

陇南地区小麦条锈菌群体遗传多样性 SSR 分析

陆宁海^{1,2}, 郑文明³, 王建锋^{1,2}, 詹刚明¹, 黄丽丽¹, 康振生^{1,2}

(¹西北农林科技大学植物保护学院, 陕西杨凌 712100; ²西北农林科技大学, 陕西省农业分子生物学重点实验室, 陕西杨凌 712100;

³河南农业大学生命科学学院, 郑州 450002)

摘要: 【目的】甘肃陇南地区是小麦条锈菌最主要和最大的越冬区, 本研究的目的是分析该地区的小麦条锈菌自然群体的遗传结构, 探索其分子遗传变异规律。【方法】采用 TP-M13-SSR 荧光标记技术, 对甘肃省陇南地区 8 个种群 409 个小麦条锈菌分离株基因组 DNA 进行 SSR 标记分析。【结果】陇南地区小麦条锈菌的观察等位基因数 (N_a) 为 1.95, 有效等位基因数目 (N_e) 为 1.43, Nei's (1973) 基因多样性指数 (H) 为 0.27, Shannon 信息指数 (I) 为 0.41。武都、文县和秦城种群遗传多样性较高, 徽县、成县和西和种群相对较低。AMOVA 分析结果表明, 小麦条锈菌群体间和群体内都存在着一定的遗传分化, 群体间的遗传变异占总变异的 12.5%, 群体内遗传变异占 87.5%。地区间的基因流 $Nm=1.83$ 。【结论】陇南地区小麦条锈菌群体遗传多样性很丰富, 但地区之间有一定的差异; 群体遗传变异主要存在于群体内部, 不同地区间存在基因的交流 and 病原菌的移动。

关键词: 小麦条锈菌; 群体遗传多样性; SSR 标记

SSR Analysis of Population Genetic Diversity of *Puccinia striiformis* f.sp.*tritici* in Longnan Region of Gansu, China

LU Ning-hai^{1,2}, ZHENG Wen-ming³, WANG Jian-feng^{1,2}, ZHAN Gang-ming¹, HUANG Li-li¹,
KANG Zhen-sheng^{1,2}

(¹College of Plant Protection, Northwest Agricultural and Forestry University, Yangling 712100, Shaanxi; ²Shaanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture, Northwest Agricultural and Forestry University, Yangling 712100, Shaanxi; ³College of Life Sciences, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002)

Abstract: 【Objective】 As Longnan region of Gansu province is one of the largest and most important over-summering areas of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in China, the objective of this study is to determine the genetic structure of *P. striiformis* f. sp. *tritici* populations in this region. 【Method】 Population genetic diversity of the *P. striiformis* f.sp. *tritici* population containing 409 isolates collected from 8 different areas in Longnan, Gansu province was investigated with TP-M13-SSR technique. 【Result】 For the Longnan population, the average number of alleles (N_a) per locus was 1.95, and the effective number of alleles (N_e) was 1.43. The Nei's gene diversity (H) and Shannon's information index (I) were 0.27 and 0.41, respectively. The genetic diversity of Wudu, Wenxian and Qingcheng populations was much higher than that of Huixian, Chengxian and Xihe populations. Analysis of AMOVA showed that there were about 12.5% of the total variations among the collections, 87.5% of the total variation presented within collections. Gen flow (Nm) was 1.83. 【Conclusion】 The important conclusion is that the populations of *P. striiformis* f. sp. *tritici* possessed relatively high levels of genetic diversity but a lower genetic differentiation in Longnan of Gansu. The main genetic variation presented within collections. There is an extensive gene flow and migration of pathogen among the regions in Longnan of Gansu.

Key words: *Puccinia striiformis* f.sp.*tritici*; population genetic diversity; SSR marker

收稿日期: 2008-11-20; 接受日期: 2009-02-11

基金项目: 国家“973”项目(2006CB100203)、现代农业产业技术体系建设专项资金资助, 国家“十一五”支撑计划(2006BAD08A05)、教育部长江学者和创新团队发展计划资助项目(200558)、教育部“111”引智项目(B07049)

作者简介: 陆宁海(1976—), 男, 甘肃宁县人, 博士, 研究方向为分子流行病学和群体遗传学。Tel: 029-87080061; E-mail: gsninghai@163.com。通信作者康振生(1957—), 男, 四川安岳人, 教授, 研究方向为病原物与寄主植物互作关系的细胞学和分子生物学。Tel: 029-87080061; E-mail: kangzs@nwsuaf.edu.cn

0 引言

【研究意义】小麦条锈病是由小麦条锈菌 (*Puccinia striiformis* f.sp.*tritici*) 引起的气流传播性病害, 遍及世界各主要麦区, 也是中国最重要的小麦病害和主要监控研究对象。甘肃陇南小麦条锈病流行区, 包括天水地区渭河流域、嘉陵江上游徽成盆地与四川接壤的白龙江流域, 是中国小麦条锈菌最重要的越冬区之一, 也是中国小麦条锈菌新小种的策源地。该区秋季的菌源可向东部广大冬麦区传播, 越冬后春季菌源可向北部和西部麦区蔓延, 对周边地区有重要影响^[1]。了解该地区条锈菌群体的遗传多样性, 对于制定更为有效的条锈病控制方法具有重要的意义。【前人研究进展】Chen^[2]等研究了北美不同地域 115 个小麦条锈菌菌株, 发现小种间及小种内单孢菌系间均存在 DNA 多态性。Hovmöller 等^[3]对采自丹麦、英国、德国和法国西北部的分离群体进行了 AFLP 分析, 结果显示西北欧地区的小麦条锈菌是同一个有效群体, 在最远达 1 700 公里的地理范围内存在长距离的锈菌迅速迁移; 对单个田块小范围的分析显示出很低的遗传多样性, 结合致病类型分析, 证实了条锈菌从英国到丹麦以及从英国到法国和德国的传播。Enjalbert 等^[4-5]首先报道了由小麦条锈菌基因组筛选出的 12 个微卫星标记; 随后应用于法国南部和北部条锈菌群体的遗传分化研究, 揭示了虽然它们都具有严格无性系群体的特征而且地理距离也不遥远, 却明显存在地理群体差异。单卫星等^[6]以小麦条锈菌基因组特异重复序列 (*Puccinia striiformis* repeat, PSR) 为探针对 160 个采自全国六省的小麦条锈菌标样进行了遗传多样性分析, 表明条锈菌群体存在很高的遗传多样性, 不同地区之间存在差异。郑文明等^[7]应用 PSR 探针对采自中国条锈菌越冬关键区甘肃天水地区的 224 个标样进行了指纹分析, 表明该地区群体内存在丰富的遗传多态性。【本研究切入点】到目前为止多数利用分子标记 (如 AFLP, RAPD, RFLP 等) 进行的小麦条锈菌遗传多样性分析都是基于在大的地理跨度收集的相对较小的分离系样本进行的, 这些大范围的研究对了解这种专性寄生物的演化和大范围流行动态预测具有重要价值。但是, 在较小地理范围内相对较多的分离系的分子遗传多样性分析有助于了解区域内病菌群体结构特点以及病菌的变异机制和分布动态, 特别是对病菌流行和进化关键地区的分析更是十分必要。目前, 对中国小麦条锈菌流行关键地区甘肃陇南较大样本的

分子遗传多样性分析尚无报道。【拟解决的关键问题】本研究将利用 SSR 标记对甘肃陇南地区的小麦条锈菌群体结构进行分析, 以期更深入地了解这些地区条锈菌自然群体遗传多样性和遗传分化。

1 材料与方法

1.1 小麦条锈菌群体标样的采集

本研究于 2006—2007 年在甘肃省陇南地区进行了小麦条锈菌标样的采集, 其中包括武都、文县、西和县、成县、徽县、天水的麦积、秦城和秦安, 共获得 409 个标样。选取发病较轻、严重程度较低、条锈菌夏孢子较为新鲜饱满、叶片较为整洁、病斑布局较为清晰的标样进行采集, 用吸水纸将标样分离包装, 在采样过程中标样在合适温度下短期干燥保存, 回到实验室如不能立即接种, 则置于干燥器中 4℃ 保存。

表 1 陇南地区小麦条锈菌标样的采集地点、数目和海拔高度

Table 1 The location, elevation, code and number of samples of *P.striiformis* f. sp. *tritici* collected from Longnan in Gansu

采样地点 Location	数量 Number of isolates	海拔 Elevation (m)	编号 Code
成县 Chengxian	30	1100~1200	CX
徽县 Huixian	38	1100~1200	HX
西和 Xihe	41	1500~1600	XH
武都 Wudou	50	1700~1850	WD
文县 Wenxian	50	1600~1900	WX
麦积 Maiji	75	1200~1500	MJ
秦城 Qincheng	75	1500~1750	QC
秦安 Qin'an	50	1500~1600	QA
总计 Total	409		

1.2 小麦条锈菌的繁殖与保存

提前 7~10 d 种植小麦感病品种铭贤 169, 选取饱满的种子, 每盆播种 10 粒, 待麦苗第一片叶完全展开后, 每盆保留麦苗 6 株。接种前一天, 清洗条锈菌标样, 冲洗掉叶片表面的杂质, 置于铺有滤纸的保湿盘中保湿 15 h, 温度为 13~15℃。在接种前对小麦进行脱蜡处理, 以利于条锈菌更容易侵染扩展。将保湿处理过的条锈菌标样取出, 用接种针挑取单孢子堆轻涂于叶片表面, 接种后清水喷雾, 置于保湿桶黑暗保湿 24 h, 温度为 13~15℃, 然后转移至适宜环境内潜育发病。叶片出现花斑后, 剪去多余心叶, 每盆只保留

1 株发病最好的植株, 加上隔离罩, 防止交叉污染。接种后约 13~15 d, 接种叶片即开始产生夏孢子。分别用收集管收集每株发病叶片上的孢子, 直至病叶不再产孢。收集的菌种抽真空封存, -70℃ 保存备用。

1.3 基因组 DNA 提取方法

基因组 DNA 的提取参照 Wang 等的方法^[8]。取 5~10 mg 新鲜小麦条锈菌夏孢子于 1.5 ml eppendorf 离心管中, 加入抽提缓冲液 50 μ l; 用电钻加研磨棒研磨样品 (冰上操作), 再加入 300 μ l 抽提缓冲液, 涡旋混匀; 每管加 30 μ l 20% 的 SDS、20 μ l 5 mol·L⁻¹ NaCl 和 30 μ l CTAB/NaCl 溶液, 颠倒混匀, 65℃ 温育 1 h (20 min 颠倒一次); 加等体积 (350 μ l) 的苯酚: 氯仿: 异戊醇, 轻轻颠倒混匀, 12 500 r/min, 4℃ 离心 12 min; 取上清液, 加 300 μ l 的氯仿, 轻轻颠倒混匀后 12 500 r/min, 4℃ 离心 10 min; 取上清液加入等体积的异丙醇 (预冷), -20℃ 放置 1~2 h; 13 000 r/min, 4℃

离心 15 min, 弃液体, 加 70% 乙醇 (预冷) 400 μ l 清洗 2 次, 每次洗后 4℃ 离心 10 min, 然后室温干燥; 加 30 μ l TE, 置 4℃ 溶解, -20℃ 保存。加 4 μ l RNaseA 酶 37℃ 温育 3~4 h, 加等体积的氯仿颠倒混匀后, 4℃ 10 000 r/min 离心, 取上清液 -20℃ 保存。采用 ND-1000 UV-Vis 微量紫外/可见分光光度计 (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer) 测定 DNA 纯度和浓度。将提取的模板 DNA 稀释为 50 ng· μ l⁻¹ 待用。

1.4 TP-M13-SSR 体系的 SSR 引物和 M13 荧光引物的合成

本研究采用了 11 对 SSR 引物, 每对引物的正链进行了荧光标记。其中, RJ18、RJ20、RJ21、RJ24 和 RJ27 参考 Enjalbert^[4]; CPS15、CPS34、CPS36、CPS08、CPS09 和 CPS10 是本课题组设计开发的。TP-M13-SSR (Tailed Primer-M13-SSR) 引物的合成, 在 TP-M13-SSR 检测系统中, 用 3 条引物来进行 PCR

表 2 SSR 引物和 M13 荧光引物的名称、序列、重复单元、退火温度和目标条带大小

Table 2 Sequences of SSR and M13 primers used in this study and repeat motif, annealing temperature and product size

引物名称 Primer name	引物序列 5'-3' Primer sequence	重复单元 Repeat motif	退火温度 Tm (°C)	目标条带大小 Product size (bp)
IR-labeled M13	CACGACGTTGTAAAACGAC			
TP-M13	CACGACGTTGTAAAACGAC			
CPS08F TP-M13	TP-M13-GATAAGAAACAAGGGACAGC	(CAG) ₁₄	55	196~216
CPS08R	CAGTGAACCCAATTACTCAG			
TP-M13-CPS09F	TP-M13-CGGGAGAAGACCTGAGC	(GTT) ₉	58	234~256
CPS09R	AGAAAACGGAATGTAATGTG			
TP-M13-CPS10F	TP-M13-TCTACTGGGCAGACTGGTC	(TAG) ₈	56	315~330
CPS10R	CGGTTGTGTTTGTCGTTTC			
TP-M13CPS15F	TP-M13-GATGGGGAA AAGTAAGAAGT	(TTC) ₄	55	236~245
CPSP15R	GGTGGGGGATGTAAGTATGTA			
TP-M13CPS34 F	TP-M13-GTTGGCTACGAGTGGTCATC	(TC) ₉	55	131~140
CPS34R	TAACACTACACA AAAGGGGTC			
TP-M13CPS36F	TP-M13-TCCAGGCAGTAAATCAGACGC	(GAC) ₆	55	145~149
CPS36R	ATCAGCAGGTGTAGCCCCATC			
TP-M13RJ27F	TP-M13-CGTCCCGACTAATCTGGTCC	(TC) ₁₀	52	225~237
RJ27R	ATGAGTTAGTTTAGATCAGGTGCGAC			
TP-M13RJ18F	TP-M13-CTGCCCATGCTCTTCGTC	(TGT) ₅	52	330~356
RJ18R	GATGAAGTGGGTGCTGCTG			
TP-M13RJ20F	TP-M13-AGAAGATCGACGCACCCG	(CAG) ₄	52	280~289
RJ20R	CCTCCGATTGGCTTAGGC			
TP-M13RJ21F	TP-M13-TTCCTGGATTGAATTCGTCG	(GTT) ₆	52	170~206
RJ21R	CAGTTCTCACTCGACCCAG			
TP-M13RJ24F	TP-M13-TTGCTGAGTAGTTTGCGGTGAG	(GTT) ₅₊₉	52	280~295
RJ24R	CTCAAGCCCATCTCCAACC			

扩增。第 1 条引物是把供试的 SSR 引物对中的正向引物和 M13 的正向引物相连接合成带有 M13 尾巴的引物,称之为 TP-M13; 第二条引物是正常的 SSR 反向引物; 第三条引物是带有 IRDye 800 荧光标记的 M13f-29 正向引物(IR-labeled M13 primer)。IR-labeled M13 primer 荧光引物 (IRD800) 由美国 LICOR 公司合成, 其它非荧光普通引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.5 TP-M13-SSR PCR 扩增条件

TP-M13-SSR 反应体系 10 μl , 参考 LICOR-4300 Tailed Primer PCR Protocol(Genetic Analysis Manual): 10 \times Reaction Buffer 1.0 μl , $\text{MgCl}_2(25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1})$ 0.8 μl , dNTPs($2.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 1.0 μl , TP-M13 ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 0.5 μl , 反向引物 ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 0.5 μl , IR-labeled M13 primer ($10 \text{ pmol}\cdot\text{ml}^{-1}$) 0.5 μl , *Taq* polymerase ($5 \text{ U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) 0.15 μl , 模版 DNA ($50 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) 1.0 μl , ddH₂O 4.55 μl 。

扩增反应在 PTC-200 (BIO-RAD) 上进行, PCR 扩增反应程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 4 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s, 64 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, 每循环一次降 0.7 $^{\circ}\text{C}$, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s, 10 个循环; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s, 54 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s, 25 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 终止反应。

1.6 PCR 扩增产物的电泳检测

荧光标记引物扩增的产物经 6.5% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 分子量标准选用荧光标记 DNA Marker 50-700 Sizing Standard。电泳过程在 LICOR-4300 DNA 自动分析仪 (LICOR Biotechnology Division, Lincoln, NE) 上进行。

1.7 统计分析

电泳图谱中的每一条带均视为一个分子标记, 并代表一个引物的结合位点。对群体遗传参数的统计基于以下两个假设: ①群体处于 Hardy-Weinberg 平衡; ②统计条带时认为电泳迁移率相同的条带是扩增基因组上的相同 DNA 片段的产物。使用 Syngene Genetools 软件 (Synoptics Ltd.) 对条带进行判读, 根据条带的有无, 并确定产物分子量, 排除模糊不清的带和无法准确标识的带, 然后构建 0, 1 二元数据矩阵。

利用 POPGENE version 1.32 软件^[9]计算以下参数: 反映基因多少和状况的遗传参数: (i) 多态性条带数 *NP* (Number of polymorphic loci) 和多态带百分率 *P* (Proportion of polymorphic loci); (ii) 等位基因观测数 *Na* (Observed number of alleles) 和有效等位基因数 *Ne* (Effective number of alleles)。反映基因多样性信息的遗传参数: (i) Nei (1973) 基因多样

性指数 *H* (Gene diversity), (ii) Shannon 信息指数 *I* (Shannon's information index)。反映基因组差异: Nei 的遗传距离 *D* (Genetic distances)。反映遗传分化程度: 应用 Nei (1973)^[10] 基因多度法计算遗传分化系数 *Gst* (coefficient of gene differentiation among population within species), $Gst = Dst / Ht$, 其中 $Dst = Ht - Hs$, *Ht* 为总遗传多样性, *Hs* 为群体内的遗传多样性, *Dst* 为群体间遗传多样性。按照 Wright 的 *Fst* 法^[11] 计算反映基因流强度的居群每代迁移数 (*Nm*), 其关系为: $Fst = 1 / (1 + 4Nm)$, $Nm (W) = (1 - Fst) / 4 Fst$, 在此, *Fst* 可认为等同于 *Gst*。

利用 DCFA1.1 统计软件^[12] 计算各群体 SSR 表现型指纹类型频数和欧氏距离平方 (δ^2), 并统计群体间共享 SSR 表现型类型及数量。利用 Arlequin3.11 软件^[13] 中的 AMOVA (Analysis of Molecular Variance) 进行分子方差分析, 统计群体间和群体内的方差、方差分量及贡献率, 依此量化评价基因多样性在群体间和群体内的差异和贡献。根据 POPGENE version 1.32 软件计算获得的遗传距离, 用 NTSYSpc-2.11F 软件进行数据分析, 用 SHAN 程序中的 UPGMA (Unweighted Pair-Group Mean Average, 非加权算术平均聚类) 方法进行聚类分析, 并通过 Tree plot 模块生成聚类图^[14]。

2 结果与分析

2.1 SSR 引物的 PCR 扩增结果

11 对 SSR 引物在 409 个分离株基因组中共扩增出 40 个位点, 其中多态性位点 38 个, 多态性百分率为 95.00%。各引物所揭示的遗传多样性水平不尽相同, 其中引物 CPS09 和 RJ24 扩增出的条带较多, CPS15、CPS36 和 RJ27 扩增的条带较少 ($NP=2$), 平均每一对引物扩增出值为 3.64 个条带, 3.45 个多态性条带。

2.2 陇南地区小麦条锈菌群体遗传多样性水平

陇南小麦条锈菌遗传多样性很丰富。在物种水平上, 观察等位基因数 (*Na*) 为 1.95, 有效等位基因数目 (*Ne*) 为 1.43, Nei's (1973) 基因多样性指数 (*H*) 为 0.27, Shannon 信息指数 (*I*) 为 0.41。在群体水平上, 多态位点百分率 (*P*) 为 70.00%~87.50%, 平均为 78.75%, 观察等位基因数 (*Na*) 为 1.65~1.88, 平均为 1.76, 有效等位基因数目 (*Ne*) 为 1.35~1.44, 平均为 1.39, Nei's (1973) 基因多样性指数 (*H*) 为 0.21~0.26, 平均为 0.23, Shannon 信息指数 (*I*) 为 0.31~0.40, 平均为 0.35。陇南小麦条锈菌遗传多样性

表 3 供试 SSR 引物的 PCR 扩增结果

Table 3 Number of loci and number of polymorphic loci of primers used in this study

引物 Primer	等位位点数 Number of loci	多态位点数 Number of polymorphic loci
CPS08	4	4
CPS09	7	7
CPS10	4	4
CPS15	2	2
CPS34	3	3
CPS36	2	2
RJ18	4	4
RJ20	3	3
RJ21	2	2
RJ24	5	5
RJ27	4	2
平均 Average	3.64	3.45
总计 Total	40	38

表 4 陇南地区小麦条锈菌群体的遗传多样性水平

Table 4 Genetic diversity parameters of *P. striiformis* f.sp.*tritici* for 8 collections from Longnan of China's Gansu

Collections ID	N_a^a	N_e^b	H^c	I^d	NP^e	$P^f\%$
成县 Chengxian	1.65	1.36	0.22	0.33	29.00	72.50
徽县 Huixian	1.70	1.35	0.21	0.31	28.00	70.00
西和县 Xihe	1.73	1.35	0.21	0.33	30.00	75.00
武都 Wudu	1.85	1.44	0.25	0.40	34.00	85.00
文县 Wenxian	1.68	1.39	0.26	0.34	33.00	82.50
麦积 Maiji	1.80	1.40	0.24	0.36	32.00	80.00
秦城 Qincheng	1.88	1.38	0.25	0.37	35.00	87.50
秦安 Qin'an	1.78	1.41	0.23	0.36	31.00	77.50
物种水平 Species level	1.95	1.43	0.27	0.41	38.00	95.00
群体水平 Population level	1.76	1.39	0.23	0.35	31.50	78.75

^a N_a : 观察等位基因数; ^b N_e : 有效等位基因数目; ^c H : Nei's (1973) 基因多样性指数; ^d I : Shannon 信息指数; ^e NP : 多态性位点数; ^f $P\%$: 多态位点百分率

^a N_a : Observed number of alleles; ^b N_e : Effective number of alleles; ^c H : Nei's gene diversity; ^d I : Shannon's Information index; ^e NP : Number of polymorphic loci; ^f $P\%$: Proportion of polymorphic loci

表 5 种群间和种群内分子变异的 AMOVA 分析结果

Table 5 Analysis of molecular variance (AMOVA) among and within the populations

变异来源 Source of variance	自由度 DF	平方和 SS	总变异百分率 PV (%)	P 值 P value
居群间 Among populations	15	322.86	12.5	<0.001
群体内 Within populations	393	1753.25	87.5	<0.001
总计 Total	408	2076.11	100.0	-

计算了 Nei's 遗传一致度 GS 和遗传距离 GD (表 6), 群体的遗传一致度为 0.8898~0.9933, 遗传距离为

在地区之间有一定程度的差异, 高山和半山区的武都、文县和秦城种群遗传多样性较高, 盆地的成县、徽县和西和种群相对较低。

2.3 小麦条锈菌群体遗传结构与分化

SSR 标记系统揭示的总的遗传多样性 (H_t) 和群体内的遗传多样性 (H_s) 分别为 0.27 和 0.23, 群体间遗传多样性 (D_{st}) 为 0.04, 遗传分化系数 (G_{st}) 为 0.148, 群体内变异占总变异的 85.2%, 群体间遗传多样性占总群体的 14.8%, 群体内多样性大于群体间多样性。利用 Arlequin 软件中的 AMOVA 方法分析结果也表明 (表 5), 小麦条锈菌群体间和群体内都存在着一一定的遗传分化, 群体间的遗传变异占总变异的 12.5% ($P<0.001$), 群体内遗传变异占 87.5%, 遗传变异主要存在于群体内部。

2.4 小麦条锈菌不同种群间的遗传距离和遗传一致度

为了进一步分析条锈菌群体间的遗传分化程度,

0.0067~0.1168, 说明群体间的相似程度较高, 遗传距离较小。其中, 成县种群和徽县种群之间相似性 ($GS=$

表 6 群体间的 Nei's 无偏遗传距离和遗传一致度

Table 6 Nei's unbiased genetic distances and genetic identities between collections

种群 Collections	成县 Chengxian	徽县 Huixian	西和县 Xihe	武都 Wudu	文县 Wenxian	麦积 Maiji	秦城 Qincheng	秦安 Qin'an
成县 Chengxian	****	0.9933	0.9839	0.9428	0.8898	0.9402	0.9578	0.9264
徽县 Huixian	0.0067	****	0.9895	0.9394	0.8962	0.9374	0.9699	0.9247
西和 Xihe	0.0162	0.0106	****	0.9437	0.8980	0.9410	0.9619	0.9227
武都 Wudu	0.0589	0.0625	0.0580	****	0.9551	0.9623	0.9424	0.9461
文县 Wenxian	0.1168	0.1096	0.1076	0.0459	****	0.9497	0.9379	0.9461
麦积 Maiji	0.0617	0.0647	0.0608	0.0384	0.0516	****	0.9679	0.9752
秦城 Qincheng	0.0431	0.0305	0.0389	0.0593	0.0642	0.0326	****	0.9695
秦安 Qin'an	0.0765	0.0783	0.0804	0.0554	0.0455	0.0251	0.0310	****

上方为遗传相似系数，下方为遗传距离 Nei's genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal)

0.9933) 最高, 遗传距离 ($GD = 0.0067$) 最近, 成县种群和文县种群之间相似性 ($GI = 0.8898$) 最低, 遗传距离 ($GD = 0.1168$) 最远。

2.5 聚类结果分析

聚类结果表明, 陇南地区小麦条锈菌群体聚为两个大的类群, Group I 由文县、武都、麦积、秦城和秦安种群组成, Group II 由徽县、成县和西和种群组成。其中 Group I 又分为 2 个亚群 Subgroup, Subgroup I 由麦积、秦城和秦安种群组成, Subgroup II 由文县和武都种群组成。来自天水地区麦积、秦城和秦安的 3 个种群聚为 1 个亚群, 来自高山地区的武都和文县聚为 1 个亚群。这表明地理距离相近的群体之间遗传距离较小, 遗传相似性较高, 群体之间可能有基因流的存在。

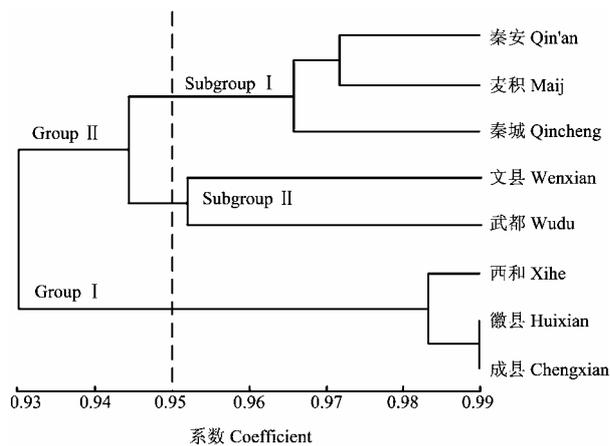


图 1 陇南地区小麦条锈菌群体的聚类分析图

Fig. 1 UPGMA dendrogram based on SSR data of *P. striiformis* f.sp.*tritici* including 8 populations from Longnan in Gansu province of China

3 讨论

中国早期关于小麦条锈菌的群体研究主要是建立在毒性标记的基础上, 通过对生理小种的分布、组成及其出现频率的研究对病原菌的动态进行监测, 为中国小麦条锈菌与小麦互生在群体水平上的演替变化规律研究提供了非常宝贵和丰富的系统性资料^[1]。然而, 毒性标记只代表了病菌群体内遗传变异中极少的一部分, 小麦条锈菌的生理小种是依据其在不同鉴别寄主上的苗期致病性差异而划分的, 并非生物学上的自然分类单元, 并不能反映其遗传本质。小麦条锈菌为专化寄生菌, 且尚未发现有性阶段, 常规的生理小种的鉴定及监测只能基于鉴别寄主, 而且小麦条锈菌体积小、繁殖快、群体大, 常规鉴定和检测, 方法繁杂、耗工耗时, 且其准确性易受鉴定条件的影响, 这些都在一定程度上制约了对条锈菌的相关研究^[2,6-7]。随着分子生物学的发展, 尤其是分子标记技术的出现为条锈菌的研究提供了有效工具, 在国际上广泛开展小麦条锈菌群体遗传研究^[15-19], 但在中国主要研究集中在流行生理小种的分子多态性分析方面^[20-21], 关于小麦条锈菌的群体遗传研究较少, 对特定地区的小麦条锈菌的群体遗传研究就更少了, 本研究首次应用 SSR 分子标记技术对陇南地区小麦条锈菌群体遗传结构和分化进行了系统全面的研究。

研究结果显示, 陇南地区小麦条锈菌遗传多样性比较丰富, 地理特征和气候特征是导致陇南地区小麦条锈菌群体遗传多样性丰富的主要因素之一。陇南地区山川交错, 气候温和, 冬季比较温暖, 夏季凉爽, 条锈菌在海拔较高处小麦上能越冬, 在海拔较低处小麦上可以越冬, 在小范围内就能完成周年循环^[1], 该

地区也是中国小麦条锈菌主要越冬易变区和新小种发源地。另外, 陇南地区在小麦条锈菌综合治理中, 大力引进抗病品种, 提高寄主群体的抗病基因多样化, 注重抗病品种的合理布局和轮换, 因此寄主抗病基因的多元化和选择压力的降低也是该地区的条锈菌群体结构复杂的主要因素之一。

聚类结果表明, 相同或相似的地理环境的小麦条锈菌群体遗传距离较小, 相似性较高, 聚为一类。文县的条锈菌主要分布在高海拔的高楼山, 武都的条锈菌采集于高海拔的米仓山, 文县和武都彼此相邻, 地理环境和气候条件极为相似, 采自两地菌株聚在第二组的第二亚组中, 而成县和徽县属于盆地, 且彼此相连, 气候特征和地理特征也很相似, 两个不同县的菌株聚在第一组。从遗传多样性上看, 高山的条锈菌比盆地的条锈菌遗传多样性丰富。这一结果与郑文明^[7]报道的天水地区高海拔的山区比低海拔川道区小麦条锈菌遗传多样性高一致, 这可能与条锈菌的越冬越冬条件有关, 在海拔山区, 夏季气温较低, 条锈菌可顺利越冬, 甚至既可越冬又可越冬, 有利于其群体遗传变异的产生, 保存和扩散。另外, 高海拔地区高强度的紫外线和射线也可能造成锈菌群体的高突变率, 如果这些突变得以顺利保存和传播, 则可能会明显地丰富锈菌群体的多样性。

利用 Arlequin 软件中的 AMOVA 方法分析结果表明, 供试小麦条锈菌群体间和群体内都存在着一定的遗传分化, 群体间的遗传变异占总变异的 12.5% ($P < 0.001$), 群体内遗传变异占 87.5%, 表明陇南地区条锈菌遗传分化程度较低。基因流对于一个遗传结构的影响是, 基因流传播愈顺畅, 遗传分化的程度将愈低。本研究中条锈菌群体间的基因流 Nm 为 1.83, 表明群体之间菌源相互交流十分频繁, 这一结果为小麦条锈菌主要在这些地区高海拔山区的自生麦苗上越冬, 在半山区和川地越冬, 可就地完成周年循环, 提供了分子证据。小麦条锈病是一种气传病害, 夏孢子在风力作用下可以大范围的传播, 这一结论也被基因流的存在所证实。除基因流对群体遗传分化的影响外, 自然选择致使病原菌本身发生的遗传改变也会对分化提供潜在的可能。小麦条锈菌至今没有发现有性世代的存在, 在通常情况下个体之间无基因交流, 生殖上是隔离的。条锈菌这一特点并不利于其产生遗传变异, 然而对自然群体的遗传多样性分析发现陇南地区条锈菌存在较高的基因型, 这些变异可能来自突变、异核现象或准性生殖, 甚至存在有性杂交可能^[15]。小麦条锈

菌菌源基数大, 繁殖快, 夏孢子可随高空气流远距离传播, 易受到自然诱变因素的影响。井金学等^[23]紫外线、进行小麦条锈菌的突变研究, 获得了颜色或致病力变异的菌株。1992 至 1993 年康振生、马青等^[24-25]也以混合接种实验获得了白化或致病力变异的新菌系, 并进行了生物学和细胞学的研究, 结果认为, 不同小种的芽管、胞间菌丝可通过融合发生核的交换和核数目的变化, 导致遗传重组。

本研究中采用了比较先进的 TP-M13-SSR PCR 技术对小麦条锈菌的群体遗传结构进行了研究。TP-M13-SSR 检测技术具有比较高的性价比, 荧光标记引物 M13 具有通用性, 只需一次性标记, 即当研究中需要增加额外的 SSR 位点时, 只需合成带尾巴序列的引物, 而荧光引物 (M13 labeled primer) 则不需重新合成, 大大提高了检测效率, 而且还降低了费用^[26-27]。本研究结合 TP-M13-SSR 检测技术及 Licor-4300 遗传分析仪拥有的近红外检测专利技术 (IR-D800) 对 SSR 扩增产物进行了荧光检测, 该检测平台自动化程度较高, 电泳结果背景底, 灵敏度高, 准确性好。从实际应用角度看, SSR-PCR 扩增产物的所有其它检测方法都可以用 TP-M13-SSR 荧光检测所替代, 尤其适合多位点对大规模群体样品的标记。该方法不存在电泳检测法中的一系列烦琐的染色和显色等过程, 检测分辨率较高、时间短、分析通量高。但是, 这种技术的试剂和仪器价格非常贵, 而且 Licor-4300 遗传分析仪非常灵敏, 对实验操作要求非常严格。

4 结论

SSR 分析揭示出陇南地区小麦条锈菌群体遗传多样性很丰富, 且地区之间有一定的差异; 群体遗传变异主要存在于群体内部, 不同地区间存在基因的交流 and 病原菌的移动。

References

- [1] 李振岐, 曾士迈. 中国小麦锈病. 北京: 中国农业出版社, 2002.
Li Z Q, Zeng S M. *Wheat Rusts in China*. Beijing: China Agricultural Press: 2002. (in Chinese)
- [2] Chen X, Line R F, Leung H. Relationship between virulence variation and DNA polymorphism in *Puccinia striiformis*. *Phytopathology*, 1993, 83(12): 1489-1497.
- [3] Hovmøller M S, Justesen A F, Brown J K M. Clonality and long-distancemigration of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in north-west Europe. *Plant Pathology*, 2002, 51: 24-32.

- [4] Enjalbert J, Duan X, Giraud T. Isolation of twelve microsatellite loci, using an enrichment protocol in the phytopathogenic fungus *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *Molecular Ecology Notes*, 2002, 2: 563-565.
- [5] Enjalbert J, Duan X, Giraud T, Vautrin D, Hovmöller M S. Genetic evidence of local adaptation of wheat yellow rust (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) within France. *Molecular Ecology*, 2005, 14: 2065-2073.
- [6] Shan W X, Chen S Y, Kang Z S. Genetic diversity in *Puccinia striiformis* Westend. f. sp. *tritici* revealed by pathogen genome-specific repetitive sequence. *Canadian Journal of Botany*, 1998, 76: 587-595.
- [7] 郑文明, 陈受宜, 康振生, 王 阳, 吴立人, 李振岐. 甘肃天水地区小麦条锈菌自然群体 DNA 指纹分析. *菌物学报*, 2005, 24(2): 199-206.
- Zheng W M, Chen S Y, Kang Z S, Wang Y, Wu L R, Li Z Q. DNA fingerprinting of natural population of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in Tianshui area. *Mycosystema*, 2005, 24 (2): 199-206. (in Chinese)
- [8] Wang X J, Zheng W M, Tang C L, Kang Z S. The development of a PCR-based method for detecting *Puccinia striiformis* latent infections in wheat leaves. *Europe Journal Plant Pathology*, 2007, 9: 232-236.
- [9] Yeh F C, Yang R C, Boyle T B J. POPGENE, the user-friendly share are for population genetic analysis. *Molecular Biotechnology Center*, 1997, 24: 112-118.
- [10] Nei M. *Molecular Evolutionary Genetics*. New York: Columbia University Press, 1987.
- [11] Wright S. The genetical structure of population. *Annual Eugenetics*, 1951, 15: 323-354.
- [12] 张富民, 葛 颂. 群体遗传学研究中的数据处理方法 I. —RAPD 数据的 AMOVA 分析. *生物多样性*, 2002, 10(4): 438-444.
- Zhang F M, Ge S. Data analysis in population genetics. I. Analysis of RAPD data with AMOVA. *Biodiversity Science*, 2002, 10(4): 438-444. (in Chinese)
- [13] Excoffier L G, Laval, Schneider. Arlequin ver. 3. 0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 2005, 1: 47-50.
- [14] Rohlf F J. *NTSYS-pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*. State University of New York, Stony Brook, NY, Version 1. 8. 1993.
- [15] Justesen A F, Ridout C J, Hovmöller M S. The recent history of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in Denmark as revealed by disease incidence and AFLP markers. *Plant Pathology*, 2002, 51: 13-23.
- [16] Lorys M A, Christian L, de Vallavieille-Pope C, Neema C. Genetic variability in *Puccinia Striiformis* f. sp. *tritici* populations sampled on a local scale during natural epidemics. *Applied Environment Microbe*, 2002, 12: 6138-6145.
- [17] Hovmöller M S, Yahyaou A H, Milus E A, Justesen A F. Rapid global spread of two aggressive strains of a wheat rust fungus. *Molecular Ecology*, 2008, 17: 3818-3826.
- [18] Hovmöller M S, Justesen A F. Appearance and interpretation of atypical phenotypes of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in NW-Europe, Australian. *Journal of Agricultural Research*, 2007, 58: 518-524.
- [19] Hovmöller M S, Justesen A F. Rates of evolution of avirulence phenotypes and DNA markers in a northwest European population of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *Molecular Ecology*, 2007, 16: 4637-4647.
- [20] 单卫星, 陈受宜, 惠东威, 吴立人, 李振岐. 我国小麦条锈菌模式菌系的 DNA 指纹分析. *科学通报*, 1996, 41(15): 1427-1430.
- Shan W X, Chen S Y, Hui D W, Wu L R, Li Z Q. DNA fingerprint analysis of pattern isolates of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in China. *Chinese Science Bulletin*, 1996, 41(15): 1427-1430. (in Chinese)
- [21] 单卫星, 陈受宜, 吴立人. 我国小麦条锈菌流行小种的 RAPD 分析. *中国农业科学*, 1995, 28(5): 1-7.
- Shan W X, Chen S Y, Wu L R. RAPD analysis of epidemic races of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in China. *Scientia Agriculture Sinica*, 1995, 28(5): 1-7. (in Chinese)
- [22] 商鸿生, 井金学, 李振岐. 紫外线诱导小麦条锈菌毒性突变的研究. *植物病理学报*, 1994, 25(4): 347-351.
- Shang H S, Jing J X, Li Z Q. Mutations induced by ultraviolet radiation affecting virulence of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in China. *Acta Phytopathologica Sinica*, 1994, 25(4): 347-351. (in Chinese)
- [23] 马 青, 康振生, 李振岐. 小麦条锈菌夏孢子芽管在小麦叶片上结合现象的研究. *西北农业大学学报*, 1993, 21(2): 97-99.
- Ma Q, Kang Z S, Li Z Q. Study on tube integration of urediniospore of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* on wheat leaf. *Journal of Northwest Sci-Tech University of Agricultural and Forestry*, 1993, 21(2): 97-99. (in Chinese)
- [24] 刘志斋, 王天宇, 黎 裕. TP-M13-SSR 技术及其在玉米遗传多样性研究中的应用. *玉米科学*, 2007, 15(6): 10-15, 31.
- Liu Z Z, Wang T Y, Li Y. TP-M13-SSR technique and its applications in the analysis of genetic diversity in maize. *Journal of Maize Sciences*, 2007, 15(6): 10-15, 31. (in Chinese)
- [25] 李会勇, 王天宇, 黎 裕, 石云素, 宋燕春, 陆 平. TP-M13 自动荧光检测法在高粱 SSR 基因型鉴定中的应用. *植物遗传资源学报*, 2005, 6(1): 68-70.
- Li H Y, Wang T Y, Li Y, Shi Y S, Song Y C, Lu P. Application of the TP-M13 automated fluorescent-labelled system of SSR genotyping in sorghum. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2005, 6(1): 68-70. (in Chinese)