

魏松红, 宋宇, 田永恒, 等. 基于SSR序列的东北不同地区稻瘟病菌遗传多样性分析[J]. 沈阳农业大学学报, 2024, 55(4): 405-416.

WEI Songhong, SONG Yu, TIAN Yongheng, et al. Genetic diversity analysis of rice blast fungus in different regions of Northeast China based on SSR[J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 2024, 55(4): 405-416.

基于SSR序列的东北不同地区稻瘟病菌遗传多样性分析

魏松红¹, 宋宇¹, 田永恒², 王奕鸣¹, 丁英¹

(1. 沈阳农业大学植物保护学院, 沈阳 110161; 2. 洛阳市农林科学院, 河南 洛阳 471023)

摘要: 稻瘟病是制约水稻高产稳产的主要因素。为明确东北地区稻瘟病菌群体遗传多样性, 以2021年分离自东北地区的96株稻瘟病菌为试材, 利用简单重复序列(simple sequence repeat, SSR)分子标记技术, 对供试稻瘟病菌进行PCR检测, 研究供试稻瘟病菌群体遗传结构、遗传多样性水平等。结果表明: 16对SSR引物均能在100~500 bp内扩增出清晰条带。供试96株稻瘟病菌可划分为13个遗传宗谱, 其中宗谱DQL02和DQL01为优势宗谱, 分别包含37株和22株菌株, 分别占总菌株数的38.54%和22.92%; 宗谱DQL04、DQL06和DQL08为次要宗谱, 分别包含9株、6株和6株菌株, 分别占总菌株数的9.38%、6.25%和6.25%; 其他8个宗谱为小宗谱, 包含菌株数为1~4株。在群体水平上, 东北地区稻瘟病菌群体间的遗传多样性水平比群体内的遗传多样性水平高, 且存在于群体内的遗传变异占群体总遗传变异的83.37%。群体间平均Nei基因多样性指数变化范围为0.083 6~0.457 1, 平均为0.204 1; 平均多态百分率变化范围为6.25%~100%, 平均为45.67%, 说明有一定遗传多样性差异存在于东北地区稻瘟病菌群体中; 聚类分析结果表明东北13个地区稻瘟病菌群体间的遗传距离为0.011 0~0.187 9, 存在较大差异。按遗传距离远近可将东北13个地区稻瘟病菌群体划分为4个类群, 第2类群全部由辽宁省种群组成; 第3类群全部由吉林省种群组成, 反映出东北地区稻瘟病菌群体遗传谱系与其地理分布有一定联系。研究结果可为了解东北地区稻瘟病菌群体遗传结构和群体演化提供理论基础。

关键词: 东北地区; 稻瘟病菌; SSR标记; 遗传结构; 遗传多样性

中图分类号: S435.111.41

文章编号: 1000-1700(2024)04-0405-12

文献标识码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Genetic Diversity Analysis of Rice Blast Fungus in Different Regions of Northeast China Based on SSR

WEI Songhong¹, SONG Yu¹, TIAN Yongheng², WANG Yiming¹, DING Ying¹

(1. College of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China;

2. Luoyang Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Luoyang Henan 471023, China)

Abstract: Rice blast is the main factor restricting the high and stable yield of rice. In order to clarify the genetic diversity of *Pyricularia oryzae* populations in Northeast region, 96 strains isolated from Northeast region in 2021 were used as test materials. Simple sequence repeat (SSR) molecular marker technology was used to detect the tested strains of *P. oryzae* by PCR, and the genetic structure and genetic diversity of the tested *P. oryzae* populations were studied. The results showed that 16 pairs of SSR primers could amplify clear bands in 100–500 bp. The 96 tested strains were divided into 13 genetic lineages. Among them, the DQL02 and DQL01 were the dominant lineages, including 37 and 22 strains, accounting for

收稿日期: 2024-04-04

基金项目: 国家重点研发计划项目(2023YFD1400205-3); 辽宁省科学研究经费项目(LSNZD201902); “兴辽英才计划”农业专家项目(XLYC2213046); 国家水稻产业技术体系项目(CARS-01)

第一作者: 魏松红(1974-), 女, 博士, 博士生导师, 教授, 从事植物病原真菌学与水稻病害研究, E-mail: songhongw125@163.com

38.54% and 22.92% of the total strains, respectively. DQL04, DQL06 and DQL08 were secondary lineages, including 9 strains, 6 strains and 6 strains, accounting for 9.38%, 6.25% and 6.25% of the total strains, respectively. The other 8 lineages were minor lineages, including 1-4 strains. At the group level, the level of genetic diversity among populations was higher than that within populations, and the genetic variation within populations accounted for 83.37% of the total genetic variation. The average Nei's genetic diversity index among populations ranged from 0.083 6 to 0.457 1, with an average of 0.204 1. The average polymorphic percentage ranged from 6.25% to 100%, with an average of 45.67%, indicating that there were some differences in genetic diversity among the populations of *P. oryzae* in Northeast region. The results of cluster analysis showed that the genetic distance between the populations of *P. oryzae* in 13 regions in the Northeast was 0.011 0-0.187 9, and there was a big difference. According to the genetic distance, the populations of *P. oryzae* in 13 regions in the Northeast could be divided into four groups. The second group was all composed of the populations of Liaoning Province, and the third group was all composed of the populations of Jilin Province, which reflected that the genetic pedigree of the population of *P. oryzae* in Northeast region was related to its geographical distribution. The results of this study can provide a theoretical basis for understanding the genetic structure and population evolution of *P. oryzae* populations in Northeast region.

Key words: Northeast China; *Pyricularia oryzae*; SSR; genetic structure; genetic diversity

由稻梨孢(*Pyricularia oryzae*)引起的稻瘟病对世界范围内的水稻生产构成严重威胁,导致水稻产量大幅度降低,一般减产为10%~20%,严重时减产达40%~50%,甚至颗粒无收^[1-2]。东北地区作为我国水稻主产区,其特殊的地理环境和气候因素有利于稻瘟病的发生与流行,使该病害长期以来一直是威胁东北地区水稻生产的首要病害^[3]。目前,在众多防治措施中,选育和利用抗瘟品种是防治稻瘟病最经济有效的策略^[4]。然而,稻瘟病菌具有复杂的遗传多样性,在田间易产生新的毒性小种,导致抗瘟品种失去持续抗性^[5-6]。因此,了解稻瘟病菌的种群结构和遗传多样性对确定适当的防治策略以提高水稻持久抗病性具有重要作用^[7]。

生物的遗传多样性研究依赖于合适的遗传标记,以便精准地揭示各种群间的遗传特征差异。已成功用于评估病原菌遗传多样性的DNA分析技术包括简单重复序列(simple sequence repeat, SSR)、随机扩增片段多态性(random amplified polymorphic DNA, RAPD)、限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)、rep-PCR等^[8-11]。其中,SSR标记具有多态性高、共显性遗传、试验结果重复性稳定性较好等特点,已被广泛用于评价稻瘟病菌群体间遗传多样性的研究^[12]。例如,李海伦等^[13]利用16对SSR引物对元阳哈尼梯田环境和‘月亮谷’6个水稻品种(系)上分离到的312株稻瘟病菌进行遗传多样性分析,结果显示来源于梯田环境的稻瘟病菌与不同水稻品种(系)的稻瘟病菌群体遗传结构差异明显;兰波等^[14]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,优势宗谱JXL0占总菌株数的37.57%,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。

本研究选用16对SSR引物,对采自东北地区的稻瘟病菌进行PCR检测,分析其群体遗传组成、遗传多样性,初步掌握东北地区稻瘟病菌群体遗传信息,以期为研究该地区稻瘟病菌群体遗传结构和群体演化提供理论基础。

1 材料与方 法

1.1 供试稻瘟病菌

2021年从东北地区采集水稻穗颈瘟试样,经常规分离及单孢纯化共获得96株稻瘟病菌(辽宁61株、吉林29株、黑龙江6株)(表1)。

1.2 供试SSR引物

参考前人相关研究选用16对SSR引物,即MS677、KMS20、P607、P37、P83、P319、P77、MS305、P409、P99、P233、P427、P657、MGM269、377~378、369~370,由上海生工科技有限公司合成(表2)。

表1 供试菌株地理来源信息及编号

Table 1 Information of geographic source and codes of tested isolates

省份 Province	菌株数 No. of strain	地区 Region	菌株编号 Name of strain
辽宁 Liaoning	61	沈阳 Shenyang	SY4、SY6、SY12、SY19、SY1、SY3、SY10、SY7
		盘锦 Panjin	PJ8、PJ18、PJ4、PJ2、PJ13、PJ6、PJ7
		铁岭 Tieling	KY14、KY12、KY17、KY10、KY8、KY4、KY2
		抚顺 Fushun	qy5、qy17、XB6、XB10、XB12、XB1、qy1、qy3
		大连 Dalian	ZH1、ZH2、PLD12、PLD1、PLD3、PLD5、PLD10、ZH3
		丹东 Dandong	QY3、QY5、FC13、FC9、FC17、FC3、QY9、QY1
		鞍山 Anshan	HC3、HC5、HC11、HC7、HC1、HC10、HC4、HC13
		营口 Yinkou	DSQ7、DSQ2、DSQ13、DSQ4、DSQ3、DSQ1、DSQ5
吉林 Jilin	29	长春 Changchun	Y10、A15、A18、A21、A33、A36、A38
		辽源 Liaoyuan	Y23、Y24、Y25、Y29、A6、A7、A8
		延边 Yanbian	Y19、Y16、Y21、A22、A23、A24、A25
		吉林 Jilin	Y32、A2、A5、A9、A11、A12、A14、A1
黑龙江 Heilongjiang	6	哈尔滨 Harbin	A26、A27、A28、A29、A30、A31

表2 本研究的SSR位点及引物信息

Table 2 Information of SSR locus and primer sequences in this study

位点 Locus	引物序列(5'→3') Primer sequence	退火温度/°C Anneal temperature	预期片段大小/bp Expected fragment size	参考文献 References
MS677	F:TCGTGAGGGTTCCTATCTGC R:GACCTTTATCGGATGCGTGT	56	255	[15]
KMS20	F:TTGGGATCTTCGGTAAGACG R:GCCGACAAGACACTGAATGA	57	250	[16]
P607	F:CCCAAGCTCCATAATACGCTAC R:TCCGAGACTCTTTGGATAGCAC	57	270	[13]
P37	F:ACCCTACCCCACTCATTTTC R:AGGATCAGCCAATGCCAAGT	57	196	[13]
P83	F:GTCTGCCTCGACTCCTTCAC R:AGCCCAAAAACAGAAAGCAA	55	168	[13]
P319	F:TAAGACCACTGGCGGAATCT R:GGCTTGTCTGCTGTACGG	55	280	[13]
P77	F:AGGCTCTCTGCCTACGAAGT R:GCTTTCGGCAAGCCTAATC	55	172	[13]
MS305	F:CGTGCCAGAAAAGACCTGAAGC R:CAGGGGATGAACTCCGATGG	58	180	[13]
P409	F:TCCCAGTACTTGCCCATCTC R:ATCTCATATCCGTCGGTCTGT	55	144	[13]
P99	F:CTAATTGCGGCTTAGGGTCA R:ACCTAGGTAGGTATACATGTTGTT	55	178	[13]
P233	F:TGAGATGGACCGCATGATTA R:TTGATGGCAGAGACATGTAGC	55	251	[13]
P427	F:CTGTACCACAACCAAGACG R:TTGCCCTGATTTGTCAGTCA	55	212	[13]
P657	F:ATCAGTCGAACCCACAAAAGC R:ATGTGTGGACGAACCAAGTCC	55	155	[13]
MGM269	F:GATGGCCAGGTCAGCTTTT R:ACTCTTTGCAGCCATGGAAC	55	266	[13]
377 ~ 378	F:CTAACGGCCGGCTAACAAG R:GTTTGCACAGTCTCGTCCATTG	55	266	[13]
369 ~ 370	F:GCTAGCTTTCCGAGATTGCT R:TTCGCTTCTATGCCCTTGTT	55	250	[13]

1.3 主要试剂及培养基

试剂:真菌基因组DNA提取试剂盒,北京索莱宝科技有限公司;Taq PCR Mix 预混液,生工生物工程(上海)股份有限公司。

培养基:马铃薯葡萄糖琼脂(PDA),马铃薯 200 g,葡萄糖 15 g,琼脂 15 g,加蒸馏水至 1 000 mL;PD 培养液:马铃薯 200 g,葡萄糖 15 g,加蒸馏水至 1 000 mL。

1.4 稻瘟病菌培养和DNA提取

纯化后的稻瘟病菌用打孔器打取 3~5 个菌饼放入 100 mL PD 培养液中,28 °C、110 r·min⁻¹ 条件下培养 12 d后,用纱布过滤,剔除菌饼,无菌水冲洗 3 次,将菌丝置于 50 °C 烘箱 24 h 烘干水分后放入自封袋 - 20 °C 冰箱保存。采用索莱宝(Solarbio)真菌基因组 DNA 提取试剂盒(货号:D2300),提取稻瘟病菌基因组 DNA。

1.5 PCR扩增体系与反应程序

1.5.1 PCR 扩增体系 总扩增体系为 20 μL,其中正向引物、反向引物各 1 μL,1 μL DNA 模板,10 μL 2 × Taq Master Mix,7 μL ddH₂O。

1.5.2 PCR 反应程序 94 °C 预变性 2 min 30 s;94 °C 变性 40 s,退火(温度按引物适宜)30 s,72 °C 延伸 1 min,共 36 个循环;72 °C 延伸 10 min 后 4 °C 保存。

1.6 琼脂糖凝胶电泳检测

将低电渗琼脂糖加入稀释好的 TAE 缓冲液中配置成 1% 的琼脂糖溶液,微波炉加热使琼脂糖充分溶解后,加入适量 Gel Red 核酸染料,摇晃混匀后倒入制胶槽,室温下冷却 30 min。

将凝固好的琼脂糖凝胶放入电泳槽,Marker、PCR 产物等分别加入点样孔,进行电泳。电泳完成后,用凝胶成像仪进行图像采集和结果记录。

1.7 数据获取与分析

处理 PCR 扩增结果,1 代表清晰稳定的扩增条带,0 代表无带,构建 0~1 数据库。用 POPGENE(version 1.32)软件对等位基因数 Na、Nei 基因多样性指数 Ht、有效等位基因数 Ne 等遗传多样性水平指数进行计算。在 neighbor joining 算法下,运用 MEGA6 软件进行非加权配对法(UPGMA)聚类分析。

2 结果与分析

2.1 供试稻瘟病菌基因组DNA检测

用稻瘟病菌特异性引物对供试稻瘟病菌基因组 DNA 进行检测,琼脂糖凝胶电泳结果显示(图 1),96 株供试稻瘟病菌基因组 DNA 在目的片段处均能扩增出清晰、稳定的条带,表明供试菌株均为稻瘟病菌,且提取的稻瘟病菌基因组 DNA 质量良好。

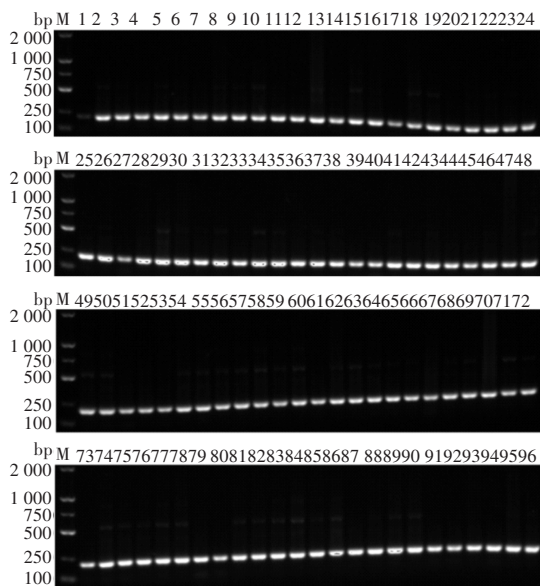
2.2 供试稻瘟病菌对SSR反应体系的PCR扩增结果

选用 16 对 SSR 引物对东北地区分离出的 96 株稻瘟病菌单孢菌株进行 PCR 扩增,均能在 100~500 bp 内扩增出清晰条带,共扩增出有效条带 1 362 个,平均扩增效率为 88.67%(图 2)。不同引物的扩增效率存在差异,其中引物 P83 的扩增效率最高,为 97.92%;引物 369~370 扩增出的条带最少,扩增效率为 42.71%,说明东北地区稻瘟病菌菌株的 DNA 基因组成存在较大差异,部分菌株亲缘关系较远(表 3)。

2.3 东北地区稻瘟病菌群体遗传结构分析

2.3.1 东北地区稻瘟病菌遗传宗谱划分 将供试东北地区稻瘟病菌群体 PCR 扩增结果转换成的 0~1 数据库,运用 NTSYS-PC2.1 软件计算遗传距离,进而对 PCR 扩增结果进行聚类处理,并据此分析东北地区稻瘟病菌群体的遗传结构。

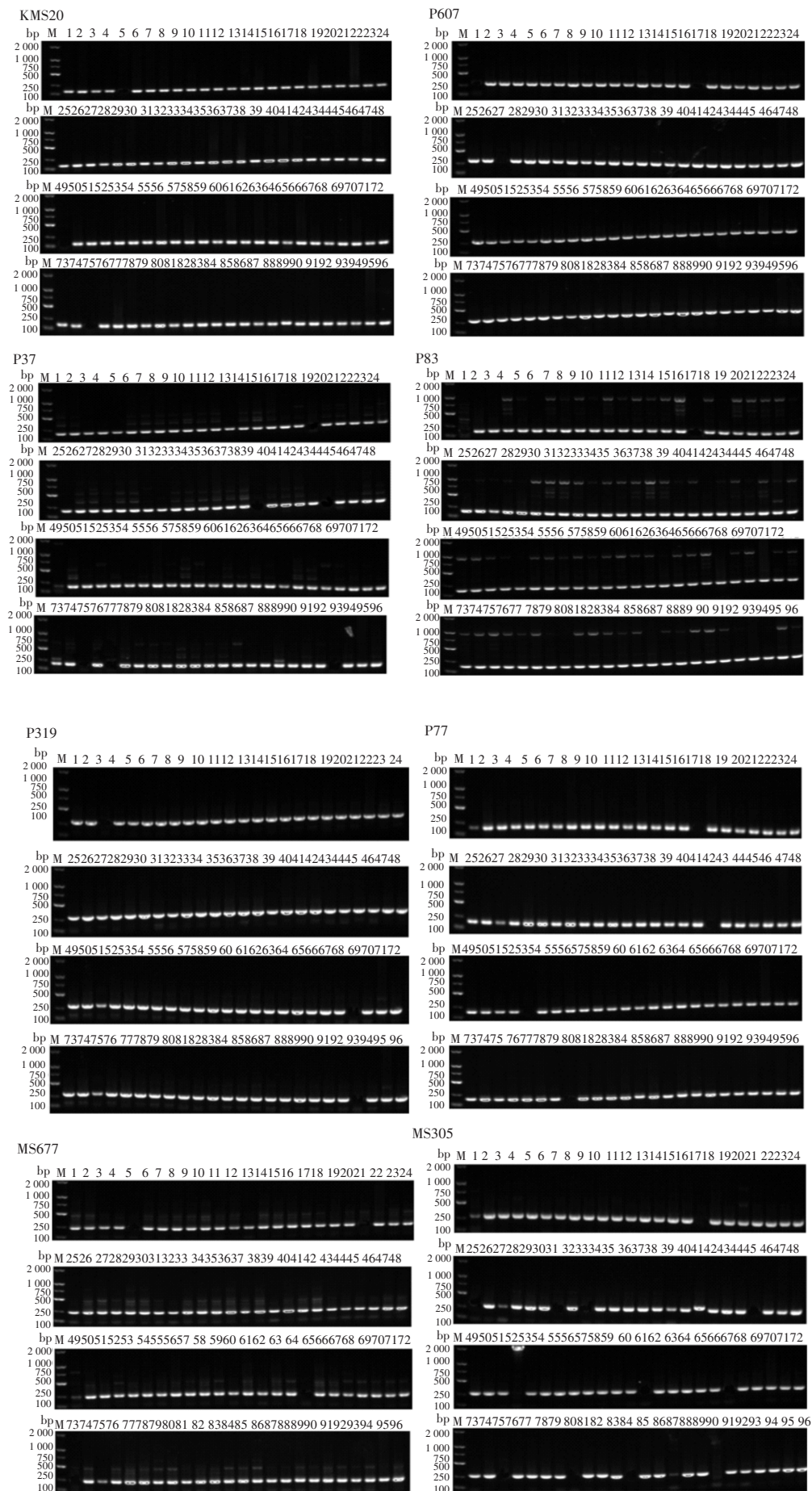
聚类分析结果显示,根据遗传距离远近将 96



M.DNA marker; 1~96. 稻瘟病菌基因组 DNA。下同
M.DNA marker; 1~96.Genomic DNA of *Pyricularia oryzae*.
The same below

图 1 稻瘟病菌特异性引物(RTF+RTR)对部分供试菌株基因组DNA的检测

Figure 1 Detection of genomic DNA of some test strains by specific primers of *Pyricularia oryzae* (RTF+RTR)



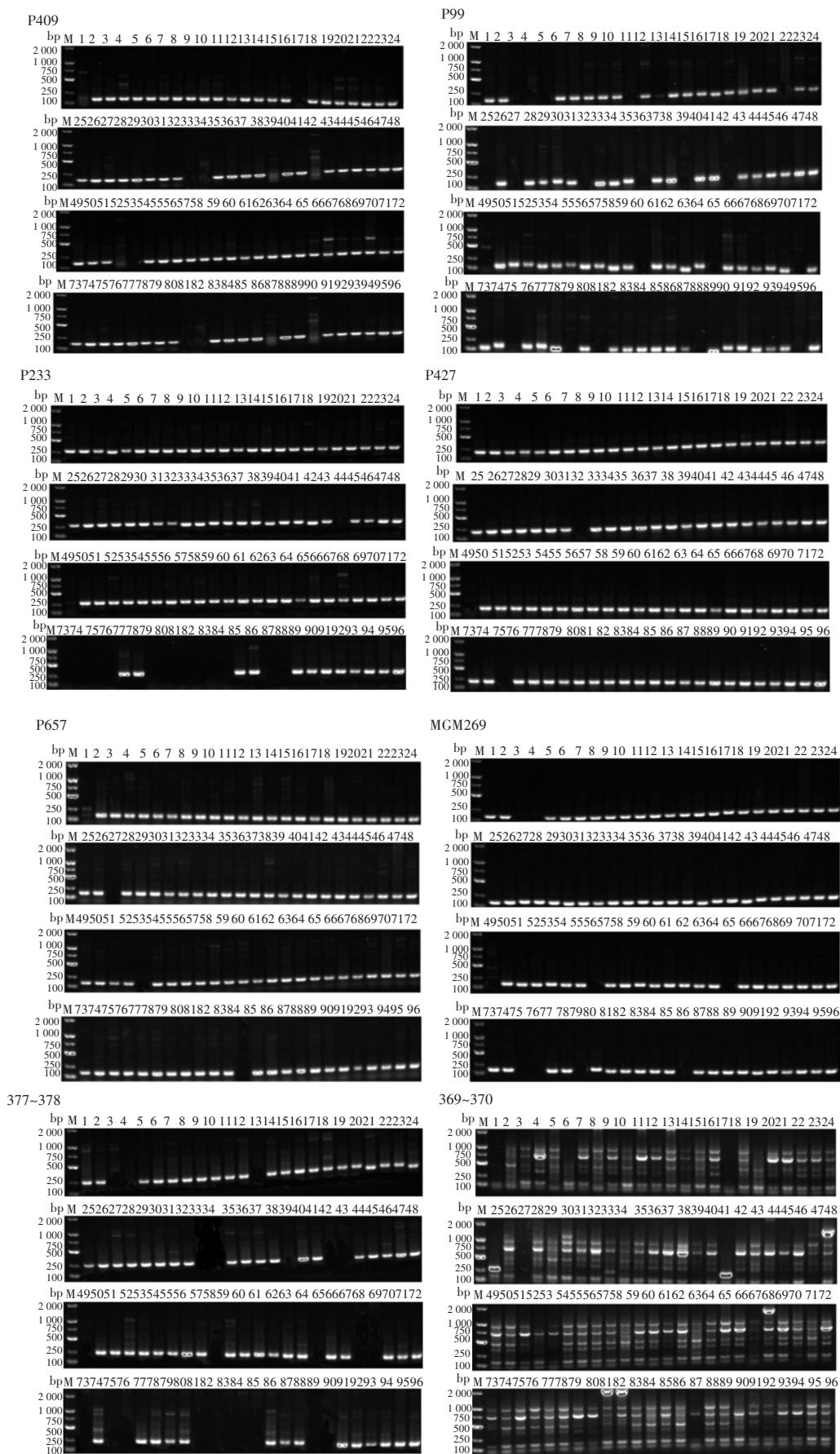


图2 SSR引物对96株稻瘟病菌株DNA的扩增结果

Figure 2 Amplification results of DNA of 96 strains of *Pyricularia oryzae* by SSR primers

表3 16对SSR引物对东北地区96株稻瘟病菌的PCR扩增结果

Table 3 16 PCR amplification results of *Pyricularia oryzae* in Northeast China using SSR primers

位点 Locus	扩增条带数 No. of bands	扩增效率/% Amplification efficiency	位点 Locus	扩增条带数 No. of bands	扩增效率/% Amplification efficiency
KMS20	93	96.88	P409	88	91.67
P607	93	96.88	P99	75	78.13
P37	90	93.75	P233	82	85.42
P83	94	97.92	P427	93	96.88
P319	93	96.88	P657	92	95.83
P77	92	95.83	MGM269	87	90.63
MS677	92	95.83	377~378	73	76.04
MS305	84	87.50	369~370	41	42.71

株稻瘟病菌划分为13个遗传宗谱(图3)。其中宗谱DQL02和DQL01分别包含37株、22株菌株,分别占总菌株数的38.54%和22.92%,为优势宗谱;宗谱DQL04、DQL06和DQL08为次要宗谱,分别包含9株、6株和6株菌株,占总菌株数的9.38%、6.25%和6.25%;其他8个宗谱为小宗谱,包含菌株为1~4株(表4)。总体来看,东北地区的优势稻瘟病菌菌株亲缘关系较远、组成复杂,稻瘟病菌群体遗传结构复杂多变,遗传信息丰富多样。

2.3.2 东北地区稻瘟病菌群体的遗传结构 分析分离自东北地区稻瘟病菌的遗传宗谱,发现分离自东北地区的稻瘟病菌所属的遗传宗谱类型复杂且存在差异,不同省份的稻瘟病菌群体都包括优势宗谱和稀有小宗谱。其中,供试辽宁省稻瘟病菌群体分属11个遗传宗谱,优势宗谱为DQL01和DQL02,分别包含15株和17株菌株,两者合占供试辽宁省稻瘟病菌总菌株数的52.46%;次要宗谱为DQL04、DQL06和DQL08,分别包含8株、6株和5株菌株,合占供试辽宁省稻瘟病菌总菌株数的31.15%;其余6个宗谱为小宗谱,均只包含1~4株菌株。供试吉林省稻瘟病菌群体由8个遗传宗谱组成,优势宗谱为DQL01和DQL02,分别包含6株和15株菌株,合占供试吉林省稻瘟病菌总菌株数的72.41%;其余6个宗谱有次要宗谱DQL04、DQL08,也有小宗谱DQL07、DQL09、DQL11和DQL12,4个小宗谱都只包含1~3株菌株。供试黑龙江省稻瘟病菌群体分属2个遗传宗谱,为优势宗谱DQL01和DQL02,分别包含1株和5株菌株,合占供试黑龙江省地区稻瘟病菌总菌株数的100%。结果表明,东北地区稻瘟病菌群体遗传宗谱多变复杂,每个群体均分属两个至多个遗传宗谱;其中3个群体中的优势宗谱均包含DQL01、DQL02,但次要宗谱和小宗谱组成不完全相同,显示出东北地区稻瘟病菌群体遗传关系的复杂多变(表5)。

2.4 东北地区稻瘟病菌群体遗传多样性

2.4.1 东北地区稻瘟病菌群体遗传分化分析 对96株稻瘟病菌进行遗传分化分析。结果显示,16对SSR引物共检测到多态性位点数16个,多态性位点率为100%。等位基因数为32,每个位点均能扩增出2个等位基因。平均有效等位基因数(N_e)为1.5596,变幅为1.319 5~1.994 1。平均Shannon's多样性指数(I)为0.525 1,变幅为0.357 0~0.691 7。平均Nei基因多样性指数(H_t)为0.345 5,变幅为0.203 6~0.498 5。复合群体平均杂合度的平均值为0.257 4,变幅为0.113 4~0.440 5;亚群体平均杂合度的平均值为0.214 6,变幅为0.098 9~0.331 5;同一位点的复合群体平均杂合度大于亚群体平均杂合度,且复合群体平均杂合度的平均值也大于亚群体平均杂合度的平均值,表明东北地区稻瘟病菌群体间的遗传多样性水平比群体内的遗传多样性水平高。平均基因流为2.506 0,平均基因差异分化系数为0.166 3,说明东北地区稻瘟病菌存在于群体间的遗传变异占群体总遗传变异的16.63%,存在于群体内遗传变异占群体总遗传变异的83.37%(表6)。

2.4.2 稻瘟病菌群体遗传多样性水平分析 稻瘟病菌群体在16个SSR标记位点的多态位点数介于3~16,东北13个地区群体间的平均有效等位基因数、平均Shannon's遗传多样性指数等遗传多样性指标存在明显差异,有一定程度的遗传分化存在于东北地区稻瘟病菌群体间。其中群体间平均Nei基因多样性指数变化范围为0.083 6~0.457 1,平均为0.204 1;平均多态百分率 P 变化范围为6.25%~100%,平均为45.67%。说明有一定遗传多样性差异存在于东北13个地区稻瘟病菌群体中,其中沈阳市稻瘟病菌群体、抚顺市稻瘟病菌群体、铁岭市稻瘟病菌群体的遗传多样性相对较高,其Nei多样性指数分别为0.444 1,0.457 1,0.381 5,Shannon's多样性指数分别为0.634 8,0.649 4,0.538 1,延边朝鲜族自治州稻瘟

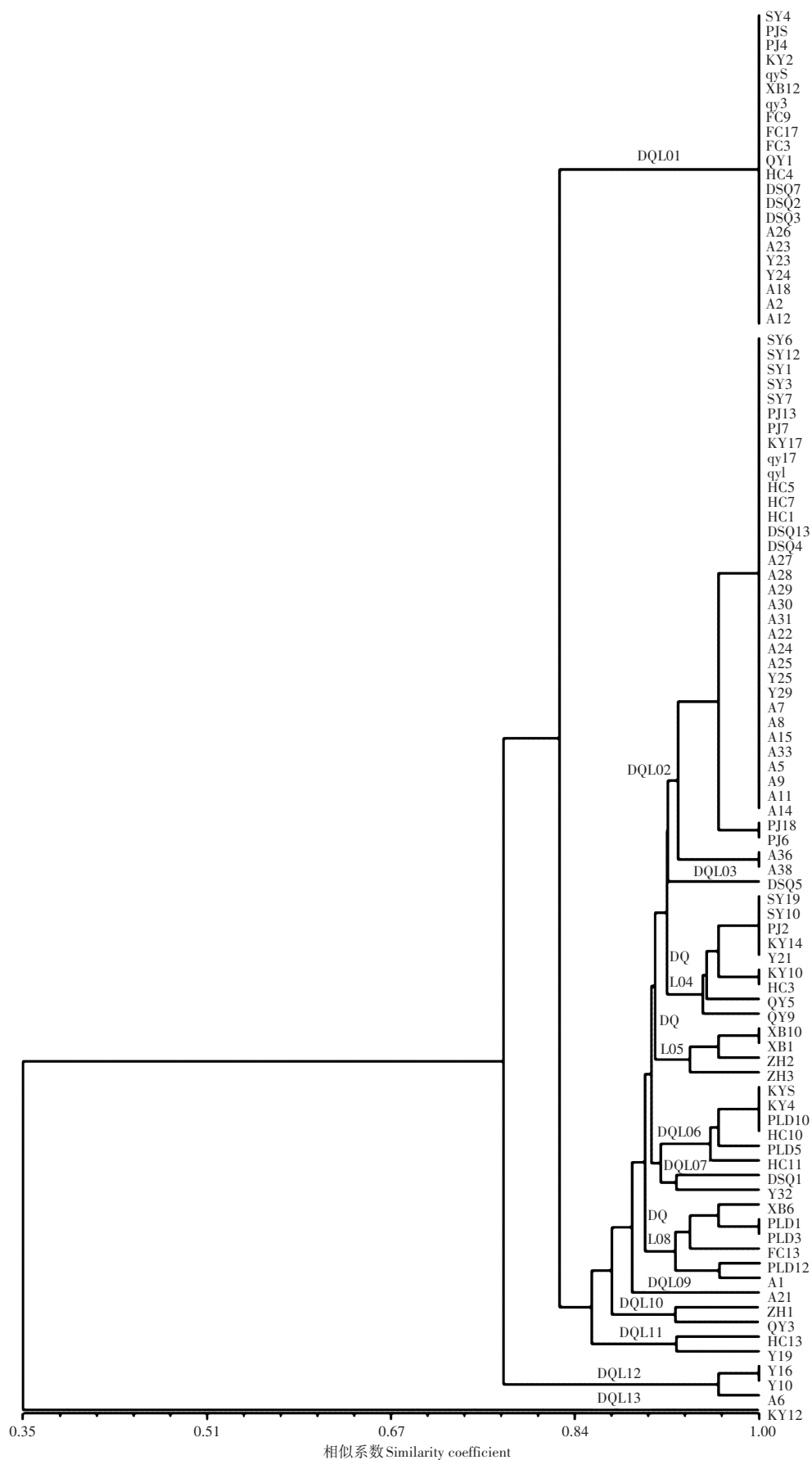


图3 基于SSR标记的稻瘟病菌聚类图

Figure 3 Cluster analysis diagram of *Pyricularia oryzae* based on SSR markers

表4 稻瘟病菌遗传宗谱

Table 4 Genetic lineage of *Pyricularia oryzae*

宗谱 Lineage	菌株 Strain	菌株数 No. of strain	所占比例/% Percentage
DQL01	SY4、PJ8、PJ4、KY2、qy5、XB12、qy3、FC9、FC17、FC3、QY1、HC4、DSQ7、DSQ2、DSQ3、A26、A23、Y23、Y24、A18、A2、A12	22	22.92
DQL02	SY6、SY12、SY1、SY3、SY7、PJ13、PJ7、KY17、qy17、qy1、HC5、HC7、HC1、DSQ13、DSQ4、A27、A28、A29、A30、A31、A22、A24、A25、Y25、Y29、A7、A8、A15、A33、A5、A9、A11、A14、PJ18、PJ6、A36、A38	37	38.54
DQL03	DSQ5	1	1.04
DQL04	SY19、SY10、PJ2、KY14、Y21、KY10、HC3、QY5、QY9	9	9.38
DQL05	XB10、XB1、ZH2、ZH3	4	4.17
DQL06	KY8、KY4、PLD10、HC10、PLD5、HC11	6	6.25
DQL07	DSQ1、Y32	2	2.08
DQL08	XB6、PLD1、PLD3、FC13、PLD12、A1	6	6.25
DQL09	A21	1	1.04
DQL10	ZH1、QY3	2	2.08
DQL11	HC13、Y19	2	2.08
DQL12	Y16、Y10、A6	3	3.13
DQL13	KY12	1	1.04

表5 东北地区稻瘟病菌群体遗传宗谱分布

Table 5 Genetic lineage distribution of *Pyricularia oryzae* population in Northeast China

省份 Province	菌株数 No. of strain	遗传宗谱(菌株数) Genetic lineage (No. of strain)
辽宁 Liaoning	61	DQL01(15)、DQL02(17)、DQL03(1)、DQL04(8)、DQL05(4)、DQL06(6)、DQL07(1)、DQL08(5)、DQL10(2)、DQL11(1)、DQL13(1)
吉林 Jilin	29	DQL01(6)、DQL02(15)、DSQ04(1)、DQL07(1)、DQL08(1)、DQL09(1)、DQL11(1)、DQL12(3)
黑龙江 Heilongjiang	6	DQL01(1)、DQL02(5)

病菌群体遗传多样性水平相对较高,而剩余地区稻瘟病菌群体的遗传多样性相对较低,哈尔滨市稻瘟病菌群体遗传多样性最低(表7)。

2.5 东北地区稻瘟病菌种群聚类分析

东北13个地区供试稻瘟病菌群体间的遗传距离为0.011 0~0.187 9,存在较大差异(表8)。按照遗传距离远近将13个地区稻瘟病菌群体划分为4个类群:大连市种群单独构成第1个类群,沈阳市种群、铁岭市种群、抚顺市种群构成第2个类群,延边朝鲜族自治州种群、辽源市种群、长春市种群构成第3个类群,吉林市种群、哈尔滨市种群、盘锦市种群、营口市种群、鞍山市种群、丹东市种群共同构成第4个类群。第2类群全部由辽宁省种群组成,第3类群全部由吉林省种群构成,反映出东北地区稻瘟病菌群体遗传谱系与其地理分布有一定联系;第1类群只包含大连市种群,第4类群包含辽宁省、吉林省、黑龙江省3省6个地区的种群,反映出东北地区稻瘟病菌群体遗传谱系的复杂多变。

供试东北3省稻瘟病菌群体间的遗传距离为0.011 0~0.187 9,存在较大差异(表9)。按遗传距离远近将东北3省稻瘟病菌群体划分为2个类群时,辽宁省种群和吉林省种群构成一个类群,黑龙江群体构成一个类群,从地理分布上看,辽宁省与吉林省相邻偏南部,黑龙江省最靠北,聚类分析反映出东北地区稻瘟病菌群体遗传谱系与地理分布存在一定相关性。

3 讨论与结论

稻瘟病菌种群遗传多样性一直是国内外相关科研工作者的研究热点,先后对不同地区的稻瘟病菌遗传结构及其遗传多样性水平等进行了分析,多数研究表明,稻瘟病菌群体具有复杂的遗传多样性^[17-18]。近年来,SSR分子标记技术越来越多地应用在病原菌群体遗传多样性研究^[19-20],表明利用SSR引物对病原菌群体遗传结构进行分析是可行的。

表6 稻瘟病菌群体的遗传分化分析

Table 6 Genetic differentiation analysis of *Pyricularia oryzae* population

位点 Locus	等位 基因数 Na	有效等位 基因数 Ne	Nei 基因多 样性指数 Ht	Shannon's 遗传 多样性指数 I	复合群体 平均杂合度 Composite population average heterozygosity	亚群体平均 杂合度 Subpopulations average heterozygosity	基因差异 分化系数 Genetic differentiation coefficient	基因流 Gene flow
369~370	2	1.590 9	0.371 4	0.558 4	0.301 7	0.286 5	0.050 3	9.447 4
377~378	2	1.994 1	0.498 5	0.691 7	0.440 5	0.331 5	0.247 6	1.519 1
KMS20	2	1.396 1	0.283 7	0.457 7	0.214 6	0.199 7	0.069 7	6.676 2
MGM269	2	1.715 6	0.417 1	0.607 8	0.333 8	0.289 0	0.134 4	3.220 7
MS305	2	1.815 7	0.449 2	0.641 5	0.376 3	0.311 2	0.173 0	2.389 7
MS677	2	1.374 5	0.272 5	0.444 1	0.156 1	0.127 0	0.186 6	2.178 8
P37	2	1.569 2	0.362 7	0.548 8	0.265 2	0.237 0	0.106 1	4.213 6
P77	2	1.462 8	0.316 4	0.496 2	0.234 7	0.215 9	0.080 4	5.716 5
P83	2	1.255 7	0.203 6	0.357 0	0.113 4	0.098 9	0.128 5	3.392 0
P99	2	1.982 1	0.495 5	0.688 6	0.433 0	0.332 0	0.233 3	1.643 5
P233	2	1.734 6	0.423 5	0.614 6	0.268 4	0.166 4	0.380 1	0.815 5
P319	2	1.319 5	0.242 1	0.406 6	0.136 9	0.115 1	0.159 6	2.631 9
P409	2	1.641 5	0.390 8	0.579 6	0.334 5	0.276 9	0.172 1	2.405 6
P427	2	1.319 5	0.242 1	0.406 6	0.136 9	0.115 1	0.159 6	2.631 9
P607	2	1.319 5	0.242 1	0.406 6	0.136 9	0.115 1	0.159 6	2.631 9
P657	2	1.462 8	0.316 4	0.496 2	0.234 7	0.215 9	0.080 4	5.716 5
平均值 Average		1.559 6	0.345 5	0.525 1	0.257 4	0.214 6	0.166 3	2.506 0

表7 稻瘟病菌群体遗传多样性水平比较

Table 7 Comparison of genetic diversity of *Pyricularia oryzae* populations

地区 Region	菌株数/株 No. of isolates	平均等位基因数 Average Na	平均有效等位基因数 Average Ne	平均 Shannon's 遗 传多样性指数 Average I	平均 Nei 基因多 样性指数 Average Ht	多态性 位点数 A	多态百分率 P/%
沈阳 Shenyang	8	2.000 0	1.812 1	0.634 8	0.444 1	16	100.00
盘锦 Panjin	7	1.187 5	1.153 9	0.119 3	0.083 6	3	18.75
铁岭 Tieling	7	1.812 5	1.719 8	0.538 1	0.381 5	13	81.25
抚顺 Fushun	8	2.000 0	1.844 9	0.649 4	0.457 1	16	100.00
大连 Dalian	8	1.312 5	1.213 0	0.179 5	0.122 0	5	31.25
丹东 Dandong	8	1.375 0	1.349 2	0.252 9	0.180 6	6	37.50
鞍山 Anshan	8	1.250 0	1.218 4	0.162 0	0.114 4	4	25.00
营口 Yinkou	7	1.312 5	1.283 8	0.208 9	0.148 7	5	31.25
哈尔滨 Harbin	6	1.062 5	1.011 8	0.018 5	0.009 9	1	6.25
延边 Yanbian	7	1.562 5	1.462 0	0.357 3	0.250 3	9	56.25
辽源 Liaoyuan	7	1.375 0	1.313 9	0.241 9	0.170 0	6	37.50
长春 Changchun	7	1.437 5	1.341 4	0.264 6	0.184 4	7	43.75
吉林 Jilin	8	1.250 0	1.188 8	0.153 9	0.106 4	4	25.00
平均值 Average		1.456 7	1.377 9	0.290 9	0.204 1	7	45.67

表8 东北地区稻瘟病菌群体遗传相似系数与遗传距离

Table 8 Genetic similarity coefficient and genetic distance of *Pyricularia oryzae* population in Northeast China

地区 Region	沈阳 Shenyang	盘锦 Panjin	铁岭 Tieling	抚顺 Fushun	大连 Dalian	丹东 Dandong	鞍山 Anshan	营口 Yinkou	哈尔滨 Harbin	延边 Yanbian	辽源 Liaoyuan	长春 Changchun	吉林 Jilin
沈阳 Shenyang	****	0.880 4	0.945 7	0.970 5	0.853 3	0.886 8	0.888 2	0.882 7	0.862 7	0.925 9	0.898 7	0.888 6	0.888 8
盘锦 Panjin	0.127 4	****	0.896 7	0.845 8	0.916 1	0.945 4	0.981 6	0.975 3	0.971 0	0.932 2	0.968 8	0.926 3	0.989 1
铁岭 Tieling	0.055 8	0.109 0	****	0.941 5	0.891 7	0.885 4	0.902 6	0.904 4	0.851 3	0.914 3	0.913 9	0.891 5	0.896 9
抚顺 Fushun	0.030 0	0.167 5	0.060 3	****	0.875 3	0.887 8	0.845 3	0.858 9	0.828 7	0.876 6	0.868 1	0.864 4	0.858 5
大连 Dalian	0.158 7	0.087 7	0.114 6	0.133 2	****	0.917 3	0.896 1	0.882 6	0.864 9	0.869 7	0.906 8	0.871 9	0.896 4
丹东 Dandong	0.120 2	0.056 1	0.121 7	0.119 0	0.086 3	****	0.927 9	0.956 1	0.914 6	0.903 3	0.939 6	0.912 1	0.960 9
鞍山 Anshan	0.118 6	0.018 6	0.102 4	0.168 1	0.109 7	0.074 9	****	0.954 8	0.950 5	0.944 3	0.948 8	0.904 7	0.970 6
营口 Yinkou	0.124 7	0.025 1	0.100 5	0.152 1	0.124 9	0.044 9	0.046 3	****	0.954 2	0.921 4	0.964 6	0.916 9	0.985 2
哈尔滨 Harbin	0.147 7	0.029 4	0.161 0	0.187 9	0.145 1	0.089 3	0.050 8	0.046 9	****	0.905 7	0.952 9	0.895 4	0.975 4
延边 Yanbian	0.077 0	0.070 2	0.089 6	0.131 7	0.139 7	0.101 8	0.057 3	0.081 8	0.099 0	****	0.960 6	0.934 4	0.942 1
辽源 Liaoyuan	0.106 8	0.031 7	0.090 0	0.141 4	0.097 8	0.062 3	0.052 6	0.036 1	0.048 2	0.040 2	****	0.973 5	0.979 7
长春 Changchun	0.118 1	0.076 6	0.114 9	0.145 8	0.137 1	0.092 0	0.100 1	0.086 8	0.110 5	0.067 9	0.026 9	****	0.938 3
吉林 Jilin	0.117 8	0.011 0	0.108 8	0.152 6	0.109 4	0.039 9	0.029 8	0.014 9	0.024 9	0.059 7	0.020 5	0.063 7	****

注:表中右上部分为遗传相似系数,左下部分为遗传距离。下同。

Note: In the table, the upper right part is the genetic similarity coefficient, and the lower left part is the genetic distance. The same below.

表9 东北地区稻瘟病菌群体遗传聚类分析

Table 9 Genetic cluster analysis of *Pyricularia oryzae* population in northeast China

省份 Province	辽宁 Liaoning	黑龙江 Heilongjiang	吉林 Jilin
辽宁 Liaoning	****	0.907 3	0.954 8
黑龙江 Heilongjiang	0.097 3	****	0.936 3
吉林 Jilin	0.046 3	0.065 8	****

本研究将从东北地区穗颈瘟病样中分离获得的96株稻瘟病菌单孢菌株作为供试菌株,利用16对SSR引物,根据遗传距离远近将供试96株稻瘟病菌分为13个遗传宗谱,其中包含2个优势宗谱DQL02和DQL01,3个次要宗谱,8个小宗谱。在群体水平上,东北地区稻瘟病菌群体间的遗传多样性水平比群体内的遗传多样性水平高,且存在于群体内的遗传变异占群体总遗传变异的83.37%。群体间平均Nei基因多样性指数变化范围为0.083 6~0.457 1,平均为0.204 1;平均多态百分率变化范围为6.25%~100%,平均为45.67%,说明有一定遗传多样性差异存在于东北13个地区稻瘟病菌群体中;这与刘翔等^[21]、刘树芳等^[22]对湖南和云南地区稻瘟病菌种群多样性的分析结果一致。因此,说明稻瘟病菌菌株群体遗传结构复杂,既存在较多的特异宗谱,又具有优势宗谱,遗传信息多样丰富,各地区稻瘟病菌具有群体遗传多样性的显著特征,这可能与稻瘟病菌为在自然条件下克服寄主抗性以避免寄主识别。真菌基因组适应的两种主要机制是有性生殖和准性生殖,但水稻稻瘟病菌的有性生殖尚未在田间观察到,性孢子仅在实验室环境中产生^[23]。因此,准性生殖很可能是导致稻瘟病菌群体遗传变异的主要机制^[24]。聚类分析结果表明东北13个地区稻瘟病菌群体间的遗传距离为0.011 0~0.187 9,存在较大差异,按遗传距离远近可将东北13个地区稻瘟病菌群体划分成4个类群,第2类群全部由辽宁省种群组成,第3类群全部由吉林省种群构成,这可能与稻瘟病菌群体所处的地理环境和气候因素有关。

在生产上,由于稻瘟病菌易变异且缺乏持久抗瘟品种,稻瘟病的发生可能日益严重,因此应加强稻瘟病菌群体遗传多样性研究,为了解水稻和稻瘟病菌之间的共同进化提供帮助,同时为选育新的抗稻瘟病水稻品种奠定理论基础^[25-26]。

参考文献:

- [1] DEAN R,VAN KAN J A L,PRETORIUS Z A,et al.The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology[J].Molecular Plant Pathology,2012,13(4):414-430.
- [2] LANGNER T,BIALAS A,KAMOUN S.The blast fungus decoded:Genomes in flux[J].mBio,2018,9(2):e00571-e00518.
- [3] 张鑫,任彬元,宋显东,等.东北三省水稻病虫害发生为害和防控现状分析[J].中国植保导刊,2018,38(8):61-66.
- [4] ODJO T,KOIDE Y,SILUE D,et al.Genetic variation in blast resistance in rice germplasm from West Africa[J].Breeding Science,2017,67(5):500-508.
- [5] 王伟舵,刘永锋.中国稻瘟病菌遗传多样性研究进展[J].江苏农业科学,2016,44(6):196-198.
- [6] FUKUTA Y,SUZUKI T,YANAGIHARA S,et al.Genetic variation of blast (*Pyricularia oryzae* Cavara) resistance in rice (*Oryza sativa* L.) accessions widely used in Kenya[J].Breeding Science,2019,69(4):672-679.
- [7] QUOC N B,TRANG H T T,PHUONG N D N,et al.Development of a SCAR marker linked to fungal pathogenicity of rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*[J].International Microbiology,2021,24(2):149-156.
- [8] LABBÉ J,MURAT C,MORIN E,et al.Survey and analysis of simple sequence repeats in the *Laccaria bicolor* genome,with development of microsatellite markers[J].Current Genetics,2011,57(2):75-88.
- [9] SEN S,SKARIA R,ABDUL MUNEER P M.Genetic diversity analysis in *Piper* species (Piperaceae) using RAPD markers[J].Molecular Biotechnology,2010,46(1):72-79.
- [10] COSTA R,PEREIRA G,GARRIDO I,et al.Comparison of RAPD,ISSR,and AFLP molecular markers to reveal and classify orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) germplasm variations[J].PLoS One,2016,11(4):e0152972.
- [11] WANG W J,SU J,CHEN K L,et al.Dynamics of the rice blast fungal population in the field after deployment of an improved rice variety containing known resistance genes[J].Plant Disease,2021,105(4):919-928.

- [12] 臧 威,张兰兰,张国民,等. 稻瘟病菌SSR反应体系的优化[J]. 中国农学通报,2007,23(6):174-178.
- [13] 李海伦,魏环宇,杨 伟,等. 水稻地方品种不同品系对田间稻瘟病菌群体遗传多样性的影响[J]. 植物保护,2022,48(3):142-150,158.
- [14] 兰 波,孙 强,杨迎青,等. 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[J]. 植物保护学报,2020,47(2):292-301.
- [15] 虞选杰,任佐华,管玲莉,等. 湖南桃江病圃丽江新团黑谷上稻瘟病菌遗传多样性分析[J]. 杂交水稻,2014,29(3):70-73.
- [16] 白珍安,任佐华,毛 莹,等. 桃江和浏阳病圃稻瘟病菌遗传多样性的SSR分析[J]. 湖南农业科学,2011(7):7-10.
- [17] XU X,YANG W,TIAN K,et al.Genetic diversity and pathogenicity dynamics of *Magnaporthe oryzae* in the Wuling Mountain area of China[J].European Journal of Plant Pathology,2019,153(3):731-742.
- [18] ABED-ASHTIANI F,KADIR J,NASEHI A,et al.Characterisation of *Magnaporthe oryzae* isolates from rice in peninsular Malaysia[J].Plant Breed,2016,52:145-156.
- [19] LONGYA A,TALUMPHAI S,JANTASURIYARAT C.Morphological characterization and genetic diversity of rice blast fungus,*Pyricularia oryzae*,from Thailand using ISSR and SRAP markers[J].Journal of Fungi,2020,6(1):38.
- [20] NGERNMUEN A,SUKTRAKUL W,DAMCHUAY K,et al.Substantial enhancement of high polymorphic SSR marker development using in silico method from 18 available rice blast fungus genome sequences and its application in genetic diversity assessment[J].Biologia,2019,74:1181-1189.
- [21] 刘 翔,任佐华,陈 娟芳,等. 利用SSR分析湖南桃江病圃丽江新团黑谷上稻瘟病菌的遗传多样性[J]. 西南农业学报,2015,28(6):2496-2500.
- [22] 刘树芳,张先闻,董丽英,等. 云南不同稻区稻瘟病菌群体遗传结构的SSR分析[J]. 中国农学通报,2023,39(12):123-130.
- [23] TSUJIMOTO NOGUCHI M.Parasexual recombination in *Magnaporthe oryzae*[J].Japan Agricultural Research Quarterly:JARQ,2011,45(1):39-45.
- [24] CHUMA I,ISOBE C,HOTTA Y,et al.Multiple translocation of the *AVR-Pita* effector gene among chromosomes of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* and related species[J].PLoS Pathogens,2011,7(7):e1002147.
- [25] RATA N,BISEN P,SINGH B,et al.Rice blast:Different aspects of breeding to achieve durable resistance[J].International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences,2017,6(8):2044-2050.
- [26] BRONDANI C,BRONDANI R P V,DA RESSURREIÇÃO GARRIDO L,et al.Development of microsatellite markers for the genetic analysis of *Magnaporthe grisea*[J].Genetics and Molecular Biology,2000,23(4):753-762.

[责任编辑 李 薇]