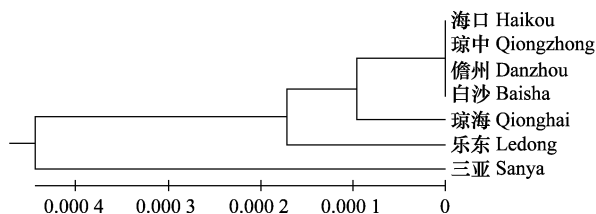


图 1 海南橡胶树白粉病菌不同地理种群的 UPGMA 系统树

Fig. 1 UPGMA tree of different geographical populations of *Oidium heveae* from rubber tree in Hainan

3 结论与讨论

遗传多样性是生物多样性的基础,一个物种的多样性越高,其在复杂的自然环境中生存的几率越高,对不同生存环境的适应力也越强。研究病菌遗传结构可为弄清病菌对不同环境、寄主的适应能力提供理论基础。本研究利用 ITS 序列对海南 7 个市县的橡胶树白粉菌群体进行遗传结构分析。结果表明,海南橡胶树白粉菌菌株间虽存在一定的遗传分化,但整体遗传多样性偏低,各地理种群间存在频繁的基因交流。分析原因有两方面,一是橡胶树白粉菌为气传性病害,可随风在各地区间传播;二是橡胶树作为一种高大乔木,寿命长,从种植-投产-更新至少需要 40 年左右,不易更新换代^[13],导致海南橡胶树栽培品种单一。据不完全统计,2006 年“RRIM600”和“PR107”两个品种占海南垦区总开割橡胶树株数的 92.2%^[14]。加上迄今还未选出一个能在生产上大规模推广的抗病品系^[5],生产上种植的都是感病品系。这些导致橡胶树白粉菌在各地区间交流频繁,寄主对病原菌的选择压力小。

本研究中,单倍型 H1 在每个群体中均有分布,共 88 个样品,占总样品数量的 92%。说明橡胶树白粉菌具有长距离传递基因流的潜力,病菌在不同地区间扩散的无性繁殖方式导致每个群体中存在相同的基因型,这与病原菌随气流传播和尚未发现橡胶树白粉菌有性时期是一致的。

从不同地区来看,三亚和乐东的单倍型分别有 4 种和 3 种,除琼海有 2 种单倍型外,海口、白沙、琼

中和儋州均只有 1 种单倍型,聚类分析结果也表明三亚群体与其他群体的亲缘关系最远,其次为乐东,这可能是由于三亚和乐东位于海南五指山南部且相邻,冬春气温相对较高,是海南每年春季橡胶树最先抽叶的地方,也是每年春季橡胶树白粉病最先开始发生和流行的地方。

本研究首次采用 ITS 标记研究了海南橡胶树白粉菌的遗传多样性和种群的遗传分化情况,获得了多态性位点和相关遗传学数据信息。下一步研究中,还需要增加其他省份的病样,配合其他类型分子标记,研究橡胶树白粉菌群体的遗传变异动态。

参考文献

- [1] 何长辉,刘锐金. 橡胶主产区自然灾害情况及农户应对措施——基于云南、海南入户调查数据的分析[J]. 热带农业科学, 2015, 35(5): 82-87.
- [2] 海南农垦科技编委会. 海南农垦橡胶树病虫害防治五十年[J]. 海南农垦科技, 2005, 17(2): 34-45.
- [3] 曹学仁,车海彦,杨毅,等. ENSO 事件与海南农垦橡胶白粉病发生流行的关系[J]. 植物保护, 2015, 41(6): 122-125.
- [4] LE T T T, DUNG P N, LIEM N V. First report of powdery mildew caused by *Erysiphe quercicola* on Mandarin in Viet Nam [J]. Plant Disease, 2016, 100(6): 1239.
- [5] LIYANAGE K K, KHAN S, MORTIMER P E, et al. Powdery mildew disease of rubber tree [J]. Forest Pathology, 2016, 46(2): 90-103.
- [6] LIYANAGE K K, KHAN S, BROOKS S, et al. Taxonomic revision and phylogenetic analyses of rubber powdery mildew fungi [J]. Microbial Pathogenesis, 2017, 105: 185-195.
- [7] 李河,朱丹雪,徐建平,等. 引起油茶炭疽病炭疽菌种群遗传结构研究[J]. 植物病理学报, 2014, 44(6): 620-628.
- [8] 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.
- [9] 李超,金海伦,高利,等. 2016 年北京地区玉蜀黍黑粉菌遗传多样性分析[J]. 植物病理学报, 2018, 48(5): 632-639.
- [10] 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.
- [11] LIBRADO P, ROZAS J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data [J]. Bioinformatics, 2009, 25: 1451-1452.
- [12] 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.
- [13] 位明明,李维国,黄华孙,等. 中国天然橡胶主产区橡胶树品种区域配置建议[J]. 热带作物学报, 2016, 37(8): 1634-1643.
- [14] 祁栋灵,王秀全,黄月球,等. 我国橡胶产业升级与关键技术调研报告——橡胶树品种选育及推广选用的几点思考与建议[J]. 中国农业科技导报, 2010, 12(2): 69-75.

(责任编辑: 田 喆)