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

李海伦[1]， 魏环宇[1,2]， 杨 伟[1]， 李成云[1]， 刘永胜[3]，
王云月[1]， 王 扬[1]， 谢 勇[1*]

（1. 云南农业大学，云南生物资源保护与利用国家重点实验室，昆明 650201；
2. 昆明学院，昆明 650214；3. 合肥工业大学食品与生物工程学院，合肥 230601）

摘要 ‘月亮谷’是云南元阳梯田种植面积最大的地方籼稻品种，种植历史逾百年仍保持对稻瘟菌较稳定的田间抗性，我们猜测其原因与‘月亮谷’-稻瘟菌的群体互作有关。为此，本研究采用群体遗传学研究方法，利用稻瘟菌 16 对 SSR 引物，对从‘月亮谷’不同单粒传纯系、‘月亮谷’自然群体、现代品种‘合系 22-2’及云南元阳哈尼梯田环境中分离到的稻瘟菌进行遗传多样性分析，以了解不同‘月亮谷’纯系对稻瘟菌群体遗传结构的影响。结果显示，来源于梯田环境的稻瘟菌与不同水稻品种(系)的稻瘟菌群体遗传结构差异明显，梯田环境：$Ht=0.160\ 3$，$I=0.323\ 8$；水稻寄主群体：$Ht=0.092\ 9$，$I=0.200\ 9$。而且，分离自不同水稻品种(系)的稻瘟菌群体遗传结构差异也较大，Shannon's 遗传多样性指数、Nei 基因多样性指数和 PIC 的总体趋势是：‘月亮谷’感病纯系(L4、L3)＞‘月亮谷’自然群体(G5)＞‘月亮谷’抗病纯系(L1、L2)＞‘合系 22-2’(H6)。基于 neighbor-joining 的聚类分析发现，从环境(Y)中挑选的 30 株稻瘟菌和 6 个不同水稻寄主材料上分离到的稻瘟菌群体在相同相似系数下的遗传宗谱的数量变化趋势为：Y＞L4＞G5＞L3＞L1＞L2＞H6，说明现代品种对田间稻瘟菌群体产生的选择压力最大。水稻地方品种的抗病纯系群体对环境中稻瘟菌群体也产生了与现代抗性品种相类似的正向选择作用，而感病纯系和自然群体有利于稻瘟菌群体的稳定性选择。

关键词 水稻地方品种； 单粒传； 稻瘟病菌； 群体遗传； 定向选择

中图分类号： S435.111.41 **文献标识码：** A **DOI：** 10.16688/j.zwbh.2021194

Effects of rice landraces on the population genetic diversity of *Magnaporthe oryzae* in the field

LI Hailun[1]， WEI Huanyu[1,2]， YANG Wei[1]， LI Chengyun[1]， LIU Yongsheng[3]，
WANG Yunyue[1]， WANG Yang[1]， XIE Yong[1*]

(1. *State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-resources in Yunnan*, *Yunnan Agricultural University*, *Kunming* 650201, *China*; 2. *Kunming University*, *Kunming* 650214, *China*; 3. *School of Food and Biological Engineering*, *HeFei University of Technology*, *Hefei* 230601, *China*)

Abstract ‘Acuce’, an indica landrace with the largest planting area in Yuanyang terrace of Yunnan province, has been planted for more than a hundred years and still maintain relatively stable resistance to *Magnaporthe oryzae* in the field. We hypothesized that this phenomenon might be related with the population interaction between ‘Acuce’ and *M. oryzae*. In order to understand the effects of ‘Acuce’ SSD lines on population genetic structure of *M. oryzae*, the genetic diversity of *M. oryzae* isolated from air in Hani terrace environment, ‘Acuce’ SSD lines, ‘Acuce’ natural population and modern variety ‘Hexi 22-2’ were analyzed using 16 pairs of SSR primers based on population genetic methodology. The results showed that the genetic structure of *M. oryzae* population from terraced field environment was significantly different from that from different rice varieties (lines): for the isolates from terraced field environment, $Ht=0.160\ 3$, $I=0.323\ 8$, and for the isolates from rice

收稿日期： 2021-04-02 **修订日期：** 2021-09-08
基金项目： 国家自然科学基金(31260415,31760500)
* 通信作者 E-mail:yongx_km@163.com

host population, $Ht = 0.092\ 9$, $I = 0.200\ 9$. Moreover, the population genetic structure of *M. oryzae* was also significantly different among different rice varieties (lines). The general trend of Shannon's genetic diversity index, Nei gene diversity index and PIC from high to low were as followed: susceptible line (L4, L3), natural population (G5), resistant line (L1, L2), and 'Hexi 22-2' (H6). Based on the neighbor-joining clustering analysis, it was observed that the quantitative variation trend of genetic genealogy of 30 *M. oryzae* populations selected from the environment (Y) and six different rice host materials under the same similarity coefficient from high to low was as followed: Y, L4, G5, L3, L1, L2, and H6, which indicated that modern varieties had the greatest selection pressure on *M. oryzae* populations in the field. Similarly, the resistant SSD line also imposed positive selection on the population of *M. oryzae*, while the susceptible SSD line and natural population were conducive to the stable selection of *M. oryzae* population.

Key words　rice landrace;　single seed descent;　*Magnaporthe oryzae*;　population genetic;　directional selection

稻瘟病是全球危害最大、流行最广的水稻真菌病害之一，严重威胁水稻的生产[1-2]。稻瘟菌 *Magnaporthe oryzae* 为异宗配合的子囊菌，生理小种组成复杂，致病性变异频繁，常导致培育出来的抗病品种在大面积推广 3～5 年后就逐渐丧失抗性[3]。而在云南省元阳县哈尼梯田的传统地方水稻品种'月亮谷'已有上百年的种植历史，但尚未有稻瘟病大发生的记载[4]。

稻瘟病发生取决于水稻寄主抗病基因与稻瘟菌致病相关基因的互作。有关稻瘟菌抗病基因和稻瘟菌无毒基因的研究近年来取得了较大的进展。目前已命名的水稻稻瘟病抗病基因 100 余个，其中 24 个已被克隆[5-6]。除 *Pi-d2* 外，已克隆的抗病基因大多为具有核苷酸结合位点和富含亮氨酸重复区的 NB-LRR 类基因。此外，绝大部分为显性基因，少数为隐性基因，如 *pi21*。*pi21* 属于数量抗性基因(QTLs)，不能像其他 NB-LRR 基因一样引起水稻的完全抗性，即过敏性坏死反应，但能限制病斑的扩展[7]。目前已定位的稻瘟菌无毒基因约有 40 个，其中已经克隆的至少有 9 个[8-11]。已有研究表明，水稻-稻瘟菌符合基因对基因互作模式[12]，如 *Pita-AvrPita*。随着稻瘟病病害研究的深入，尤其是功能基因组研究的深入，水稻-稻瘟菌已经成为重要的植物病害研究模式[13]。

在生产中，稻瘟病的发生流行与水稻寄主品种-稻瘟菌的群体互作密切相关。然而，有关水稻地方品种遗传背景较一致的品种(系)与稻瘟病菌群体的互作规律还鲜有报道。一般经典群体遗传学理论认为，寄主对病原菌的选择分为正向选择(positive selection)和负向选择(negative selection)，即定向选择(directional selection)以及平衡选择(balancing selection)[14-15]。在元阳梯田环境中是否存在这种明显的选择作用，以及不同基因型的'月亮谷'纯系对稻瘟菌群体产生选择作用的规律目前未见报道。

因此，本研究对采自元阳哈尼梯田环境和'月亮谷'单粒传(single seed descent，SSD)纯系上分离到的稻瘟菌群体进行遗传多样性分析，比较其群体遗传结构。目的是探明不同基因型水稻品系对稻瘟病菌群体的选择方式，进而探索部分水稻地方品种持久种植的内在原因。

1　材料与方法

1.1　供试材料

供试水稻品种(系)共 6 个。'月亮谷'*Oryza sativa* ssp. *indica* 自然群体 G5 来源于元阳哈尼梯田农户自留种；'月亮谷'F_8 代单粒传纯系 L1、L2、L3、L4 由农户自留种 G5 经 8 代单粒传(SSD)获得，经人工接种稻瘟病菌抗性评价，L1、L2 抗病，L3、L4 感病；现代水稻品种'合系 22-2'(云南省农业科学院选育，常规粳稻，母本'喜峰'，父本'楚粳 4 号')。

1.2　方法

1.2.1　田间试验设计

供试的 6 个水稻品种(系)分别于 2015 年和 2016 年的 5 月－10 月种植于元阳哈尼梯田(元阳县箐口村)，按当地常规育苗方法育苗、移栽。每品种(系)1 个处理，3 次重复，每小区 30 m^2，完全随机区组排列。四周保护行种植'月亮谷'自然群体。所有施肥、水分管理均为当地传统方法，生长期间不喷施杀菌剂。

1.2.2　稻瘟菌的分离

1.2.2.1　水稻寄主上稻瘟菌的分离

2015 年－2016 年，连续 2 年在稻瘟病发生期(9 月)从田间随机采集 6 个水稻品种(系)的穗颈瘟样本(30 个/品系)，采用毛细管打孔单孢分离法进行单孢分离获得寄主菌株[16]。

1.2.2.2　梯田环境中稻瘟菌的分离

采集穗颈瘟样本的同时，从梯田环境中捕捉稻瘟菌孢子。通过固定式孢子捕捉仪(YFBZ1，河南云

飞科技发展有限公司)，按照说明书于田间捕捉孢子，为期 2 周。具体方法为：在上述试验地中按五点取样的方式布置孢子捕捉仪，于晴天定时开机 5～8 h(夜间 2:00一次日 10:00)，每 3 d 采集 1 次，共 5 次。每次采集结束后更换载玻片，将载玻片带回实验室用显微镜观察孢子数量，采用单孢分离法分离稻瘟菌获得环境菌株[17]。对分离到的稻瘟菌株根据来源不同进行统一编号(表 1)。

表 1　来源于环境和寄主的稻瘟菌单孢菌株信息

Table 1　Information of *Magnaporthe oryzae* strains isolated from the aerial environment and rice host

菌株编号 Code of strain	来源 Source	菌株数/株 Number of strains	样本采集时间/年-月 Sampling time
Y1-132	梯田环境 Y	132	2015－09/2016－09
L1-1～30	‘月亮谷’抗病纯系 L1	30	2015－09/2016－09
L2-1～30	‘月亮谷’抗病纯系 L2	30	2015－09/2016－09
L3-1～30	‘月亮谷’感病纯系 L3	30	2015－09/2016－09
L4-1～30	‘月亮谷’感病纯系 L4	30	2015－09/2016－09
G5-1～30	‘月亮谷’自然群体 G5	30	2015－09/2016－09
H6-1～30	‘合系 22-2’H6	30	2015－09/2016－09

1.2.3　稻瘟菌株的 SSR 遗传多样性分析

1.2.3.1　DNA 的提取与 PCR 扩增

采用 CTAB 法提取稻瘟菌单孢菌株基因组 DNA[18]。PCR 反应的 SSR 引物经多态性筛选后确定，为平均分布在稻瘟菌 7 条染色体上的 16 对引物(表 2)[19]。引物由北京硕擎生物技术服务有限公司合成。PCR 反应体系为 20 μL，包含2× master mix 10 μL、20 μmol/L 引物各 1 μL、DNA 模板 2 μL，ddH_2O 6 μL。PCR 反应程序为：94℃预变性 2.5 min；94℃变性 40 s，退火温度(表 2)下退火 30 s，72℃延伸1 min，36 个循环；最后 72℃延伸 10 min，4℃保存。PCR 产物用 6%聚丙烯酰胺变性胶电泳检测，并在凝胶成像系统下观察结果，采集图像。

表 2　用于本研究的 SSR 位点及引物信息

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

位点 Locus	染色体 Chromosome	引物序列(5′-3′) Primer sequence	退火温度/℃ Anneal temperature	预期片段大小/bp Expected fragment size
KMS20	1	F：TTGGGATCTTCGGTAAGACG R：GCCGACAAGACACTGAATGA	57	250
P607	1	F：CCCAAGCTCCATAATACGCTAC R：TCCGAGACTCTTTGGATAGCAC	57	270
P37	2	F：ACCCTACCCCCACTCATTTC R：AGGATCAGCCAATGCCAAGT	57	196
P83	2	F：GTCTGCCTCGACTCCTTCAC R：AGCCCAAAAACAGAAAGCAA	55	168
P319	2	F：TAAGACCACTGGCGGAATCT R：GGCTTTGTCTGGTTGTACGG	55	280
P77	3	F：AGGCTCTCTGCCTACGAAGT R：GCTTTCGGCAAGCCTAATC	55	172
MS677	3	F：TCGTGAGGGTTCCTATCTGC R：GACCTTTATCGGATGCGTGT	56	255
MS305	4	F：CGTGCCAGAAAGACCTGAAGC R：CAGGGGATGAACTCCGATGG	58	180
P409	4	F：TCCCAGTACTTGCCCATCTC R：ATCTCATATCCGTCGGTCGT	55	144
P99	5	F：CTAATTGCGGCTTAGGGTCA R：ACCTAGGTAGGTATACATGTTGTT	55	178
P233	5	F：TGAGATGGACCGCATGATTA R：TTGATGGCAGAGACATGTAGC	55	251

续表 1　Table 1(Continued)

位点 Locus	染色体 Chromosome	引物序列(5′-3′) Primer sequence	退火温度/℃ Anneal temperature	预期片段大小/bp Expected fragment size
P427	5	F：CTGTCACCACAACCAAGACG R：TTGCCCTGATTTGTCAGTCA	55	212
P657	6	F：ATCAGTCGAACCCACAAAGC R：ATGTGTGGACGAACCAGTCC	55	155
MGM269	6	F：GATGGCCAGGTCAGCTTTT R：ACTCTTTGCAGCCATGGAAC	55	266
377～378	7	F：CTAACGGCCGGCTAACAAG R：GTTTGCACAGTCGTCGTCCATTG	55	266
369～370	7	F：GCTAGCTTTCCGAGATTGCT R：TTCGCTTCTATGCCCTTGTT	55	250

1.2.3.2　数据的获取与分析

电泳中稳定清晰的扩增条带赋值为 1，无带为 0，构建二元数据矩阵。用 POPGENE（version 1.32）软件计算多态带数 AP 和多态带百分率 P、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*。聚类分析通过 DAWwin 6.0 和 MEGA 6 软件在 neighbor-joining 算法下按非加权配对法（UPGMA）完成，聚类分析由 Figtree1.4.2 完成。

2　结果与分析

2.1　稻瘟菌群体 SSR 遗传多样性分析

2.1.1　梯田环境中稻瘟菌群体 SSR 遗传多样性分析

利用 16 对 SSR 引物对梯田环境中捕获并分离到的 132 个稻瘟菌单孢菌株进行遗传多样性分析。扩增结果显示，稻瘟菌群体扩增产物大小在 100～500 bp 内，与预期大小一致；16 对 SSR 引物在梯田环境采集的 132 个单孢菌株中共检测到 16 个多态位点，多态位点百分率为 100%，在 16 个多态位点上共扩增到 43 个等位基因。每个位点扩增到的等位基因数有较大差异，在 2～4 个之间。扩增到等位基因数最多的位点为 P77，其扩增到 4 个等位基因。遗传多样性水平最高的位点也为 P77（*Ht*=0.514 8，*I*=0.941 3）。平均有效等位基因数（Ne）为 1.267 9，变幅为 1.040 3～2.061 0。平均 Shannon's 遗传多样性指数（*I*）为 0.323 8，变幅为 0.097 0～0.941 3。平均 Nei 基因多样性指数（*Ht*）为 0.160 3，变幅为 0.038 7～0.514 8（表 3）。

表 3　梯田环境中稻瘟病菌株在 16 个 SSR 位点上的遗传多样性

Table 3　Genetic diversity of *Magnaporthe oryzae* isolates from air in the terrace environment based on polymorphism analysis using 16 SSR markers

位点 Locus	染色体 No. of chromosome	等位基因数 Na	有效等位基因数 Ne	Shannon's 遗传多样性指数 *I*	观察杂合度 *Ho*	期望杂合度 *He*	Nei 基因多样性指数 *Ht*	多态性信息量 PIC
KMS20	1	2	1.096 3	0.186 7	0	0.088 2	0.087 9	0.084 0
P607	1	2	1.125 4	0.224 8	0.026 3	0.111 8	0.111 4	0.105 1
P37	2	2	1.208 6	0.314 8	0.019 7	0.173 2	0.172 6	0.157 7
P83	2	3	1.097 6	0.218 2	0	0.089 2	0.088 9	0.087 0
P319	2	2	1.140 2	0.242 6	0	0.123 3	0.122 9	0.115 3
P77	3	4	2.061 0	0.941 3	0.013 2	0.516 5	0.514 8	0.468 0
MS677	3	3	2.061 0	0.499 1	0.006 6	0.252 8	0.252 0	0.235 7
MS305	4	3	1.205 0	0.355 2	0.013 2	0.170 7	0.170 1	0.160 8
P409	4	2	1.067 9	0.144 7	0	0.063 8	0.063 6	0.061 6
P99	5	3	1.347 8	0.513 8	0.013 2	0.258 9	0.258 1	0.242 6
P233	5	3	1.310 8	0.479 9	0	0.237 9	0.237 1	0.223 9
P427	5	2	1.061 0	0.133 4	0.006 6	0.057 6	0.057 5	0.055 7
P657	6	3	1.047 3	0.119 0	0.006 6	0.045 3	0.045 1	0.044 3
MGM269	6	3	1.202 5	0.331 1	0	0.168 9	0.168 4	0.156 2
377～378	7	3	1.215 2	0.380 5	0.006 6	0.177 7	0.177 1	0.169 5
369～370	7	3	1.040 3	0.097 0	0	0.038 8	0.038 7	0.037 8
平均值　Average		2.687 5	1.267 9	0.323 8	0.007 0	0.160 9	0.160 3	0.150 3

2.1.2 寄主来源的稻瘟菌群体的 SSR 遗传多样性分析

从 6 个水稻材料上分离到的稻瘟菌群体中分别挑选 22 个，共 132 个菌株构建一个群体，进行遗传多样性分析。结果显示，16 对 SSR 引物从供试水稻品种上分离到的 132 个单孢菌株中共检测到 16 个多态位点，多态位点百分率为 100%，在 16 个多态位点上共扩增到 42 个等位基因。每个位点扩增到的等位基因数有较大差异，在 2～4 个之间，扩增到等位基因数最多的位点为 P77，共检测到 4 个等位基因；遗传多样性水平最高的引物为 MS677（Ht=0.426 6，I=0.667 6）。平均有效等位基因数（Ne）为 1.122 3，变幅为 1.045 1～1.743 8。平均 Shannon's 遗传多样性指数（I）为 0.200 9，变幅为 0.105 9～0.667 6。平均 Nei 基因多样性指数（Ht）为 0.092 9，变幅为 0.043 1～0.426 6（表 4）。

表 4 寄主来源的稻瘟病菌株在 16 个 SSR 位点上的遗传多样性

Table 4 Genetic diversity of *Magnaporthe oryzae* population from rice host based on polymorphism analysis using 16 SSR markers

位点 Locus	染色体 No. of chromosome	等位基因数 Na	有效等位基因数 Ne	Shannon's 遗传多样性指数 I	观察杂合度 Ho	期望杂合度 He	Nei 基因多样性指数 Ht	多态信息量 PIC
KMS20	1	2	1.149 4	0.253 3	0.080 9	0.130 4	0.129 9	0.121 5
P607	1	2	1.174 6	0.280 9	0.088 2	0.149 2	0.148 7	0.137 6
P37	2	2	1.052 8	0.119 6	0.007 4	0.050 3	0.050 1	0.048 8
P83	2	3	1.069 0	0.168 0	0.007 4	0.064 8	0.064 5	0.063 5
P319	2	2	1.052 8	0.119 6	0.007 4	0.050 3	0.050 1	0.048 8
P77	3	4	1.085 4	0.211 2	0.007 4	0.078 9	0.078 6	0.077 4
MS677	3	3	1.743 8	0.667 6	0.007 4	0.428 1	0.426 6	0.347 3
MS305	4	3	1.076 7	0.175 9	0.014 7	0.071 5	0.071 3	0.069 6
P409	4	2	1.045 1	0.105 9	0	0.043 3	0.043 1	0.042 3
P99	5	3	1.076 9	0.180 0	0.014 7	0.071 7	0.071 4	0.070 0
P233	5	3	1.060 9	0.149 2	0.014 7	0.057 6	0.057 4	0.056 4
P427	5	2	1.052 8	0.119 6	0.007 4	0.050 3	0.050 1	0.048 8
P657	6	3	1.108 2	0.162 8	0.014 7	0.09 8	0.050 1	0.092 9
MGM269	6	3	1.068 8	0.162 8	0.007 4	0.064 6	0.064 4	0.063 0
377～378	7	3	1.069 0	0.168 0	0.007 4	0.064 8	0.064 5	0.063 5
369～370	7	2	1.077 0	0.182 3	0	0.071 7	0.071 5	0.070 2
平均值 Average		2.619 3	1.122 3	0.200 9	0.017 8	0.096 2	0.092 9	0.088 8

2.1.3 来源于梯田环境与水稻品种（系）的稻瘟菌群体间遗传多样性的比较

随机挑选 30 个不同来源的稻瘟菌株组成 7 个群体，对这些不同来源的稻瘟菌群体进行遗传多样性分析。结果显示，这些群体在 16 个 SSR 标记位点的多态位点数介于 4（H6）～15（Y）个之间，各群体间的平均有效等位基因数、平均 Shannon's 遗传多样性指数、平均 Nei 基因多样性指数、平均期望杂合度、平均多态信息量、多态位点数差异较为明显，且梯田环境中的菌株群体各项指数明显高于水稻品种（系）上分离到的菌株群体。其中，群体间平均 Nei 基因多样性指数变化范围为0.042 8～0.246 3，平均为 0.134 4；平均多态信息量变化范围为 0.031 9～0.260 3，平均为 0.122 2。水稻品种（系）的稻瘟菌群体间总体趋势是感病纯系（L3、L4）和'月亮谷'自然群体（G5）的稻瘟菌多样性指数高于抗病纯系（L1、L2）和'合系 22-2'（H6）的稻瘟菌多样性指数（表 5）。

表 5 不同来源的稻瘟菌群体的遗传多样性比较

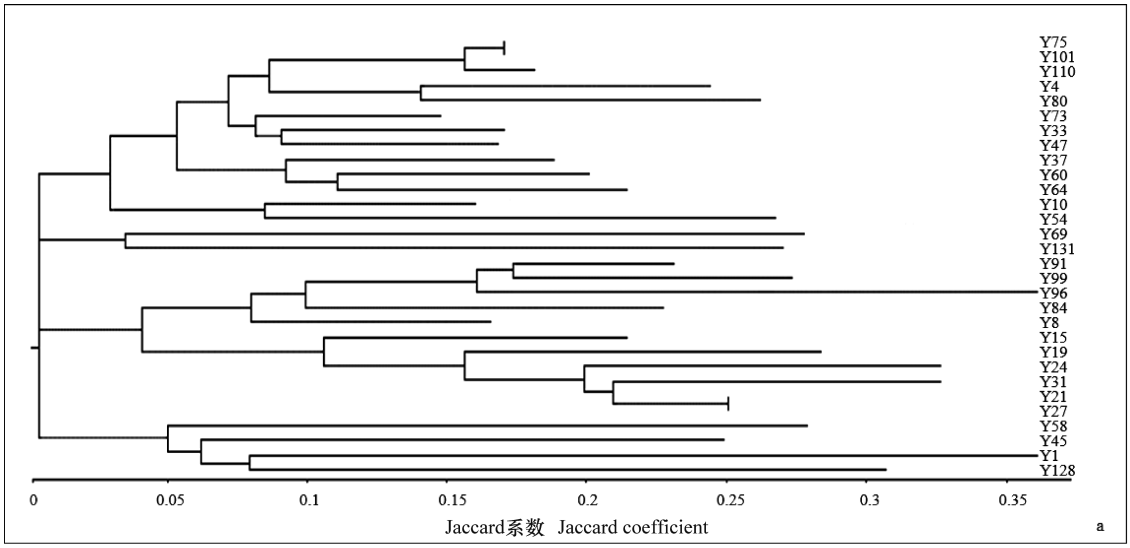
Table 5 Comparison of genetic diversity of *Magnaporthe oryzae* populations from different sources

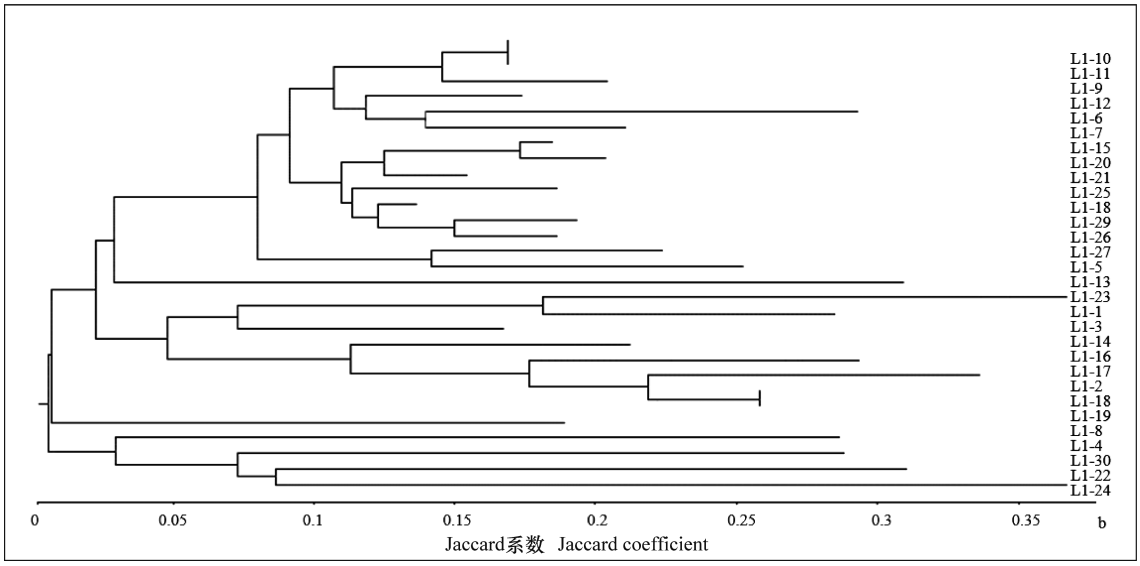
群体 Populations	菌株数/株 Number of isolates	平均等位基因数 Average Na	平均有效等位基因数 Average Ne	平均 Shannon's 遗传多样性指数 Average I	平均 Nei 基因多样性指数 Average Ht	多态百分率/% P	平均多态信息量 Arerage PIC	多态位点数 A
L1	30	1.588 2	1.125 0	0.163 2	0.092 3	58.820 0	0.081 2	10
L2	30	1.529 4	1.047 9	0.105 1	0.051 1	52.940 0	0.048 3	9
L3	30	1.599 4	1.148 9	0.168 8	0.098 1	47.060 0	0.085 2	8
L4	30	1.923 4	1.431 3	0.367 4	0.228 1	76.470 0	0.190 1	13
G5	30	1.882 4	1.245 0	0.310 4	0.182 5	76.470 0	0.158 4	13
H6	30	1.235 3	1.030 2	0.073 8	0.042 8	23.530 0	0.031 9	4
Y	30	1.933 4	1.588 9	0.401 9	0.246 3	80.000 0	0.260 3	15
平均值 Average		1.670 2	1.231 0	0.227 2	0.134 4	59.327 1	0.122 2	10.285 7

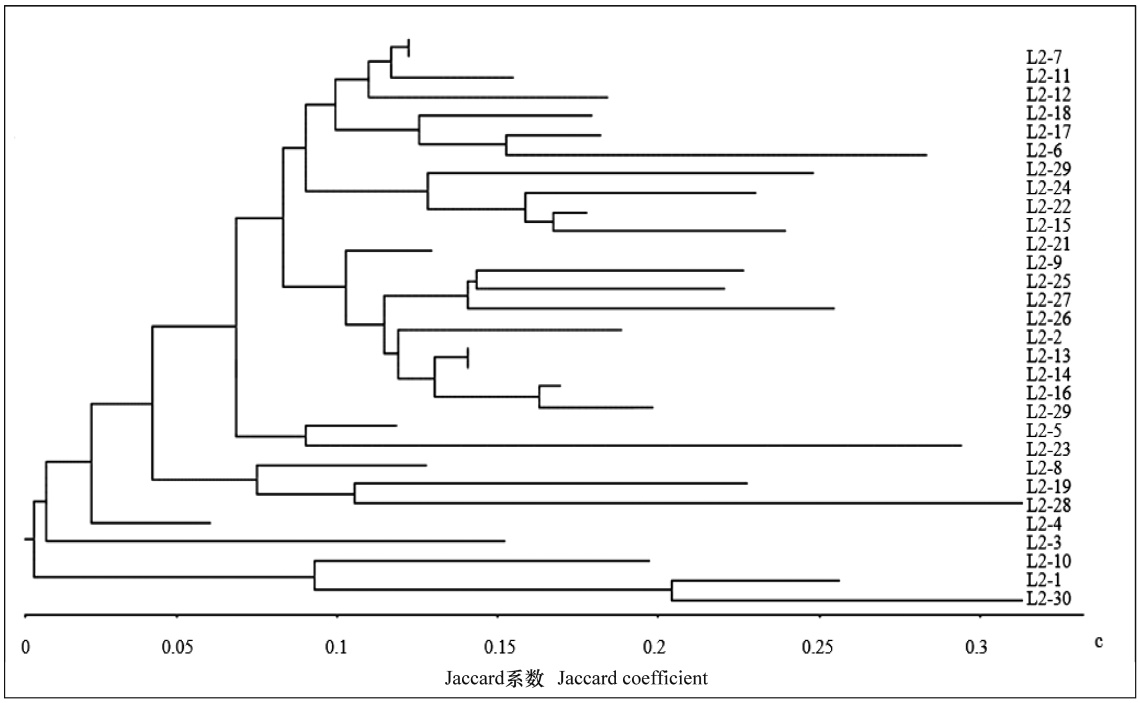
以上结果显示，梯田环境和水稻寄主上的稻瘟菌群体遗传多样性指数差异较大，且环境中稻瘟菌群体的遗传多样性指数远远高于来源于水稻寄主上的群体，即环境中稻瘟菌群体经水稻寄主选择后，遗传多样性明显降低。

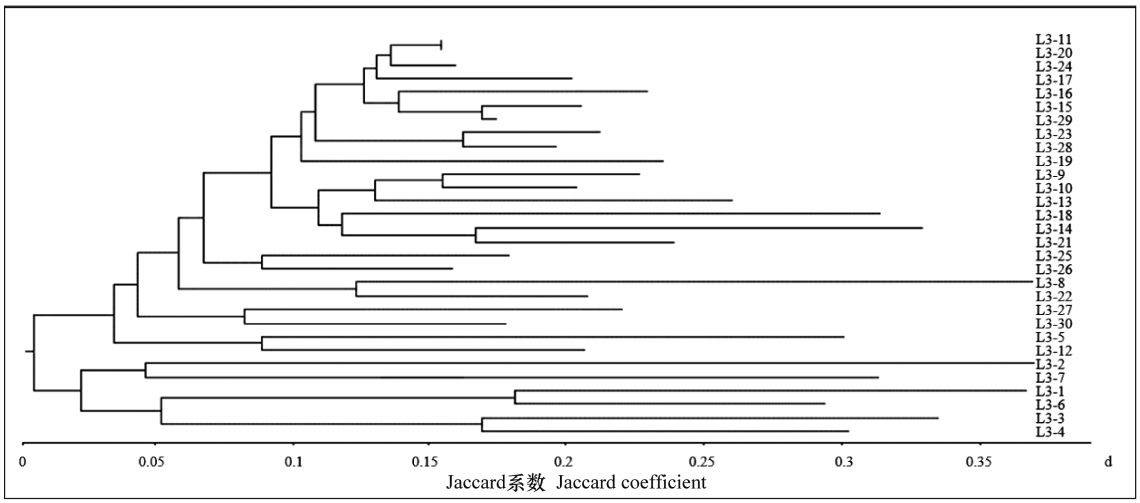
2.1.4　不同来源稻瘟菌群体的聚类分析

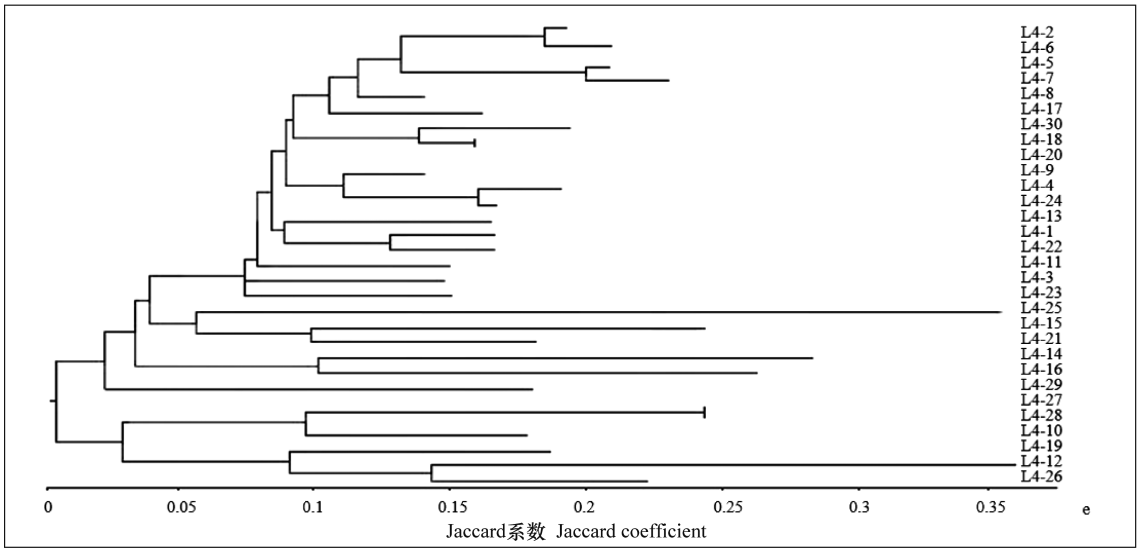
为比较不同来源稻瘟菌群体的遗传多样性，采用 neighbor-joining 建树方法，以 UPGMA 算法对 2015 年和 2016 年从 6 个寄主材料和梯田环境中分离到的 30 株（编号为 1～30）稻瘟菌群体进行聚类分析和遗传结构比较，连续两年得到了类似的研究结果。从 2016 年采集菌株的聚类图可以看出（图 1），在 Jaccard 系数 0.1 水平上，梯田环境中的菌株群体可以划分为 18 个不同的遗传谱系，菌株在各谱系分布均匀，不存在优势谱系；而 6 个寄主材料上分离到的稻瘟菌群体的遗传谱系差异较大，来自于各材料上的 30 个菌株可划分为 8～15 个谱系：L4：16，G5：14，L3：13，L1：12，L2：11，H6：8，各群体均存在一定比例的优势谱系。7 个稻瘟病菌群体的遗传种群趋势为：Y＞L4＞G5＞L3＞L1＞L2＞H6。说明不同抗、感基因型寄主群体对稻瘟菌群体的选择压力各不相同且选择压力大小趋势为：H6＞L2＞ L1＞L3＞G5＞L4。从改良水稻品种‘合系 22-2’（H6）上分离到的稻瘟菌群体遗传结构相对单一，且相似性水平较高，这表明其对稻瘟病菌群体的选择压力最大。

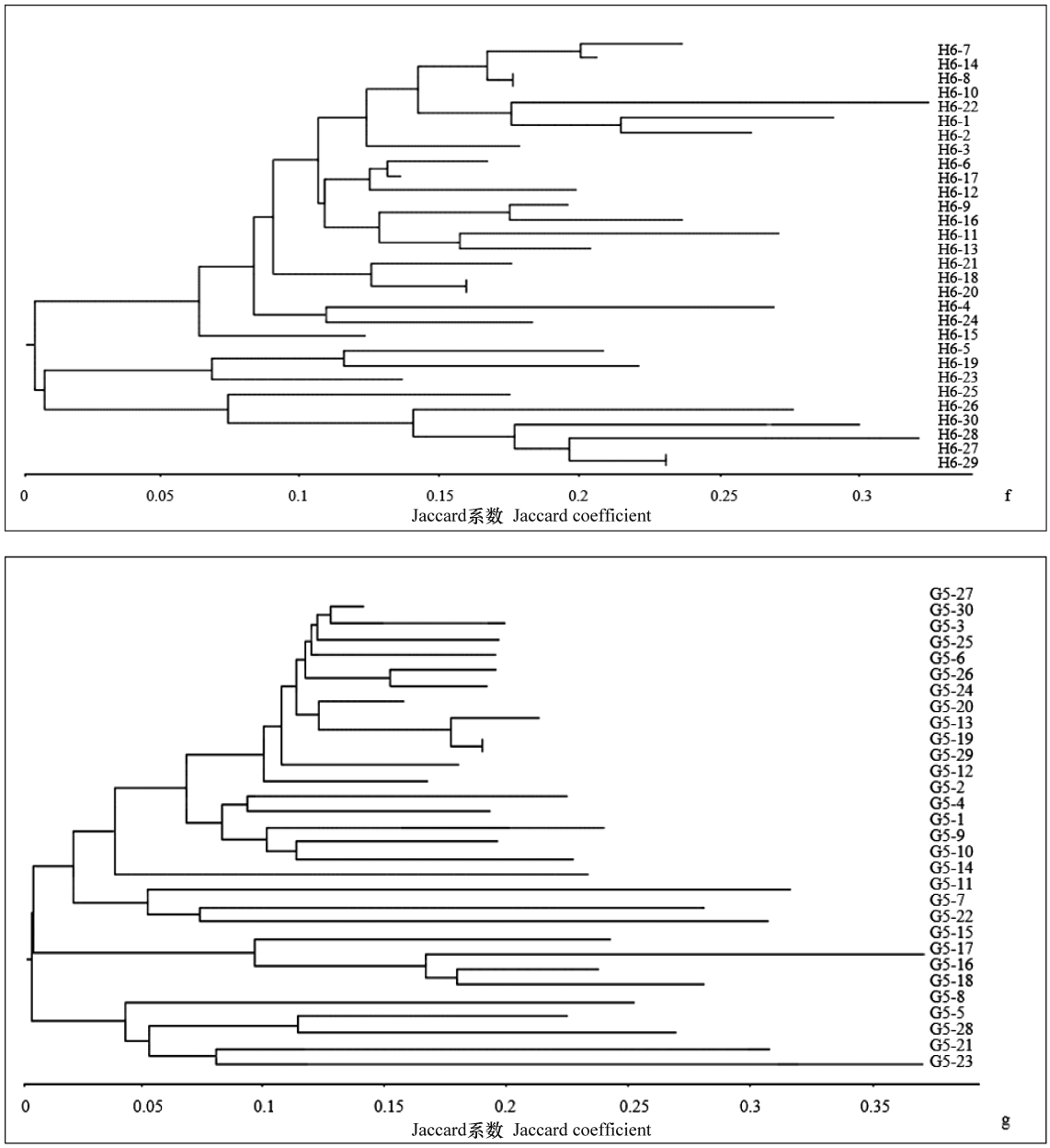





L2-7
L2-11
L2-12
L2-18
L2-17
L2-6
L2-29
L2-24
L2-22
L2-15
L2-21
L2-9
L2-25
L2-27
L2-26
L2-2
L2-13
L2-14
L2-16
L2-29
L2-5
L2-23
L2-8
L2-19
L2-28
L2-4
L2-3
L2-10
L2-1
L2-30
0
0.05
0.1
0.15
0.2
0.25
0.3
c
Jaccard系数 Jaccard coefficient


L3-11
L3-20
L3-24
L3-17
L3-16
L3-15
L3-29
L3-23
L3-28
L3-19
L3-9
L3-10
L3-13
L3-18
L3-14
L3-21
L3-25
L3-26
L3-8
L3-22
L3-27
L3-30
L3-5
L3-12
L3-2
L3-7
L3-1
L3-6
L3-3
L3-4
0
0.05
0.1
0.15
0.2
0.25
0.3
0.35
d
Jaccard系数 Jaccard coefficient


L4-2
L4-6
L4-5
L4-7
L4-8
L4-17
L4-30
L4-18
L4-20
L4-9
L4-4
L4-24
L4-13
L4-1
L4-22
L4-11
L4-3
L4-23
L4-25
L4-15
L4-21
L4-14
L4-16
L4-29
L4-27
L4-28
L4-10
L4-19
L4-12
L4-26
0
0.05
0.1
0.15
0.2
0.25
0.3
0.35
e
Jaccard系数 Jaccard coefficient



a: 梯田环境; b: 抗病纯系L1; c:抗病纯系L2; d: 感病纯系L3; e: 感病纯系L4; f: 现代品种‘合系22-2’H6; g: ‘月亮谷’自然群体G5
a: Captured isolates from the terraced field; b: Resistant line L1; c: Resistant line L2; d: Susceptible line L3; e: Susceptible line L4; f: Modern variety ‘Hexi 22-2’ H6; g: ‘Acuce’ natural population G5

图 1　基于 SSR 标记的 2016 年不同来源稻瘟菌菌株的聚类图

Fig. 1　Clustering dendrogram of *Magnaporthe oryzae* isolates collected in 2016 from various sources based on SSR markers

3　讨论

本研究选取的 16 对 SSR 标记分布在稻瘟菌的 7 条染色体上，能较全面地反映供试材料的遗传多样性和遗传背景。多样性指数分析的结果均表明梯田环境中稻瘟菌群体的遗传多样性水平远远高于水稻寄主材料上稻瘟菌群体的多样性。多态信息量(PIC)用于连锁分析时标记基因(标志序列)的多态性估计，现在常用来衡量座位多态性高低程度，本研究中梯田环境中菌株群体和寄主稻瘟病菌群体的 PIC 均值分别为 0.150 3 和 0.088 8，说明梯田环境中稻瘟菌株群体在测定的 16 个遗传位点上的多样性水平远远高于水稻寄主材料上分离到的稻瘟菌群体。从遗传进化的观点看，寄主与病原菌是一种“军备竞赛”(arm race)关系，这种协同进化(coevolution)使寄主的防卫系统与病原菌的致病因子形成

一种动态关系。元阳哈尼梯田种植水稻的历史超过1 300多年，独特的水稻生产模式保持了数量较多的地方品种。据统计，在这特定区域中种植的地方品种约为50个[20]。由于品种来源复杂，各品种内存在普遍的遗传异质性(intra-heterogeneity)，且品种内个体间存在抗性差异[21-22]。对‘月亮谷’单粒传纯系接种稻瘟菌后0～48 h的转录组分析发现，抗/感纯系差异表达基因在数量和表达时序上均存在较大差异(结果另文发表)，从群体遗传学与寄主-病原菌互作的角度看，这种品种内或品种间遗传异质性群体对稻瘟菌群体的选择方式与大面积栽培单一品种群体对稻瘟菌的选择方式应当存在较大差异。

多年来，对稻瘟菌的群体遗传多样性研究已有较多的报道，但绝大多数研究的样本都是来源于水稻寄主，忽略了田间环境的情况，难以反映栽培环境中稻瘟菌群体的组成结构。而本研究从梯田环境分离稻瘟菌，目的是了解梯田生态环境中稻瘟菌的群体遗传组成，以利于定量描述不同基因型品种(系)对环境中稻瘟菌群体的选择压力。本研究结果表明，单一的抗性品种(系)会显著降低稻瘟菌群体的遗传多样性，有大量的不同基因型稻瘟菌会因寄主抗性的选择压力而被淘汰。因此，从水稻寄主上分离稻瘟菌仅仅能了解稻瘟菌群体中的一部分。

本研究通过比较来源于不同水稻品种(系)和环境中稻瘟菌群体遗传多样性，证明了现代品种对稻瘟菌群体产生了较大的选择压力，单一品种大面积种植必然会造成具有毒性的稻瘟菌小种群体数量上升，导致病害流行。本研究中，来源于合系品种‘合系22-2’(H6)的稻瘟菌遗传多样性水平最低，是其对稻瘟菌群体的选择压力大的结果，这也可能是现代品种难以在哈尼梯田推广的一个原因。相反，传统地方品种‘月亮谷’丰富的遗传多样性促进了稻瘟菌群体的稳定选择，并保持相对的动态平衡，这也许就是一些地方品种能够持续种植的内在原因之一。因此，‘月亮谷’作为元阳梯田种植历史悠久的地方籼稻品种，中抗稻瘟病，其对栽培环境广泛的适应性和丰富的群体遗传多样性已经引起了很多学者的关注[4,20-23]。但‘月亮谷’是否携带抗稻瘟病相关基因，尤其是广谱抗性基因及可能存在的抗病新位点仍值得深入研究。

参考文献

[1] DEAN R, KAN J, PRETORIUS Z A, et al. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology [J]. Molecular Plant Pathology, 2012, 13(4): 414-430.

[2] OSÉS-RUIZ M, SAKULKOO W, MARTIN-URDIROZ M, et al. Two independent S-phase checkpoints regulate appressorium-mediated plant infection by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* [J]. Proceedings of the national Academy of Sciences, 2017, 114(2): E237-E244.

[3] 李婷，王建龙. 水稻稻瘟病抗性基因研究进展[J]. 作物研究，2012，26(6)：713-718.

[4] 夏欣，陈平，杨伟，等. 水稻地方品种‘月亮谷’纯系对田间稻瘟病菌的选择[J]. 植物保护，2018，44(4)：74-80.

[5] 马建，马小定，赵志超，等. 水稻抗稻瘟病基因 *Pi*35 功能性分子标记的开发及其应用[J]. 作物学报，2015，41(12)：1779-1790.

[6] 何峰，张浩，刘金灵，等. 水稻抗稻瘟病天然免疫机制及抗病育种新策略[J]. 遗传，2014，36(8)：756-765.

[7] ZHANG Yu, ZHAO Jianhua, LI Yali, et al. Transcriptome analysis highlights defense and signaling pathways mediated by rice *pi*21 gene with partial resistance to *Magnaporthe oryzae* [J/OL]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7: 1834. DOI: 10.3389/fpls.2016.01834.

[8] LI Jinbin, LU Lin, JIA Yulin, et al. Effectiveness and durability of the rice *Pi-ta* gene in Yunnan province of China [J]. Phytopathology, 2014, 104(7): 762-768.

[9] 韩艺娟，鲁国东. 水稻与稻瘟病菌相互作用研究进展[J]. 生物技术通报，2018，34(2)：25-37.

[10] 柏斌，吴俊，周波，等. 稻瘟病抗性分子育种研究综述[J]. 杂交水稻，2012，27(3)：5-9.

[11] 田妍，李承夏，邢俊杰. 水稻稻瘟菌无毒基因研究进展[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版)，2013(S1)：74-79.

[12] WANG Baohua, EBBOLE D J, WANG Zonghua. The arms race between *Magnaporthe oryzae* and rice: Diversity and interaction of *Avr* and *R* genes [J]. Journal of Integrative Agriculture, 2017, 16(12): 2746-2760.

[13] 陈其国，韦淑亚，章萍. 水稻与稻瘟病菌互作的分子机制研究进展[J]. 中国稻米，2018，24(3)：62-65.

[14] VITTI J J, GROSSMAN S R, SABETI P C. Detecting natural selection in genomic data [J]. Annual Review of Genetics, 2013, 47(1): 97-120.

[15] MCCLELLAN D A. Directional Darwinian Selection in proteins [J/OL]. BMC Bioinformatics, 2013, 14(S13): S6. DOI: 10.1186/1471-2105-14-S13-S6.

[16] 王英俊，邱梅. 一种高通量真菌的分离方法：CN201210554055.8 [P]. 2014-06-25.

[17] 谢勇，徐返，杨伟，等. 一种简易有效的气传植物真菌病害孢子的单孢分离法：CN201610000854 [P]. 2016-03-23.

[18] 刘丽，张永军，许长征，等. 一种改良的CTAB法提取产多糖真菌DNA[J]. 中国生物工程杂志，2014，34(5)：75-79.

[19] ADREIT H, SANTOSO, ANDRIANTSIMIALONA D, et al. Microsatellite markers for population studies of the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea* [J]. Molecular Ecology Notes, 2007, 7(4): 667-670.

(下转158页)

nivorous moth [J]. Evolutionary Ecology Research, 2004, 6(4): 607-618.

[23] 彭帅，郑丽霞，吴伟坚. 瓜实蝇对寄主植物的产卵选择性[J]. 环境昆虫学报，2013，35(2)：273-276.

[24] 张金龙，闫振华，方薛交，等. 瓜实蝇与南亚实蝇产卵选择性及种间竞争研究[J]. 云南农业大学学报(自然科学)，2017，32(3)：427-431.

[25] RATTANAPUN W, AMORNSAK W, CLARKE A R. *Bactrocera dorsalis* preference for and performance on two mango varieties at three stages of ripeness [J]. Entomologia Experimentalis et Applicata, 2009, 131(3): 243-253.

[26] 黄慧欣，李媛，黄爱玲，等. 橘小实蝇对5个品种火龙果果实的产卵选择[J]. 果树学报，2021，38(3)：394-402.

[27] 刘慧，陈泽铭，侯柏华，等. 桔小实蝇和番石榴实蝇幼虫取食阶段的种内竞争[J]. 环境昆虫学报，2015，37(6)：1163-1169.

[28] YANG Xiaofan, FAN F, MA Chunseng, et al. Effect of host plants on the development, survivorship and reproduction of *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae) under laboratory conditions [J]. Austral Entomology, 2016, 55(4): 433-438.

[29] 中国植物保护学会. 第十一次全国会员代表大会暨2013年学术年会论文集[C]. 北京：中国农业科学技术出版社，2013.

[30] 李定旭，雷喜红，李政，等. 不同寄主植物对桃小食心虫生长发育和繁殖的影响[J]. 昆虫学报，2012，55(5)：554-560.

[31] 王怡，孔维娜，郭永福，等. 不同寄主植物对梨小食心虫幼虫龄数的影响[J]. 山西农业科学，2018，46(9)：1515-1521.

[32] 王文倩，郑亚强，陈斌，等. 基于年龄-阶段两性生命表的不同寄主对马铃薯块茎蛾生长发育和繁殖力的影响[J]. 植物保护学报，2020，47(3)：488-496.

[33] 李引，冷春蒙，胡迪，等. 不同寄主植物对小菜蛾生长发育和繁殖的影响[J]. 西北农业学报，2019，28(3)：475-480.

[34] BURRACK H J, FORNELL A M, CONNELL J H, et al. Intraspecific larval competition in the olive fruit fly (Diptera: Tephritidae) [J]. Environmental Entomology, 2009, 38(5):1400-1410.

[35] GOGGIN F L. Plant-aphid interactions: molecular and ecological perspectives [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2007, 10(4): 399-408.

[36] HAFSI A, FACON B, RAVIGNÉ V, et al. Host plant range of a fruit fly community (Diptera: Tephritidae): does fruit composition influence larval performance? [J/OL]. BMC Ecology, 2016, 16(1): 40. DOI: 10.1186/s12898-016-0094-8.

[37] 苟玉萍. 不同寄主对异迟眼蕈蚊生物学参数及体内保护酶活性影响的研究[D]. 兰州：甘肃农业大学，2015.

[38] KRODER S, MESSING R H. A new parasitoid from Kenya, *Fopius ceratitivorus*, complements the extant parasitoid guild attacking Mediterranean fruit fly in Hawaii [J]. Biological Control, 2010, 53(2): 223-229.

[39] 何超，沈登荣，尹立红，等. 不同基质及颜色背景对井上蛀果斑螟产卵生物学的影响[J]. 植物保护，2020，46(5)：116-121.

[40] 刘路，周琼，宋傲群，等. 柑橘大实蝇对不同柑橘品种的产卵偏好和幼虫取食选择[J]. 昆虫学报，2014，57(9)：1037-1044.

[41] 梁萌，阿不都瓦哈·艾再孜，阿地力·沙塔尔. 枣实蝇对枣果挥发物的选择行为[J]. 林业科学研究，2020，33(2)：145-153.

[42] 金菊，阮赞誉，黄珍富，等. 莲雾果实挥发物对橘小实蝇的引诱作用[J]. 华南农业大学学报，2015，36(3)：71-77.

[43] LIENDO M C, PARRENO M A, PIETREK A G, et al. Infestation of fruit by conspecific and heterospecific females deters oviposition in two Tephritidae fruit fly species [J]. Journal of Applied Entomology, 2020, 144(8): 701-709.

[44] XAVIER C, DONALD K, MWANASITI B, et al. Identification of glutamic acid as a host marking pheromone of the African fruit fly species *Ceratitis rosa* (Diptera: Tephritidae) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(38): 9933-9941.

[45] BIRKE A, LOPEZ-RAMIREZ S, JIMENEZ-MENDOZA R, et al. Host marking pheromone and GF$^{TM}_{120}$ applied in a push-pull scheme reduce grapefruit infestation by *Anastrepha ludens* in field-cage studies [J]. Journal of Pest Science, 2020, 93(1): 507-518.

[46] 赵静，王华堂，曾鑫年，等. 卵表化合物对桔小实蝇产卵行为的影响[J]. 环境昆虫学报，2014，36(1)：89-94.

[47] 陈国发，闫峻，王鹏，等. 欧洲绕实蝇属昆虫信息化学物质及其应用研究进展[J]. 中国森林病虫，2018，37(6)：27-31.

[48] EL-GENDY I R, DRAZ K A, El-AW M A, et al. Interaction among peel hardness, fruit-age and gibberellic acid on infestation susceptibility of citrus fruits by peach fruit fly, *Bactrocera zonata* (Saunders) (Diptera: Tephritidae) [J]. African Entomology, 2020, 28(1): 125-132.

[49] 李媛，黄爱玲，黄慧欣，等. 橘小实蝇对三华李果实的产卵选择[J]. 南方农业学报，2020，51(2)：319-326.

[50] 郭腾达，姜莉莉，孙瑞红，等. 橘小实蝇危害3种苹果的风险评估[J]. 果树学报，2021，38(2)：231-241.

(责任编辑：杨明丽)

(上接150页)

[20] 高东，何霞红，朱有勇. 元阳水稻地方品种多样性变化及换种规律研究[J]. 植物遗传资源学报，2011，12(2)：311-313.

[21] 董超，徐福荣，杨文毅，等. 云南元阳哈尼梯田水稻地方品种‘月亮谷’的遗传变异分析[J]. 中国水稻科学，2013，27(2)：137-144.

[22] 翟婉婉，李雪萍，徐返，等. 云南水稻地方品种‘月亮谷’的群体多样性分析[J]. 植物遗传资源学报，2016，17(3)：423-432.

[23] LIAO Jingjing, HUANG Huichuan, MEUSNIER I, et al. Pathogen effectors and plant immunity determine specialization of the blast fungus to rice subspecies [J/OL]. eLife, 2016, 5: e19377. DOI: 10.7554/eLife.19377.

(责任编辑：杨明丽)