

三个不同抗条锈病小麦品种种子内生真菌多样性分析

Diversity of endophytic fungi in the seeds of three wheat cultivars resistant to stripe rust

宋晓贺^{1*} 李彦凯¹ 李 强²

(1. 安庆师范大学生命科学学院, 皖西南生物多样性和生态保护安徽省重点实验室, 安徽 安庆 246133;

2. 西北农林科技大学植物保护学院, 旱区作物逆境生物学国家重点实验室, 陕西 杨凌 712100)

Song Xiaohu^{1*} Li Yankai¹ Li Qing²

(1. Anhui Provincial Key Laboratory for Biodiversity and Ecological Conservation in the South-West of Anhui Province, College of Life Sciences, Anqing Normal University, Anqing 246133, Anhui Province, China; 2. State Key Laboratory of Crop Stress Biology for Arid Areas, College of Plant Protection, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi Province, China)

由条锈菌 *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* 引起的小麦条锈病是影响世界范围内小麦安全生产的重要病害。植物内生真菌是指在其生活史的一定阶段或全部阶段生活于健康植物组织或器官内部的真菌, 宿主植物不表现出外在症状。种子表面和内部携带有丰富的微生物种群, 岳红宾等(1996)认为小麦种子内生真菌的组成与小麦品种有一定的关系。目前鲜见关于抗病植物种子内生真菌的报道, 其种群组成及其在植物抗病性方面可能发挥的生物学功能也研究甚少。本研究利用 ITS 区域高通量测序技术, 研究三属麦 1 号、咸农 4 号和铭贤 169 三种小麦种子内生真菌群落组成, 以期挖掘小麦抗条锈病的潜在有益内生真菌资源, 这对小麦条锈病的可持续控制具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

供试小麦: 本试验选取三属麦 1 号、咸农 4 号和铭贤 169 三种小麦。三属麦 1 号是通过簇毛麦、硬粒小麦、小黑麦杂交选育而成, 苗期和成株期对条锈病均表现免疫, 为高抗品种; 咸农 4 号是目前公认的可持续抗条锈病的小麦品种; 铭贤 169 是小麦条锈病高感品种。均由西北农林科技大学植物保护学院小麦病原真菌监测及抗病遗传实验室提供。

试剂及仪器: UNIQ-10 柱式真菌基因组抽提试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司; GeneJET 胶回收试剂盒、Ion Plus Fragment Library Kit 建库试剂盒, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司。Ion S5TMXL 测序系统, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; Bio-Rad T100 梯度 PCR 仪, 美国 Bio-Rad 公司;

EPS 301 电泳仪及 JY04S-3C 型紫外凝胶成像仪, 北京君意东方电泳设备有限公司。

1.2 方法

3 个供试小麦品种各称取 5 g 种子, 无菌水冲洗 3 遍, 75% 乙醇消毒 1 min, 无菌水冲洗 3 次, 0.1% 升汞浸泡 7 min, 无菌水冲洗 3~5 次。取灭菌石英砂于灭菌研钵中, 将种子充分研磨, 按照 UNIQ-10 柱式真菌基因组抽提试剂盒的操作说明提取内生真菌基因组 DNA。经检验质量合格的 DNA 样品送北京诺禾致源生物信息技术有限公司测序。用带有 Barcode 的特异性引物 ITS1-1F-F (5'-CTTGGTCATTAGAGGAAGTAA-3') 和 ITS1-1F-R (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3'), 对样本的 ITS 区域进行 PCR 扩增, 引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。30 μL PCR 反应体系: 2×Phusion Master Mix 15 μL、2 μmol/L 正反向引物各 3 μL、1 ng/μL DNA 10 μL, 补 ddH₂O 至总体积 30 μL。PCR 反应程序: 98℃ 预变性 1 min; 98℃ 变性 10 s, 50℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 30 个循环; 72℃ 延伸 10 min, 4℃ 保存。各样本重复 3 次, 同一样本 PCR 产物混合后用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测样品质量。

回收 PCR 产物并构建文库, 经定量和文库检测合格后进行 ITS 高通量测序。对原始测序数据进行质量控制, 得到最终的有效数据; 对所有样品全部有效数据进行聚类, 在 97% 序列相似度水平上计算操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU)的数量; 进行物种注释分析, 获得分类学信息并在各个分类水平上统计各样本的群落组成; 计算 Alpha 多样性指数来反映内生真菌群落丰度, 包括 Chao1 指数、

香农指数、ACE指数和覆盖率,值越大丰度越大;根据最大丰度排名前10的目的系统发生关系信息和相对丰度数据,生成物种相对丰度柱形累加图,分析不同样品间的差异,以揭示高抗、持久抗病和感病小麦品种种子内生真菌群落的差异。

2 结果与分析

2.1 样品内生真菌群落多样性分析

3个供试小麦样本测序共产生241 948条原始序列,质量控制后得到240 225条高质量的目标片

段,179 804序列用于构建OTU并获得注释信息。在97%的序列一致性水平上,共获得注释信息的序列聚类成664个OTU,铭贤169、咸农4号和三属麦1号含有的OTU数目分别为168、184和312个。三属麦1号的Chao1指数、香农指数和ACE指数均高于铭贤169和咸农4号,说明三属麦1号中不仅内生真菌群落丰度最大,而且群落中物种数量也最多(表1)。

表1 3个小麦品种种子内生真菌测序结果统计以及 Alpha多样性指数
Table 1 Sequence statistics and alpha diversity of three wheat varieties

样品名称 Sample	有效数据 Valid data	注释数据 Trimmed data	Alpha多样性指数 Alpha diversity				
			分类单元 Operational taxonomic unit (OTU)	Chao1 指数 Chao1 index	香农指数 Shannon index	ACE 指数 ACE index	覆盖率 Coverage (%)
铭贤169 Mingxian 169	80 128	61 067	168	175	1.55	178.88	1
咸农4号 Xiannong 4	80 037	62 977	184	185	1.76	186.43	1
三属麦1号 Sanshumai 1	80 060	55 760	312	312	3.60	312.21	1

2.2 物种注释和内生真菌群落结构分析

3个小麦品种样本共检测到4门17纲31目38科44属63种真菌的存在。其中优势门为子囊菌门Ascomycota,占总测序数目的92.44%,其次是担子菌门Basidiomycota(5.19%)、接合菌门Zygomycota(0.10%)和壶菌门Chytridiomycota(0.09%),未知类群占2.18%。座囊菌纲Dothideomycetes是优势纲,占总测序数纲的88.66%,其次是酵母纲Saccharomycetes(2.63%)和银耳纲Tremellomycetes(1.92%)。在子囊菌门中共有6纲14目,格孢腔目Pleosporales丰度信息和多样性最大,占85.86%。担子菌门中共有5纲14目;接合菌门共有1纲1目,壶菌门共有2纲2目。

在铭贤169、咸农4号和三属麦1号中分别检测到22、26和28个目的真菌存在,有20个目真菌在3个品种中共存。选取最大丰度排名前10的目进行分析,包括格孢腔目、肉座菌目Hypocreales、酵母目Saccharomycetales、煤炱目Capnodiales、银耳目Tremellales、锁掷酵母目Sporidiobolales、散囊菌目Eurotiales、炭角菌目Xylariales、红菇目Russulales和Holt-ermanniales,发现内生真菌相对含量最高的是格孢腔目,为0.86,三属麦1号样品中格孢腔目为0.70,明显低于其在铭贤169样品和咸农4号样品中的0.95和0.92;肉座菌目在持久抗病品种咸农4号样品中相对含量最高,剩余8个目在高抗品种三属麦1号样品中

的相对含量均明显高于其在持久抗病和感病品种中的相对含量。

3 讨论

本研究首次利用ITS高通量测序技术系统分析了不同抗条锈病小麦品种种子内生真菌群落多样性。结果显示小麦种子内生真菌种类分布广泛,涉及子囊菌门、担子菌门、接合菌门和壶菌门4个门。在目的水平上,格孢腔目为优势菌目,属于座囊菌纲,Jumpponen & Jones(2009)、Zhang & Yao(2015)通过ITS高通量测序技术也发现格孢腔目真菌作为优势目存在于大果栎*Quercus macrocarpa*、虎耳草*Saxifraga cepitosa*等多种植物中。本研究结果将为进一步挖掘利用小麦内生真菌资源提供参考信息。

参 考 文 献 (References)

Jumpponen A, Jones KL. 2009. Massively parallel 454 sequencing indicates hyperdiverse fungal communities in temperate *Quercus macrocarpa* phyllosphere. *New Phytologist*, 184(2): 438–448
Yue HB, Wang SZ, Yuan HX, Li HL. 1996. Analysis of endophytic fungi flora in wheat seeds. *Acta Agriculturae Universitatis Henanensis*, 30(4): 354–357 (in Chinese) [岳红宾, 王守正, 袁红霞, 李洪连. 1996. 小麦种子内生真菌区系分析. *河南农业大学学报*, 30(4): 354–357]
Zhang T, Yao YF. 2015. Endophytic fungal communities associated with vascular plants in the high arctic zone are highly diverse and host-plant specific. *PLoS ONE*, 10(6): e0130051

(责任编辑:王 璇)