

浙皖鄂地区水稻纹枯病菌 5 个种群的遗传结构分析

王 玲¹, 黄雯雯^{1,2}, 黄世文^{1,2,*}, 刘连盟¹, 刘恩勇^{1,2}

(1. 中国水稻研究所, 杭州 310006; 2. 广西大学农学院, 南宁 530003)

摘要: 水稻纹枯病是世界性的主要病害之一。目前对该病病原菌种群的遗传多样性研究不多, 知之甚少, 了解其种群的遗传结构可以增加对其进化历程的了解, 以制定科学的防治策略。水稻纹枯病菌通常被认为是以无性克隆繁殖为主, 但有研究报道它具有混合繁殖方式。有关我国浙皖鄂地区水稻纹枯病菌种群的遗传多样性研究尚未见报道。为了解该地区水稻纹枯病菌种群的遗传变异、基因流、繁育方式及其遗传背景, 采用 ITS-5.8S rDNA 测序技术, 分析了分离自浙江富阳(FY)、安徽绩溪(JX)和巢湖(CH)以及湖北荆州(JZ)和孝感(XG)的 5 个水稻纹枯病菌种群 75 个菌株的遗传多样性。*Rhizoctonia solani* AG-1 IA 是采集地区水稻纹枯病菌的优势类群。ITS-5.8S rDNA 序列经测定共检测到 78 个多态位点, 碱基 A、T、C、G 的平均含量分别为 25.4%、33.6%、21.0% 和 20.0%。序列的平均转换与颠换比(Ti/Tv)为 1.65, 其中密码子第 3 位点的变异最高。根据序列的核苷酸变异共定义了 29 种单倍型, 其中单倍型 H5 为 5 个种群的共享单倍型, 占样本数的 61.33%。5 个种群的单倍型多样性和核苷酸多样性分别为 0.627 和 0.482%, 显示水稻纹枯病菌种群具有较高的遗传多样性。种群间固定化指数 Fst 为 -0.0253—0.0170, 基因流 Nm 为 5.56—11.12, 说明种群间基因交流频繁, 基因流抑制了由遗传漂变引起的遗传分化, 菌丝或菌核短距离扩散和带菌种子远距离传播增加了种群间的基因交流。AMOVA 分析显示, 种群间的遗传变异仅占总变异的 19.03%, 而 80.97% 的变异存在于种群内部, 种群间的遗传分化很低。Mantel 检验发现, 遗传距离与地理距离无显著相关性($r = -0.241$, $P = 0.499$)。采用 UPGMA 法构建的单倍型间的系统发育树表明, 不同地点的单倍型分支混合分布, 这进一步验证了 Mantel 检验的结果。单倍型的网状分析显示, 水稻纹枯病菌种群曾经发生过种群暴发而不断扩散, 因还未能获得足够的时间建立更加复杂的结构故而呈非典型“星状”。采用中性检验分析了水稻纹枯病菌种群遗传结构, 结果表明, 种群间存在很强的自然选择作用, 群体符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡, 说明水稻纹枯病菌群体是一个随机交配群体, 具有以担孢子进行有性繁殖和以菌丝或菌核进行无性繁殖的混合繁殖方式。这种生物学特性可能是导致其在较小生态范围内较高的遗传多样性水平和较低的种群遗传分化的原因。另外, 水稻纹枯病菌经有性繁殖产生新的基因型, 并通过无性繁殖在群体内固定繁殖, 这种遗传模式极有可能导致其进化潜能提高, 极易对杀菌剂产生抗性。因此, 对水稻纹枯病菌的防治, 除了施用化学药剂和种植抗性品种外, 还需要防治农田灌水引起的病原菌(菌丝和菌核)在地区间的流动传播, 减少带菌种子迁移或农用机械的交叉污染, 对水稻、大豆和玉米等寄主作物的种子进行播前处理等等, 这些对于水稻纹枯病菌的防治也是极为重要的。

关键词: 水稻纹枯病菌; ITS-5.8S rDNA 序列; 单倍型; 种群遗传分化; 遗传多样性

Genetic structure of five populations of the rice sheath blight pathogen *Rhizoctonia solani* AG-1 IA from provinces of Zhejiang, Anhui and Hubei

WANG Ling¹, HUANG Wenwen^{1,2}, HUANG Shiwen^{1,2,*}, LIU Lianmeng¹, LIU Enyong^{1,2}

1 China National Rice Research Institute, Hangzhou 310006, China

2 Agricultural College, Guangxi University, Nanning 530003, China

Abstract: Rice sheath blight (RSB) is one of the most devastating rice diseases on a global basis. Genetic diversity of RSB pathogen population is poorly understood. Studying on the genetic structure of the population will help to understand the evolution of the pathogen, and to design better strategies to control the disease. In general, the RSB pathogen is thought to be an asexual fungus, though a mixed reproductive mode has been reported. No information is available about the genetic

基金项目: 农业行业专项资助项目(nhyzx07-049); 中央级公益性科研院所专项资金项目(2009RC004-4); 浙江省三农五方科技协助项目(SN200711)

收稿日期: 2009-09-22; 修订日期: 2010-02-03

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: swhuang666@sohu.com

diversity and population structure of the fungus in provinces of Zhejiang, Anhui and Hubei. To reveal the genetic variation, gene flow, reproductive mode and genetic background of the RSB pathogen in these areas, ITS-5.8S rDNA sequencing approach was used to analysis seventy five isolates from the infected samples collected from Fu Yang (FY) in Zhejiang Province, Ji Xi (JX) and Chao Hu (CH) in Anhui Province, as well as Jing Zhou (JZ) and Xiao Gan (XG) in Hubei Province. The dominant pathogen of RSB in these areas was *Rhizoctonia solani* anastomosis group AG-1 IA. Seventy eight variable sites were detected from ITS-5.8S rDNA sequences of these seventy five isolates, the content of A, T, C and G nucleotides were 25.4%, 33.6%, 21.0% and 20.0%, respectively. The transition/transversion (Ti/Tv) ratio was 1.65 and the highest variation position was in the third-codon. Twenty nine haplotypes were identified based on nucleotide variation, and haplotype 5 (H5) was appeared on all 5 area populations with the highest frequency of 61.33%. A high genetic diversity was observed among populations with 0.627 for haplotype diversity and 0.482% for nucleotide diversity. The fixation index (Fst) and gene flow parameter (Nm) among populations were -0.0253 to 0.0170 and 5.56 to 11.12, respectively, indicating that the gene flow were frequent among populations and overcome the impact of genetic drift. Short-distance dispersal of asexual propagules (mycelium or sclerotia), and long-distance dispersal via contaminated seeds may enhance the gene flow. Analysis of molecular variance (AMOVA) revealed that only 19.03% of genetic variation occurred among populations whereas 80.97% existed within populations, suggesting a very low genetic differentiation among populations. Mantel test showed that no significant correlation was found between genetic distance and geographic distance ($r = -0.241, P = 0.499$). Phylogenetic tree of haplotypes constructed by UPGMA methods exhibited highly mixed branches among different areas, which was consistent with the results of Mantel test. A "star like" pattern of interrelationship of haplotypes from *R. solani* AG-1 IA was found by network analysis, suggesting a bread out of population during its evolution, because of insufficient time for the pathogen to form a more complicated population structure. Neutral test for genetic structure showed that the populations were in Hardy-Weinberg (HW) equilibrium suggesting a high natural selection existed in the populations. These results also showed that a mixed reproductive mode, including asexual and sexual reproduction in the populations of *R. solani*. The characteristics could explain why a high genetic diversity and low genetic differentiation existed among populations in small areas. Pathogen with a mixed reproductive mode would accelerate its evolution, because more new geotypes could be generated by recombination and kept through asexual reproduction, which would cause high risk of fungicides resistance. Therefore, the disease control measures will include reducing the spread of fungal mycelia and sclerotia via shared irrigation systems or contaminated seed to minimize the gene flow, pretreating the seeds, as well as fungicide and resistance varieties application.

Key Words: *Rhizoctonia solani* AG-1 IA; ITS-5.8S rDNA sequence; haplotype; population genetic differentiation; genetic diversity

水稻纹枯病是世界性的水稻三大病害之一,在各水稻种植国家普遍发生,一般造成水稻减产10%—30%,严重时可达50%^[1]。水稻纹枯病的病原菌为立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*),其有性态为瓜亡革菌(*Thanatephorus cucumeris*)。该菌寄主范围广泛,水稻、玉米、大豆、花生和高粱等都是*R. solani*的寄主,导致其病原基数不断积累。根据菌丝融合与否,*R. solani*可划分为14个菌丝融合群(AG-1—AG-13,AG-BI)^[2-3]。根据培养性状、寄主以及生理生化等特性又可分为不同的亚群,其中融合群AG-1可划分为AG-1 IA、AG-1 IB、AG-1 IC三个亚群^[4],AG-1 IA亚群是水稻纹枯病的优势致病菌群^[5]。

了解水稻纹枯病菌种群的遗传多样性,对于更好地理解病害的发生和流行以及进一步制定防治水稻纹枯病的策略具有重要的意义。然而,目前大多数水稻纹枯病菌遗传多样性研究都是在个体水平,少数研究者使用RFLP^[6-7]、SSR^[8]、测序技术^[9]等进行了种群水平上的遗传研究,国内尚未有对其种群遗传多样性及其遗传变异特征进行研究的报道。ITS序列是核糖体rDNA转录间隔区,由于承受的选择压力小、进化速率快,具有

较大的变异性,已成为较好的种群遗传多样性的研究手段^[10]。根据ITS-5.8S rDNA序列的差异推导群体中在同一染色体上等位基因相互连锁并以一个单位共同遗传的基因单位,即单倍型,评价水稻纹枯病菌种群的遗传多样性的研究甚少。Ciampi等^[9]用ITS-5.8S rDNA测序技术,在20个水稻纹枯病菌中只定义了1种单倍型,在32个大豆纹枯病菌中定义了6种单倍型,认为水稻纹枯病菌为无性繁殖,而玉米纹枯病菌以有性繁殖为主。而Roseish等^[6]、Linde等^[7]和Bernardes等^[8]分别采用RFLP和SSR分子标记进行的研究均表明,水稻纹枯病菌具有克隆生长和有性繁殖两种繁殖方式。基于此,本研究对浙皖鄂3省5个不同生境采集、分离的75个水稻纹枯病菌的ITS-5.8S rDNA序列进行分析,旨在揭示该地区其种群的遗传结构和遗传多样性水平,并探讨其遗传变异的繁殖方式,为制定防治策略和措施提供必要的理论指导。

1 材料与方法

1.1 水稻纹枯病菌的分离与纯化

于2007—2008年选择安徽绩溪(JX)、安徽巢湖(CH)、湖北荆州(JZ)、湖北孝感(XG)和浙江富阳(FY)分别采集典型的水稻纹枯病症状的病株样本,样本间的取样距离至少保持在300m以上,每个取样群体随机采集15个病样,各个种群采集的地理位置见图1。参照水琼脂分离法^[11]对病样进行组织分离,待病原物的菌丝从病组织上长出1cm时,挑取单枝尖端菌丝进行观察,通过菌丝生长、分枝、分隔及菌核产生情况,筛选分离物,对获得的水稻纹枯病菌进行纯化培养,保存备用。

1.2 水稻纹枯病菌菌丝融合群的判定

菌丝融合群判定所用的标准菌株由华南农业大学资源环境学院周而勋教授提供,包括分别隶属于AG-1 IA、AG-1 IB、AG-1 IC、AG-2-1、AG-2 IIIB、AG-3、AG-4、AG-5、AG-6、AG-8、AG-9 S21和AG-BI菌丝融合群的12个标准菌株。采用载玻片定位融合法^[12],并参照改进的玻片配对法^[13],将鉴定的水稻纹枯病菌分别与各菌丝融合群的标准菌株配对,保湿培养,待两菌落前缘菌丝在玻片中央相遇并开始交叉重叠时,镜检菌丝间有无相互融合的现象。根据有无菌丝融合并参照判定标准^[12-13],判定各菌株的菌丝融合群类型。

1.3 水稻纹枯病菌ITS-5.8S rDNA序列的扩增和测序

采用改良的CTAB法^[3]抽提水稻纹枯病菌的基因组总DNA。用于PCR扩增ITS-5.8S rDNA序列的特异引物为:ITS1(5'-TCCGTAGGTAAACCTGGCG-3')和ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')^[14]。扩增产物经电泳检测后,回收、纯化PCR产物,与pMD18-T Vector载体连接,转化大肠菌感受态细胞DH5 α ,筛选阳性克隆,送交上海生物工程有限公司进行序列测定,通过DNAMAN软件(Lynnon Biosoft)处理测得的序列。

1.4 数据分析

序列的对位排列使用Clustal-X软件^[15]辅以手工校正,删除引物序列。采用MEGA4软件^[16]分析核苷酸组成、计算转换/颠换值(transition/transversion, T_i/T_v)及Kimura双参数遗传距离(Kimura 2-parameter distance, K2-P),并根据Nei's遗传距离用非加权组平均法(unweighted pair-group method using arithmetic average, UPGMA)构建系统发育树,以AG-1 IB序列(GenBank登录号GQ118250)为外群,Kimura双参数法为替代模型,系统树分支的置信度采用自展法(bootstrap analysis, BP)重复检测1000次。用DnaSP 4.10软件^[17]统计ITS-5.8S rDNA序列的单倍型、单倍型多样度(haplotype diversity, H_d)、核苷酸多样性(nucleotide diversity, P_i)、群体间固定化指数(fixation index, F_{st})和基因交流值(gene flow, N_m)。根据ITS-5.8S rDNA序列的单倍型频率和核苷酸差异,基于Median-Joining法^[18]用Network 4.5.1.0软件(Fluxus Technology Ltd)建立单倍型的网状亲缘关系图。为了解种群是否符合Hardy-Weinberg(H-W)平衡定律,进行Tajima式 D ^[19]和

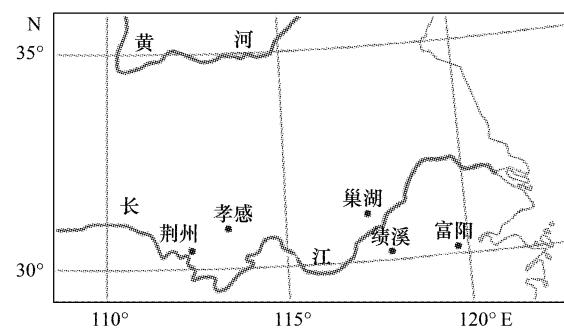


图1 水稻纹枯病感病样品采集的地理位置图

Fig. 1 A map showing the geographic locations of sheath-blight-infected samples collected

Fu 和 Li 式 $D^{[20]}$ 检验中性假说是否成立, 如中性检验为负值并且显著偏离中性进化的歧义度, 则可能是由于种群扩张引起的。用 Arlequin Ver 3.01 软件^[21]的分子方差分析(Analysis of molecular variance, AMOVA)方法, 以 1000 次重复随机抽样单倍型重排后进行 F 显著性检验^[22], 用于估计种群内和种群间的遗传变异。采用 Mantel test 模型^[23]进行种群间的遗传距离与地理距离相关性的显著性分析。

2 结果与分析

2.1 水稻纹枯病菌的分离和菌丝融合群的判定

5 个不同生境(JX、CH、JZ、XG 和 FY)采集的水稻纹枯病样品, 经分离、纯化得到 75 个水稻纹枯病菌菌株。所有的菌株与隶属于融合群 *R. solani* AG-1 IA 的标准菌株接触后, 均表现为完全融合, 且接触点附近的菌丝细胞无任何异常反应, 菌丝的细胞壁和质膜在接触点完全溶解, 原生质相互交流。说明 75 个水稻纹枯病菌均属于 *R. solani* AG-1 IA 融合群类型, *R. solani* AG-1 IA 是水稻纹枯病致病菌的优势类群。

2.2 水稻纹枯病菌种群 ITS-5.8S rDNA 序列多态性和单倍型多样性

经测序得到 75 个水稻纹枯病菌的 ITS-5.8S rDNA 核苷酸序列, GenBank 登录号为 GQ118174—GQ118248。对所有序列进行核苷酸组成分析, 碱基 A、T、C、G 的平均含量分别为 25.4%、33.6%、21.0% 和 20.0%, A+T 含量为 59.0%, G+C 含量为 41.0%, 富含碱基 A+T, 表现出一定的碱基偏倚性。序列的平均转换与颠换(Ti/Tv)比值为 1.65, 密码子第一、第二、第三位点的 Ti/Tv 值分别为 1.41、1.03、1.73, 显示第三位点的变异最高。ITS-5.8S rDNA 序列共有 78 个变异位点, 推导出 29 种独立单倍型, 以单倍型 H1 为标准进行比对, 得到该段序列的碱基变异位点图(图 2)。每个种群分别有 4—9 种单倍型, 大多数为各种群独有, 共享单倍型只有 H5 和 H14。其中 H5 在 5 个种群中均有分布, 占样本总数的 61.33%, 如 CH 种群内有 9 个样本共享单倍型 H5; JX 和 FY 种群存在 2 个样本共享 1 种单倍型 H14; 其余单倍型均为各种群特有, 只在 1 个样本中出现(表 1)。

表 1 水稻纹枯病菌各种群 ITS-5.8S rDNA 序列的单倍型分布

Table 1 Haplotype distributions of ITS-5.8S rDNA sequences in each population of *R. solani* AG-1 IA

种群 Population	GenBank 登录号 GenBank accession No.	单倍型数 Number of haplotype	单倍型 Haplotype
绩溪 JX	GQ118174—GQ118188	8	H1, H5(8)*, H11, H12, H14, H24, H28, H29
巢湖 CH	GQ118234—GQ118248	7	H2, H5(9)*, H6, H7, H9, H17, H26
荆州 JZ	GQ118189—GQ118203	4	H5(12)*, H8, H10, H15
孝感 XG	GQ118204—GQ118218	6	H5(10)*, H16, H18, H19, H20, H22
富阳 FY	GQ118219—GQ118233	9	H3, H4, H5(7)*, H13, H14, H21, H23, H25, H27

H 表示单倍型, 带星号的括号内数字表示某群体中出现同一单倍型的样本数

2.3 水稻纹枯病菌种群的遗传结构分析

5 个种群内的单倍型多样性(Hd)和核苷酸多样性(Pi)分别为 0.371—0.800 和 0.149%—1.231%, 平均值为 0.627 和 0.482%。其中 FY 种群的单倍型多样性最高, 为 0.800。CH 种群的核苷酸多样性最高, 为 $Pi = 1.231\%$ (表 2)。将所有的个体作为一个整体进行分析, 结果显示, 中性检验值均为负值(Tajima's

表 2 水稻纹枯病菌种群内的遗传多样性

Table 2 Genetic diversity within populations of *R. solani* AG-1 IA

种群 Population	单倍型多样性 Haplotype diversity (Hd)	核苷酸多样性/% Nucleotide diversity (Pi)	Tajima 式 D 检验 Tajima's D test	Fu 和 Li 式 D 检验 Fu and Li's D test
绩溪 JX	0.657	0.234	-1.897*	-2.456*
巢湖 CH	0.733	1.231	-2.343*	-3.111*
荆州 JZ	0.371	0.149	-1.549	-1.309
孝感 XG	0.571	0.155	-2.040*	-2.694*
富阳 FY	0.800	0.642	-2.379*	-3.278
合计 Total	0.627	0.482	-2.766*	-5.449*

* 表示中性检验显著偏离中性假说($P < 0.05$)

图2 水稻纹枯病菌种群的ITS-5.8S rDNA序列变异位点的比较

Fig. 2 Comparison of variable sites of ITS-5.8S rDNA sequences in populations of *R. solani* AG-1 IA

图上的数字由上至下为碱基变异位点在所测序列中的位置

$D = -2.766$ 和 Fu 和 Li's $D = -5.449$), 显著偏离中性突变-遗传漂变平衡, 表明这水稻纹枯病菌在历史上出现过种群扩张, 种群间存在很强的自然选择作用, 群体呈现 H-W 平衡, 说明水稻纹枯病菌群体是一个随机交配群体。

种群间的 F_{ST} 值较小 (-0.0253 — -0.0170) , Nm 较大 (5.56 — 11.12) , 这表明各种群间存在较高水平的基因流动。其中 CH 与 FY 种群间的 Nm 最高、 F_{ST} 值最低, 显示 CH 和 FY 种群间基因交流最频繁 (表 3)。AMOVA 分析表明, 种群间和种群内的遗传变异均达到极显著水平 ($P < 0.001$), 在总的遗传变异中, 80.97%

的变异发生群体内,而种群间的变异仅占 19.03%,显示大部分遗传变异存在于种群内(表 4)。

表 3 水稻纹枯病菌种群间的固定化指数(对角线以下)与基因交流值(对角线以上)

Table 3 F_{st} (below diagonal) and Nm (above diagonal) between populations of *R. solani* AG-1 IA

固定化指数 F_{st}	基因交流值 Nm				
	绩溪 JX	巢湖 CH	荆州 JZ	孝感 XG	富阳 FY
绩溪 JX	-	6.01	9.70	5.56	5.76
巢湖 CH	0.0108	-	6.46	6.34	11.12
荆州 JZ	-0.0189	0.0056	-	5.85	6.48
孝感 XG	0.0170	0.0069	0.0130	-	7.00
富阳 FY	0.0141	-0.0253	0.0053	0.0000	-

表 4 水稻纹枯病菌种群的遗传变异的分子方差分析

Table 4 AMOVA analysis of genetic variation in populations of *R. solani* AG-1 IA

变异来源 Source of variation	自由度 Df	离差平方和 Sum of squares deviations	方差分量 Variance component	方差分量比率/% Percentage of total variation	P
种群间 Among populations	4	26.813	0.3481	19.03	<0.001
种群内 Within populations	70	103.667	1.4810	80.97	<0.001
总计 Total	74	130.480	1.8291	100	

2.4 水稻纹枯病菌种群间的遗传分化与地理距离的关系

种群间的遗传距离为 0.0016—0.0093,对种群间的遗传距离与相对应的地理距离进行 Mantel 显著性检验,结果表明,群体间的地理距离和遗传距离间不存在显著相关性($r = -0.241, P = 0.499$),暗示水稻纹枯病菌种群的遗传分化不符合距离隔离模式(表 5)。

表 5 水稻纹枯病菌种群间的遗传距离(对角线以下)和地理距离(km,对角线以上)

Table 5 Genetic distance (below diagonal) and geographical distance (in kilometers, above diagonal) between populations of *R. solani* AG-1 IA

种群 Population	绩溪 JX	巢湖 CH	荆州 JZ	孝感 XG	富阳 FY
绩溪 JX	-	175.07	622.32	485.85	132.79
巢湖 CH	0.0075	-	530.70	389.76	273.00
荆州 JZ	0.0019	0.0070	-	141.05	754.80
孝感 XG	0.0020	0.0071	0.0016	-	617.62
富阳 FY	0.0044	0.0093	0.0040	0.0040	-

2.5 水稻纹枯病菌种群 ITS-5.8S rDNA 序列单倍型的系统发育

水稻纹枯病菌 ITS-5.8S rDNA 序列单倍型的系统发育树表明,29 个单倍型可以分为 2 个支系,除 H29 外,其它单倍型聚为一类。没有一个来自同一种群的全部单倍型能组成单系群。不同地点的单倍型分支混合分布,显示其间存在有效基因流(图 3)。单倍型的网状亲缘关系表明单倍型的分支式样呈现一个非典型“星状”发散图。所有的单倍型拥有一个共享的中心单倍型(H5)并聚成分支。绝大多数单倍型仅以 1 至 4 步突变与 H5 直接相连,而单倍型 H14、H24、H25、H27、H28 和 H29 例外,它们通过较多突变与 H5 连接,在位置上显得孤立(图 4)。暗示水稻纹枯病菌种群曾经发生过种群扩张或者起源于较小的奠基种群,从起源地向其它地区的扩张过程中,不同环境条件下的种群受到了不同程度的选择作用,种群因为还未能获得足够的时间建立更加复杂的结构故而呈非典型“星状”。

3 讨论

3.1 浙皖鄂地区水稻纹枯病菌种群的遗传多样性

遗传多样性是评价一个物种的进化潜能和抵制自然界各种生存压力的重要遗传学指标。一个物种的遗

传多样性愈丰富,对环境变化的适应性就愈大。衡量遗传多样性的重要指标有单倍型多样性(*Hd*)和核苷酸多样性(*Pi*)。Ciampi等^[9]用ITS-5.8S rDNA序列分析了巴西和其它7个国家的大豆和水稻纹枯病菌种群的遗传多样性,结果表明,巴西大豆纹枯病菌种群ITS-5.8S rDNA序列的*Hd*和*Pi*分别为0.827和0.917%,其它国家大豆纹枯病菌种群的*Hd*和*Pi*分别为0.431和0.270%;而在20个水稻纹枯病菌中仅发现一种单倍型。本研究中浙皖鄂地区水稻纹枯病菌种群ITS-5.8S rDNA序列*Hd*和*Pi*分别为0.627和0.482%,显示其具有较高的遗传多样性,这与Rosewich等^[6]、Linde等^[7]和Bernardes-de-Assis等^[8]研究结果一致。与Ciampi等^[9]的差异可能是由于采样地点和样本量的不同造成的,如浙皖鄂平原山地丘陵相间的多样化的生境环境为遗传多样性的形成提供了有利条件。此外,水稻纹枯病菌种群遗传多样性高也与种群历史有关,反映了水稻纹枯病菌在瓶颈效应后经历了种群的迅速扩张,扩张后的种群通过变异积累了高的*Hd*和*Pi*。水稻纹枯病菌遗传多样性处于较高的水平,说明其对环境变化的潜在适应能力强,容易扩展其分布范围,揭示了水稻纹枯病发生面积广和危害程度重的遗传基础。

3.2 浙皖鄂地区水稻纹枯病菌种群的遗传结构

遗传分化的程度是衡量种群遗传结构的主要指标,而基因流的作用则是减少种群间的遗传分化^[24]。Wright^[25]认为种群间基因流大于4,则能发挥均质化作用,有效抑制由遗传漂变引起的遗传分化。本研究表明,种群间的基因交流值均大于4,抵制了遗传漂变的作用,减少了种群间的遗传分化,使得大部分遗传变异存在于种群内。种群间基因交流频繁,维持遗传变异的能力强,产生新的遗传变异的机会也多,这有利于增加遗传多样性,并使之保持较高的水平。种群间基因流很大推测可能与水稻纹枯病菌具有较强的扩散能力有关,但不同种群在遗传上并不是均一的,种群间的基因流可能还受到诸如地理分布、生活史特征、迁移个体与地方个体杂交的可能性等因素的影响。

3.3 浙皖鄂地区水稻纹枯病菌种群的地理分布对遗传结构的影响

简单的地理距离隔离模式并不能解释浙皖鄂地区水稻纹枯病菌的遗传结构特征,因为不同种群间的遗传差异大小与地理距离没有显著的相关性,表现出地理的“随机效应”。一般而言,在生态区大环境条件下,种群遗传分化有一定的趋同性和“地理亲缘性”。但也不排除在较小的地理范围内,如浙皖鄂地区,光照、温度、降水等生态因子没有大的变化,自然选择的压力相对一致,使得某些优势类型(基因型)固定、繁殖。而稻田灌溉水又源于同一长江水系,也可能容易发生基因相互渗透,在遗传结构上表现出地理的“随机性”。由于种群遗传多样性的地理差异与种群的地理生态环境、空间分布大小、取样的数量、分子标记种类以及衡量遗传多样性所使用参数等有关,所以,评价水稻纹枯病菌种群遗传分化是否与地理有相关性还需要在一个相当大的空间范围内尽可能使用多的种群数量和使用多态性适合度高的分子标记。此外,本研究结果也说明了浙皖鄂地区水稻纹枯病菌的遗传分化还应受到除地理因素之外的其它因素的影响。

3.4 浙皖鄂地区水稻纹枯病菌种群遗传分化的繁殖方式

繁育系统是影响种群遗传分化的重要因素。水稻纹枯病菌无性世代的菌丝和菌核作为遗传分化的一个重要载体,其有效扩散对种群的扩张、遗传多样性以及遗传结构的形成具有重要影响。除雨水传播菌丝和菌

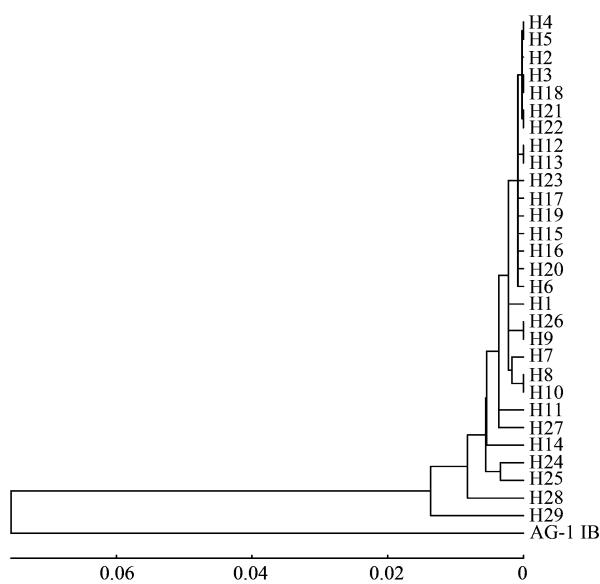


图3 水稻纹枯病菌种群ITS-5.8S rDNA序列单倍型的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of haplotypes of ITS-5.8S rDNA sequences in populations of *R. solani* AG-1 IA

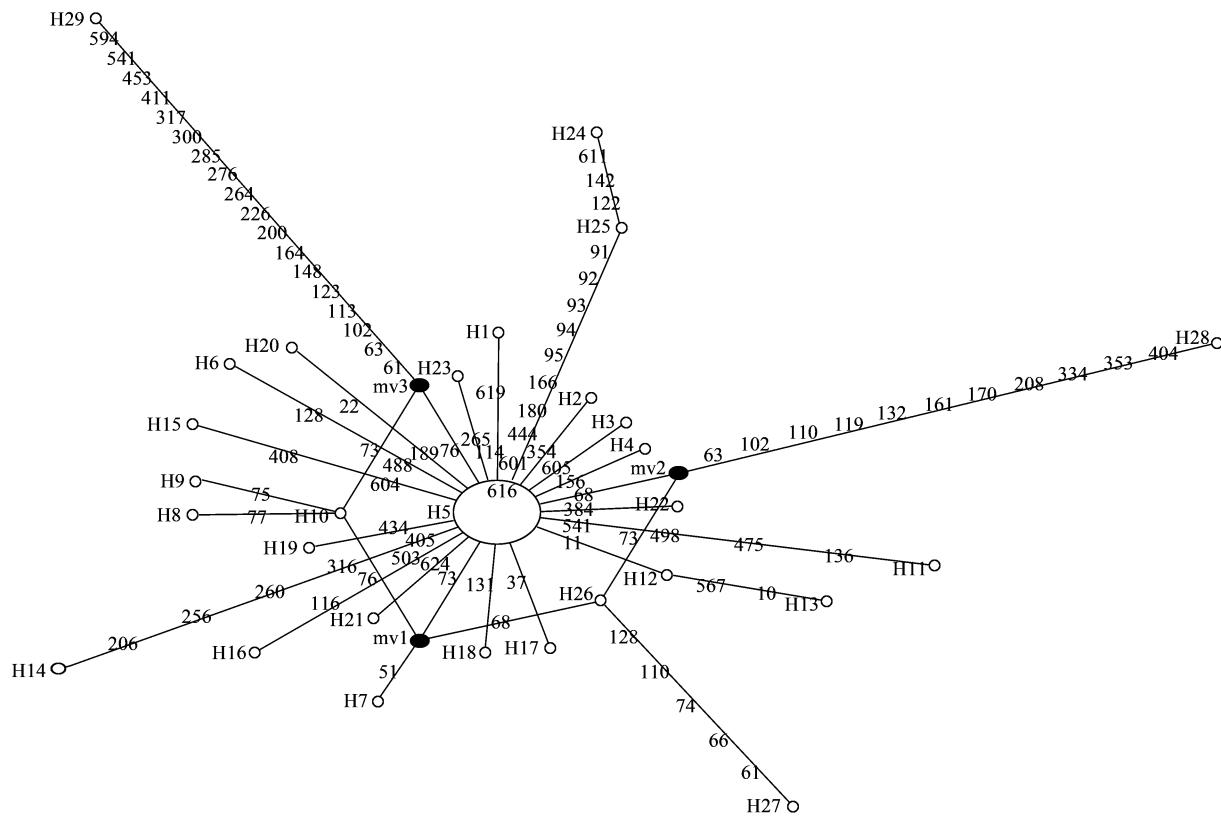


图4 水稻纹枯病菌种群 ITS-5.8S rDNA 序列单倍型的网状亲缘关系图

Fig. 4 Networks relating haplotypes of ITS-5.8S rDNA sequences in populations of *R. solani* AG-1 IA

圆圈表示单倍型, 分支上的数值表示核苷酸突变位点, 圆圈大小表示单倍型的频率, 黑点表示单倍型间的中间向量

核外, 人为活动干扰以及种子捕食者也导致了菌源在地区间迁移, 进一步促进了菌丝和菌核传播的频率及范围, 加剧了水稻纹枯病菌在地区间的基因交流。此外, 水稻纹枯病菌有性世代担孢子的运动也是遗传变异形成的一个重要原因^[6-9], 通过有性重组可以快速形成新的基因型, 进一步提高病原菌群体适应环境改变的能力。但是在自然条件下很难产生担孢子, 仅在玉米和大豆上观测到担孢子^[26]。

本研究中单倍型 H5 在每个群体中均有分布, 这与 Rosewich 等^[6] 和 Pascual 等^[11] 分别在水稻纹枯病菌和玉米纹枯病菌不同种群间发现相同的基因型的结果一致。说明了水稻纹枯病菌具有长距离传递基因流的潜力, 病原体(菌丝和菌核)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, 且克隆生长有利于基因型在种群内维持。然而, 浙皖鄂地区水稻纹枯病菌种群符合自然选择的 H-W 遗传平衡, 显示水稻纹枯病菌也具有有性繁殖方式。有性繁殖维持了种群较高的遗传多样性水平和对变化环境适应能力, 促进种群间基因交流使得群体均质化, 减少了群体间的遗传分化。本研究说明水稻纹枯病菌具有混合繁殖策略, 以菌丝或菌核进行的无性繁殖和以担孢子进行的有性繁殖, 这与前人的研究结果一致^[6-9]。

但是, 根据 McDonald 等^[27-28] 的病害风险评估理论, 水稻纹枯病菌的有性和无性混合繁殖的遗传模式极有可能导致其进化潜能提高, 抵制自然界各种生存压力的能力增强, 防治更加困难。因此, 对水稻纹枯病菌的防治, 除了施用化学药剂和选育抗性品种外, 还需要阻止农田灌溉水引起的菌源(菌丝和菌核)在地区间的流动, 减少人为活动引起的种子或病株带菌迁移或农用机械的交叉污染, 对水稻、大豆和玉米等寄主作物的种子进行播前处理等等, 这些对于水稻纹枯病菌的防治也是极为重要的。

References:

- [1] Jia Y, Correa-Victoria F, McClung A, Zhu L, Liu G, Wamishe Y. Rapid determination of rice cultivar responses to the sheath blight pathogen

- Rhizoctonia solani* using a micro-chamber screening method. *Plant Disease*, 2007, 91(5): 485-489.
- [2] Carling D E, Baird R E, Gitaitis R D, Brainard K A, Kuninaga S. Characterization of AG-13 a newly reported anastomosis group of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*, 2002, 92(8): 893-899.
- [3] Carling D E, Kuninaga S, Brainard K A. Hyphal anastomosis reactions rDNA-internal transcribed spacer sequences, and virulence levels among subsets of *Rhizoctonia solani* anastomosis group-2 (AG-2) and AG-Bl. *Phytopathology*, 2002, 92(1): 43-50.
- [4] Banniza S, Rutherford M A. Diversity of isolates of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA and their relationship to other anastomosis groups based on pecticzymograms and molecular analysis. *Mycological Research*, 2001, 105(1): 33-40.
- [5] Pascual C B, Hyakumachi M. Distribution of vegetatively compatible populations of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA in a field planted with different host species. *Journal of General Plant Pathology*, 2000, 66(3): 206-209.
- [6] Rosewich U L, Pettway R E, McDonald B A, Kistler H C. High levels of gene flow and heterozygote excess characterize *Rhizoctonia solani* AG-1 IA (*Thanatephorus cucumeris*) from Texas. *Fungal Genetics and Biology*, 1999, 28(3): 148-159.
- [7] Linde C C, Zala M, Paulraj R S D, McDonald B A, Gnanamanickam S S. Population structure of the rice sheath blight pathogen *Rhizoctonia solani* AG-1 IA from India. *European Journal of Plant Pathology*, 2005, 112(2): 113-121.
- [8] Bernardes-de-Assis J, Storari M, Zala M, Wang W, Jiang D, Shidong L, Jin M, McDonald B A, Ceresini P C. Genetic structure of populations of the rice-infecting pathogen *Rhizoctonia solani* AG-1 IA from China. *Phytopathology*, 2009, 99(9): 1090-1099.
- [9] Giampi M B, Kuramae E E, Fenille R C, Meyer M C, Souza N L, Ceresini P C. Intraspecific evolution of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA associated with soybean and rice in Brazil based on polymorphisms at the ITS-5.8S rDNA operon. *European Journal of Plant Pathology*, 2005, 113(2): 183-196.
- [10] Xu J P. Fundamentals of fungal molecular population genetic analyses. *Current Issues in Molecular Biology*, 2006, 8(2): 75-90.
- [11] Pascual C B, Toda T, Raymondo A D, Hyakumachi M. Characterization by conventional techniques and PCR of *Rhizoctonia solani* isolates causing banded leaf sheath blight in maize. *Plant Pathology*, 2000, 49(1): 108-118.
- [12] Parmeter J R, Sherwood R T, Paltt W D. Anastomosis grouping among isolates of *Thanatephorus cucumeris*. *Phytopathology*, 1969, 59(9): 1270-1278.
- [13] Chen Y X, Zhang D H, Duan X Y, Lu S Y. Study on the anastomosis group classification of *Rhizoctonia solani* and teleomorphs. *Acta Phytopathologica Sinica*, 1985, 15(3): 139-143.
- [14] White T J, Bruns T, Lee S, Taylor J W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics // Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J J, White T J. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Application*. New York: Academic Press, 1990: 315-322.
- [15] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins D G. The Clustal-X windows interface: Flexible strategies for multiple sequences alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(24): 4876-4882.
- [16] Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24(8): 1596-1599.
- [17] Rozas J, Sanchez-Delbarrio J C, Meseguer X, Rozas R. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, 2003, 19(18): 2496-2497.
- [18] Bandelt H J, Forster P, Rohl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 1999, 16(1): 37-38.
- [19] Tajima F. The effect of change in population size on DNA polymorphism. *Genetics*, 1989, 123(3): 597-601.
- [20] Fu Y X, Li W H. Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics*, 1993, 133(3): 693-709.
- [21] Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin ver 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 2005, 1: 47-50.
- [22] Nei M. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Annals of Human Genetics*, 1977, 41(2): 225-233.
- [23] Mantel N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, 1967, 27(2): 209-220.
- [24] Lenormand T, Guillemaud T, Bourguet D, Raymond M. Evaluating gene flow using selected markers: a case study. *Genetics*, 1998, 149(3): 1383-1392.
- [25] Wright S. Evolution in Mendelian population. *Genetics*, 1931, 16(2): 91-159.
- [26] Giampi M B, Meyer M C, Costa M J N, Zala M, McDonald B A, Ceresini P C. Genetic structure of population of *Rhizoctonia solani* anastomosis group-1 IA from soybean in Brazil. *Phytopathology*, 2008, 98(8): 932-941.
- [27] McDonald B A, Linde C. The population genetics of plant pathogens and breeding strategies for durable resistance. *Euphytica*, 2002, 124(2): 163-180.
- [28] McDonald B A, Linde C. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 2002, 40: 349-379.

参考文献:

- [13] 陈延熙, 张敦华, 段霞渝, 鲁素芸. 关于 *Rhizoctonia solani* 菌丝融合分类和有性世代的研究. *植物病理学报*, 1985, 15(3): 139-143.