甘肃省甘谷县小麦条锈菌群体遗传结构分析

王翠翠[1,2] 李磊福[1] 骆 勇[3] 吴波明[1] 李 辉[4] 马占鸿[1*]

（1. 中国农业大学植物病理学系，农业农村部作物有害生物监测与绿色防控重点实验室，北京 100193；
2. 潍坊科技学院，山东省设施园艺生物工程研究中心，潍坊 261000；3. 美国加州大学 Kearney 农业研究中心，Parlier CA 93648；4. 甘肃省植保植检站，兰州 730000）

摘要：为明确我国小麦条锈菌 *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* 主要越夏地区的群体遗传结构及演变情况，利用SSR荧光检测技术，对甘肃省甘谷县2013—2015年期间连续5个小麦生长季采集的141株小麦条锈菌单孢系基因组DNA进行分子标记分析，对小麦条锈菌季节亚群的遗传多样性进行分析。结果表明，甘谷地区小麦条锈菌的遗传多样性丰富，有效等位基因数为1.71，Shannon信息指数为0.66，2014年秋季（2014A）亚群体的基因型多样性低于其余亚群体。分子变异方差分析结果显示，小麦条锈菌季节亚群体间变异仅占21%，变异主要出现在亚群体内部，表明甘谷地区各季节亚群体间遗传分化水平差异较小，小麦条锈菌群体在一个小范围内基本能维持稳定状态。主坐标分析（PCoA）、遗传分化、基因流以及共享基因型分析均表明2014年秋季（2014A）亚群体的遗传结构与相邻季节亚群体存在一定差异，表明越夏过程对甘谷地区个别年份小麦条锈菌群体周年稳定性造成较大的影响，越冬过程对小麦条锈菌群体的影响相对较小，春季受外来菌源干扰的可能性较低。

关键词：小麦条锈菌；SSR检测技术；遗传分化；季节演变

Analysis of genetic structure of a local *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* population in Gangu County, Gansu Province in China

WANG Cuicui[1,2] LI Leifu[1] LUO Yong[3] WU Boming[1] LI Hui[4] MA Zhanhong[1*]

（1. MOA Key Lab of Pest Monitoring and Green Management, Department of Plant Pathology, China Agricultural University, Beijing 100193, China; 2. Shandong Facility Horticulture Bioengineering Research Center, Weifang University of Science and Technology, Weifang 261000, Shandong Province, China; 3. Kearney Agricultural Center, University of California, Parlier CA 93648, USA; 4. Plant Protection Station of Gansu Province, Lanzhou 730000, Gansu Province, China）

Abstract: To clarify the population genetic structure and seasonal evolution of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in a tiny area of main over-summering regions in China, genomic DNA of 141 isolates of *P. striiformis* f. sp. *tritici* sampled from 2013 spring to 2015 spring in Gangu County, Gansu, China was amplified with 12 pairs of SSR markers. The results showed that genetic diversity of *P. striiformis* f. sp. *tritici* in Gangu area was abundant, and the effective allele number was 1.71, and Shannon's information index was 0.66. The genotypic diversity of subpopulation in autumn 2014 (2014A) was significantly lower than that in other seasons. The analysis of molecular variance showed most of the variation occurred within the seasonal subpopulation,and only 21% variance existed among subpopulations, which indicated *P. striiformis* f. sp. *tritici* population could maintain stability in a local area over seasons. Principal coordinate analysis, genetic differentiation analysis, gene flow and shared genotype analysis all

基金项目：国家重点研发计划（2018YFD0200501，2017YFD0201700），中央高校基本科研业务费专项（2019TC168）

* 通信作者（Author for correspondence），E-mail：mazh@cau.edu.cn

收稿日期：2019-09-03

showed that subpopulation of 2014 autumn (2014A) had genetic divergence with other adjacent seasonal subpopulations, which indicated over-summering progress might interrupt the stability of population genetic structure, however not affected by the over-wintering progress, suggesting the spring sources mainly come from local area.

Key words: *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*; SSR detection technique; genetic differentiation; seasonal succession

小麦条锈病是由条形柄锈菌小麦专化型*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*引起的大区流行性病害，遍及世界各主要麦区，流行年份可造成严重的经济和产量损失（李振岐和曾士迈，2002；马占鸿，2018）。甘肃省天水市位于我国小麦条锈病西北流行区，是小麦条锈病的常发区和病菌新生理小种的重要策源地之一（李振岐和曾士迈，2002），导致该地区小麦品种抗条锈性容易丧失。小麦条锈菌可在该地区海拔1 400~2 000 m以上区域的晚熟小麦或自生麦苗上成功越夏（李振岐和曾士迈，2002），在2 080 m以下的地区能顺利越冬，完成周年循环，其秋季的菌源能够借助气流向东部广大冬麦区传播，越冬后春季菌源则可向北部和西部麦区蔓延，对周边地区小麦条锈病的发生有重要影响（李振岐和曾士迈，2002）。郑文明等（2005）研究发现天水市甘谷县的麦积山和凤凰等地区小麦条锈菌均具有丰富的DNA分子多态性，且在同一时间尺度不同地区间菌源交流频繁，然而在理论越夏越冬区（海拔1 400~2 080 m）（李振岐和曾士迈，2002；潘广等，2011）小范围内的小麦条锈菌群体结构是否能维持稳定状态，以及是否有外来菌源的涌入等问题尚不清楚。

自20世纪90年代中期以来，DNA分子标记开始应用于小麦条锈菌分子群体遗传学研究（单卫星等，1995；Enjalbert et al.，2002；郑文明等，2005）。微卫星标记（simple sequence repeats，SSR）技术因其具有、多态性高、分布广、重复性好和共显性标记等特点，在小麦条锈菌群体遗传学研究方面应用广泛（Chen et al.，2009；Zhan et al.，2013；2015），如陆宁海等（2009）利用SSR引物标记分析发现陇南不同海拔地区的小麦条锈菌群体遗传多样性有明显差异，且遗传分化程度也不同；Hu et al.（2017）使用SSR引物标记了961个小麦条锈菌分离物，明确了我国西藏与其它地区的遗传距离较远，属于不同的遗传群组；Ali et al.（2014）利用20对SSR引物标记全球409个小麦条锈菌单孢系，发现喜马拉雅山附近的中国、尼泊尔和巴基斯坦等国家小麦条锈菌群体具有较高的多样性和重组水平，推测这些国家可能是全球小麦条锈菌的起源中心。目前，关于小麦条锈菌的研究多集中于区域间的遗传结构，而在遗传变异水平较高的越夏区内，小麦条锈菌是否能在较小的地理范围内保持群体遗传结构的稳定性尚不清楚。

本研究选取甘肃省甘谷县的1个区域，应用SSR分子标记技术对该区域2013—2015年期间连续5个小麦生长季的小麦条锈菌亚群体进行群体遗传结构研究，明确该地区小麦条锈菌群体的季节演变，以期为制定更为有效的菌源基地病害综合防控策略提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株及小麦：本研究所使用的小麦条锈菌单孢系均采自甘肃省天水市甘谷县古坡乡和白家湾乡，2个采样点间相距最远不超过10 km。样本采集时间为2013年至2015年的秋季（秋苗期）和春季（返青苗期），共包括5个小麦生长季：2013年春季（30株），2013年秋季（26株），2014年春季（30株），2014年秋季（30株）和2015年春季（25株），每季采集6~9个田块，共获得141株小麦条锈菌单孢系。同一季节采集的样本命名为1个季节亚群体，2013年春季、2013年秋季、2014年春季、2014年秋季和2015年春季亚群体分别用2013S、2013A、2014S、2014A和2015S表示，5个季节亚群体的样本汇总命名为甘谷群体。选取田间发病较轻，叶片整洁，小麦条锈菌夏孢子堆稀疏且新鲜饱满的小麦叶片进行采集。用吸水纸将不同样本的病叶分别进行包装，于4℃干燥保存。小麦高感条锈品种铭贤169，由中国农业大学植物病害流行实验室提供。

试剂及仪器：REPLI-g Mini Kit试剂盒，凯杰生物技术（上海）有限公司；DNA Marker GS500、*Taq* Polymerase、10×Reaction Buffer等PCR扩增相关试剂，宝日医生物技术（北京）有限公司；十六烷基三甲基溴化铵（hexadecyl trimethyl ammonium bromide，CTAB）、乙二胺四乙酸（ethylene diamine tetraacetic acid，EDTA）、Tris-HCl、氯仿、异戊醇以及其它试剂均为国产分析纯。FastPrep-24细胞破碎

仪，美国MP公司；Mastercycler系列PCR仪，德国艾本德公司；NanoDrop ND-1000微量分光光度计，中国基因有限公司；ABI 3730XL基因测序仪，美国ABI公司。

1.2 方法

1.2.1 小麦条锈菌菌种的扩繁与基因组DNA提取

小麦条锈菌2013S与2014A亚群体样品采用人工接种方法进行扩繁，获得新鲜的夏孢子堆供试。接种前10 d左右，选取感病品种铭贤169饱满种子15粒，种在直径9 cm的花盆中，待第1片叶完全展开时进行间苗，保留8棵长势好且一致的麦苗用于接种扩繁。接种前将4℃干燥保存的病叶剪成3 cm左右小段，置于铺有湿润滤纸的培养皿中，13~15℃保湿15 h。接种前对即将接种的麦苗叶片进行脱蜡处理，并喷洒0.05%的吐温溶液，使叶片表面附着分布均匀的小液滴。然后将保湿的病叶取出，用消毒接种针挑取饱满的鲜黄色夏孢子堆，沾到小麦叶片表面的液滴上。每个叶片取1个孢子堆接种到1株麦苗上。接种后将麦苗置于8~10℃条件下，黑暗保湿培养24 h，然后扣上隔离罩，转移到17℃/14℃（日/夜）的气候室中继续培养，每日光照14 h。待接种后15 d左右叶片产生夏孢子时，分别单独收集不同单孢系的夏孢子。将其在干燥器中经4℃干燥48 h后，转移至−80℃保存。

小麦条锈菌基因组DNA提取参照Justesen et al.（2002）的CTAB方法，并稍加改动。称取5 mg左右收集保存的夏孢子粉，装在含0.4 g石英砂的2 mL离心管中，加入750 μL预热到65℃的2% CTAB缓冲液，并加入10 μL巯基乙醇。将研磨管置于细胞破碎仪上6 m/s振荡40 s，冰浴5 min，再次振荡。65℃水浴30 min，每10 min将离心管上下颠倒数次混匀。加入750 μL的氯仿/异戊醇（24∶1）溶液，轻微振荡混匀，12 000 r/min离心10 min；取上清液，加入等体积的氯仿/异戊醇（24∶1）溶液，再次以12 000 r/min转速离心10 min，取上清液；加入−20℃预冷的0.6倍体积的异丙醇，−20℃静置2 h，12 000 r/min离心10 min，弃上清液。加入−20℃预冷的1 mL 70%酒精清洗2次，室温干燥，加入30 μL灭菌双蒸水溶解。采用微量分光光度计测定DNA溶液的浓度和纯度，−20℃保存，备用。

1.2.2 小麦条锈菌单个夏孢子堆的多重置换扩增

小麦条锈菌2013A、2014S和2015S亚群体样品采用1.2.1方法获取基因组DNA，该方法可用于从少量条锈病菌夏孢子扩增DNA而不需要进行菌种扩繁（Justesen et al.，2002）。扩增前，对采集的叶片进行保湿，保湿方法同1.2.1。约15 h后孢子堆呈现饱满的鲜黄色时，用接种针挑取1个边缘清晰的孢子堆加入到装有1 μL ddH_2O的PCR管中，再加入2.5 μL REPLI-g Mini Kit试剂盒中的PBS缓冲液与之混合。参照REPLI-g Mini Kit试剂盒说明书将每管加入3.5 μL D2缓冲液，混匀并瞬时离心，冰浴10 min。加入3.5 μL反应终止液，瞬时离心，每个PCR管中加入9.5 μL ddH_2O、29 μL REPLI-g Mini反应缓冲液和1 μL REPLI-g Mini DNA聚合酶，混匀并瞬时离心，总体积为50 μL。扩增反应在PCR仪上进行，反应程序为：30℃恒温16 h，65℃加热3 min，DNA聚合酶失活，终止反应。采用微量分光光度计测定扩增所得DNA的浓度和纯度，−20℃保存，备用。

1.2.3 小麦条锈菌夏孢子基因组DNA的SSR扩增

本研究采用无显著连锁、扩增效率高，且产物单一的12对SSR引物对供试小麦条锈菌的基因组DNA进行扩增，所有引物均由北京擎科新业生物技术有限公司合成，对每对引物的F链5′端进行荧光标记（表1），其中引物CPS8、CPS13、CPS27、CPS34合成参考Chen et al.（2009）；引物RJO3、RJO20合成参考Enjalbert et al.（2002），引物WSR44合成参考Zhan et al.（2015），引物RJN3、RJN5、RJN6、RJN8、RJN13合成参考Bahri et al.（2009）。

所有SSR扩增体系均为10 μL，其中针对RJO3、RJO20引物的反应体系为：10×Reaction Buffer（Mg^{2+} plus）1.0 μL、2.5 mmol/L dNTPs 0.3 μL、5 U/μL *Taq* Polymerase 0.05 μL、10 μmol/L正反向引物各1 μL、50 ng/μL模版DNA 1.0 μL、ddH_2O 5.65 μL（Enjalbert et al.，2002）；其它引物的反应体系为：10×Reaction Buffer（Mg^{2+} plus）1.0 μL、2.5 mmol/L dNTPs 1 μL、5 U/μL *Taq* polymerase 0.15 μL、10 μmol/L正反向引物各0.5 μL、50 ng/μL模版DNA 1.0 μL、ddH_2O 5.85 μL（Bahri et al.，2009；Chen et al.，2009；Zhan et al.，2015）。

SSR扩增反应在PCR仪上进行，各反应体系采用的反应程序为：94℃预变性4 min；94℃变性30 s，相应退火温度下（表1）退火30 s，72℃延伸45 s，35个循环；72℃延伸10 min，4℃终止反应。扩增完成后，将扩增产物用锡箔纸遮光包装，送至北京擎科新业生物技术有限公司，在ABI3730XL基因测序仪上进行电泳分析，分子量标准选用荧光标记DNA Marker GS500（35~500 bp）。

表1 本研究中使用的SSR引物序列、重复单元、退火温度和产物长度信息

Table 1 Sequences, repeat motif, annealing temperature and product size of SSR primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列（5′–3′） Primer sequence（5′–3′）	重复单元 Repeat motif	退火温度 Annealing temperature/℃	产物长度 Product size/bp
CPS8	F：FAM-GATAAGAAACAAGGGACAGC/R：CAGTGAACCCAATTACTCAG	$(CAG)_{14}$	56	203–209
CPS13	F：FAM-TCCAGGCAGTAAATCAGACGC/R：ATCAGCAGGTGTAGCCCCATC	$(GAC)_6$	58	122–128
CPS27	F：TAMRA-GATGGGGAAAAGTAAGAAGT/R：GGTGGGGGATGTAAGTATGTA	$(TTC)_4$	57	225–228
CPS34	F：TAMRA-GTTGGCTACGAGTGGTCATC/R: TAACACTACACA AAAGGGGTC	$(TC)_9$	56	106–114
RJO3	F：FAM-GCAGCA CTGGCAGGT GG/R：GATGAATCAGGA TGGCTC C	$(TGG)_8$	52	203–205
RJO20	F：HEX-AGA AGATCGACGCACCCG/R：CCT CCGATTGGCTTAGGC	$(CAG)_4$	52	283–289
WSR44	F：HEX-AGGCCCCAGGAACACAAAAA/R：TCACACACGCTCCACAGTAC	$(GT)_6$	58	188–192
RJN3	F：ROX-TGGTGGTGCTCCTCTAGTC/R：AGGGGTCTTGTAAGATGCTC	$(CT)_9$	52	335–343
RJN5	F：ROX-AACGGTCAACAGCACTCAC/R：AGTTGGTCGCGTTTTGCTC	$(CT)_8$	52	223–229
RJN6	F：TAMRA-CAATCTGGCGGACAGCAAC/R：CACCTAGGATACCACCGCC	$(AAC)_9$	52	309–318
RJN8	F：FAM-ACTGGGCAGACTGGTCAAC/R：TCGTTTCCCTCCAGATGGC	$(GAT)_8$	52	301–330
RJN13	F：HEX-TTAGCTCAGCCGGTTCCTC/R：CAGGTGTAGCCCCATCTCC	$(ACG)_6$	52	149–152

1.2.4 小麦条锈菌遗传多样性和遗传分化水平分析

利用GeneMaker 2.4.0读取由北京擎科新业生物技术有限公司提供的毛细管电泳峰图数据，根据目标位置峰的有无确定特定片段大小的PCR产物的有无，基因型用引物+产物片段长度（有无）或英文字母表示。利用GenClone 2.0软件（Arnaud-Haond & Belkhir，2007）统计小麦条锈菌单个季节亚群体和甘谷群体的基因型个数，基因型多样性（genotypic diversity，*GD*）的计算方法为基因型个数与单孢系数量的比值。利用POPGENE 1.32软件（Yeh et al. 1997）计算有效等位基因数目和Shannon信息指数以及相邻季节亚群体间基因流N_m。根据Wright（1931）判断标准，若N_m>1，则两亚群体之间基因交流顺畅，若N_m>4，则说明亚群体间菌源交流达到较高水平。利用GenClone 2.0软件（Arnaud-Haond & Belkhir，2007）计算小麦条锈菌两季节亚群体共享基因型频率，计算公式为：共享基因频率=共享基因型个数/$\sqrt{\text{亚群体1的单孢系个数} \times \text{亚群体2的单孢系个数}}$。利用GenAlEx 6.501软件（Peakall & Smouse，2006）中的分子方差分析（analysis of molecular variance，AMOVA）计算相邻季节亚群体间的差异，以F_{st}指数作为衡量参数，若F_{st}>0.25，则所比较的2个亚群体分属于不同的群体，遗传分化程度较高（Hartl & Clark，1998），进行1 000次permutation自举检验；将遗传距离转换为特征向量，利用主坐标分析（PCoA）观察各亚群体在二维空间中的分布，直观反映遗传差异。

2 结果与分析

2.1 小麦条锈菌季节亚群体的遗传多样性水平

用12对SSR引物在甘谷县5个季节亚群体141个分离物中共检测到117种基因型，5个季节亚群体中2015S的基因型多样性最高，为1.00，其次为亚群体2013S、2013A和2014S的基因型多样性高于0.90，而2014A最低，为0.67，甘谷群体整体基因型多样性水平为0.83（表2）。相邻季节亚群体共享基因型结果显示，亚群体2013A与2014S间共享基因型的平均频率最高，为0.08，其次为亚群体2013S与2013A间的共享基因频率，为0.04，其余相邻亚群体间没有共享基因型。

表2 甘谷县5个小麦条锈菌季节亚群体基因型和基因多样性

Table 2 Genotypic and gene diversity of five seasonal subpopulations of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* from Gangu County

亚群体 Subpopulation	群体大小 Size	基因型个数（基因型多样性） No. of genotypes（genotypic diversity）	有效等位基因 Effective allele	Shannon信息指数 Shannon's information index
2013S	30	28（0.93）	1.44±0.10	0.44±0.06
2013A	26	25（0.96）	1.43±0.10	0.40±0.07
2014S	30	27（0.90）	1.39±0.10	0.38±0.07
2014A	30	20（0.67）	1.89±0.10	0.68±0.05
2015S	25	25（1.00）	1.72±0.11	0.61±0.07
总计Total	141	117（0.83）	1.71±0.09	0.66±0.04

S：春季；A：秋季。S：Spring；A：autumn.

2013年春季至2015年春季5个季节甘谷县小麦条锈菌总体上基因多样性水平较高，其有效等位基因数为1.71，Shannon信息指数达0.66（表2）。其中亚群体2014A和20145S的Shannon信息指数高于其余3个群体，分别为0.68和0.61。

2.2 甘谷县小麦条锈菌群体结构与遗传分化

利用GenAlEx 6.501软件进行AMOVA分析，结果显示，甘谷县5个季节亚群体在亚群体内和亚群体间均存在一定程度的变异，其中亚群体间变异占21%，遗传变异主要发生在亚群体内部。对每相邻2个季节亚群体进行遗传分化分析，结果显示，2013S *vs* 2013A、2013A *vs* 2014S、2014S *vs* 2014A、2014A *vs* 2015S的F_{st}值依次为0.04、0.00、0.38和0.25（表3）。其中亚群体2013A与2014S的遗传差异不显著（P=0.41>0.05），同时这2个季节亚群体间基因流强度非常高（N_m=37.30>4），表明研究期间亚群体2013A与2014S间有较高水平的遗传一致度，菌源交流频繁。亚群体2014S与2014A间的F_{st}最大，且这2个亚群体间基因流小于1，表明亚群体2014S与2014A遗传差异较大，基因交流不顺畅。其余相邻亚群体间遗传分化系数F_{st}均小于0.25，且基因流N_m大于1，表明相邻亚群体间均存在一定程度的菌源交流。

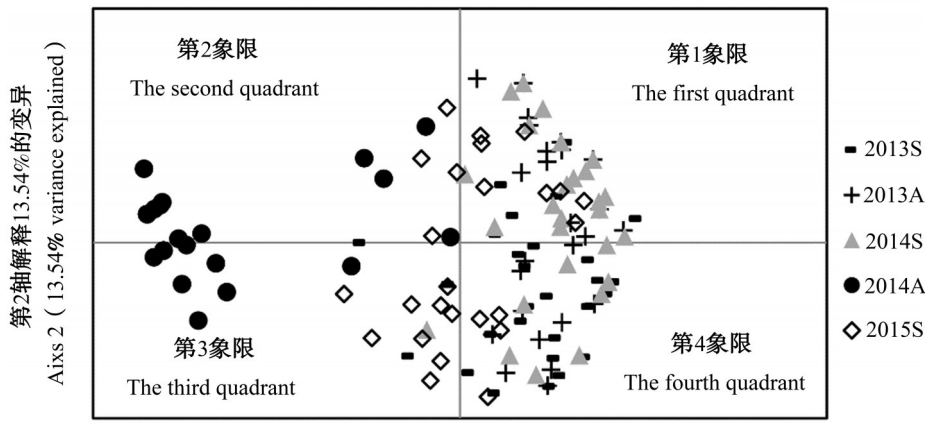
表3 甘谷县小条锈菌5个季节亚群体间遗传分化水平（对角线下）与基因流（对角线上）

Table 3 Analysis of genetic differentiation (below the diagonal) and gene flow (above the diagonal) among five seasonal subpopulations of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* from Gangu County

亚群体 Subpopulation	2013S	2013A	2014S	2014A	2015S
2013S	…	8.17	–	–	–
2013A	0.04（P<0.01）	…	37.30	–	–
2014S	–	0.00（P=0.41）	…	0.77	–
2014A	–	–	0.38（P<0.01）	…	1.39
2015S	–	–	–	0.25（P<0.01）	…

…表示对角线，–表示非相邻亚群体，并未进行遗传分化水平和基因流的计算。S：春季；A：秋季。… represents the diagonal, and – represents the non-calculated F_{st} and N_m between the non-adjacent subpopulations. S: spring; A: autumn.

主坐标分析（PCoA）结果表明，前2个轴能够解释44.93%的遗传变异（图1），分别用横、纵坐标轴表示，其中横坐标轴（第1轴）解释了小麦条锈菌群体31.39%的遗传变异，纵坐标轴（第2轴）解释了13.54%的遗传变异。亚群体2014A与其余4个亚群体距离较远，其基因型主要分布在第2、3象限，仅有少量基因型与亚群体2015S有重合；其余亚群体基因型有较高的混合度，表明除2014A外其余各亚群体间的遗传交流较为频繁。



S：春季；A：秋季。S：Spring; A: autumn.

图1 甘谷县小麦条锈菌5个季节亚群体的主坐标分析

Fig. 1 Results of the principal coordinates analysis on five *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* subpopulations sampled from five seasons in Gangu, China

3 讨论

多重置换技术提取单孢子堆基因组DNA，此技术操作简便，不需要人工育苗繁菌，省时省力，其产物已用于真菌群体扩增片段长度多态性（amplified fragment length polymorphism，AFLP）（Zhang et al.，2015），以及DNA序列等分析（Wang et al.，2009），证明了该方法具有良好的基因组位点覆盖性。因此，本研究选择多重置换技术扩增小麦条锈菌的产物，将其用于SSR分子标记。

病原菌在不同季节间的遗传多样性变化、遗传分化水平以及基因流动等信息，可以反映出病原菌在不同季节是否经历大量个体死亡，或者是否接受外来菌源（Goss，2015），这对于指导病害的综合防治具有重要的参考价值。因此，为了解2013—2015年甘谷县小范围内小麦条锈菌群体遗传结构的季节演变，本研究分析了连续5个小麦生长季小麦条锈菌的群体结构。结果显示，2014年秋季（2014A）亚群体与前后相邻季节亚群体间有较大的遗传差异，其余相邻亚群体间有较强的遗传交流，即在小范围内小麦条锈菌群体基本能够维持稳定状态，菌源的延续性较好。小麦条锈病为气传病害，夏孢子在风力作用下可以进行远距离传播，陆宁海等（2009）、Ali et al.（2016）和Gu et al.（2018）研究结果表明在天水市内部小麦条锈菌菌源交流频繁，而在其中1个较小的地理范围内，小麦条锈菌群体结构仍然可以维持较好的稳定性，因此针对甘谷县小麦条锈病防控应尽量将发病点全面铲除，以避免其菌源周年循环从而传播到其它地区。

本研究结果显示，小麦条锈菌从2014年春季到2014年秋季其基因型多样性显著下降，表明2014年的越夏过程对该地区病原菌群体多样性造成了较大影响。越夏是小麦条锈菌周年循环中最薄弱的环节，一方面其夏孢子受到高温的影响无法存活，另一方面低海拔地区菌源与自生苗和高海拔地区小麦的衔接，以及高海拔菌源与秋苗的衔接也是越夏成功与否的关键因素。田间调查发现，2014年甘肃省整体的越夏菌量是近年来最少的1年（http://www.agroinfo.com.cn/news_detail_4558.html），且秋苗发病较轻，病原菌数量的减少可能是造成其多样性降低的原因。相对于越夏，甘谷县大部分地区具备越冬条件，研究期间冬季12—1月平均气温均在−2℃以上，因此在冬季小麦条锈菌以菌丝形态在叶片中存活，翌年春季大量繁殖（李振岐和曾士迈，2002），若在冬季或早春进行防治，可能会取得较好的防效。

过去关于小麦条锈菌群体结构研究主要集中在地域间，而针对群体结构的时间变化研究较少。季节亚群体间的遗传分化和基因流水平能够反映菌源在季节间的交流程度。Ali et al.（2016）研究发现天水市小麦条锈菌群体在2004年春季和2005年春季具有较高水平的遗传一致度；而Liang et al.（2016）发现2019年秋季与2010年秋季甘肃省的小麦条锈菌群体遗传多样性与遗传结构存在一定的差异，以上研究表明与春季相比，小麦条锈菌群体在秋季容易发生较大的群体变化。本研究通过共享基因型、PCoA和遗传分化水平分析等结果发现，2个秋季亚群体中仅2014年秋季（2014A）亚群体与其余亚群体存在一定程度的遗传差异，表明随着全球气温变暖和病菌耐高温能力增强，越夏要求的海拔下限不断下降（陈万权等，2013），因病原菌数量急剧减少而造成群体瓶颈效应的情况可能并不是每年都发生。此时，采取铲除自生苗、适时晚播等措施能够有效阻断越夏菌源与秋苗间的衔接，降低秋苗的发病流行程度（谢水仙等，1997）。与2014年春季（2014S）亚群体相比，2015年春季亚群体（2015S）与2014年秋季（2014A）亚群体间遗传分化水平更低，表明2015年春季（2015S）亚群体多为冬季潜伏菌源，而2015年春季（2015S）亚群体基因型多样性较2014年秋季（2014A）亚群体有较大程度的提高，说明该区域在保留越冬菌源的基础上，还可能接收了外来菌源。谷医林等（2018）研究发现，在甘谷县1个较小地理范围内，小麦条锈菌存在由南向北传播的趋势。本研究选取的地理范围内，春季外来菌源主要来自周边哪些地区，以及在不同年度是否具有稳定传播趋势尚需进一步研究证实，该信息对于制定区域间的病害联合防控措施具有指导意义。

参 考 文 献（References）

ALI S, GLADIEUX P, LECONTE M, GAUTIER A, JUSTESEN AF, HOVMØLLER MS, ENJALBERT J, DE VALLAVIEILLE-POPE C. 2014. Origin, migration routes and worldwide population genetic structure of the wheat yellow rust pathogen *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. PLoS Pathogens, 10(1): e1003903

ALI S, SOUBEYRAND S, GLADIEUX P, GIRAUD T, LECONTE M, GAUTIER A, MBOUP M, CHEN WQ, DE VALLAVIEILLE-POPE C, ENJALBERT J. 2016. CLONCASE: estimation of sex frequency and effective population size by clonemate resampling in partially clonal organisms. Molecular Ecology Resources, 16 (4): 845−861

ARNAUD-HAOND S, BELKHIR K. 2007. GENCLONE: a computer program to analyze genotypic data, test for clonality and describe spatial clonal organization. Molecular Ecology Notes, 7(1): 15−17

BAHRI B, LECONTE M, DE VALLAVIEILLE-POPE C, ENJALBERT J. 2009. Isolation of ten microsatellite loci in an EST library of the phytopathogenic fungus *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. Conservation Genetics, 10: 1425−1428

CHEN CQ, ZHENG WM, BUCHENAUER H, HUANG LL, LU NH, KANG ZS. 2009. Isolation of microsatellite loci from expressed sequence tag library of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. Molecular Ecology Resources, 9(1): 236−238

CHEN WQ, KANG ZS, MA ZH, XU SC, JIN SL, JIANG YY. 2013. Integrated management of wheat stripe rust caused by *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in China. Scientia Agricultura Sinica, 46 (20): 4254−4262 (in Chinese) [陈万权, 康振生, 马占鸿, 徐世昌, 金社林, 姜玉英. 2013. 中国小麦条锈病综合治理理论与实践. 中国农业科学, 46(20): 4254−4262]

ENJALBERT J, DUAN X, GIRAUD T, VAUTRIN D, DE VALLAVIEILLE-POPE C, SOLIGNAC M. 2002. Isolation of twelve microsatellite loci, using an enrichment protocol in the phytopathogenic fungus *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. Molecular Ecology Notes, 2(4): 563−565

GOSS EM. 2015. Genome-enabled analysis of plant-pathogen migration. Annual Review of Phytopathology, 53: 121−135

GU YL, LI Y, WANG CC, CHU BY, LIU Q, LUO Y, MA ZH. 2018. Inter-seasonal and altitudinal inoculum dynamics for wheat stripe rust and powdery mildew epidemics in Gangu, northwestern China. Crop Protection, 110: 65−72

GU YL, WANG CC, CHU BY, LI LF, LUO Y, MA ZH. 2018. Intra-regional dispersal of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in Gangu County, Gansu Province. Journal of Plant Protection, 2018, 45(1): 185−186 (in Chinese) [谷医林, 王翠翠, 初炳瑶, 李磊福, 骆勇, 马占鸿. 2018. 甘谷县小麦条锈菌小范围传播分析. 植物保护学报, 45(1): 185−186]

HARTL DL, CLARK AG. 1998. Principles of population genetics. Sunderland: Sinauer Associates

HU XP, MA LJ, LIU TG, WANG CH, PENG YL, PU Q, XU XM. 2017. Population genetic analysis of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* suggests two distinct populations in Tibet and the other regions in China. Plant Disease, 101: 288−296

JUSTESEN A, RIDOUT C, HOVMØLLER MS. 2002. The recent history of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in Denmark as revealed by disease incidence and AFLP markers. Plant Pathology, 51(1): 13−23

LI ZQ, ZENG SM. 2002. The rust disease in China. Beijing: China Agriculture Press (in Chinese) [李振岐, 曾士迈. 2002. 中国小麦锈病. 北京: 中国农业出版社]

LIANG JM, LIU XF, LI Y, WAN Q, MA ZH, LUO Y. 2016. Population genetic structure and the migration of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* between the Gansu and Sichuan Basin populations of China. Phytopathology, 106(2): 192−201

LU NH, ZHENG WM, WANG JF, ZHAN GM, HUANG LL, KANG ZS. 2009. SSR analysis of population genetic diversity of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in Longnan region of Gansu, China. Scientia Agricultura Sinica, 42(8): 2763−2770 (in Chinese) [陆宁海, 郑文明, 王建锋, 詹刚明, 黄丽丽, 康振生. 2009. 陇南地区小麦条锈菌群体遗传多样性SSR分析. 中国农业科学, 42(8): 2763−2770]

MA ZH. 2018. Researches and control of wheat stripe rust in China. Journal of Plant Protection. 45(1): 1−6 (in Chinese) [马占鸿. 2018. 中国小麦条锈病研究与防控. 植物保护学报, 45(1): 1−6]

PAN G, CHEN WQ, LIU TG, GAO L, CAO SQ, WANG XM. 2011. Survey of overwintering *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* at different altitudes in the areas of Tianshui, Gansu Province. Plant Protection, 37(2): 103−106 (in Chinese) [潘广, 陈万权, 刘太国, 高利, 曹世勤, 王晓明. 2011. 天水地区不同海拔高度小麦条锈菌越冬调查初报. 植物保护, 37(2): 103−106]

PEAKALL R, SMOUSE PE. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Notes, 6(1): 288−295

SHAN WX, CHEN SY, WU LR, LI ZQ. 1995. RAPD analysis of epidemic races of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in China. Scientia Agricultura Sinica, 28(5): 1−7 (in Chinese) [单卫星, 陈受宜, 吴立人, 李振岐. 1995. 中国小麦条锈菌流行小种的RAPD分析. 中国农业科学, 28(5): 1−7]

WANG YC, ZHU MQ, ZHANG R, YANG HL, WANG Y, SUN GY, JIN SL, HSIANG T. 2009. Whole genome amplification of the rust *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* from single spores. Journal of Microbiological Methods, 77(2): 229−234

WRIGHT S. 1931. Evolution in Mendelian populations. Genetics, 16 (2): 97−159

XIE SX, CHEN WQ, CHEN YL, SONG WZ, LIU SJ, YANG FR, YANG SF, HU JW, DONG JS. 1997. Occurrence and management of wheat stripe rust (*Puccinia striiformis* West) in autumn, winter, and spring in the south of Gansu Province. Journal of Plant Protection, 24(1): 29−34 (in Chinese) [谢水仙, 陈万权, 陈扬林, 宋位中, 刘守俭, 杨发荣, 杨世发, 胡箭卫, 董敬生. 1997. 陇南地区小麦条锈病发生动态与治理. 植物保护学报, 24(1): 29−34]

YEH FC, YANG RC, BOYLE TBJ, YEH FC, YANG RC, BOYLE TBJ, YE ZH, MAO JX. 1997. POPGENE, the user-friendly share are for population genetic analysis. Molecular Biotechnology Center, 24: 112−118

ZHAN GM, WANG FP, LUO HY, JIANG SC, ZHENG WM, HUANG LL, KANG ZS. 2015. Screening for simple sequence repeat markers in *Puccinia striiformis tritici* based on genomic sequence. Journal of Zhejiang University - Science B: Biomedicine & Biotechnology, 16(8): 727−732

ZHAN GM, ZHUANG H, WANG FP, WEI GR, HUANG LL, KANG ZS. 2013. Population genetic diversity of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* on different wheat varieties in Tianshui, Gansu Province. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 29: 173−181

ZHANG R, MA ZH, WU BM. 2015. Multiple displacement amplification of whole genomic DNA from urediospores of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. Current Genetics, 61: 221−230

ZHENG WM, CHEN SY, KANG ZS, WANG Y, WU LR, LI ZQ. 2005. DNA fingerprinting of natural population of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in Tianshui area. Mycosystema, 24(2): 199−206 (in Chinese) [郑文明, 陈受宜, 康振生, 王阳, 吴立人, 李振岐. 2005. 甘肃天水地区小麦条锈菌自然群体DNA指纹分析. 菌物学报, 24(2): 199−206]

（责任编辑：王 璇）