基于SSR序列的江西省不同生态地区稻瘟病菌遗传多样性分析

兰 波[1,2] 孙 强[3] 杨迎青[2] 李湘民[2*] 霍光华[1*]

（1. 江西农业大学，菌物资源保护与利用江西省重点实验室，南昌 330045；2. 江西省农业科学院植物保护研究所，南昌 330200；3. 黄岛海关，山东 青岛 266555）

摘要：为明确江西省稻瘟病菌*Magnaporthe oryzae*群体遗传结构及其多样性水平，选用13对SSR引物对分离自5个不同生态地理县(市)水稻穗颈瘟标样的稻瘟病菌单孢菌株的全基因组进行PCR扩增，利用最长距离法和POPGENE 32生物学软件对其进行聚类分析和群体遗传多样性分析。结果显示，共分离获得189株稻瘟病菌菌株，13对SSR引物对其均能扩增出1条大小相同且清晰的条带，多态性位点百分率高达100.00%。供试189株稻瘟病菌菌株在相似系数为0.74时可划分为15个遗传宗谱，其中宗谱JXL01包含71株菌株，占总菌株数的37.57%，为优势宗谱；宗谱JXL02、JXL14为亚优势宗谱，分别包含31、26株菌株，占总菌株数的16.40%和13.76%；宗谱JXL03、JXL08、JXL10为次要宗谱，包含10~17株菌株；其它9个宗谱为小宗谱，包含菌株都在5株以下。在群体水平上，来源于不同生态型地区的5个稻瘟病菌群体的Nei's基因多样性指数为0.375，Shannon信息指数为0.558，具有丰富的遗传多样性，且群体间差异较大；这5个种群基于非加权配对平均法大多聚为一类，种群遗传谱系与地理区域分布呈一定相关性，群体遗传多样性均值为0.373，存在一定的遗传分化，且群体内多样性大于群体间多样性，总遗传变异的64.56%存在于群体内。表明江西省稻瘟病菌群体结构既包含明显的优势宗谱，又存在复杂多变的特异性小宗谱，遗传多样性丰富，且与地理分布有一定的相关性。

关键词：稻瘟病菌；遗传多样性；SSR标记；遗传分化

Genetic diversity analysis of rice blast fungus in different ecological regions of Jiangxi Province in China based on SSR

LAN Bo[1,2] SUN Qiang[3] YANG Yingqing[2] LI Xiangmin[2*] HUO Guanghua[1*]

（1. Jiangxi Key Laboratory for Conservation and Utilization of Fungal Resources, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, Jiangxi Province, China; 2. Institute of Plant Protection, Jiangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanchang 330200, Jiangxi Province, China; 3. Huangdao Customs House, Qingdao 266555, Shandong Province, China）

Abstract: In order to clarify the genetic structure and diversity level of *Magnaporthe oryzae* populations in Jiangxi Province, 13 pairs of SSR primers were used to cluster analysis and population genetic diversity analysis of *M. oryzae* from five different ecological counties (cities) based on complete linkage method by biological software of POPGEN 32. The results showed that total 189 strains were separated, the specific products could be amplified clearly with all primer pairs, and the polymorphic loci was 100.00%. The 189 tested strains were divided into 15 genetic lineages at a similarity coefficient of 0.74. Among them, JXL01 was the dominant lineages, which contained 71 strains, accounting for 37.57% of the total strains. JXL02 and JXL14 were sub-dominant lineages containing 31 and 26 strains with the percentage

基金项目：国家重点研发计划(2016YFD0200808)，江西省水稻产业技术体系(JXARS-02-04)，江西省现代农业协同创新项目(JXXTCX2019-01)

* 通信作者（Authors for correspondence），E-mail：xmli1025@aliyun.com，hgh3828079@sohu.com

收稿日期：2019-06-19

of 16.40% and 13.76% respectively. JXL03, JXL08 and JXL10 were secondary lineages, containing the strain from ten to 17. The other nine lineages were minor lineages and contained fewer than five strains. At the group level, the Nei's genetic diversity index and Shannon's information index of five populations were 0.375 and 0.558, which indicated the existence of rich genetic diversity in *M. oryzae* populations from different geographic regions. Most populations from the above five regions were clustered into one group, which meant that the genetic lineages of the populations from different areas were related to their geographic distributions. And meanwhile, certain genetic differentiation existed in the same *M. oryzae* population (total heterozygosit was 0.373). The genetic diversity of within-population was higher than that of among-population, and 64.56% of the total heritable variation in within-population. Overall, populations of *M. oryzae* in Jiangxi Province were rich in genetic diversity with both dominant and variable minor lineage, and it exists in certain correlation with geographical distribution.

Key words: *Magnaporthe oryzae*; genetic diversity; SSR primer; genetic differentiation

由真菌稻梨孢*Magnaporthe oryzae*引起的稻瘟病是一种世界性水稻病害，在整个生育期都可造成危害，已成为制约水稻高产、稳产的主要因素（Saleh et al.，2014）。该病害的危害程度与水稻品种、栽培技术及环境条件等因素相关，流行年份一般减产10%~20%，重者减产达40%~50%，甚至颗粒无收（兰波等，2014）。江西省属于长江中下游双季稻区，稻瘟病在两季水稻中都有发生，但在早稻生产中的发生尤为严重，且该地区多样性的地理环境和气候条件有利于稻瘟病的发生流行，在江西省丘陵山区和环湖稻区稻瘟病的发生率极高。因此，加强对江西省稻瘟病的田间监测，掌握稻瘟病菌群体遗传结构及规律对于稻瘟病的防治具有重要意义（肖丹凤等，2013）。

目前，化学防治与抗病品种的利用是防治稻瘟病的主要措施。化学防治对稻瘟病的发生和流行具有良好的防治效果，但化学农药的过度使用给自然环境和人类健康带来了巨大危害（陈银凤等，2017），因此，抗病品种的培育是当前防治稻瘟病最经济有效的方法（Silue et al.，1992；韩艺娟和鲁国东，2018）。目前，水稻中已被鉴定或克隆的抗稻瘟病基因已超过80个（华丽霞等，2016）。但由于稻瘟病菌生理小种具有复杂性以及易变异的特点，其毒性基因在短时间内就克服了水稻的抗性基因，导致新培育出的抗病品种在推广3~5年后逐渐丧失抗性（Khang et al.，2008；Huang et al.，2014）。因此，要培育具有持久抗性的新品种，就需加强对水稻与稻瘟病菌生理小种互作调控机制的研究，全面准确掌握各地区稻瘟病菌群体结构的组成及生理小种的变化规律（肖丹凤等，2013；姚琳等，2014）。

通过接种鉴别品种测定菌株的致病型是研究稻瘟病菌群体结构的传统方法。该方法在抗病育种上具有一定的应用价值，但由于易受环境或其它因素的影响，其结果难以准确反映稻瘟病菌菌株内在的变异性（Chen et al.，1995；雷财林等，2002）。20世纪80年代以来，随着DNA指纹分析技术不断涌现，已能在DNA水平上检测稻瘟病菌的遗传变异。其中，简单重复序列（simple sequence repeat，SSR）是由至少5次重复以上的1~6个碱基对组成，在一些原核和真核生物的基因组序列中广泛分布，对于基因及基因组的遗传变异具有重要作用，因而被广泛应用于真菌基因定位及群体遗传多样性等研究领域中（Karaoglu et al.，2005；Labbé et al.，2011；穆慧敏等，2013）。如周瑚等（2018）利用14对SSR引物对湖南省桃江病圃的92株稻瘟病菌单孢菌株进行遗传多样性分析，结果显示该地区稻瘟病菌遗传差异较大，遗传结构复杂；冯彦霞等（2013）采用8对多态性较好的SSR标记对我国黄淮麦区的116株小麦全蚀病菌*Gaeumannomyces graminis*菌株进行分析，发现小麦全蚀病菌群体间和群体内均存在着一定的遗传分化，且病菌群体结构与其地理来源有一定的关系。本研究拟采用童新建等（2012）筛选的13对SSR引物对采集自江西省5个不同生态型稻区的稻瘟病菌进行PCR检测，分析其群体遗传结构，探索该地区稻瘟病菌群体的遗传多样性、群体间的亲缘关系以及群体间的遗传分化关系，初步掌握江西省稻瘟病菌群体的变化规律，以期为当地水稻品种的合理布局与延长水稻抗病品种的使用寿命提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株：于江西省都昌县、丰城市、井冈山市、万安县和婺源县5个不同生态地理型稻区水稻感病品种上采集穗颈瘟标样269份，其中都昌县59份，丰城市47份，井冈山市64份，万安县43份，婺源县56份。

培养基：马铃薯葡萄糖琼脂（potato dextrose agar，PDA）培养基：马铃薯200 g、葡萄糖20 g、琼脂15 g、蒸馏水1 L；PD液体培养基：PDA培养基中不加琼脂；稻节保存培养基：剪取当年晒干的2 cm长水稻秸秆颈节部10~15个，清水浸泡6 h洗净后置于15 mm×100 mm玻璃试管中，棉塞封口，121℃湿热灭菌20 min。

试剂及仪器：DNA提取试剂盒、植物基因组提取试剂盒，天根生化科技（北京）有限公司；dNTP、*Taq* DNA聚合酶、10×Buffer（含Mg^{2+}），日本TaKaRa公司；其余试剂均为国产分析纯。PGX-320A-3恒温光照培养箱，宁波莱福科技有限公司；IX53型光学显微镜，日本Olympus公司；Centrifuge 5418低温离心机，德国Eppendorf公司；T100普通PCR仪、Universal Hood II凝胶成像系统，美国Bio-Rad公司；JY600电泳仪，北京君意东方电泳设备有限公司。

1.2 方法

1.2.1 稻瘟病菌的分离与培养

取采集的269份稻瘟病标样，分别剪成寸许并浸水18~24 h，待充分吸水后，用清水冲洗2~3次，再用灭菌水冲洗1次，放入垫以U形玻璃棒的保湿培养皿中，置于28℃恒温培养箱内暗培养2 d，待观察到标样上有灰色或灰绿色的孢子后，于显微镜下用简易挑孢针挑取单个孢子，置于PDA斜面培养基中，于28℃暗培养7 d获得纯培养物。将纯培养物转接到稻节保存培养基中，于28℃暗培养7 d，常温干燥后于4℃保存，备用。

1.2.2 稻瘟病菌的SSR标记分析

将1.2.1分离保存的稻瘟病菌菌株活化后，分别挑取适量菌丝接入PD液体培养基中，于120 r/min、28℃条件下摇培3~6 d，待菌丝体生长至一定量后用灭菌纱布过滤收集、烘干并于−20℃保存备用。将收集的菌丝体分装于2 mL Eppendorf管中，加2颗直径5 mm的灭菌碳钢珠后迅速加入65℃预热的CTAB提取液，磨样后利用植物基因组提取试剂盒参照说明书对供试稻瘟病菌基因组DNA进行提取，将提取的DNA于−20℃保存备用。选择童新建等（2012）报道的13对SSR引物KMS02、KMS20、SMS17、A5、D4、D5、G5、FG01、FG02、FG03、MS355、MS363、MS677对供试稻瘟病菌基因组DNA进行PCR扩增，引物均由北京奥科鼎盛生物科技有限公司合成（表1）。20 μL反应体系：DNA模板1 μL（≤200 ng）、0.2~0.4 μmol/L正反向引物各1 μL、2.5 mmol/L dNTP 0.5 μL、*Taq* DNA聚合酶0.2 μL、10×Buffer（含Mg^{2+}）2 μL、ddH_2O 14.3 μL。反应程序：95℃预变性5 min；94℃变性30 s，55~57℃（按引物各自退火温度）退火1 min，72℃延伸60~90 s（根据片段大小而定），35个循环；72℃再延伸10 min。获得的PCR产物于4℃保存，经1%琼脂糖凝胶电泳检测，在凝胶成像系统紫外灯下显示特异性条带并拍照保存。

1.2.3 稻瘟病菌群体的遗传结构分析

根据1.2.2扩增结果，有扩增条带的菌株记为1，无扩增条带的菌株记为0，构建供试稻瘟病菌菌株基于SSR引物扩增结果的0-1数据库；应用NTSYS-PC 2.1数据处理系统（Nei & Li，1979）计算遗传距离，用最长距离法对13对引物的扩增结果进行聚类，通过聚类分析可以将菌株归类成密切相关程度不同的组，每1个组称为1个遗传宗谱，根据聚类结果对稻瘟病菌群体的遗传结构进行分析（卢代华等，2005）。

表1 不同SSR引物对189株稻瘟病菌单孢菌株的PCR扩增结果

Table 1 The amplified results of different SSR primers among 189 isolates of *Magnaporthe oryzae*

SSR引物 SSR primer	浓度/（μmol/L） Concentration	退火温度/℃ Annealing temperature	延伸时间/s Extension time	预期片段大小/bp Expected size	扩增条带数 No. of bands	扩增效率/% Amplification efficiency
KMS02	0.4	55	90	350	152	80.84
KMS20	0.2	57	60	250	112	59.26
SMS17	0.4	55	90	350	144	76.19
A5	0.2	56	60	250	53	28.04
D4	0.4	55	75	300	135	71.43
D5	0.4	55	90	350	121	64.02
G5	0.4	55	75	300	185	92.59
FG01	0.2	55	60	250	146	77.25
FG02	0.4	55	75	300	61	32.28
FG03	0.2	55	60	250	84	44.44
MS355	0.2	56	60	250	167	88.36
MS363	0.2	56	60	250	116	61.38
MS677	0.2	56	60	250	148	78.31

1.2.4　稻瘟病菌群体的遗传多样性分析

基于SSR特异性扩增结果，分析江西省5个不同生态型稻区稻瘟病菌的群体遗传多样性。通过POPGENE 32软件计算等位基因观察数*Na*、有效等位基因数*Ne*、Nei's基因多样性指数*H*、Shannon信息指数*I*、多态性位点数*NP*、多态性位点百分率*P*、群体遗传多样性H_t、群体内遗传多样性H_s、群体间遗传多样性D_{st}、遗传分化系数G_{st}、基因流N_m等群体遗传多样性参数。根据江西省5个稻瘟病菌群体的Nei's遗传距离，利用MEGA 7.0软件以非加权配对平均（unweighted pair group method with arithmatic mean，UPGMA）法构建系统树，分析5个稻瘟病菌群体间的遗传分化关系。

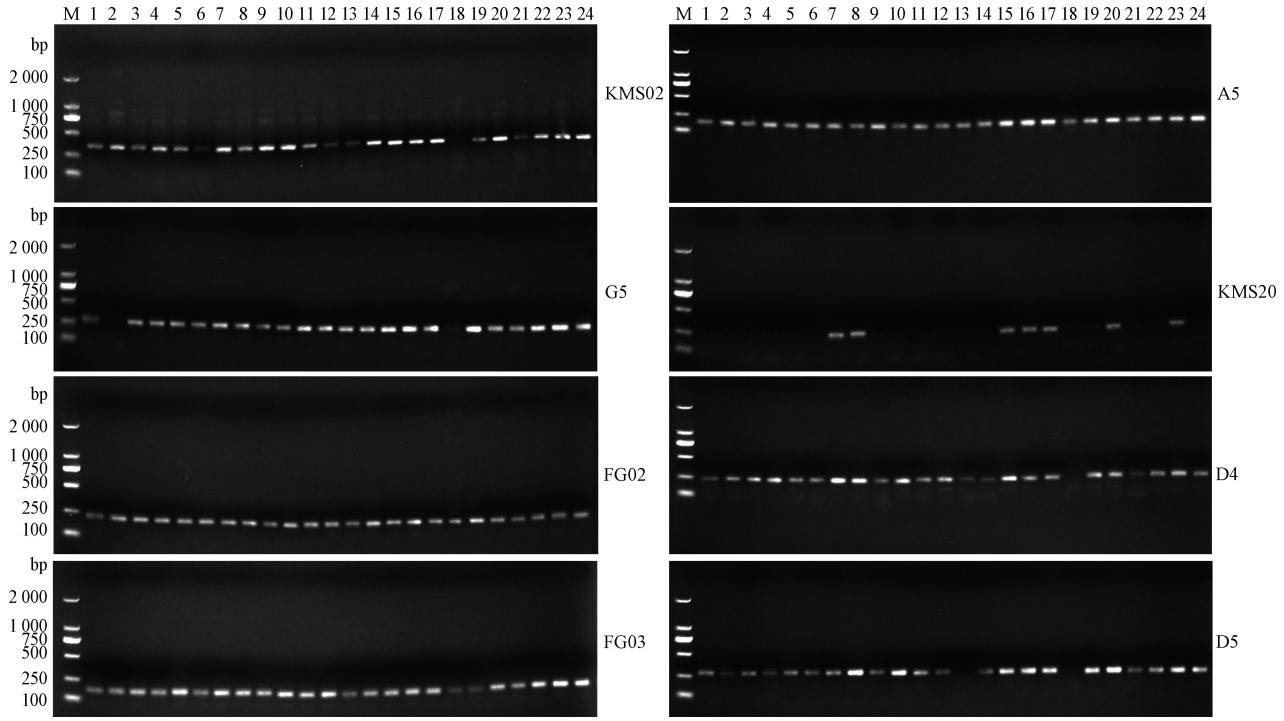
2 结果与分析

2.1　稻瘟病菌的分离结果

从江西省5个不同生态型稻区采集的穗颈瘟标样中共分离得到189株单孢分离菌株。其中都昌县42株菌株，编号为DC01~DC42；井冈山市44株菌株，编号为JGS01~JGS44；丰城市39株菌株，编号为FC01~FC39；万安县32株菌株，编号为WA01~WA32；婺源县32株菌株，编号为WY01~WY32。都昌县、井冈山市、丰城市、万安县、婺源县的生态环境不同，并分别处于江西省的北部、中部和南部，地理生态类型分别为环湖区、山区、平原区、丘陵地区和丘陵多山区，这对于分析地域性稻瘟病菌群体遗传多样性有一定的代表性。

2.2　不同引物对稻瘟病菌的PCR扩增结果

选用13对SSR引物对分离获得的189株稻瘟病菌菌株基因组DNA进行PCR扩增，每对引物均只能扩增出1个大小为250~350 bp且清晰的特异性条带（图1）。13对SSR引物在供试189株稻瘟病菌菌株中的扩增效率存在差异。引物G5的扩增效率最高，为92.59%，引物FG02扩增的条带数最少，扩增效率为32.28%，说明这些稻瘟病菌菌株的DNA基因组成差异较大，亲缘关系较远（表1）。



M：DNA ladder；1~24：稻瘟病菌FC01~FC24。M：DNA ladder；1–24：samples of the blast fungus isolates FC01–FC24.

图1　引物KMS02、G5、FG02、FG03、A5、KMS20、D4、D5对部分稻瘟病菌菌株DNA的扩增结果

Fig. 1　Amplification of DNA markers of *Magnaporthe oryzae* by primers KMS02，G5，FG02，FG03，A5，KMS20，D4 and D5

2.3　江西省稻瘟病菌群体遗传结构分析

2.3.1　稻瘟病菌群体遗传宗谱划分

聚类分析结果显示，在相似系数为0.74时可将189株稻瘟病菌划分为15个遗传宗谱（图2）。其中宗谱JXL01包含71株菌株，占总菌株数的37.57%，为优势宗谱；宗谱JXL02、JXL14为亚优势宗谱，分别包含31株和26株菌株，占总菌株数的16.40%和13.76%；宗谱JXL03、JXL08、JXL10为次要宗谱，包含10~17株菌株；其它9个宗谱为小宗谱，包含菌株都在5株以下（表2）。总体来看，来源于江西省的优势稻瘟病菌菌株亲缘关系较远，稻瘟病菌群体遗传结构复杂多变，遗传信息丰富多样。

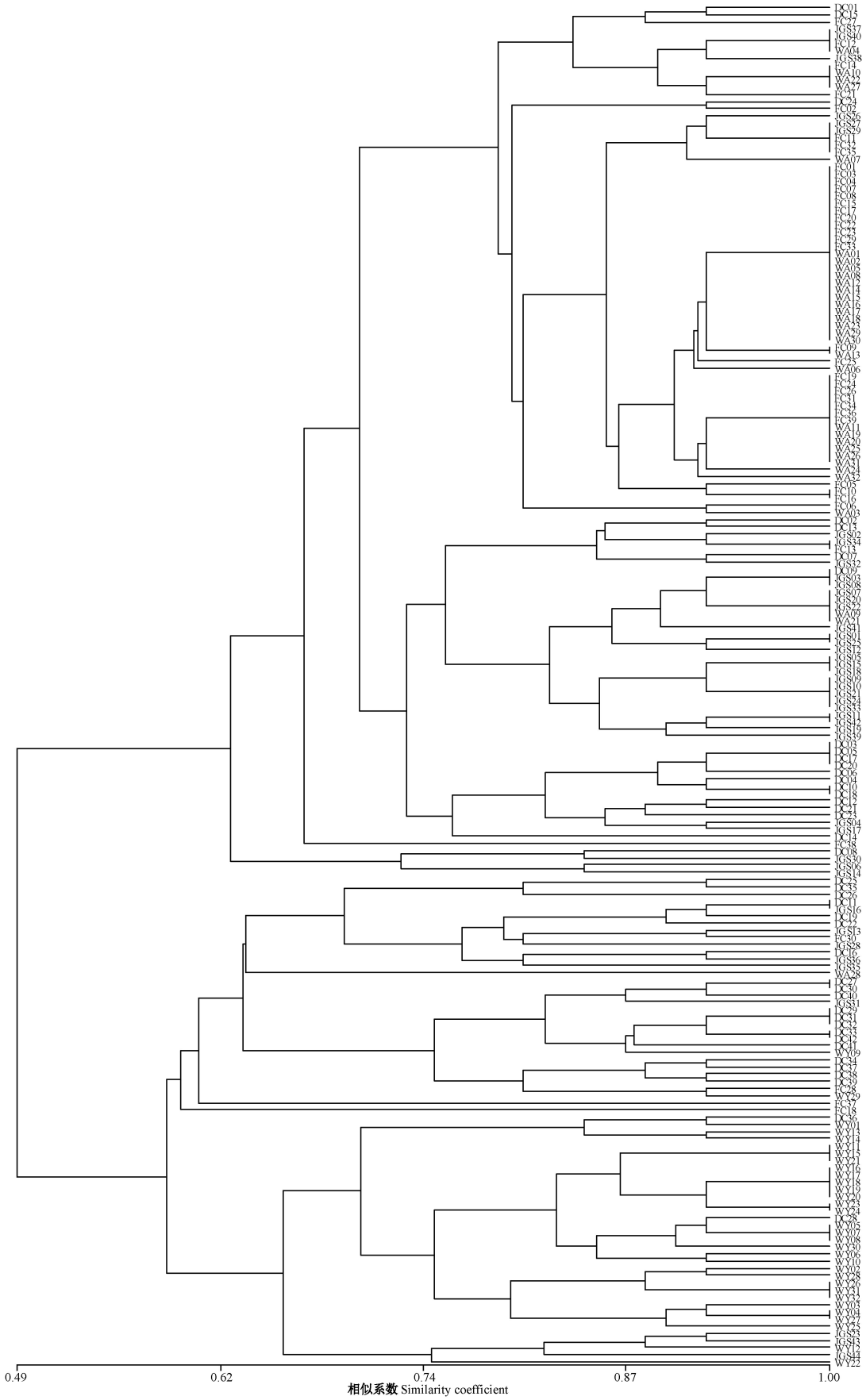


图2 应用最长距离法构建不同SSR引物对稻瘟病菌扩增结果的聚类图

Fig. 2 Cluster diagram of the amplification results of *Magnaporthe oryzae* with different SSR primers by maximum distance method

表2 在0.74相似水平上江西省稻瘟病菌菌株的遗传宗谱

Table 2 Genetic lineages of *Magnaporthe oryzae* isolates at 0.74 similar level

宗谱 Lineage	菌株 Isolate	菌株数 No. of isolates	所占比例/% Percentage
JXL01	DC01, DC15, FC27, JGS37, JGS40, FC12, WA04, JGS38, FC14, WA10, WA22, WA27, FC21, DC24, FC02, JGS26, JGS27, JGS29, FC11, FC32, FC35, WA07, FC01, FC03, FC04, FC07, FC08, FC15, FC17, FC20, FC22, FC23, FC29, FC33, WA01, WA02, WA05, WA08, WA12, WA14, WA15, WA16, WA17, WA18, WA23, WA29, WA30, FC09, WA13, FC25, WA06, FC19, FC24, FC26, FC31, FC34, FC36, FC39, WA11, WA19, WA20, WA25, WA26, WA31, WA24, WA32, FC05, FC10, FC16, FC06, WA03	71	37.57
JXL02	DC02, DC13, JGS02, JGS34, FC13, DC07, JGS32, DC09, JGS03, JGS08, JGS07, JGS20, JGS22, WA09, WA21, JGS41, JGS01, JGS25, JGS12, JGS05, JGS15, JGS18, JGS09, JGS10, JGS21, JGS24, JGS33, JGS11, JGS42, JGS19, JGS39	31	16.40
JXL03	DC03, DC05, DC17, DC20, DC06, DC04, DC10, DC18, DC12, DC21, DC23, JGS04, JGS17, DC14	14	7.41
JXL04	FC38	1	0.53
JXL05	DC08, JGS30	2	1.06
JXL06	JGS06, JGS14	2	1.06
JXL07	DC25, DC35, DC26	3	1.59
JXL08	DC11, JGS16, DC19, DC22, JGS13, FC30, JGS28, DC16, JGS36, JGS35	10	5.29
JXL09	WA28	1	0.53
JXL10	DC27, DC30, DC40, JGS31, DC29, DC31, DC32, DC33, DC42, DC41, WY09, DC34, DC37, DC38, DC39, FC28, WY29	17	8.99
JXL11	FC37	1	0.53
JXL12	FC18	1	0.53
JXL13	DC36, WY01, WY13, WY14	4	2.12
JXL14	WY11, WY15, WY21, WY16, WY17, WY18, WY19, WY20, WY23, WY24, DC28, WY05, WY07, WY08, WY30, WY06, WY10, WY02, WY28, WY26, WY31, WY32, WY03, WY04, WY27, WY25	26	13.76
JXL15	JGS23, JGS43, WY12, JGS44, WY22	5	2.65

2.3.2 不同生态型稻区稻瘟病菌群体的遗传结构

通过分析来源于不同生态地理型稻区稻瘟病菌的遗传宗谱发现，来源不同的稻瘟病菌所属遗传宗谱类型存在较大差异，且每个地区稻瘟病菌群体都有优势宗谱和稀有小宗谱。如都昌县稻瘟病菌群体的优势宗谱为JXL03和JXL10，分别含有12株和13株菌株，两者合占总菌株数的59.52%；井冈山市稻瘟病菌群体则分属8个遗传宗谱，其中JXL02为优势宗谱，包含24株菌株，占总菌株数的54.55%；丰城市稻瘟病菌群体分属7个遗传宗谱，其中JXL01为优势宗谱，包含33株菌株，占总菌株数的84.62%；万安县稻瘟病菌群体分属3个遗传宗谱，其中JXL01为优势宗谱，包含29株菌株，占总菌株数的90.63%；婺源县稻瘟病菌群体分属4个遗传宗谱，其中JXL14为优势宗谱，包含25株菌株，占总菌株数的78.13%。表明除了丰城市与万安县稻瘟病菌群体的优势宗谱一样，其它地区稻瘟病菌群体的遗传宗谱有很大差异，优势宗谱与小宗谱都不同（表3）。

表3 江西省稻瘟病菌群体遗传宗谱的地理分布

Table 3 Geographic distribution of the genetic lineages of *Magnaporthe oryzae* populations in Jiangxi Province

群体 Population	地区生态型 Geographic ecology	菌株数 No. of isolates	遗传宗谱（菌株数） Genetic lineage (No. of isolates)
都昌 Duchang	环湖区 Around lake	42	JXL01(3), JXL02(4), JXL03(12), JXL05(1), JXL07(3), JXL08(4), JXL10(13), JXL13(1), JXL14(1)
井冈山 Jianggangshan	山区 Mountainous	44	JXL01(6), JXL02(24), JXL03(2), JXL05(1), JXL06(2), JXL08(5), JXL10(1), JXL15(3)
丰城 Fengcheng	平原区 Plain	39	JXL01(33), JXL02(1), JXL04(1), JXL08(1), JXL10(1), JXL11(1), JXL12(1)
万安 Wan'an	丘陵地区 Hilly land	32	JXL01(29), JXL02(2), JXL09(1)
婺源 Wuyuan	丘陵山地区 Hilly and mountainous	32	JXL10(2), JXL13(3), JXL14(25), JXL15(2)

2.4 稻瘟病菌群体的遗传多样性分析

2.4.1 稻瘟病菌群体的遗传多样性水平

5个不同生态型稻区的稻瘟病菌群体遗传多样性都比较丰富。在群体平均水平上，江西省稻瘟病菌群体的有效等位基因数*Ne*为1.639，Nei's基因多样性指数*H*为0.375，Shannon信息指数*I*为0.558，多态性位点数*NP*为13个，多态性位点百分率*P*为100.00%。在不同区域之间，各稻瘟病菌群体的遗传多样性水平存在一定差异。都昌县稻瘟病菌群体具有较高的遗传多样性，Nei's基因多样性指数*H*为0.353，Shannon信息指数*I*为0.522，其次是井冈山市稻瘟病菌群体的遗传多样性相对较高，而丰城市和婺源县稻瘟病菌群体的遗传多样性相对较低，万安县稻瘟病菌群体的遗传多样性最低（表4）。

表4 江西省5个不同生态型稻区稻瘟病菌群体的遗传多样性

Table 4 Genetic diversity of *Magnaporthe oryzae* populations in five ecological rice areas in Jiangxi Province

群体 Population	等位基因观察数 Observed no. of alleles	有效等位基因数 No. of effective alleles	Nei's基因多样性指数 Nei's gene diversity index	Shannon信息指数 Shannon information index	多态性位点数 No. of polymorphic loci	多态性位点百分率/% Percentage of polymorphic loci
都昌 Duchang	2.000	1.631	0.353	0.522	13	100.00
井冈山 Jianggangshan	1.923	1.448	0.270	0.415	11	84.62
丰城 Fengcheng City	2.000	1.331	0.219	0.359	13	100.00
万安 Wan'an	1.769	1.226	0.145	0.240	10	76.92
婺源 Wuyuan	1.692	1.358	0.217	0.332	9	69.23
平均数 Average	2.077	1.639	0.375	0.558	13	100.00

2.4.2 稻瘟病菌群体的遗传分化分析

江西省5个不同生态型稻区的稻瘟病菌群体存在一定的遗传分化。5个稻瘟病菌群体的遗传多样性H_t平均为0.373，群体内遗传多样性H_s平均为0.241，群体间遗传多样性D_{st}平均为0.132，表明江西省稻瘟病菌群体内的遗传多样性大于群体间的遗传多样性。5个稻瘟病菌群体的遗传分化系数G_{st}平均为0.354，表明江西省稻瘟病菌总遗传变异的35.44%存在于群体间，而64.56%的遗传变异则存在于群体内。5个稻瘟病菌群体的基因流N_m平均为0.911，说明江西省各稻瘟病菌群体间的基因流动性较小（表5）。

表5 江西省5个不同生态型地区稻瘟病菌群体的遗传分化分析

Table 5 Analysis of gene diversity of *Magnaporthe oryzae* populations in five ecological rice areas in Jiangxi Province

基因位点 Locus	群体遗传多样性 Total heterozygosity	群体内遗传多样性 Subpopulation heterozygosity	遗传分化系数 Genetic differentiation coefficient	基因流 Gene flow
A5	0.324	0.206	0.363	0.878
D4	0.481	0.227	0.529	0.445
D5	0.347	0.300	0.134	3.226
FG01	0.419	0.165	0.605	0.326
FG02	0.421	0.157	0.626	0.299
FG03	0.467	0.201	0.569	0.379
G5	0.125	0.109	0.125	3.509
KMS02	0.334	0.254	0.239	1.595
KMS20	0.437	0.359	0.179	2.298
MS355	0.498	0.298	0.402	0.744
MS363	0.218	0.191	0.125	3.515
MS677	0.467	0.430	0.800	5.756
SMS17	0.316	0.235	0.256	1.454
平均数 Average	0.373	0.241	0.354	0.911

2.5 稻瘟病菌种群的聚类分析

供试5个稻瘟病菌种群间的遗传距离为0.033~0.214，存在较大的差异（表6）。根据遗传距离构建5个稻瘟病菌种群的UPGMA系统树，在遗传距离为0.10时，5个不同生态型稻区的稻瘟病菌种群可以划分成2个类群，其中丰城种群、万安种群和井冈

山种群构成一个类群，都昌种群与婺源种群构成另一个类群（图3）。从稻瘟病菌种群地理分布来看，处于相同类群的丰城市、万安县、井冈山市位于江西省中南部，另一类群的都昌县与婺源县位于江西省东北部，这反映出江西省稻瘟病菌种群遗传谱系与其地理分布也具有一定相关性。

表6 江西省5个稻瘟病菌种群的遗传相似系数与遗传距离

Table 6 Genetic identity and genetic distance of five populations of *Magnaporthe oryzae* in Jiangxi Province

种群 Population	都昌 Duchang	井冈山 Jinggangshan	丰城 Fengcheng	万安 Wan'an	婺源 Wuyuan
都昌 Duchang		0.967	0.878	0.807	0.863
井冈山 Jinggangshan	0.033		0.897	0.859	0.894
丰城 Fengcheng	0.130	0.109		0.968	0.940
万安 Wan'an	0.214	0.152	0.033		0.926
婺源 Wuyuan	0.148	0.113	0.062	0.077	

表中上三角代表遗传相似系数，下三角代表遗传距离。The upper triangle in the table represents the genetic similarity coefficient, and the lower triangle represents the genetic distance.

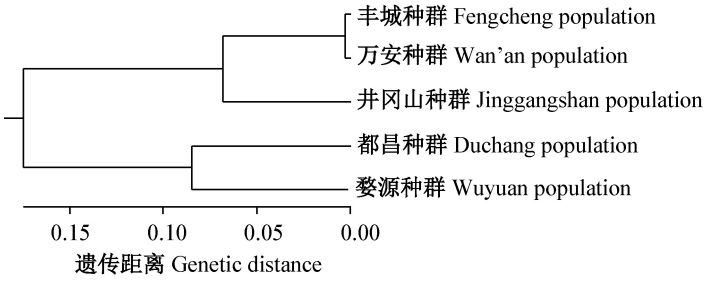


图3 江西省5个稻瘟病菌种群间的UPGMA聚类图

Fig. 3 UPGMA dendrogram of five populations of *Magnaporthe oryzae* in Jiangxi Province

3 讨论

本研究从位于江西省北部、中部和南部的5个不同生态型稻区采集稻瘟病标样，在地理区位上具有一定的代表性，供试菌株均分离自田间自然发病的穗颈瘟标样，且1个稻瘟病标样只分离1株稻瘟病菌供试，能够很好地反映江西省田间稻瘟病菌的群体遗传结构。因此，无论从菌株来源还是菌株分离方法，供试菌株都能满足江西省稻瘟病菌的遗传多样性研究。目前，随着分子标记技术的快速发展，SSR标记被广泛应用于植物真菌病害种群结构的遗传多样性分析，国内已有多位学者进行了相关研究。如黄立飞等（2018）利用5对引物对采集自广西壮族自治区6个地区的59株甘薯茎腐病菌 *Dickeya dadantii* 进行种群遗传多样性分析，结果显示，在遗传相似系数为0.79时，59株菌株被划分为5个类群，类群划分与菌株来源地间有一定的相关性；姜舒畅等（2018）利用19个中国鉴别寄主和11对SSR标记引物对云南省4个地市的88株条锈菌 *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* 进行了群体结构和遗传多样性分析，结果表明云南省条锈菌群体毒性结构复杂，多样性水平丰富。陈小林等（2017）利用本研究采用的13对SSR引物对采集自广西壮族自治区的107株稻瘟病菌单孢菌株进行遗传多样性分析，在0.88相似水平上将其划分为14个遗传宗谱；表明利用本研究选择的这13对SSR引物进行稻瘟病菌遗传多样性分析是可行的。

本研究采用已报道的13对SSR引物检测江西省5个县（市）的189株稻瘟病菌的遗传多样性，当相似系数为0.74时，可将供试菌株划分为15个遗传宗谱，其中，包含1个优势宗谱JXL01（占总菌株数的37.57%），2个亚优势宗谱，3个次要宗谱和9个小宗谱，说明江西省稻瘟病菌在遗传结构上存在一定程度的变异，并且来源地不同的菌株分散在不同的宗谱内；颜学海等（2016）选用13对SSR引物将来自我国西南地区18个县（市）的221株稻瘟病菌单孢菌株在0.16相异水平上划分为13个遗传宗谱，包含2个优势宗谱，所含菌株数占总菌株数的92.76%；童建新等（2012）利用13对SSR引物将来自湖南省19个县的169株稻瘟病单孢菌株在0.80相似水平上划分为8个遗传宗谱，包含1个优势宗谱，菌株数占总菌株数的66.86%。从优势宗谱的个数及其所占比例来看，本研究中江西省稻瘟病菌群体的遗传结构相

对于中国西南地区、湖南省的优势宗谱，其优势更不明显，较为分散，同时还存在着更多特异性小宗谱，层次比较丰富，这可能与江西省各地区复杂的生态地理环境、适宜的气象条件及寄主品种的多样化等因素有关。

生物群体的遗传多样性是用来评价生物资源状况的重要依据。Nei's基因多样性指数和Shannon信息指数是衡量生物遗传多样性的重要参数（郭宝英等，2011）。本研究发现，来源于江西省5个不同生态型稻区的稻瘟病菌群体遗传多样性水平较高，群体的Nei's基因多样性指数为0.375，Shannon信息指数为0.558，且不同群体间的遗传多样性水平存在一定差异。如来自环鄱阳湖区的都昌县稻瘟病菌在群体水平上其基因多样性指数和Shannon信息指数均最高，说明都昌县稻瘟病菌群体发生变异的潜力最大，其次是井冈山市稻瘟病菌群体的变异性相对较高；因此应加强这2个地区稻瘟病菌群体的动态监测，掌握其遗传变化规律，这将为该地区水稻抗病品种合理布局、有效防止稻瘟病发生流行提供更充分的科学依据。本研究对江西省5个不同生态型稻区稻瘟病菌群体遗传分化水平的分析结果显示，这5个区域的稻瘟病菌群体内的遗传多样性大于群体间的遗传多样性。Wright（1931）提出群体间遗传分化系数在0.05~0.15之间表示遗传分化程度居于中等水平；当群体间基因流大于1时，群体间就存在一定的基因流动，能发挥匀质化作用。本研究中5个稻瘟病菌群体间的遗传分化系数平均为0.354，说明江西省稻瘟病菌不同群体间存在较大的遗传分化，并且总遗传变异的64.56%存在于群体内，这进一步表明群体内变异和群体间变异均是江西省稻瘟病菌遗传变异的来源。另外，江西省不同稻瘟病菌群体间的基因流为0.911，说明5个区域稻瘟病菌群体间的基因交流较少，这可能与5个地区的特殊地理位置有关。

本研究应用13对SSR标记对江西省5个不同生态型稻区的稻瘟病菌群体遗传结构进行了分析，并应用相关统计分析软件对稻瘟病菌群体遗传参数进行了分析，获得的结果将为江西省水稻抗病育种和品种科学布局提供一定的参考。但由于本研究采集菌株地区的数量有限，对江西省全省稻瘟病菌群体遗传结构及其多样性分析还不够系统和全面，因此在后续研究中将加强对江西省其它稻瘟病易发区稻瘟病菌菌株的收集、保存，扩大采集群体范围，以期获得更为全面、准确的分析结果。

参 考 文 献（References）

CHEN DH, ZEIGLER RS, LEUNG H, NELSON RJ. 1995. Population structure of *Pyricularia grisea* at two screening sites in the Philippines. Phytopathology, 85(9): 1011−1020

CHEN XL, YAN Q, LI RF, LI KH, WEI SF, HUANG FK, WEI LL. 2017. Physiological races identification and genetic diversity analysis of *Magnaporthe oryzae* in Guangxi Province. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 30(4): 761−772 (in Chinese) [陈小林, 颜群, 李瑞芳, 李焜华, 韦善富, 黄凤宽, 韦丽丽. 2017. 广西稻瘟病菌生理小种鉴定及遗传多样性分析. 西南农业学报, 30(4): 761−772]

CHEN YF, ZHANG Y, CHEN XJ, KANG XX, GENG Y, ZHOU FQ, DONG HG. 2017. Control techniques of chemical pesticide reduction in rice pest control. Journal of Zhejiang Agricultural Sciences, 58(12): 2231−2234 (in Chinese) [陈银凤, 张云, 陈夕军, 康晓霞, 耿越, 周奋启, 董红刚. 2017. 水稻病虫害防治化学农药减量控害技术. 浙江农业科学, 58(12): 2231−2234]

FENG YX, LI W, SUN HY, DENG YY, YU HS, CHEN HG. 2013. Genetic diversity of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* populations in Huang-Huai winter wheat production region of China. Journal of Plant Protection, 40(6): 495−501 (in Chinese) [冯彦霞, 李伟, 孙海燕, 邓渊钰, 于汉寿, 陈怀谷. 2013. 黄淮麦区小麦全蚀病菌群体的遗传多样性分析. 植物保护学报, 40(6): 495−501]

GUO BY, ZHOU C, LÜ ZM, LI JJ, WU CW. 2011. Genetic diversity of different geographical populations in *Octopus variabilis* revealed by ISSR analysis. Oceanologia et Limnologia Sinica, 42 (6): 868−873 (in Chinese) [郭宝英, 周超, 吕振明, 李继姬, 吴常文. 2011. 长蛸(*Octopus variabilis*)不同地理群体遗传多样性的ISSR分析. 海洋与湖沼, 42(6): 868−873]

HAN YJ, LU GD. 2018. Recent understanding on the interactions between rice and *Magnaporthe oryzae*. Biotechnology Bulletin, 34 (2): 25−37 (in Chinese) [韩艺娟, 鲁国东. 2018. 水稻与稻瘟病菌相互作用研究进展. 生物技术通报, 34(2): 25−37]

HUA LX, HE L, JIANG QP, YE PS, DAI SD, WEI SG, LIU ZH, ZENG HL. 2016. The process of gene-specific DNA markers development and application for rice blast resistance genes. Molecular Plant Breeding, 14(10): 2739−2748 (in Chinese) [华丽霞, 何炼, 蒋秋平, 叶鹏盛, 代顺冬, 韦树谷, 刘朝辉, 曾华兰. 2016. 稻瘟病抗性基因特异性分子标记的开发及应用进展. 分子植物育种, 14(10): 2739−2748]

HUANG J, SI WN, DENG QM, LI P, YANG SH. 2014. Rapid evolution of avirulence genes in rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. BMC Genetics, 15(5): 45

HUANG LF, CHEN JY, FANG BP, LUO ZX, ZHANG XJ, WANG ZY. 2018. Pathogenic differentiation and genetic diversity of *Dickeya dadantii* causing bacterial stem and root rot of sweetpotato. Journal of Plant Protection, 45(6): 1227−1234 (in Chinese) [黄立飞, 陈景益, 房伯平, 罗忠霞, 张雄坚, 王章英. 2018. 甘薯茎腐病菌的遗传多样性及致病力差异分析. 植物保护学报, 45 (6): 1227−1234]

JIANG SC, YAO Q, ZHAO J, HUANG LL, KANG ZH, ZHAN GM. 2018. Genetic analysis of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in Yunnan Province based on virulence phenotypes and simple sequence repeats. Journal of Plant Protection, 45(1): 83−89 (in Chinese) [姜舒畅, 姚强, 赵杰, 黄丽丽, 康振生, 詹刚明. 2018. 基于毒性表型与微卫星标记的云南省条锈病菌群体遗传分析. 植物保护学报, 45(1): 83−89]

KARAOGLU H, LEE CMY, MEYER W. 2005. Survey of simple sequence repeats in completed fungal genomes. Molecular Biology and Evolution, 22(3): 639−649

KHANG CH, PARK SY, LEE YH, VALENT B, KANG S. 2008. Genome organization and evolution of the *AVR-Pita* avirulence gene family in the *Magnaporthe grisea* species complex. Molecular Plant-Microbe Interactions, 21(5): 658−670

LABBÉ J, MURAT C, MORIN E, LE TACON F, MARTIN F. 2011. Survey and analysis of simple sequence repeats in the *Laccaria bicolor* genome, with development of microsatellite markers. Current Genetics, 57(2): 75−88

LAN B, YANG YY, XU PD, LI XM, HE LG. 2014. Analysis of resistance of rice major *Pi*-genes to the *Magnaporthe grisea* isolates in Jiangxi Province. Journal of Plant Protection, 41(2): 163−168 (in Chinese) [兰波, 杨迎青, 徐沛东, 李湘民, 何烈干. 2014. 水稻主要抗瘟基因品系对江西省稻瘟病菌分离株系的抗性分析. 植物保护学报, 41(2): 163−168]

LEI CL, WANG JL, JIANG WR, LING ZZ, GEORGE ML. 2002. Population structure and genetic variation of rice blast fungus in some rice-growing regions in northern China. Acta Phytopathologica Sinica, 32(3): 219−226 (in Chinese) [雷财林, 王久林, 蒋琬如, 凌忠专, GEORGE ML. 2002. 我国北方部分稻区稻瘟病菌群体遗传结构研究. 植物病理学报, 32(3): 219−226]

LU DH, YE HL, LIAO HM, GONG XS, ZHOU XQ. 2005. Population genetic structure and its variation of rice blast fungus in long-grained nonglutinous rice growing regions in Sichuan. Journal of Plant Protection , 32(1): 23−28 (in Chinese) [卢代华, 叶慧丽, 廖华明, 龚学书, 周西全. 2005. 四川籼稻区稻瘟病菌群体遗传结构. 植物保护学报, 32(1): 23−28]

MU HM, JIANG H, WANG YL, SUN GC. 2013. Methodology of genetic diversity research on rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. Chinese Journal of Rice Science, 27(5): 545−552 (in Chinese) [穆慧敏, 姜华, 王艳丽, 孙国昌. 2013. 研究稻瘟病菌群体遗传多态性的分子标记方法. 中国水稻科学, 27(5): 545−552]

NEI M, LI WH. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 76 (10): 5269−5273

SALEH D, MILAZZO J, ADREIT H, FOURNIER E, THARREAU D. 2014. South-East Asia is the center of origin, diversity and dispersion of the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. The New Phytologist, 201(4): 1440−1456

SILUE D, NOTTEGHEM JL, THARREAU D. 1992. Evidence of a gene-for-gene relationship in the *Oryza sativa-Magnaporthe grisea* pathosystem. Phytopathology, 82(5): 577−580

TONG XJ, REN ZH, LIU YX, YU H, LIU EM. 2012. Analysis of genetic diversity of *Magnaporthe oryzae* in Hunan. Hybrid Rice, 27 (3): 66−70 (in Chinese) [童新建, 任佐华, 刘毅雄, 俞海, 刘二明. 2012. 湖南稻瘟病菌遗传多样性分析. 杂交水稻, 27(3): 66−70]

WRIGHT S. 1931. Evolution in Mendelian populations. Genetics, 16: 97−159

XIAO DF, ZHANG PS, WANG L, HUANG SW. 2013. Research progress on populations and physiological race distribution of rice blast pathogen (*Magnaporthe grisea*) in China. Chinese Journal of Rice Science, 27(3): 312−320 (in Chinese) [肖丹凤, 张佩胜, 王玲, 黄世文. 2013. 中国稻瘟病菌种群分布及优势生理小种的研究进展. 中国水稻科学, 27(3): 312−320]

YAN XH, DENG YB, HAN D, YANG Y, HE JM, DENG QM. 2016. Analysis of genetic diversity among populations for the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* in southwest China. Journal of Plant Protection, 43(4): 537−543 (in Chinese) [颜学海, 邓元宝, 韩冬, 杨阳, 何建美, 邓其明. 2016. 西南地区稻瘟病菌群体遗传多样性分析. 植物保护学报, 43(4): 537−543]

YAO L, WANG J, LU DH, ZHANG H, CHEN Y, GONG XS, MAO JY. 2014. Progress on avirulence genes in *Magnaporthe grisea*. Chinese Agricultural Science Bulletin, 30(4): 232−237 (in Chinese) [姚琳, 王剑, 卢代华, 张欢, 陈宇, 龚学书, 毛剑宇. 2014. 稻瘟病菌无毒基因研究进展. 中国农学通报, 30(4): 232−237]

ZHOU H, REN ZH, LIU PK, ZHANG YY, WANG HH, LIU EM. 2018. Analysis of genetic diversity of 92 *Magnaporthe oryzae* in rice blast nursery at Taojiang, Hunan. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 31(4): 725−730 (in Chinese) [周瑚, 任佐华, 刘品克, 张译允, 王恒沪, 刘二明. 2018. 湖南桃江病圃92个稻瘟病菌株遗传多样性分析. 西南农业学报, 31(4): 725−730]

（责任编辑：李美娟）