

台灣稻熱病菌之族群結構

段中漢^{1*}、陳冠穎¹

¹ 農業部農業藥物試驗所農藥應用組，臺灣 臺中市。

* 聯絡作者，E-mail: chduan1@hotmail.com

摘 要

段中漢、陳冠穎。2024。台灣稻熱病菌之族群結構。植物醫學 66(1_2): 15-30。

稻熱病為臺灣水稻重要病害，常對稻米產量及品質造成損失。本研究為探討臺灣各地稻熱病菌族群結構及族群間的基因流動，試將全島各縣市劃分為6區 (A~F)，每區隨機選取32株單孢菌株，共計192株用於本研究。為菌株基因分型，乃選用非致病基因*Avr-Piz-t*、簡單重複序列G5及5種Pyrms以及散置重複序列*Pot2* rep- PCR等分子標記進行試驗。多型性訊息指數 (PIC) 顯示，除Pyrms77B及Pyrms409低於0.1，*Pot2* rep- PCR及G5約為0.4，其他均達0.6以上，多屬資訊豐富的分子標記。另發現近1/3菌株同時兼具原*Avr-Piz-t*及插有*Pot2*轉座子之雙重等位基因。整合上述8種分子標記進行多基因座基因型分析，共得102種組合，亦即有102種基因型，其中75種基因型各僅有1支菌株，另27種基因型分別有2至15支菌株。各地區族群 (A-F) 分別有10、18、14、11、17及13種獨有基因型 (佔比55.0~66.7%)，但無任何基因型遍布6個地區。根據上述8種分子標記建構全台6個地區族群的遺傳距離樹狀圖顯示，花蓮台東族群迥異於其他族群，而西部各族群也與宜蘭族群有別。稻熱病菌族群遺傳多樣性指數分析顯示，苗栗-台中-南投族群遺傳變異最大，其次是宜蘭族群。本研究結論為，台灣稻熱病菌已在不同地區演化出基因型特異之族群結構，而不同地區族群間的基因流動率低，可能藉由人為輸送罹病種子、秧苗或稻穀之傳播。

關鍵詞：稻熱病菌、族群生物學

前 言

稻 (*Oryza sativa* L.) 屬禾本科 (Poaceae)，是糧食作物之一，全球有半數人口以其為主要熱量來源⁽²²⁾，而稻米也是臺灣民眾的主食。歷史悠久的臺灣水稻栽培兼具生產糧食、穩定生態及美化地景等多重功能，堪稱典範農業。近年稻作面積相

較於民國七十年代之前雖已大減，但兩期作總面積達23萬餘公頃，仍居所有作物之冠；以西部平原之彰化、雲林及嘉義等縣分列前三名，其他各縣市亦有面積不等的種植⁽⁴⁾。在臺灣，已知水稻病害計有67種⁽³⁾，稻熱病是最重要的病害。該病是每年必然發生的風土病，卻未必為害嚴重；但如遇連日降雨而蔓延成為流行病，則會對稻米產量及品質造成較大損失，這也是所有水稻品種必經稻熱病抗病檢定的緣故⁽⁷⁾。

稻熱病是由病原菌*Pyricularia oryzae* Cavara所引起，因其兼具學術價值與經濟重要性，曾被分子植物病理學期刊 (Molecular Plant Pathology) 票選為十大病原真菌之首⁽⁹⁾。該菌亦是植物病原真菌全基因解序的首例，並成為解析植物真菌性病害分子基礎的模式菌種⁽¹⁰⁾。稻熱病菌基因體學的資訊不僅可用以全域視角來研究病原菌的分子植物病理學，也對稻熱病菌族群遺傳研究供應許多分子標記 (molecular marker)。族群遺傳學 (population genetics) 探討病原菌族群結構及演化動力如：天擇、突變、基因流動 (gene flow) 及遺傳漂變 (genetic drift) 等對族群結構的影響。而流行病學 (epidemiology) 探討病原菌族群在寄主植物族群的感染、傳播、分布、發展、致病性及抗藥性等，則對形塑病原菌族群結構深具影響力。族群遺傳學的研究工具，如遺傳標記、取樣技術及分析方法等，亦可應用於流行病學追蹤病原菌在不同時間與空間的動態分布^(27, 28)，而流行病學提供病原菌族群的動態訊息則可作為抗病育種及部署抗病品種的參考。將植物流行病學與族群遺傳學的概念與方法結合而成的族群生物學 (population biology)，已有許多案例證實能更有效的用以解決病害問題⁽²⁸⁾。因而，許多植物病理學者已意識到植物病原菌族群結構的解析對研究植物病理學及遂行有效病害防治的重要性⁽²⁷⁾。

稻熱病菌以其大量分生孢子為主要感染源，每一分生孢子通常由3個細胞所構成，每一細胞可能有不同的細胞核配置 (nuclear configuration)^(34, 35)，顯示本菌遺傳變異潛力大，對抗病育種與藥劑防治均構成嚴峻挑戰。以分子標記探討台灣地區稻熱病菌族群結構，利於對快速演化的稻熱病菌掌握其族群現況與演化方向，為防治決策提供科學證據，是病害防治成功的基

礎。解析稻熱病菌族群結構，首須建立一套適用的分子標記系統。水稻已知有超過100種抗病基因 (resistance gene, *R*)，稻熱病菌則已有40種非致病基因 (avirulence gene, *Avr*) 與水稻上對應的抗病基因以基因對基因 (gene for gene) 的關係產生抗病反應⁽⁴⁶⁾。如某一非致病基因存在於部分稻熱病菌菌株，但在另一些菌株則否，或有突變基因產生，則此一非致病基因就能成為稻熱病菌族群的多型性標記 (polymorphic marker)⁽⁴⁴⁾。我們藉由聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 檢測菌株中非致病基因的種類與檢出率，就可作為分子標記供族群分析之用。

真菌基因體含有許多重複序列 (repeated sequences)，主要分為兩類，分別是串聯重複序列 (tandem repeats) 及散置重複序列 (interspersed repeats)⁽¹¹⁾。此兩者的區別在於重複序列是否相鄰，相鄰的就是串聯重複序列，不相鄰的就是散置重複序列，這些序列因長短及位置不同而可用為真菌族群的分子標記。屬串聯重複序列的簡單重複序列 (simple sequence repeats, SSRs) 亦稱微衛星 (microsatellite)，是基因多型性的一種。簡單重複序列在菌種基因體中廣泛存在，一般是以1-6個核苷酸為重複單位^(18, 40)，這類序列已用於稻熱病菌族群遺傳研究與建構其基因圖譜 (genetic map)^(37, 47)。李氏等根據稻熱病菌基因體序列資料庫，開發出17組簡單重複序列標記，發現其中D4、G5及H4等3組序列具高度多型性，已用於稻熱病菌族群分析⁽²⁵⁾。此外，Adreit及Kaye等亦根據前述資料庫分別開發出18及24組代號Pyrms系列的簡單重複序列基因座 (locus)，並以其為分子標記用於稻熱病菌族群研究及建構其遺傳圖譜^(1, 21)。Pyrms系列分子標記曾用於分析非洲地區多達二千餘株稻熱病菌的大規模試驗，我們擬自此研究中選取其呈現變異較大的5種作為本研究分子標記的一部分⁽³²⁾。屬散置重複序列的轉座子 (transposon) *Pot2*也是一種多型性分子標記，已用於稻熱病菌族群分析⁽¹⁵⁾。利用反覆因子序列聚合酶連鎖反應 (repetitive element-based PCR, rep-PCR) 增幅介於*Pot2*之間不同長度的核酸片段，並於電泳膠片 (gel) 上呈現其條帶型 (banding pattern)，可用為製作稻熱病菌指紋圖譜 (DNA fingerprint)，此亦有數篇報告發表^(5, 15, 19, 20)。

近年來，台灣稻熱病菌的研究多著重在其病原性及其相關基因於族群之分布，故多以非致病基因及病原性做為其族群研究的標記，其他分子標記較少觸及^(8, 38, 39)。稻熱病雖為台灣最大面積作物水稻的重要病害，但針對其族群作系統性研究並不多見。本研究嘗試以2019迄2023年採自台灣各地區的稻熱病菌，針對其族群基因型結構與變異進行分析。我們將全台依縣市別劃分為北中南東等6區，每區選取32株稻熱病菌，總計192株，先用分子標記進行菌株基因型鑑定 (genotyping)，再就各區內與區間稻熱病菌族群基因型變異相關參數進行計算分析。分析結果希能回應以下問題：(一)、台灣稻熱病菌族群基因型結構現況，(二)、不同地區稻熱病菌族群間的基因流動率，

(三)、稻熱病菌族群基因型與地理區的關係。

材料與方法

菌株採集與保存

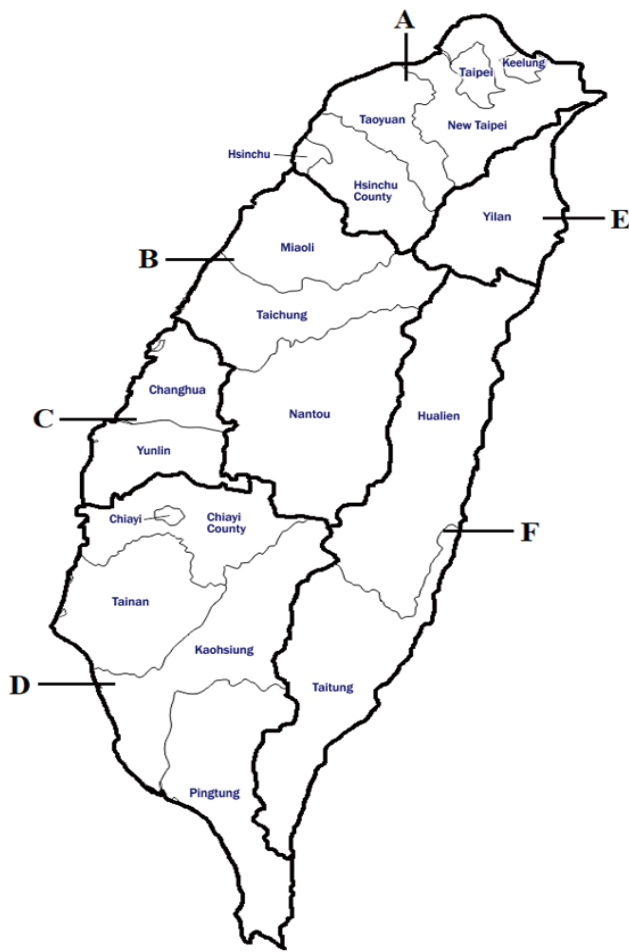
自2019年起迄2023年，先後前往臺灣各縣市，以其所轄鄉鎮區為單位逢機採集罹稻熱病之水稻葉片，一及二期稻作均為採樣對象。於田間採得具稻熱病典型病斑稻葉，攜返實驗室後，先以自來水沖洗葉片並拭乾，再剪取具病斑之稻葉片段置於載玻片，放入經噴水潤濕之9-cm玻璃培養皿，於室內(24~28℃) 靜置至次日，以待其產孢。將病斑上新產生的稻熱病菌分生孢子以移植針刮至裝有2%水瓊脂 (water agar) 之9-cm平板，於立體顯微鏡下以玻璃針單孢分離法獲得單孢菌株，總計430株，每一菌株均來自不同的採樣稻田。單孢菌株培養於馬鈴薯葡萄糖洋菜培養基 (potato dextrose agar, PDA, Difco™, USA) 平板，置24℃無光照之定溫箱5日。培養所得之菌種平板以直徑5 mm打孔器切取菌落周緣菌絲塊，放入內裝1 mL無菌水之2-mL冷凍小管 (cryogenic vial, Nalgene Co., USA)，置16℃定溫箱作長期保存。為進行台灣各地區稻熱病菌族群特性分析，原擬將全台劃分為西部之北、中、南及東部等四區。但因分析結果證實宜蘭族群結構異於花東族群，故予獨立，而西部之彰化及雲林兩縣因稻作面積分列全台前二名，且合計面積佔比超過全台1/3，故又將其獨立而出，是以總計劃為6區：A區 (台北、桃園、新竹)、B區 (苗栗、台中、南投)、C區 (彰化、雲林)、D區 (嘉義、台南、高雄、屏東)、E區 (宜蘭) 及F區 (花蓮、台東) (圖一)。自所獲菌株中，每區逢機選取32支菌株組成該區供試族群，6區合計192株 (補充表一)。

核酸萃取與分子標記

本稻熱病菌族群分析是綜合多種分子標記以鑑別各菌株基因型 (genotype) 並進行各區族群參數分析。所用分子標記均使用聚合酶連鎖反應技術，故需抽取菌株基因體去氧核糖核酸 (genomic DNA)。供試菌株先自2-mL冷凍小管中將其菌絲塊移置於馬鈴薯葡萄糖洋菜培養基平板，於24℃黑暗定溫箱培養5日以獲得所需菌絲。於刮取菌絲後，再以核酸萃取套組 (AllPure Plant Genomic DNA Kit, 百歐生技公司，臺灣) 抽取菌株基因體去氧核糖核酸供後續試驗之用。本研究使用的分子標記及其操作方法臚列如次。

Avr-Piz-t 基因

先由預備試驗篩選台灣已報告之6種稻熱病菌非致病基因：*Avr-Pi9*、*Avr-Pib*、*Avr-Pik*、*Avr-Pita1*、*Avr-Ptr*及*Avr-Piz-t*^(38, 39, 43)，以視其是否具基因多型性，供試菌株則用先前已發表報告中的28株菌⁽¹²⁾。篩選試驗的聚合酶連鎖反應液含



圖一、供試稻熱病菌菌株採樣地區分布圖。

Fig. 1. Thirty-two isolates of *Pyricularia oryzae* were collected from A to F geographical regions each in Taiwan. This map was retrieved and modified from Adobe stock#276118568.

12.5 μ L 主混合液 (master mix) PowerAmp 2X PCRmix-Green (慧眾生技公司, 臺灣), 其成分為 1.25 units Taq DNA polymerase、0.4 mM 4種dNTP及3mM $MgCl_2$ 。反應前加入各基因前後向引子各1 μ L (10 μ M)^(39, 44)及2 μ L (10 ng) 基因體去氧核糖核酸, 再加水至總體積為25 μ L。聚合酶連鎖反應以基因擴增儀 (Thermal Cycler) Biometra TAdvanced 96G (Analytik Jena GmbH, Germany) 進行基因增幅反應。增幅條件先為95 $^{\circ}$ C, 10 min, 接著進入35次增幅循環, 每一循環之變性溫度 (denaturation temperature) 為95 $^{\circ}$ C, 30 sec; 引子黏合溫度 (annealing temperature) 為55 $^{\circ}$ C, 30 sec; 延伸溫度 (extension temperature) 為72 $^{\circ}$ C, 1 min; 最後再以72 $^{\circ}$ C, 7 min結束反應。每菌株取增幅產物2 μ L於2%瓊脂糖電泳膠片 (agarose gel) 以100V, 40 min進行電泳分離, 經溴化乙錠 (ethidium bromide) 染色後, 以照膠系統FloGel (型號: FGIS-2) (科光生物公司, 臺灣) 觀察結果 (以下同)。篩選結果顯示, *Avr-Piz-t*是唯具多型性之非致病基因, 即部分菌株有此基因

產物, 部分菌株無之 (補充表二)。乃以*Avr-Piz-t*作為本研究分子標記之一, 其族群分析之聚合酶連鎖反應條件如上, 但引子黏合溫度經溫度梯度試驗調為52.5 $^{\circ}$ C, 以能同時獲得*Avr-Piz-t*之原始基因及插有轉座子*Pot2*之突變基因增幅產物。

G5簡單重複序列

先就李氏等依稻熱病菌基因組序列資料庫所建構並篩選之3種具高度多型性簡單重複序列分子標記 (D4、G5及H4) 進行預備試驗, 以判定其可否作為本研究之多型性分子標記⁽²⁵⁾。預備試驗所用菌株與前項篩選試驗同。試驗結果僅獲G5具多型性, 可供本研究族群分析之用。預備試驗與後續族群分析的聚合酶連鎖反應試驗除引子對為G5F/G5R (表一), 引子黏合溫度為55 $^{\circ}$ C, 其餘器材、試劑、儀器及反應溫度、時間等均與前項試驗相同。

Pyrms簡單重複序列

依據Odjo等對非洲地區稻熱病菌族群之研究結果, 選取多型性程度較高的5種簡單重複序列基因座 (Pyrms47、Pyrms77B、Pyrms99B、Pyrms409及Pyrms427) 用於本研究⁽³²⁾。聚合酶連鎖反應液含12.5 μ L主混合液PowerAmp 2X PCRmix-Green, 反應前加入前後向引子各1 μ L (10 μ M) (表一), 其前向引子並標以fluorescein amidites (FAM) 或hexachlorofluorescein (HEX) 螢光染料, 另加2 μ L (10 ng) 菌株基因體去氧核糖核酸, 補水至總體積25 μ L。聚合酶連鎖反應以同前之基因擴增儀進行增幅反應。增幅條件先為95 $^{\circ}$ C, 5 min, 接著進入35次增幅循環, 每一循環之變性溫度為95 $^{\circ}$ C, 30 sec, 引子黏合溫度為55 $^{\circ}$ C, 30 sec, 延伸溫度為72 $^{\circ}$ C, 30 sec, 最後再以72 $^{\circ}$ C, 5 min, 結束反應。所獲增幅產物以蒸餾水稀釋200倍後, 取其0.5 μ L混以10 μ L Formamide HiDi及GeneScan-500LIZ size marker (Applied Biosystems, USA) 作為分析樣品, 再以96-capillary ABI Prism 3730XL genetic analyzer (Applied Biosystems) 進行毛細管電泳分析, 分析結果經套裝軟體GeneMapper 4.0 software (Applied Biosystems) 轉換為各等位基因大小 (單位: bp)。

Pot2 rep-PCR 反覆因子序列

依據散置重複序列*Pot2*兩端序列所設計的一組外向型引子 (outwardly directed primers) 增幅介於*Pot2*間不同長度的核酸片段, 供族群分析⁽¹⁵⁾。所用之聚合酶連鎖反應液含10 μ L主混合液5X PrimeSTAR GXL Buffer (Takara Bio Inc. Japan)、1 μ L PrimeSTAR GXL DNA polymerase (1.25 units) 及4 μ L 2.5 mM 4種dNTP。反應前加入*Pot2*兩端引子各1 μ L (10 μ M) (表一) 及2 μ L (10 ng) 菌株基因體去氧核糖核酸, 補水至總體積50 μ L。聚合酶連鎖反應以同前之基因擴增儀進行核酸增幅反應, 增幅條件先為98 $^{\circ}$ C, 5 min, 接著進入35次增幅循環, 每一循環之變性溫度為98 $^{\circ}$ C, 1 min, 引子黏合溫度為50 $^{\circ}$ C, 1 min, 延伸溫度為68 $^{\circ}$ C, 10 min, 最後再以68 $^{\circ}$ C, 15 min, 結束反應。增幅反應

表一、本研究用引子對序列表

TABLE 1. Primer sets used in this study

Name	Direction	Primers	Reference
<i>Avr-Piz-t</i>	Forward	GATCAAATGAACACCAGGAA	Wang et al. 2014
	Reverse	CGATGAAGAATGGAAGAATG	
<i>Pot2</i> -rep	Forward	CGGAAGCCCTAAAGCTGTTT	Kachroo et al. 1994
	Reverse	CCCTCATTCGTCACGTTT	
G5	Forward	GTAACCAGGCCGTTTCAAGA	Li et al. 2016
	Reverse	GGAGTTGTCAGAAGGACAGA	
Pyrms47	Forward	TCACATTTGCTTGCTGGAGT	Odjo et al. 2021
	Reverse	AGACAGGGTTGACGGCTAAA	
Pyrms77B	Forward	AGGCTCTTCGCTACGAAGT	Odjo et al. 2021
	Reverse	GCTTCGGCAAGCCTAATC	
Pyrms99B	Forward	CACCACTTTATGGCGCAGT	Odjo et al. 2021
	Reverse	ACCTAGGTAGGTATACATGTTGTT	
Pyrms409	Forward	TCCAGTACTTGCCCATCTC	Odjo et al. 2021
	Reverse	ATCTCATATCCGTCGGTCGT	
Pyrms427	Forward	CTGTACCACAACCAAGACG	Odjo et al. 2021
	Reverse	TTGCCCTGATTTGTCAGTCA	

產物以每菌株2 μ L之量於2%瓊脂糖電泳膠片以100 V，40 min 進行電泳分離，經溴化乙錠染色後，觀察並記錄。

三、族群結構分析

整合上述各種分子標記處理各菌株之結果，先作菌株之多位點基因型分型 (multilocus genotyping)，再進行族群遺傳分析。菌株基因型之分型是先將試驗結果數位化，再由生成式人工智慧軟體ChatGPT協助完成。另計算各種分子標記的多型性訊息指數 (polymorphic information content, PIC)，以檢驗其效能，計算公式為 $PIC = 1 - \sum (P_i)^2$ ， P_i 代表該基因座第*i*個等位基因的出現頻率⁽²⁾。族群遺傳分析係以套裝軟體POPGENE version 1.31計算各族群之遺傳多樣性指數 (genetic diversity index)⁽⁴⁵⁾，包括effective number of alleles⁽²⁴⁾、Nei's gene diversity⁽³⁰⁾、Shannon's information index⁽¹⁷⁾、genetic differentiation coefficient (Gst)^(31, 36)、gene flow (Nm, $Nm = 0.5 (1 - Gst) / Gst$)⁽²⁶⁾、Nei's unbiased genetic identity及genetic distance⁽²⁹⁾；另進行族群間遺傳變異分析以評估族群間的基因流動率；並建構族群遺傳距離關係樹狀圖，以顯示族群間的關聯性。上述供分析之試驗數據組 (data set) 是以codominant模式開啟，再以haploid模式進行分析。另以套裝軟體Arlequin ver 3.5.2.2進行族群分子變異階層式分析 (Hierarchical analysis of molecular variance, AMOVA) 以評估稻熱病菌不同族群階層對遺傳變異的貢獻程度^(13, 14)。

結 果

去氧核糖核酸多型性 (DNA polymorphisms)

*Avr-Piz-t*基因

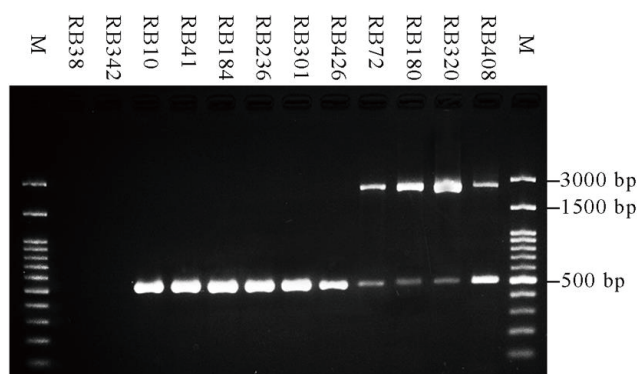
非致病基因篩選試驗獲知，僅*Avr-Piz-t*基因存於部分菌株，其他菌株則否，唯其可供族群分析之用，其他5種非致病基因均存在於全部供試菌株 (補充表二)。測試本研究192株稻熱病菌獲知，89株 (46.3%) 有*Avr-Piz-t*基因 (ca. 500 bp)，42株 (21.9%) 無此基因，另有61株 (31.8%) 除具此原始基因外，並兼有在此基因起始碼後212 bp 處插有長度為1860 bp之*Pot2*轉座子序列 (內含1605 bp *Pot2* transposase gene, GenBank #PP081349) 之突變基因而成為雙重等位基因 (double-allele)，使該類菌株在電泳膠片上同時出現*Avr-Piz-t*及*Avr-Piz-t*插有*Pot2*之兩種條帶 (ca. 500 bp / 2300 bp)；且本研究未見僅單有此突變基因之菌株 (圖二、補充表一)。本基因多型性訊息指數為0.636 (表二)。

G5簡單重複序列

供試菌株之G5分子標記經聚合酶連鎖反應，獲有序列長度約270、500及600 bp等3種增幅產物 (圖三)，其多型性訊息指數為0.416 (表二)。在供試的192株菌中，136株菌 (70.8%) 具270 bp條帶，其序列含19組ATAC串聯重複序列，55株菌 (28.6%) 具500 bp條帶，其序列含48組ATAC串聯重複序列，僅1株源自台東菌株具600 bp條帶，其序列含87組ATAC串聯重複序列 (基因序列未揭示) (補充表一)。

Pyrms簡單重複序列

應用五組Pyrms簡單重複序列基因座分析本研究192株稻熱病菌基因型，結果顯示，Pyrms47有168、170、172、174、176、178、180及181 bp等8種等位基因，多型性訊息指數為



圖二、稻熱病菌*Avr-Piz-t*基因及其插有*Pot2*轉座子增幅電泳膠片圖。

Fig. 2. Gel electrophoretic profile of PCR amplification of *Avr-Piz-t* gene and the gene with an insertion of *Pot2* transposon (amplicon size:1860 bp). Numerals on the top of gel represent the isolate number. RB38 and 342 are absent of *Avr-Piz-t*; RB10, 41, 184, 236, 301 and 426 are present of the intact allele only; RB72, 180, 320 and 408 are present of the intact allele and the allele inserted with *Pot2* transposon (double-allele). M is DNA marker.

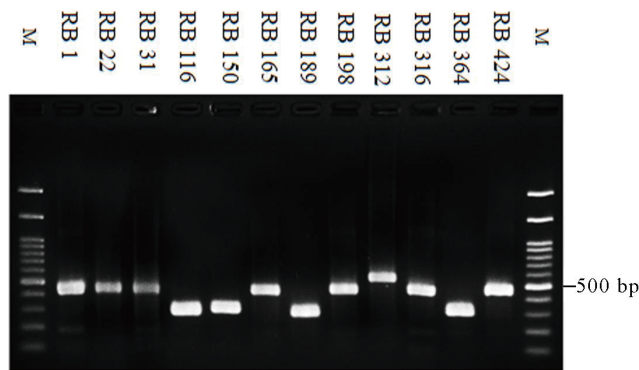
表二、本研究所用分子標誌之等位基因數量、大小、基因型及多型性訊息指數表

TABLE 2. Number of alleles and genotypes and polymorphic information content (PIC) of each molecular marker used in this study

Molecular marker	No. of allele	No. of genotype	Size range (bp)	PIC ¹
<i>Avr-Piz-t</i>	2 ²	3	500-2300	0.636
<i>Pot2</i> -rep	2	4	2000-3000	0.435
G5	3	3	270-600	0.416
Pyrms47	8	8	168-181	0.738
Pyrms77B	3	3	190-193	0.031
Pyrms99B	13	13	180-236	0.705
Pyrms409	2	2	169-171	0.070
Pyrms427	9	9	211-220	0.759

¹ PIC: polymorphism information content, $PIC = 1 - \sum (P_i)^2$, P_i stands for the i th allele frequency of one locus.

² The intact allele and the allele inserted with *Pot2* transposon.



圖三、稻熱病菌G5簡單重複序列增幅電泳膠片圖。

Fig. 3. Gel electrophoretic profile of PCR amplification of G5 simple sequence repeat. Numerals on the top of gel represent the isolate number. M is DNA marker.

0.738；Pyrms77B有190、191及193 bp等3種等位基因，多型性訊息指數為0.031；Pyrms99B有180、183、186、197、200、203、206、212、215、218、221、227及236 bp等13種等位基因，多型性訊息指數為0.705；Pyrms409有169及171 bp等2種等位基因，多型性訊息指數為0.070；Pyrms427有211、212、213、214、215、216、217、218及220 bp等9種等位基因，多型性訊息指數為0.759 (表二、補充表一)。

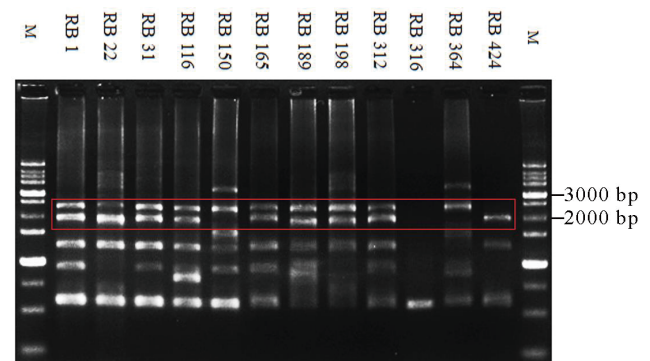
Pot2 rep-PCR 反覆因子序列

介於轉座子*Pot2*間的去氧核糖核酸序列經聚合酶連鎖反應，在電泳膠片上呈現多種條帶，長度介於500至5,000 bp。基於多型性及穩定性原則，僅選取鹼基數介於2000至3000 bp的

條帶予以記錄，計有無條帶、雙條帶及單一條帶等三種數量條帶；單一條帶又因其鹼基數與雙條帶之上或下條帶相當而有單一上及單一下兩種，故合計有4種帶型 (圖四)，其多型性訊息指數為0.435 (表二)。在供試之192株菌中，143株 (74.5%) 具雙條帶，13株 (6.8%) 具單一上條帶，5株 (2.6%) 具單一以下條帶，31株 (16.1%) 無條帶 (補充表一)。

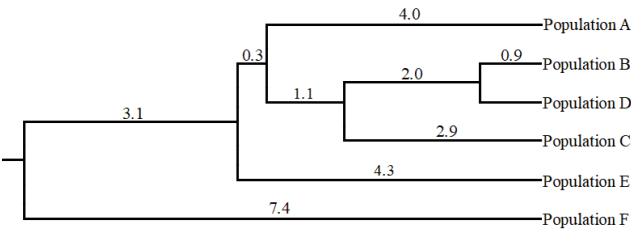
族群結構分析

分析供試192支稻熱病菌菌株的4類共8種分子標記，計得102種組合，亦即有102種基因型，其中75種基因型 (佔73.5%) 僅各有1株菌；其他27種基因型分別有2至15株菌，無任何基因型遍布於全台6個地區族群 (補充表三)。跨區的基因型計有19種，其中跨2區者最多，有11種；其次為跨3區者有5種，跨4區者有3種 (補充表三)。基因型A003有15株，數量最多，A016及A31各有9株，次之；A007有8株，A004有7株。此外，各地區族群 (A-F) 分別有10、18、14、11、17及13種獨有基因型 (佔比55.0~66.7%) (補充表三)。根據上述8種分子標記分析全台6個地區族群所建構的遺傳距離 (genetic distance) 樹狀圖，可見花東族群與其他地區族群分列兩集群 (cluster)，而宜蘭族群又與西部各族群有別。西部4個族群彼此間呈現不同的關聯性，北部族群與其他族群相隔較遠，苗中投族群則與南部族群較近 (圖五)。遺傳多樣性指數分別顯示各族群各基因座實際等位基因數 (N_a) 與有效等位基因數 (N_e) 的平均值，數值愈大表示該族群的基因變異程度愈高。基因多樣性 (gene diversity) 指數 H 及 I 分別用以表示遺傳歧異度的高低，多基因座基因型 (MLG) 則表示具多型性基因座 (多於一個等位基因) 基因型的百分率。稻熱病菌族群遺傳多樣性指數表顯示，苗中投族群遺傳變異最大，其次是宜蘭族群，其他各族群遺傳變異相對較小 (表三)。族群基因流動與遺傳距離成對評估表顯示，花東族群與其他族群間基因流動率最低，其次為宜蘭族群；而西部各族群彼此間



圖四、稻熱病菌*Pot2*反覆因子序列增幅電泳膠片圖。

Fig. 4. Gel electrophoretic profile of *Pot2*-based PCR fingerprint pattern. The banding patterns within the red rectangle were recorded. Numerals on the top of gel represent the isolate number. M is DNA marker.



圖五、台灣稻熱病菌各地區族群遺傳距離關聯圖。

Fig. 5. Relatedness between six regional *Pyricularia oryzae* populations from Taiwan based on Nei's (1978) genetic distance. Method = UPGMA --Modified from NEIGHBOR procedure of PHYLIP Version 3.5. The numbers on each branch represent the relative distance between the nodes. Refer to Fig. 1 for population information.

表三、稻熱病菌族群遺傳多樣性指數表

TABLE 3. Genetic diversity indexes within six regional populations of *Pyricularia oryzae*

Genetic diversity index ²	Population ¹						Overall
	A	B	C	D	E	F	
Polymorphic loci (%) ³	75.00	100.00	87.50	100.00	75.00	87.50	100.00
Na ⁴	3.13	4.13	3.13	3.00	3.25	3.75	5.13
Ne ⁵	2.02	2.43	2.04	1.92	2.45	2.36	2.46
H ⁶	0.38	0.49	0.41	0.37	0.45	0.46	0.48
I ⁷	0.69	0.93	0.74	0.67	0.83	0.86	0.94
MLG ⁸	17	27	21	20	27	22	102

¹ Refer to Fig.1 for population information.

² Genetic diversity indexes were based on combined analyses of molecular markers of *Avr-Piz-t*, *G5*, *Pot2*-rep, and *Pyrms* of 47, 77B, 99B, 427 and 409.

³ Percentage of loci with more than one allele.

⁴ Na: means of observed number of alleles.

⁵ Ne: means of effective number of alleles (Hartl and Clark, 1989).

⁶ H: means of Nei's gene diversity (Nei, 1973).

⁷ I: Shannon's information index as a measure of means of gene diversity (Konopiński, 2020).

⁸ Number of multilocus genotypes (MLG).

則有較多基因流動，苗中投族群與嘉南高屏族群間具有較低 Gst 與較高 Nm (0.023 / 21.168)，表示兩族群間有比較強的基因流動，且其高 Nei's unbiased genetic identity 與低 genetic distance (0.982 / 0.019)，也支持這個現象 (表四)。分子變異階層式分析 (AMOVA) 顯示，遺傳變異源自花東族群組 (group) 與其他地區族群組間佔比 1.80%，源自各組內族群間佔比 2.60%，大部分的遺傳變異則源自各地區族群內，佔比 95.60% (表五)。

討 論

稻熱病菌族群結構分析是族群研究的基礎工作，本研究以台灣本島為範圍，廣泛採集各鄉鎮區的稻熱病菌，是具有完整

表四、稻熱病菌族群基因流動與遺傳距離成對評估表

TABLE 4. Pairwise estimates of G_{ST} / N_m (above diagonal) and Nei's unbiased genetic identity³ / genetic distance⁴ (below diagonal) among six regional populations of *Pyricularia oryzae*

Population ⁵	A	B	C	D	E	F
A	---	0.056 / 8.437	0.075 / 6.215	0.056 / 8.431	0.071 / 6.562	0.076 / 6.048
B	0.925 / 0.076	---	0.031 / 15.762	0.023 / 21.168	0.343 / 14.062	0.086 / 5.289
C	0.905 / 0.100	0.963 / 0.038	---	0.061 / 7.579	0.071 / 6.577	0.088 / 5.156
D	0.938 / 0.064	0.982 / 0.019	0.925 / 0.078	---	0.065 / 7.217	0.127 / 3.439
E	0.905 / 0.100	0.951 / 0.050	0.896 / 0.110	0.916 / 0.088	---	0.058 / 8.057
F	0.894 / 0.112	0.843 / 0.171	0.862 / 0.149	0.801 / 0.217	0.910 / 0.095	---

¹ G_{ST} : mean of genetic differentiation coefficient (Ryman and Leimar, 2009).

² N_m : gene flow from the estimate mean of G_{ST} (McDermott and McDonald, 1993).

³ Nei's unbiased genetic identity (Nei, 1978).

⁴ Nei's unbiased genetic distance (Nei, 1978).

⁵ Refer to Fig.1 for population information.

表五、稻熱病菌族群分子變異階層分析表

TABLE 5. Hierarchical analysis of molecular variance (AMOVA) among six regional populations of *Pyricularia oryzae*

Source of Variation	d.f.	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation
Among groups ¹	1	1.373	0.00898	1.80
Among populations within groups	4	3.575	0.01300	2.60
Within populations	186	88.875	0.47782	95.60
Total	191	93.823	0.49980	...

¹ Group 1 (=population A to E) and Group 2 (=population F). Refer to Fig.1 for population information.

族群代表性的一批菌株。試驗過程中，就已應用於稻熱病菌族群研究的多種分子標記依其實用性先進行評估，經選定數種核酸重複序列及一種非致病基因 *Avr-Piz-t* 供試，均具多型性且易於辨識的特性。非致病基因在國內外均有許多研究，多著重在其與水稻抗病性間的關係^(25, 33, 39, 44, 46)。近期，Syauqi 等就台灣地區稻熱病菌 *Avr-Piz-t* 基因型做調查，發現具該原始基因及插有 *Pot2* 轉座子的突變基因菌株比例分別約為 63% 及 36%，無此基因者不及 1%；Syauqi 等所見插有 *Pot2* 轉座子的 *Avr-Piz-t* 基因是否亦為雙重等位基因則未敘明⁽³⁹⁾。另有報告稱，取自台灣的稻熱病菌有超過半數具此突變基因⁽⁶⁾。在本研究之 192 支菌株中，有 61 株同時保有原始 *Avr-Piz-t* 基因及插有 *Pot2* 轉座子之突

變基因，此雙重等位基因佔比約32%。從其電泳膠片觀之，某一菌株兼具此兩種條帶者均不及僅有單一條帶者清晰；且凡具雙條帶者，上下條帶的清晰度互為消長，菌株RB320與RB408可為例証（圖二）。推測可能是同一菌株部分*Avr-Piz-t*基因插有*Pot2*轉座子，另一些則否，且在數量上互補所致。這種突變基因產生的可能原因包括但不限於以下數種，如基因重複 (gene duplication)、多重染色體組 (multiple sets of chromosomes) 或單一孢子具多細胞 (multiple cells) 等⁽⁴¹⁾。至於此類菌株與水稻間的交互作用為何，惟賴接種試驗始能釐清。此外，具有這種突變基因的菌株雖遍及全台，但仍因地區而有不同，北部 (A區) 及花東地區明顯較少，僅有1至2株菌；其他地區則分別有11至18株菌，此亦顯示不同地區族群的特性 (補充表一)。

屬簡單重複序列的G5分子標記雖較少用於稻熱病菌的族群研究⁽²⁵⁾，但因具有簡單且明確之特性，又兼操作容易費用低廉，是良好的分子標記 (圖三)。儘管G5標記在本研究僅有3種等位基因，但其分布頻率卻在全台6個地區存有明顯差異，其500 bp等位基因的數量在台灣中南部各族群約占半數 (12~15株)，北部 (A) 族群較少 (8株)，宜蘭族群更少 (5株)，花蓮-台東族群僅有1株；反之，270 bp等位基因在A族群有24株，多於西部其他族群，而在宜蘭及花東地區分別佔有27及30株之多數 (補充表一)。這適與本研究之地區族群遺傳距離關聯圖 (圖五) 互相呼應，足證G5是鑑別族群的良好分子標記。

Pot2 rep-PCR 反覆因子序列常用於稻熱病菌之族群研究，此方法亦具價廉且易於操作之特性^(5, 15, 19)。但在電泳膠片上因條帶數量較多且清晰度不一，紀錄及分析不易 (圖四)。由於本研究已另使用其他分子標記，基於執簡馭繁之原則，僅選取電泳膠片上方簡單且明確的兩種條帶列入記錄。惟由結果觀之，雙條帶在西部各族群佔大多數 (75~100%)，但在宜蘭及花東族群則均不及半數 (約47%) (補充表一)，此亦與本研究之圖五的圖像接近。上述三種分子標記 (*Avr-Piz-t*、*Pot2*-rep及G5) 的PIC值介於0.416~0.636，均為可適度呈現族群變異的分子標記⁽³²⁾ (表二)。

Pyrms簡單重複序列是本研究中解析度最高的分子標記，差距可至1個鹼基 (base)，但需使用專用儀器，耗材又貴，非一般實驗室可行。基於經費考量，本研究參考Odjo等的報告，選用Pyrms系列標記中5種多型性較佳者進行試驗⁽³²⁾。但不同Pyrms標記於本研究族群之效率差異甚大，Pyrms47、Pyrms99B及Pyrms427等的PIC值均達0.7以上，而Pyrms77B及Pyrms409僅分別為0.031及0.070 (表二)，顯然這類分子標記的效率會因稻熱病菌不同族群而有別。但因此系列標記種類甚多可供選擇且精確度高，作為族群分子標記仍具優勢。

在稻熱病菌的族群研究中，取樣技術及分子標記是關乎分析結果的重要因子。Odjo等採取遍及非洲大陸及馬達加斯加等多國的稻熱病菌計2057株⁽³²⁾，王氏等在美國7個水稻種植州選用457株菌⁽⁴²⁾，均具廣泛代表性。但他們都僅使用多組簡單

重複序列Pyrms^(32, 42)。在台灣，Syauqi等選用分布於8縣市的645株菌，但大多數來自6處稻熱病監測田 (blast disease monitoring plot)，其以非致病基因 (*Avr-Piz-t*及*Avr-Pib*)、配對型及散置重複序列*Pot2*等不同類型分子標記供試，已兼顧不同分子標記特性⁽³⁹⁾。本研究逢機選取遍及全台各縣市鄉鎮區的192支菌株，數量雖較少但具地區代表性及普遍性。在基因分型試驗中，更涵蓋多種不同類型分子標記，其優點是可在不同鑑別度的分子標記間作調整，如欲提高鑑別度就納入各種類型分子標記，使其基因型逾百種 (補充表一、三)，如要降低基因型數量則可將鑑別度較高的一些Pyrms標記排除，則其基因型僅剩10餘種 (數據未揭示)。

Odjo等以12組Pyrms簡單重複序列標記探討非洲大陸各國與馬達加斯加島稻熱病菌的族群結構，發現各國族群間高度分化，不同基因型稻熱病菌的擴散受限於地理環境，且僅在相鄰國家間流動⁽³²⁾。這種現象與本研究相似，亦即台灣各地均有該地區特有的基因型菌株，僅有少數 (21/102, 20.6%) 基因型菌株跨區分布，且具地緣關係 (補充表三)。這或可證明稻熱病菌難以自行作較長距離移動，從而造就大量區域性基因型菌株。這種地理侷限性也可由本研究的分子變異階層分析 (AMOVA) 獲得支持，即主要變異源自族群內，源自族群間的變異極少 (表五)。此外，僅有單一菌株的基因型在本研究中佔比甚高 (83/102, 81.4%) (補充表三)，這在非洲族群中亦類同 (245/393, 62.3%)⁽³²⁾，這也顯示稻熱病菌易突變的特性，因而產生許多獨特的變異菌株。

儘管台灣稻作面積不大，全台六個地區的稻熱病菌族群仍呈現顯著差異，花東族群與其他地區族群迥異，彼此分立成兩個集群。除卻花東族群所代表的集群，在另一集群中，宜蘭族群又明顯異於西部各族群，可見地理效應至為明顯 (圖五)。由於花東族群與其他地區族群間差異顯著，推測花東地區受中央山脈及其西側之玉山山脈及阿里山山脈阻隔，導致其族群演化成獨特結構。宜蘭族群亦自外於西部各族群，也可能因地理上北有雪山山脈，南有中央山脈阻隔之故。而西部地區不但在地理上連成一片，加以交通便利，使稻熱病菌族群間差異較小，但也呈現北部族群異於中南部族群之現象，儘管南秧北調亦難改變此一格局。稻熱病菌族群分布與地理區的關係亦見於以病原性作為指標的研究，在中央山脈的阻隔下，東部 (含宜蘭) 及西部族群呈現明顯差異⁽⁸⁾。這類研究結果均表示，稻熱病菌族群在地理侷限下，各自因當地自然環境及人為因素，復經長期演化，已出現具地區特色的族群，而此演化動力可能主要來自水稻品種的更迭^(8, 19, 42)。陳氏在針對稻熱病菌族群的病原性分析中，即認為台灣稻熱病菌族群的地理分布與區域水稻主要栽培品種有關⁽⁸⁾。此外，陳文又稱西部稻熱病菌族群遺傳多樣性高於東部地區 (含宜蘭)，本研究亦有類似結果 (表三)。由於各地區稻熱病菌變異主要源自族群內，且族群間的流動程度低 (表四、表五)，可能僅靠罹病稻種、秧苗或稻穀的輸送，帶動

其基因流動。而稻熱病菌隨其寄主進入新環境後能否發展為主要族群，尚須視病原菌與水稻品種及當地環境之互動而定。

水稻栽培環境會影響田間稻熱菌族群的結構，這些因素包括氣候、水稻品種、栽培制度、農藥、病蟲害、以至地理因素等。現今稻熱病菌的族群結構是綜合反映上述各種影響因子的結果，我們可就其族群結構探討稻熱病菌如何與其寄主及各種環境因子互動，進而推測稻熱病菌族群的演化趨勢，採取因應措施。面對快速演化的稻熱病菌，惟有投入更多資源於其族群研究，掌握其族群結構與演化方向，並據以採行病害整合管理作為，期能減少病害損失，確保糧食安全。

謝 辭

本研究承農業部112年及113年農科-5.3.1-藥-P2計畫經費補助，謹此致謝。

引用文獻

- Adreit, H., Kadrawi, S., Andriantsimialona, D., Utami, D. W., Notteghem, J. L., Lebrun, M. H., and Tharreau, D. 2007. Microsatellite markers for population studies of the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. Mol. Ecol. Notes 7:667-670.
- Anderson, J. A., Churchill, G. A., Autrique, J. E., Tanksley, S. D., and Sorrells, M. E. 1993. Optimizing parental selection for genetic linkage maps. Genome 36:181-186.
- Anonymous, 2019. List of Plant Diseases in Taiwan 5th ed. Taiwan Phytopathological Society. Taichung, 329 pp. (in Chinese)
- Anonymous, 2023. Agricultural Statistics Yearbook. Department of Statistics, Ministry of Agriculture, , Taipei, 358 pp. (in Chinese)
- Babujee, L., and Gnanamanickam, S. S. 2000. Molecular tools for characterization of rice blast pathogen (*Magnaporthe grisea*) population and molecular marker-assisted breeding for disease resistance. Curr. Sci. 78(3):248-257.
- Chen, C., Chen, M., Hu, J., Zhang, W., Zhong, Z., Jia, Y., Allaux, L., Fournier, E., Tharreau, D., Wang, G.-L., Wang, Z., Shen, W.-C., Lu, G., Wang, B., and Mitchell, T. K. 2014. Sequence variation and recognition specificity of the avirulence gene AvrPiz-T in *Magnaporthe oryzae* field populations. Fungal Genom. Biol. 4:113.
- Chen, L. C., Chen, Y. S., and Cheng, Y. H. 2004. Test of rice varieties and strains resistant to rice blast in blast nurseries during 1990-2002. J. Agric. Res. China 53:269-283. (in Chinese)
- Chen, Y.-N. 2023. Determinate the rice blast pathogen clusters in Taiwan and the causes of their annual distribution changes. Doctoral Dissertation, Plant Pathology Institute, National Chung Hsing University, Taichung. 126 pp. (in Chinese)
- Dean, R. A., Van Kan, J. A. L., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., Rudd, J. J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., and Foster, G. D. 2012. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. Mol. Plant Pathol. 13:414-430.
- Dean, R. A., Nicholas, J., Talbot, N. J., Ebbole, D. J., Farman, M. L., Mitchell, T. K., Orbach, M. J., Thon, M., Kulkarni, R., Xu, J.-R., Pan, H., Read, N. D., Lee, Y.-H., Carbone, I., Brown, D., Oh, Y. Y., Donofrio, N., Jeong, J. S., Soanes, D. M., Djonovic, S., Kolomiets, E., Rehmeier, C., Li, W., Harding, M., Kim, S., Lebrun, M.-H., Bohnert, H., Coughlan, S., Butler, J., Calvo, S., Ma, L.-J., Nicol, R., Purcell, S., Nusbaum, C., Galagan, J. E., and Birren, B. W. 2005. The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. Nature 434:980-986.
- Dhillon, B., and Goodwin, S. B. 2011. Identification and annotation of repetitive sequences in fungal genomes. Pages 33-50 in: Fungal Genomics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology) vol. 722. Xu, J., and Bluhm, B. H. eds. Humana Press, Totowa, N.J., USA, 285 pp.
- Duan, C.-H., and Chen, G.-Y. 2023. Molecular identification, mating type, and fungicide sensitivity of *Pyricularia oryzae* isolates from Taiwan. J. Plant Med. Plant. 65(1):33-42. (in Chinese)
- Excoffier, L., Laval, G., and Schneider, S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. Evol. Bioinform. Online 1:47-50.
- Excoffier, L., Smouse, P. E., and Quattro, J. M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics 131(2):479-491.
- George, M. L. C., Nelson, R. J., Zeigler, R. S., and Leung, H. 1998. Rapid population analysis of *Magnaporthe grisea* by using rep-PCR and endogenous repetitive DNA sequences. Phytopathology 88:223-229.
- Hartl, D. L. and Clark, A. G. 1989. Principles of Population Genetics. 2nd. edition. Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA, USA. 682 pp.
- Hennink, S. and Zeven, A. C. 1991. The interpretation of Nei and Shannon-Weaver within population variation indices. Euphytica 51(3):235-240.
- Ishii, S., and Sadowsky, M. J. 2009. Applications of the rep-

- PCR DNA fingerprinting technique to study microbial diversity, ecology and evolution. *Environ. Microbiol.* 11: 733-740.
19. Javan-nikkhah, M., McDonald, B., Banke, S., and Hedjaroude, G. 2004. Genetic structure of Iranian *Pyricularia grisea* populations based on rep-PCR fingerprinting. *Eur. J. Plant Pathol.* 110:909-919.
 20. Kachroo, P., Leong, S. A., and Chattoo, B. B. 1994. *Pot2*, an inverted repeat transposon from the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Mol. Gen. Genet.* 245:339-348.
 21. Kaye, C., Milazzo, J., Rozenfeld, S., Lebrun, M.-H., Tharreau, D. 2003. The development of simple sequence repeat markers for *Magnaporthe grisea* and their integration into an established genetic linkage map. *Fungal Genet. Biol.* 40:207-214.
 22. Khush, G. S. 2005. What it will take to feed 5.0 billion rice consumers in 2030. *Plant Mol. Biol.* 59:1-6.
 23. Konopiński M. K. 2020. Shannon diversity index: a call to replace the original Shannon's formula with unbiased estimator in the population genetics studies. *PeerJ* 8:e9391.
 24. Kumari, S., Tayal, P., Sharma, E., Kimura, M., and Crow, J. F. 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* 49:725-738.
 25. Li, J., Lu, L., Jia, Y., Wang, Q., Fukuta, Y., and Li, C. 2016. Characterization of field isolates of *Magnaporthe oryzae* with mating type, DNA fingerprinting, and pathogenicity assays. *Plant Dis.* 100:298-303.
 26. McDermott, J. M., and McDonald, B. A. 1993. Gene flow in plant pathosystems. *Annu. Rev. Phytopathol.* 31:353-373.
 27. McDonald, B. A. 1997. The population genetics of fungi: tools and techniques. *Phytopathology* 87:448-453.
 28. Milgroom, M. G., and Peever, T. L. 2003. Population biology of plant pathogens: the synthesis of plant disease epidemiology and population genetics. *Plant Dis.* 87:608-617.
 29. Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *Am. Nat.* 106:283-292.
 30. Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 70:3321-3323.
 31. Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89:583-590.
 32. Odjo, T., Diagne, D., Adreit, H., Milazzo, J., Raveloson, H., Andriantsimalona, D., Kassankogno, A. I., Ravel, S., Gumedzoe, Y. M. D., Ouedraogo, I., Koita, O., Silue, D., and Tharreau, D. 2021. Structure of African populations of *Pyricularia oryzae* from rice. *Phytopathology* 111:1428-1437.
 33. Onaga, G., Wydra, K., Koopmann, B., Sere, Y., and von Tiedemann, A. 2015. Population structure, pathogenicity, and mating type distribution of *Magnaporthe oryzae* isolates from East Africa. *Phytopathology* 105:1137-1145.
 34. Ou, S. H. 1980a. A look at worldwide rice blast disease control. *Plant Dis.* 64:439-445.
 35. Ou, S. H. 1980b. Pathogen variability and host resistance in rice blast disease. *Ann. Rev. Phytopathol.* 18:167-187.
 36. Ryman, N., and Leimar, O. 2009. G_{ST} is still a useful measure of genetic differentiation - a comment on Jost's *D*. *Mol. Ecol.* 18:2084-2087.
 37. Suzuki, F., Suga, H., Tomimura, K., Fuji, S., Arai, M., Koba, A., and Nakajima, T. 2009. Development of simple sequence repeat markers for Japanese isolates of *Magnaporthe grisea*. *Mol. Ecol. Resour.* 9(2):588-590.
 38. Syauqi, J. 2021. Identification of *AVR-Pib*, *AVR-Pita1* and *AVR-Pi9* genotypic polymorphism and population dynamics of rice blast fungus in Taiwan. Master Thesis, Plant Pathology and Microbiology Institute, National Taiwan University, Taipei, 109 pp.
 39. Syauqi, J., Chen, R.-K., Cheng, A.-H., Wu, Y.-F., Chung, C.-L., Lin, C.-C., Chou, H.-P., Wu, H.-Y., Jian, J.-Y., Liao, C.-T., Kuo, C.-C., Chu, S.-C., Tsai, Y.-C., Liao, D.-J., Wu, Y.-P., Abadi, A. L., Sulistyowati, L., and Shen, W.-C. 2022. Surveillance of rice blast resistance effectiveness and emerging virulent isolates in Taiwan. *Plant Dis.* 106:3187-3197.
 40. Tautz, D., Renz, M. 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Res.* 12(10):4127-4138.
 41. Taylor, J. W., Branco, S., Gao, C., Hann-Soden, C., Montoya, L., Sylvain, I., Gladieux, P. 2017. Sources of fungal genetic variation and associating it with phenotypic diversity. *Microbiol. Spectr.* 5:10.1128/microbiolspec.funk-0057-2016.
 42. Wang, X., Jia, Y., Wamishe, Y., Jia, M. H., and Valent, B. 2017. Dynamic changes in the rice blast population in the United States over six decades. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 30:803-812.
 43. Wu, B.-R. 2019. The *AVR-Pik* genotype composition and pathogenicity of *Magnaporthe oryzae* in Taiwan. Master Thesis, Plant Pathology and Microbiology Institute, National Taiwan University, Taipei, 90 pp. (in Chinese)
 44. Xing, J., Jia, Y., Peng, Z., Shi, Y., He, Q., Shu, F., Zhang, W., Zhang, Z., and Deng, H. 2017. Characterization of molecular identity and pathogenicity of rice blast fungus in Hunan Province of China. *Plant Dis.* 101:557-561.
 45. Yeh, F., Yang, R. C., Boyle, T. B. J., Ye, Z. H., and Mao, J. X. 1997. POPGENE, The user-friendly shareware for population

- genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Center, University of Alberta, Canada.
46. Zhang, Z., Jia, Y., Wang, Y., and Sun, G. 2020. A rapid survey of avirulence genes in field isolates of *Magnaporthe oryzae*. Plant Dis. 104:717-723.
47. Zheng, Y., Zhang, G., Lin, F., Wang, Z., Jin, G., Yang, L., Ying Wang, Y., Chen, X., Xu, Z., Zhao, X., Wang, H., Lu, J., Lu, G., and Wu, W. 2008. Development of microsatellite markers and construction of genetic map in rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. Fungal Genet. Biol. 45:1340-1347.

by Yilan. We concluded that the population structure of *P. oryzae* is closely associated with the geographical location and that gene flow between regions is limited. A few cases of gene flow could be attributed to the transport of infected seeds, seedlings or husks.

Keywords: population biology, *Pyricularia oryzae*

ABSTRACT

Duan, C.-H.* and Chen, G.-Y. 2024. Population structure of *Pyricularia oryzae* from rice in Taiwan. J. Plant Med. 66(1_2): 15-30.

*Corresponding author, E-mail: chduan1@hotmail.com

Rice blast disease caused by *Pyricularia oryzae* is one of the most devastating diseases of rice in Taiwan and worldwide. Despite the importance of rice blast disease, little is known about its diversity and population structure in Taiwan. The present study intended to understand the population structure of *P. oryzae* and gene flow between six regional populations in Taiwan. A total of 192 isolates (32 from each population) were collected from the whole island and genotyped using different molecular markers: *Avr-Piz-t* avirulence gene, *Pot2*-based repetitive element polymerase chain reaction (rep-PCR), and simple sequence repeat markers: G5 and pyrms. Except for pyrms77B and pyrms409, all markers showed the polymorphic information content values between 0.41 and 0.75, suggesting that most of the markers were highly informative to capture the population variances. Interestingly, we found that 61 isolates had the intact *Avr-Piz-t* allele coexisting with the gene inserted with *Pot2* transposon (double-allele). In population structure analyses based on the aforementioned markers, 102 multilocus genotypes were identified and none of them was found in all 6 regional populations. Populations A to F had 10, 18, 14, 11, 17, and 13 unique genotypes (55.0~66.7%), respectively, indicating that each population was very differentiated. Based on Nei's genetic distance, the six regional populations were divided into two clusters. The populations from four western regions and Yilan County were grouped as one cluster, while the Hualien-Taitung population was grouped as another. Genetic diversity indexes showed that population variation is the highest in central Taiwan (Miaoli-Taichung-Nantou region) followed

補充表一、台灣稻熱病菌各基因型菌株分子標記紀錄表

TABLE S1. Genotyping information for *Pyricularia oryzae* isolates collected in Taiwan

Isolate	Origin ²	Year	Molecular marker ¹								Genotype ³
			<i>Avr-Piz-t</i>	G5	<i>Pot2</i> -rep	P47	P427	P77B	P99B	P409	
RB105	A-Xinwu	2021	+	270	2	170	211	191	186	169	A001
RB107	A-Xinwu	2021	–	270	2	176	213	191	215	169	A002
RB109	A-Hukou	2021	+	500	2	172	215	191	206	169	A003
RB111	A-Xinpu	2021	+	500	2	170	213	191	206	169	A004
RB113	A-Xinpu	2021	–	270	2	176	215	191	212	169	A005
RB114	A-Xinfeng	2021	+	500	0	174	213	191	206	169	A006
RB116	A-Xinfeng	2021	–	270	2	174	215	191	212	169	A007
RB124	A-Beitou	2021	–	270	2	176	218	191	212	169	A008
RB160	A-Emei	2021	+	270	2	170	211	191	186	169	A001
RB161	A-Xinpu	2021	–	270	2	174	215	191	212	169	A007
RB162	A-Daxi	2021	–	270	2	174	215	191	221	169	A009
RB164	A-Daxi	2021	–	270	2	176	215	191	200	169	A010
RB165	A-Qionglin	2021	+	500	2	172	215	191	206	169	A003
RB280	A-Beitou	2021	+	500	2	170	213	191	206	169	A004
RB325	A-Zhongli	2022	–	270	2	174	215	191	212	169	A007
RB327	A-Zhongli	2022	–	270	2	174	215	191	212	169	A007
RB332	A-Yangmei	2022	+	500	2	172	215	191	206	169	A003
RB336	A-Yangmei	2022	–	270	2	176	215	191	212	169	A005
RB338	A-Guanyin	2022	+	500	2	172	215	191	206	169	A003
RB341	A-Guanyin	2022	–	270	0	176	215	191	212	169	A011
RB342	A-Xinwu	2022	–	270	0	178	215	191	212	169	A012
RB344	A-Xinwu	2022	–	270	2	174	215	191	212	169	A007
RB346	A-Zhubei	2022	–	270	2	174	215	191	212	169	A007
RB348	A-Zhubei	2022	+	500	2	172	215	191	206	169	A003
RB350	A-Guanxi	2022	+	270	2	170	211	191	186	169	A001
RB352	A-Hengshan	2022	–	270	2	174	215	191	212	169	A007
RB354	A-Daxi	2022	+P2	270	2	172	215	191	215	169	A013
RB356	A-Qionglin	2022	+	270	2	172	215	191	206	169	A014
RB357	A-Qionglin	2022	–	270	2	178	215	191	212	169	A015
RB361	A-Zhongli	2022	+	270	U1	172	211	191	186	169	A016
RB362	A-Bade	2022	–	270	2	172	215	191	212	169	A017
RB363	A-Hengshan	2022	–	270	2	176	215	191	212	169	A005
RB1	B-Xitun	2019	+	500	2	170	213	191	183	169	A018
RB4	B-Xitun	2021	–	270	2	180	217	191	236	169	A019
RB6	B-Wufeng	2019	+	500	2	168	213	191	206	169	A020
RB9	B-Zhushan	2020	+	500	2	172	215	191	206	169	A003
RB24	B-Qingshui	2020	+	500	L1	172	218	191	206	169	A021
RB26	B-Qingshui	2020	+P2	270	0	174	215	190	212	169	A022
RB29	B-Qingshui	2020	+	500	2	172	215	191	206	169	A003
RB39	B-Wuqi	2020	+	500	2	172	215	191	203	169	A023
RB48	B-Mingjian	2020	+	500	2	174	215	191	206	169	A024
RB51	B-Zhushan	2020	+	500	0	172	216	191	206	169	A025
RB57	B-Dadu	2020	+	500	2	170	213	191	206	169	A004
RB58	B-Dadu	2020	+	500	2	172	215	191	206	169	A003
RB60	B-Houli	2020	+	500	2	170	218	191	180	169	A026
RB67	B-Waipu	2020	+	500	2	172	218	191	206	169	A027

TABLE S1. (continued from previous page)

Isolate	Origin ²	Year	Molecular marker ¹								Genotype ³
			<i>Avr-Piz-t</i>	G5	<i>Pot2</i> -rep	P47	P427	P77B	P99B	P409	
RB69	B-Waipu	2020	+P2	270	0	174	215	191	215	169	A028
RB72	B-Dajia	2020	+P2	270	0	176	215	191	212	169	A029
RB74	B-Dajia	2020	–	270	2	174	216	191	212	169	A030
RB117	B-Caotun	2021	+P2	270	2	174	215	191	212	169	A031
RB128	B-Yuanli	2021	+	500	2	170	215	191	206	169	A032
RB129	B-Zaoqiao	2021	+P2	270	2	174	215	191	212	169	A031
RB130	B-Tongxiao	2021	+P2	270	2	174	217	191	212	169	A033
RB166	B-Toufen	2021	+	500	2	170	220	191	206	169	A034
RB316	B-Nantou	2022	+P2	270	0	176	215	191	227	169	A035
RB318	B-Nantou	2022	+	500	0	172	216	191	197	169	A036
RB320	B-Caotun	2022	+P2	270	2	174	213	191	212	169	A037
RB322	B-Zhushan	2022	+P2	270	2	174	213	191	212	169	A037
RB398	B-Miaoli	2022	+P2	270	2	174	215	190	212	171	A038
RB400	B-Sanyi	2022	+P2	270	2	176	217	191	212	169	A039
RB401	B-Touwu	2022	+P2	270	2	180	217	191	218	169	A040
RB402	B-Tongluo	2022	+P2	270	2	174	213	191	212	169	A037
RB406	B-Tongluo	2022	+P2	270	0	174	218	191	212	169	A041
RB408	B-Houlong	2022	+P2	270	2	180	218	191	218	169	A042
RB10	C-Beigang	2020	+	270	L1	172	216	191	206	169	A043
RB13	C-Sihu	2020	+	500	2	170	218	191	206	169	A044
RB15	C-Lugang	2020	+P2	270	2	174	216	191	212	169	A045
RB17	C-Yuanzhang	2020	+	270	2	170	214	191	206	169	A046
RB20	C-Erlun	2020	+P2	270	2	174	218	191	212	169	A047
RB22	C-Baozhong	2020	+	500	2	172	216	191	206	169	A048
RB28	C-Lunbei	2020	+P2	270	2	176	216	191	212	169	A049
RB31	C-Zhutang	2020	+	500	2	172	216	191	206	169	A048
RB32	C-Zhutang	2020	+	500	0	172	216	191	206	169	A025
RB35	C-Pitou	2020	–	270	2	176	216	191	215	169	A050
RB38	C-Erlin	2020	–	270	2	174	216	191	212	169	A030
RB41	C-Erlin	2020	+	500	2	168	214	191	206	169	A051
RB44	C-Xihu	2020	+	500	2	172	216	191	206	169	A048
RB49	C-Xizhou	2020	–	270	2	174	216	191	212	169	A030
RB52	C-Hemei	2020	+P2	270	2	176	216	191	212	169	A049
RB54	C-Dacun	2020	+	500	2	172	215	191	206	169	A003
RB62	C-Shetou	2020	+	500	2	172	216	191	206	169	A048
RB75	C-Xianxi	2020	–	270	2	176	216	191	212	169	A052
RB77	C-Dounan	2020	–	270	2	174	213	191	212	169	A053
RB79	C-Xiluo	2020	+	500	2	172	216	191	206	169	A048
RB81	C-Huwei	2020	+P2	270	2	174	216	191	212	169	A045
RB83	C-Citong	2020	+	500	2	172	216	191	206	169	A048
RB84	C-Puyan	2020	+P2	270	2	176	215	191	218	169	A054
RB85	C-Beidou	2020	+	500	2	172	215	191	206	171	A055
RB88	C-Fuxing	2020	+	500	2	172	215	191	206	169	A003
RB90	C-Tianzhong	2020	+P2	270	0	174	215	191	215	169	A028
RB93	C-Tuku	2020	+	500	2	174	216	191	206	169	A056
RB94	C-Ershui	2020	+P2	270	2	174	216	191	212	169	A045
RB96	C-Fenyuan	2021	+	500	2	172	213	191	206	169	A057

TABLE S1. (continued from previous page)

Isolate	Origin ²	Year	Molecular marker ¹								Genotype ³
			<i>Avr-Piz-t</i>	G5	<i>Pot2</i> -rep	P47	P427	P77B	P99B	P409	
RB99	C-Xiushui	2021	+P2	270	2	174	218	191	212	169	A047
RB102	C-Zhutang	2021	+P2	270	2	174	215	191	212	169	A031
RB103	C-Erlun	2021	+P2	270	2	174	215	191	218	169	A058
RB139	D-Liuying	2021	+	500	2	172	215	191	206	169	A003
RB140	D-Guantian	2021	+P2	270	2	176	215	191	212	169	A059
RB142	D-Houbi	2021	+	500	2	170	213	191	206	169	A004
RB146	D-Changzhi	2021	+P2	270	2	174	215	191	212	169	A031
RB158	D-Chaozhou	2021	+	500	2	172	215	191	206	169	A003
RB170	D-Meinong	2022	+	500	2	170	213	191	206	169	A004
RB172	D-Meinong	2022	+	500	2	172	213	191	206	169	A057
RB173	D-Shanlin,	2022	+P2	270	2	174	215	191	212	169	A031
RB175	D-Shinyuan	2022	+P2	270	2	174	215	191	212	169	A031
RB177	D-Wandan,	2022	+P2	270	2	174	215	191	221	169	A060
RB180	D-Kanding	2022	+P2	270	2	180	215	191	212	169	A061
RB182	D-Pingtung	2022	+P2	270	2	174	215	191	212	171	A062
RB184	D-Donggang	2022	+	500	2	172	215	191	206	169	A003
RB186	D-Daliao	2022	+	500	2	170	213	191	206	169	A004
RB187	D-Lioujia	2022	+P2	270	2	178	213	191	212	169	A063
RB188	D-Baihe	2022	+	500	2	174	213	191	206	169	A064
RB189	D-Baihe	2022	+P2	270	2	178	215	191	212	169	A065
RB191	D-Liouying	2022	–	270	2	174	215	191	212	169	A007
RB194	D-Liouying	2022	+P2	270	2	174	217	193	212	169	A066
RB195	D-Guantian	2022	+P2	270	2	180	213	191	212	169	A067
RB198	D-Lutsau	2022	+	500	2	172	215	191	206	169	A003
RB201	D-Lutsau	2022	+P2	270	2	176	215	191	212	169	A059
RB202	D-Lioujiao	2022	–	270	2	176	215	191	212	169	A005
RB205	D-Puzi	2022	+P2	270	2	174	215	191	215	169	A068
RB208	D-Singgang	2022	+P2	270	2	178	215	191	215	169	A069
RB211	D-Singgang	2022	+	500	2	174	215	191	206	169	A024
RB213	D-Xiaying	2022	+	500	2	172	215	191	206	169	A003
RB214	D-Yijhu	2022	+P2	270	2	174	215	191	212	169	A031
RB215	D-Sikou	2022	+P2	270	2	174	215	191	212	169	A031
RB218	D-Xingying	2022	+	500	2	174	213	191	215	169	A070
RB219	D-Dalin	2022	+P2	270	2	176	215	191	212	169	A059
RB223	D-Minsyong	2022	+P2	270	2	174	217	191	212	169	A033
RB328	E-Toucheng	2022	+	270	2	172	211	191	186	169	A071
RB330	E-Toucheng	2022	+P2	270	2	176	217	191	215	169	A072
RB359	E-Suao	2022	+P2	270	2	174	217	191	212	169	A033
RB364	E-Suao	2022	+	270	U1	172	211	191	186	169	A016
RB366	E-Dongshan	2022	+P2	270	2	174	215	191	215	169	A068
RB368	E-Dongshan	2022	+P2	270	0	174	215	191	212	169	A073
RB369	E-Dongshan	2022	+P2	270	2	174	215	191	212	169	A031
RB371	E-Wujie	2022	+P2	270	2	176	216	191	212	169	A049
RB373	E-Wujie	2022	+P2	270	L1	174	213	191	212	169	A074
RB375	E-Wujie	2022	+P2	270	0	174	215	191	215	169	A028
RB376	E-Yilan	2022	+	270	U1	172	213	191	186	169	A075
RB377	E-Yilan	2022	+P2	270	2	174	217	191	215	169	A076

TABLE S1. (continued from previous page)

Isolate	Origin ²	Year	Molecular marker ¹								Genotype ³
			<i>Avr-Piz-t</i>	G5	<i>Pot2</i> -rep	P47	P427	P77B	P99B	P409	
RB380	E-Yilan	2022	+P2	270	2	176	217	191	212	169	A039
RB381	E-Yilan	2022	+	270	2	170	211	191	186	169	A001
RB383	E-Luodong	2022	+P2	270	0	176	215	191	206	169	A077
RB385	E-Luodong	2022	+	270	2	174	220	191	212	169	A078
RB386	E-Luodong	2022	+	270	2	172	220	191	186	169	A079
RB387	E-Jiaoxi	2022	+P2	270	0	174	215	191	212	169	A073
RB388	E-Jiaoxi	2022	+	270	2	170	211	191	186	169	A001
RB390	E-Sanshing	2022	+P2	270	0	174	217	191	215	169	A080
RB392	E-Sanshing	2022	+	270	0	176	215	191	212	169	A081
RB393	E-Sanshing	2022	+	500	0	172	213	191	206	169	A082
RB395	E-Sanshing	2022	+	500	0	172	215	191	206	169	A083
RB397	E-Sanshing	2022	+	500	2	170	216	191	206	169	A084
RB421	E-Toucheng	2023	+	270	2	170	211	191	186	169	A001
RB423	E-Toucheng	2023	+	270	0	176	217	191	206	169	A085
RB424	E-Toucheng	2023	+	500	L1	174	215	191	206	169	A086
RB426	E-Toucheng	2023	+	270	0	172	211	191	186	169	A087
RB428	E-Jhuangwei	2023	+	270	0	174	215	191	212	169	A088
RB429	E-Jhuangwei	2023	+	500	0	172	215	191	206	169	A083
RB433	E-Jhuangwei	2023	+	270	0	174	215	191	212	169	A088
RB435	E-Jhuangwei	2023	+	270	2	176	218	191	212	169	A089
RB148	F-Chihshang	2021	–	270	2	181	213	191	215	171	A090
RB150	F-Luye	2021	+	270	U1	172	211	191	186	169	A016
RB152	F-Jian	2021	+	270	U1	172	211	191	186	169	A016
RB154	F-Fenglin	2021	+	270	U1	174	211	191	186	169	A091
RB156	F-Yuli	2021	+	270	U1	172	213	191	186	169	A075
RB225	F-Luye	2022	–	270	2	174	216	191	212	169	A092
RB228	F-Guanshan	2022	–	270	2	174	216	191	212	169	A092
RB233	F-Chihshang	2022	–	270	2	174	218	191	212	169	A093
RB236	F-Chihshang	2022	+	270	U1	172	211	191	186	169	A016
RB237	F-Beinan	2022	–	270	2	174	216	191	212	169	A030
RB238	F-Chenggong	2022	+	270	U1	172	211	191	186	169	A016
RB239	F-Taitung	2022	–	270	2	174	218	191	212	169	A094
RB242	F-Fuli	2022	–	270	2	176	215	191	212	169	A005
RB245	F-Fuli	2022	–	270	2	174	216	191	212	171	A095
RB248	F-Yuli	2022	–	270	2	176	218	191	212	169	A008
RB252	F-Yuli	2022	+	270	0	174	211	191	186	169	A096
RB253	F-Guangfu	2022	–	270	2	178	213	191	215	171	A097
RB257	F-Ruisui	2022	+	270	U1	172	213	191	186	169	A075
RB261	F-Fonglin	2022	+	270	U1	172	211	191	186	169	A016
RB269	F-Fengbin	2022	+P2	270	0	172	218	191	218	169	A098
RB271	F-Jian	2022	+	270	2	172	212	191	186	169	A099
RB273	F-Shoufeng	2022	–	270	0	174	216	191	212	169	A092
RB277	F-Shoufeng	2022	+	270	U1	172	211	191	186	169	A016
RB283	F-Guanshan	2022	+P2	270	0	174	215	191	212	169	A073
RB286	F-Guanshan	2022	–	270	0	174	216	191	212	169	A092
RB290	F-Guanshan	2022	–	270	L1	172	216	191	212	169	A100
RB293	F-Chihshang	2022	+	500	2	170	213	191	206	169	A004

TABLE S1. (continued from previous page)

Isolate	Origin ²	Year	Molecular marker ¹								Genotype ³
			<i>Avr-Piz-t</i>	G5	<i>Pot2</i> -rep	P47	P427	P77B	P99B	P409	
RB296	F-Chihshang	2022	–	270	0	178	213	191	215	171	A101
RB301	F-Haiduan	2022	+	270	U1	172	211	191	186	169	A016
RB306	F-Taitung	2022	–	270	2	174	216	191	212	169	A030
RB312	F-Luye	2022	+	600	2	170	213	191	206	169	A102
RB419	F-Guanshan	202	–	270	2	174	216	191	212	169	A030

¹ *Avr-Piz-t*: “+” = presence of the intact allele, “+/P2” = presence of the intact allele and the allele inserted with *Pot2* transposon (double-allele), “–” = absence of the allele; G5: SSRs marker, the numbers stand for the amplicon sizes of alleles (unit: bp) (Li, 2016); *Pot2*-rep PCR: 0 = no band, 2 = double bands, U1 = single upper band, L1 = single lower band (Kachroo, 1994); P47, P77B, P99B, P409 and P427: SSRs markers, P stands for Pyrms, the numbers are the amplicon sizes of alleles (Adreit et al. 2007).

² Origin: City / County – Town, City / County of A = Taipei, Taoyuan and Hsinchu; B = Miaoli, Taichung and Nantou; C = Changhua and Yunlin; D = Chiayi, Tainan, Kaohsiung and Pingtung; E = Yilan; F = Hualien and Taitung.

³ Genotype was assigned based on analysis of all eight molecular markers.

補充表二、稻熱病菌非致病基因在供試菌株之檢出

TABLE S2. Presence (+) or absence (-) of *Avr* genes in the tested isolates of *Pyricularia oryzae*

Isolate	Avirulence (<i>Avr</i>) gene					
	<i>Avr-Pi9</i>	<i>Avr-Pib</i>	<i>Avr-Pik</i>	<i>Avr-Pita1</i>	<i>Avr-Pita2</i>	<i>Avr-Piz-t</i>
RB4	+	+	+	+	+	–
RB9	+	+	+	+	+	+
RB29	+	+	+	+	+	+
RB30	+	+	+	+	+	+
RB38	+	+	+	+	+	–
RB80	+	+	+	+	+	+
RB82	+	+	+	+	+	–
RB105	+	+	+	+	+	+
RB107	+	+	+	+	+	–
RB112	+	+	+	+	+	–
RB123	+	+	+	+	+	+
RB129	+	+	+	+	+	–
RB132	+	+	+	+	+	–
RB134	+	+	+	+	+	–
RB135	+	+	+	+	+	+
RB137	+	+	+	+	+	+
RB140	+	+	+	+	+	–
RB142	+	+	+	+	+	–
RB144	+	+	+	+	+	–
RB146	+	+	+	+	+	–
RB148	+	+	+	+	+	+
RB151	+	+	+	+	+	+
RB152	+	+	+	+	+	+
RB157	+	+	+	+	+	–
RB159	+	+	+	+	+	–
RB167	+	+	+	+	+	+
RB168	+	+	+	+	+	–
RB169	+	+	+	+	+	–

補充表三、稻熱病菌各基因型菌株在各地區族群數量表

TABLE S3. The numbers of *Pyricularia oryzae* isolates of each genotype in six regional populations¹

Genotype	Population					
	A	B	C	D	E	F
A001	3				3	
A002	1					
A003	5	3	2	5		
A004	2	1		3		1
A005	3			1		1
A006	1					
A007	7			1		
A008	1					1
A009	1					
A010	1					
A011	1					
A012	1					
A013	1					
A014	1					
A015	1					
A016	1				1	7
A017	1					
A018		1				
A019		1				
A020		1				
A021		1				
A022		1				
A023		1				
A024		1		1		
A025		1	1			
A026		1				
A027		1				
A028		1	1		1	
A029		1				
A030		1	2			3
A031		2	1	5	1	
A032		1				
A033		1		1	1	
A034		1				
A035		1				
A036		1				
A037		3				
A038		1				
A039		1			1	
A040		1				
A041		1				
A042		1				
A043			1			
A044			1			
A045			3			
A046			1			
A047			2			
A048			6			
A049			2		1	

TABLE S3. (continued)

Genotype	Population					
	A	B	C	D	E	F
A050			1			
A051			1			
A052			1			
A053			1			
A054			1			
A055			1			
A056			1			
A057			1	1		
A058			1			
A059				3		
A060				1		
A061				1		
A062				1		
A063				1		
A064				1		
A065				1		
A066				1		
A067				1		
A068				1	1	
A069				1		
A070				1		
A071					1	
A072					1	
A073					2	1
A074					1	
A075					1	2
A076					1	
A077					1	
A078					1	
A079					1	
A080					1	
A081					1	
A082					1	
A083					2	
A084					1	
A085					1	
A086					1	
A087					1	
A088					2	
A089					1	
A090						1
A091						1
A092						4
A093						1
A094						1
A095						1
A096						1
A097						1
A098						1
A099						1
A100						1
A101						1
A102						1

¹ Refer to Table S1 for populations and genotypes information.