

西南地区小麦抗条锈病种质的遗传多样性及群体结构分析

陈天青¹, 黄芳², 李文贞³, 蒋选利², 王伟¹, 刘冬成⁴, 阳文龙⁴, 张爱民⁴, 张立异¹

(¹ 贵州省旱粮研究所, 贵阳 550006; ² 贵州大学农学院, 贵阳 550025; ³ 广东海洋大学农学院, 湛江 524088;

⁴ 中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京 100101)

摘要: 全面了解西南地区小麦抗条锈病种质遗传多样性和群体结构信息, 能有效提高抗病品种的育种效率。本研究利用基于基因分型测序(GBS)技术的 DArT-seqTM 方法对 134 份小麦材料开展了全基因组基因分型, 共获得了 6919 个多态性的 SNP(single nucleotide polymorphism) 标记, 其多态性指数(PIC, polymorphism information content) 的范围在 0.01~0.50 之间, 平均值为 0.32。根据 SNP 标记在 134 份小麦品种中的基因分型数据, 计算了品种间的遗传相似系数(GS), 其变异范围为 0.51~0.98, 平均值 0.61。非加权组平均法(UPGMA, unweighted pair-group method with arithmetic mean) 聚类分析结果显示根据来源地和亲缘关系的不同, 这批小麦品种(系) 可划分为 5 个群。主坐标分析(PCoA) 结果显示, 小麦材料清晰地聚集形成了 2 个群。第 1 类群由不同来源的小麦材料组成, 群体较大且分布更紧密。而第 2 类群几乎都由贵州小麦组成, 品种数目较少但更加分散。在抗条锈病基因的分布上, 大多数携带 Yr9 基因位点的小麦品系聚集在第 1 类群中, 而绝大多数携带 Yr26 抗病基因位点的小麦品系则聚集在第 2 类群中。本研究从基因型多样性水平上阐释了西南地区小麦抗病种质遗传背景, 为西南地区和小麦的抗条锈病育种提供了理论依据。

关键词: 普通小麦; DArT-seq; 遗传多样性; 群体结构

Investigation and Analysis of Genetic Diversity and Population Structure for Wheat Germplasms Resistant to Stripe Rust in Southwest China

CHEN Tian-qing¹, HUANG Fang², LI Wen-zhen³, JIANG Xuan-li², WANG Wei¹,

LIU Dong-cheng⁴, YANG Wen-long⁴, ZHANG Ai-min⁴, ZHANG Li-yi¹

(¹ Guizhou Institute of Upland Crops, Guiyang 550006; ² Agricultural College, Guizhou University, Guiyang 550025;

³ Agronomic College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088;

⁴ Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Science, Beijing 100101)

Abstract: Knowledge of genetic diversity and population structure is essential for the effective use of wheat germplasms resistant to stripe rust in Southwest China in breeding programs. In this study, DArT-seqTM based on genotyping by sequencing(GBS) approach was used to screen a collection of 134 common wheat varieties from the whole genome, and 6919 informative single nucleotide polymorphism(SNP) markers were obtained. The polymorphism information content(PIC) of SNP markers was in the range from 0.01 to 0.50, with the average of 0.32. SNP-based genetic similarity(GS) value among 134 wheat accessions ranged from 0.51 to 0.98, with the average of 0.61. The unweighted pair-group method with arithmetic mean(UPGMA) dendrogram indicated that the wheat accessions were clustered into five groups according to their origins and pedigrees. Two clear groups(Group I and

收稿日期:2015-01-19 修回日期:2015-02-28 网络出版日期:2015-10-14

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20151014.1429.030.html>

基金项目: 国家自然科学基金项目(31160281); 贵州省国际科技合作计划项目(黔科合外 G(2013)7039 号); 贵州省优秀青年科技人才培养对象专项资金项目(黔科合人字(2013)4 号); 贵州省留学人员科技活动项目(黔人项目资助合同(2013)01 号); 贵州省农科院专项((2010)003 号)

第一作者主要从事小麦抗病育种研究。E-mail: chen-tianqing@hotmail.com

通信作者: 张立异, 主要从事小麦分子育种研究。E-mail: lyzhang1997@hotmail.com

Group II) were identified using principal-coordinates analysis (PCoA) of the whole-genome level. Group I was highly clustered with no obvious separation of cultivars (lines) originating from different geographic regions, most of them carried *Yr9* locus; Group II was mainly composed of varieties from Guizhou province, most of them carried *Yr26* locus. Our results provide valuable information of genetic diversity for stripe rust resistant wheat germplasms in Southwest China, which will facilitate wheat breeding for resistance to strip rust in our country.

Key words: common wheat; DArT-seq; genetic diversity; population structure

普通小麦 (*Triticum aestivum* L.) 是世界上最主要的粮食作物, 提供人类生存所需一半的食物热量, 同时满足了人类很大一部分的营养需求^[1]。世界各地的小麦育种计划都在致力于选育优质、高产和抗病的小麦新品种。而全面了解种质资源的遗传多样性信息是选择杂交亲本和建立杂种优势群的基础, 对提高小麦的产量与品质, 增强其植株的抗病性, 改良其在生产上的农艺性状具有指导意义。因此, 遗传多样性的研究对于普通小麦育种及其遗传资源的保存与利用具有十分重要的意义^[2]。

随着分子标记技术快速的发展, 第 1 代和第 2 代分子标记已经大量地应用于普通小麦的遗传多样性分析, 如第 1 代分子标记 RFLPs (restriction fragment length polymorphisms)^[3-4], 第 2 代分子标记 AFLPs (amplified fragment length polymorphisms)^[5-7] 和 SSRs (simple sequence repeats)^[8-10]。由于普通小麦是异源六倍体作物 ($2n = 42$), 具有庞大 ($\sim 1600\text{Mb}$) 而复杂 ($> 80\%$ 的重复序列) 的基因组, 而它的全基因组测序刚刚完成, 且物理图谱还未构建完成^[11], 这使得第 3 代分子标记 SNP (single nucleotide polymorphism) 目前在普通小麦中的开发和应用较其他作物 (如水稻和玉米) 更为困难。但是随着分子标记技术的不断发展, 高通量和低成本地开发小麦 SNP 分子标记成为可能。基于高通量的第 2 代测序技术 (NGS, next generation sequencing) 诞生了许多新的 SNP 检测方法, 可以同时进行 SNP 标记发掘和基因分型, 既降低检测费用, 又可获得高质量的 SNP 标记^[12]。

基因分型测序技术 (GBS, genotyping by sequencing) 是一种基于 NGS 的最新基因分型方法。其原理是将基因组 DNA 进行酶切, 然后对酶切片段两端序列进行高通量测序, 通过分析获得 SNP 信息并进行基因分型, 是一种快速、简便、低成本的基因分型方法^[13]。目前, 澳大利亚 DArT P/L 公司发展的 DArT-seqTM 方法是结合多样性微阵列技术 (DArT, diversity arrays technology) 和 NGS 的一种 GBS 技术。DArT-seqTM 依赖于简化基因组途径来增加基因组代

表的单拷贝序列并测序, 可以同时检测到 SNP 和 DArT 标记^[14]。

SNP 标记已经被广泛应用于主要农作物分子遗传学研究中, 如水稻高密度分子标记图谱的构建^[15] 和基因精细定位^[16]、玉米的群体结构分析及关联作图^[17]等。而在小麦的研究方面, S. Chao 等^[18] 利用覆盖全基因组的 1536 个 SNP 标记, 调查了来源于美国和墨西哥的 478 个冬春麦品种的群体结构和连锁不平衡程度。C. Zanke 等^[19] 利用 770 个 SSR 标记和 7934 个 SNP 标记来对来自欧洲的 358 个冬麦品种和 14 个春麦品种群体开展了遗传多样性调查和全基因组关联分析, 发现位于小麦 5BL 上的类似水稻的光周期 *Hd6* 基因对小麦抽穗期起着非常重要的作用。最近, B. Courtois 等^[20] 利用 DArT-seq 技术开展的粳稻根部性状的关联分析中, 共获得了 9727 个 DArT 标记和 6717 个 SNP 标记, 确定的 19 个极显著关联的分子标记中发现了几个可能的候选基因, 而 DArT-seq 技术在小麦研究中的应用还未见报道。

小麦条锈病是影响我国小麦生产的主要病害之一, 而贵州和四川是我国小麦条锈病等多种病害的重发区^[21-22], 特别适合小麦条锈病的研究和抗病新品种的选育。近 30 年以来, 该地区通过远缘杂交等手段选育了一批小麦条锈病抗源 (如贵农 21、贵农 22 和贵农 775 等)^[23-28], 并且育成了一批生产上广泛应用的新品种和优良品系。贵州和四川地区的条锈病流行小种为条中 32 和 33 等^[29-30], 小麦的抗条锈性主要来源于贵农 22 和 92R 系列的 *Yr26*^[31-33]。但是 2009 年以来在四川郫县出现了贵农 22 致病类型条锈菌变异小种 V26, 导致携带 *Yr26* 的小麦品系丧失抗性^[34]。邝文静等^[34] 研究证明 V26 对含有 *Yr9* 洛夫林 13 没有毒性, 但能够侵染 39 个四川小麦新品种中的 38 个, 引起四川大面积生产中 83.26% 的田块发病。2010-2011 年度刘太国等^[35] 对来自我国 14 个省区的条锈菌进行了生理小种鉴定和分析, 有 4.3% 的标样被鉴定为贵农 22 (V26) 类群, 且主要分布在四川、云南和甘肃三省, 指出该类群已经

扩展至全国 9 个省区。所以本研究对主要来自贵州和四川地区的 134 份小麦抗病品种(系),结合 *Yr9* 和 *Yr26* 抗病基因紧密连锁分子标记的扫描结果,利用 DArT-seqTM 技术开展全基因组的 SNP 标记基因分型,了解西南地区抗条锈病品种(系)的遗传多样性及群体结构,为拓宽群体遗传基础和组配选育优质高产的抗病新品种提供理论依据,同时也为下一步小麦抗条锈病的全基因组关联作图做好铺垫。

表 1 供试小麦品种(系)名称、来源、系谱及抗病基因标记检测结果

Table 1 Name,source,pedigree and *Yr* genes scanning results of the wheat cultivars(lines) in experiment

品种(系) Cultivar(line)	来源地 Origin	亲本组合 Pedigree	分子标记检测 ^a Molecular detection	
			<i>Yr9</i> (AF1/AF4 ,1500 bp)	<i>Yr26</i> (gwm11 ,193 bp)
0308	贵州	抗白粉病基因库群选		+
9712	贵州	不详		+
贵麦 12 GM12	贵州	不详	+	
贵育 17 GY17	贵州	不详		+
黔麦 12 QM12	贵州	综矮抗 2 号/阿勃//小黑麦///小燕麦		+
黔麦 14 QM14	贵州	不详.	+	
黔麦 15 QM15	贵州	兴矮抗 1 号/C39	+	
黔麦 16 QM16	贵州	QR3/QR1		
黔麦 17 QM17	贵州	P36/1726	+	
黔麦 18 QM18	贵州	抗白粉病基因库群选		+
黔麦 19 QM19	贵州	9665F8//贵农 21/阿勃		+
夏繁 28 XF28	贵州	贵农 21/阿勃		+
黔 110117-1 Q110117-1	贵州	小偃 503/976F4		+
黔 11AT6-5 Q11AT6-5	贵州	矮败小麦//贵农 21/阿勃///墨黑 25		+
黔麦 20 QM20	贵州	贵农 775//贵农 21/阿勃		
黔 079988-46 Q079988-46	贵州	贵农 775/98318		+
黔 102032-8 Q102032-8	贵州	超选/9639	+	
黔 110240-2 Q110240-2	贵州	贵农 001/夏繁 61		+
黔 110209-4 Q110209-4	贵州	节燕 970012/9611F6		+
贵农 18 GN18	贵州	莱州 137/贵农 775		+
贵农 19 GN19	贵州	中燕 96-3/贵农 21		+
贵农 25 GN25	贵州	早优 2 号/贵农 775		+
贵农 26 GN26	贵州	贵农 97012/贵农 21	+	+
贵农 28 GN28	贵州	贵农 13 号/贵农 775		+
贵农 19-4 GN19-4	贵州	小黑麦/光稃野燕麦//普通小麦	+	
贵农 21 GN21	贵州	簇毛麦/硬粒小麦//普通小麦	+	
贵农 21-1 GN21-1	贵州	簇毛麦/硬粒小麦//普通小麦	+	+
贵农 22 GN22	贵州	簇毛麦/硬粒小麦//普通小麦		+
贵农 775 GN775	贵州	节节麦/光稃野燕麦//偏凸山羊草/硬粒小麦		+
白免 3 号 BM3	贵州	矮粒多系选		
节燕普 1 JYP1	贵州	节节麦/光稃野燕麦//偏凸山羊草/硬粒小麦	+	

1 材料与方法

1.1 供试材料

本研究选用主要来源于贵州和四川的 134 份普通小麦品种(系)。其中贵州 73 份、四川 39 份。还有一些来源于中国其他小麦主产区的品种(系),包括苏、鄂、豫、陕、京等地的 22 份(表 1)。

表 1(续)

品种(系)	来源地	亲本组合	分子标记检测 ^a Molecular detection	
Cultivar(line)	Origin	Pedigree	Yr9(AF1/AF4,1500 bp)	Yr26(gwm11,193 bp)
节燕普 2 JYP2	贵州	节节麦/光稃野燕麦//偏凸山羊草/硬粒小麦	+	
节燕普 3 JYP3	贵州	节节麦/光稃野燕麦//偏凸山羊草/硬粒小麦		+
TG	贵州	提莫非维小麦/光稃野燕麦		+
TP2	贵州	提莫非维小麦/葡萄牙野燕麦		+
TP3	贵州	提莫非维小麦/葡萄牙野燕麦	+	+
硬葡 1 YP1	贵州	硬粒小麦/葡萄牙野燕麦	+	
硬葡 2 YP2	贵州	硬粒小麦/葡萄牙野燕麦	+	
一粒葡 8-1 YLP8-1	贵州	一粒小麦/葡萄牙野燕麦	+	
一粒葡 8-40 YLP8-40	贵州	一粒小麦/葡萄牙野燕麦	+	
P1-2	贵州	提莫非维小麦变异株系选		+
P3 芒-8 P3M-8	贵州	提莫非维小麦变异株系选		+
P5-1	贵州	提莫非维小麦变异株系选		+
P7-9	贵州	提莫非维小麦变异株系选		+
P7-26	贵州	提莫非维小麦变异株系选		+
以光-1 YG-1	贵州	以色列野生二粒小麦/光稃野燕麦	+	
以光-4 YG-4	贵州	以色列野生二粒小麦/光稃野燕麦	+	+
以特选 1 YTX1	贵州	以色列野生二粒小麦/光稃野燕麦		+
以特选 2 YTX1	贵州	以色列野生二粒小麦/光稃野燕麦		+
固优 1 GY1	贵州	以色列野生二粒小麦/光稃野燕麦		+
贵协 1 GX1	贵州	提莫非维小麦/葡萄牙野燕麦		+
贵协 3 GX3	贵州	野生二粒小麦/光稃野燕麦		
贵协 4 GX4	贵州	野生二粒小麦/光稃野燕麦		+
贵协 5 GX5	贵州	野生二粒小麦/光稃野燕麦		+
P13-1	贵州	提莫非维小麦变异株系选		+
P13-3	贵州	提莫非维小麦变异株系选		
P13-4	贵州	提莫非维小麦变异株系选		+
P13-5	贵州	提莫非维小麦变异株系选		+
安麦 7 号 AM7	贵州	三属麦/8625		
毕 2007-1 B2007-1	贵州	不详	+	
毕 2007-7 B2007-7	贵州	不详		
毕麦 18 号 BM18	贵州	毕 89-2/贵农 93-4//贵农 93-4	+	
丰优 1 号 FY1	贵州	不详	+	
丰优 2 号 FY2	贵州	00435///SI24//苏麦 3 号/无芒 1 号	+	
丰优 3 号 FY3	贵州	8619-3-1/8524-1-6	+	
丰优 6 号 FY6	贵州	9106-1-8/9303-9-6	+	
丰优 7 号 FY7	贵州	87111/90225		
丰优 8 号 FY8	贵州	西农 1376/特大穗		+
丰优 9 号 FY9	贵州	8619-3-1/8729-6-2		
丰优 10 号 FY10	贵州	云 35334-3/丰优 3 号		+
丰优 92212 FY92212	贵州	不详	+	

表 1(续)

品种(系) Cultivar(line)	来源地 Origin	亲本组合 Pedigree	分子标记检测 ^a Molecular detection	
			Yr9(AF1/AF4,1500 bp)	Yr26(gwm11,193 bp)
兴育 7 号 XY7	贵州	不详	+	
兴育 823 XY823	贵州	不详		+
绵麦 1403 MM1403	四川	绵阳 04854/贵农 21-1	+	
绵麦 185 MM185	四川	绵阳 96-5/辽春 10 号		+
绵麦 228 MM228	四川	1275-1/内 2938//99-1522		
绵麦 367 MM367	四川	1275-1/99-1522		+
绵麦 37 MM37	四川	96EW37/绵阳 90-100		+
绵麦 39 MM39	四川	绵阳 96-78/贵农 21-1		+
绵麦 43 MM43	四川	绵阳 92-8/88-304//贵农 19-4	+	
绵麦 45 MM45	四川	07146-12-1/贵农 19-4	+	
绵麦 46 MM46	四川	07242-3-1-1/贵农 21		
绵麦 47 MM47	四川	绵阳 96-5/贵农 19-4	+	
绵麦 48 MM48	四川	绵阳 01821/贵农 19-4	+	+
绵农 4 号 MN4	四川	(75-21-4/76-19) F4/(绵阳 11 号/Alondras) F3		
绵阳 2002-5 MY2002-5	四川	绵阳 01821/贵农 19-4		
绵阳 26 MY26	四川	绵阳 81-5/川育 81-24		
绵麦 38 MM38	四川	07146-12-1/贵农 19-4	+	
绵麦 40 MM40	四川	绵阳 01821/贵农 19-4		
绵麦 42 MM42	四川	绵阳 96-5/贵农 21-1	+	
国豪麦 15 GHM15	四川	绵阳 96-5/贵农 19-4//NE	+	
西科麦 2 XKM2	四川	川育 11/墨 444 选	+	
西科麦 3 XKM3	四川	贵农 21/5575	+	
西科麦 5 XKM5	四川	贵农 21/96 II -39		+
川麦 107 CM107	四川	2469/80 - 28 - 7	+	
川麦 16 CM16	四川	不详	+	
川麦 30 CM30	四川	77/YAA//ALD'S'/3/YSZ//ST2022/983	+	
川麦 39 CM39	四川	墨 444/90-7		
川麦 44 CM44	四川	96 夏 440/贵农 21	+	+
川麦 50 CM50	四川	贵农 21/3295	+	+
川麦 60 CM60	四川	98-1231//贵农 21/生核 3295		+
川麦 45 CM45	四川	GH430/SW1862	+	
川麦 51 CM51	四川	174/183//99-1572		
川农 10 CN10	四川	78-5038/85-D. H. 5015	+	
川农 17 CN17	四川	91S-23/A302		
川农 18 CN18	四川	川育 12/87-429	+	
川农 19 CN19	四川	91S-23/A302		
川农 23 CN23	四川	R1685/MY26		
川农 27 CN27	四川	川农 19/R3301 CN19/R3301		
CN04-1	四川	N1491/N1071	+	
CN04-2	四川	N1491/N1071	+	

表 1(续)

品种(系)	来源地	亲本组合	分子标记检测 ^a Molecular detection	
Cultivar(line)	Origin	Pedigree	Yr9(AF1/AF4, 1500 bp)	Yr26(gwm11, 193 bp)
SY95-71	四川	Eronga83/繁 6//繁 6		
淮麦 18 HM18	江苏	豫麦 13/鲁麦 14		
92R137	江苏	6V(6A) 异代换系/扬麦 5 号		+
NAU24	江苏	不详	+	
南农 06y603 NAU06y603	江苏	不详		
鄂麦 15 EM15	湖北	882-852//鄂恩 1 号/Nppp-2///贵农 11 号	+	
襄麦 27 XM27	湖北	84C-432/贵农 31-1//贵农 20-3///丰优 5 号///浙丰 2 号		
襄麦 55 XM55	湖北	8811/贵农 24-7//鄂麦 19		
襄麦 83 XM83	湖北	贵农 20-3/6038//中优 9803		
郑 9023 Z9023	河南	西农 881/陕 213		
偃育 898 YY898	河南	贵农 25-8/豫麦 18		
05 中 38 05Z38	河南	不详	+	
中 91-13 Z 91-13	北京	不详		+
中麦 415 ZM415	北京	贵农 11/京 411//京 411		
中优 9507 ZY9507	北京	中优 8 号系选		
CA9722	北京	京 411/贵农 11//京 411		
铭贤 169 MX169	山西	不详		
小偃 54 XY54	陕西	小偃 6 号系选		
临麦 33 号 LM33	甘肃	92 元-11/贵农 20	+	+
临麦 34 号 LM34	甘肃	94 选 4149/贵农 20//82316-1/临麦 26 号		+
陇鉴 9343 LJ9343	甘肃	贵农 21/77-69		+
天选 43 号 TX43	甘肃	8845-1-1-1-1/贵农 22		+
中植 2 号 ZZ2	甘肃	陕 167、贵农 22、 <i>T. Spelta</i> album 复合杂交	+	

^a ‘+’ 代表品种携带与抗病基因 *Yr9* 或 *Yr26* 紧密连锁的分子标记

^a ‘+’ means the cultivars carrying the molecular markers that closely linked with *Yr9* or *Yr26* gene

1.2 基因组 DNA 的提取及标记扫描

根据 DArT P/L 公司建议的方法 (<http://www.triticarte.com.au>) 提取小麦基因组 DNA。每份材料选择单株幼嫩的叶片来提取, DNA 用 TE 溶解后, 利用核酸蛋白分析仪检测 DNA 浓度, 用于标记扫描和全基因组基因分型。利用与小麦条锈病 *Yr9* 和 *Yr26* 紧密连锁的分子标记, 扫描 134 份小麦材料。与 *Yr9* 连锁的标记为 AF1/AF4 (Forward, 5'-GGAGACAT-CATGAAACATTTG-3', Reverse, 5'-CTGTTGTTGG GCAGAAAG-3'), 是 SCAR 标记, 其目标片段为 1500 bp^[36]; 与 *Yr26* 紧密连锁的标记为 gwm11 (Forward, 5'-GGATAGTCAGACAATTCTTGTG-3', Reverse, 5'-GTGAATTGTGTCTTGTATGCTTCC-3'), 是 SSR 标记, 目标片段为 193 bp, 与 *Yr26* 相距 1.9 cM^[37]。PCR 扩增采用 10 μL 体系, 即 10 × PCR Buffer 1 μL,

25 mmol/L MgCl₂ 0.6 μL, 10 μmol/L 的正反向引物各 0.25 μL, 10 mmol/L dNTP 0.2 μL, *Taq* DNA 聚合酶 (5 U/μL) 0.1 μL, DNA 模板 40 ng, 加 ddH₂O 补足 10 μL。PCR 反应程序为: 94 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 45 s, 55 ~ 65 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 35 个循环, 72 °C 后延伸 10 min (退火温度因不同的标记而异)。根据所用分子标记的不同类型, 扩增产物选用琼脂糖凝胶电泳或聚丙烯酰胺凝胶电泳进行检测。

1.3 DArT-seqTM 基因分型

134 份小麦 DNA 样品寄往澳大利亚 DArT P/L 公司, 利用 DArT-seqTM 技术进行全基因组基因分型。DArT-seqTM 是 DArT 和 NGS 相结合的 GBS 技术。它利用 2 个限制性内切酶 *Pst*I/*Taq*I 进行基因组复杂性简化, 再用 Illumina 测序仪进行 short-read

测序。首先,将各 DNA 样品(每板 96 个样品)进行限制性酶切,限制性片段与 *Pst*I 特异性接头连接(接头分别附以 96 个不同 barcodes 来编码各 DNA 样品)。然后,进行 PCR 扩增并检测质量。再将 96 个样品混合,在 Illumina Hiseq2000 测序仪进行单通道测序(*Pst*I 接头包含一个测序引物,确保产生的 Tag 总是从 *Pst*I 酶切位点开始阅读)。获得的所有序列被过滤、分配到它们对应的目标数据集,barcode 序列被切除,最后剩余 69 bp 序列。SNP 分型结果表格由 DArT P/L 公司专门的分析流水线产生。序列信息分析如下:首先利用 BowtieV0.12,将 69 bp 序列与小麦 Pseudomolecules 进行比对,以 3 个错配作为最大限度去确定 69 bp 序列内的多态性 SNP 的位置;然后利用 BLAST($e\text{-value} < 1.0 \times 10^{-20}$)把相同的序列再与人工染色体进行比对,估计是否还有其他的序列能够被定位。与 Pseudomolecules 只有 1 个 Hit 或者大于 1 个 Hit 且在第 1 次和第 2 次 Hits 之间的差异至少为 1.0×10^{-5} 的那些序列被保留用于下一步分析。计算所有标记的 Call rate, Call rate 小于 0.8 的标记被丢弃。然后计算剩余标记的等位基因频率,小于 2.5% 的标记也被去除。

1.4 统计分析

每个 SNP 标记的多态性信息含量 *PIC* 指数的计算公式为: $PIC = 1 - \sum (P_i)^2$, 其中 P_i 是群体中含有第 i 个等位基因的比例。根据每个标记的等位基因出现与否,把 SNP 标记转换为 0 和 1 的二进制矩阵。将该矩阵作为输入文件,利用 NTSYSPC V2.0 软件,计算 Jacard 遗传相似性系数,进行 PCoA 分析和 UPGMA 聚类分析。

2 结果与分析

2.1 SNP 标记基因分型

对 134 个小麦材料的 DArT-seq™ 检测,共获得 SNP 标记 8764 个。利用与已知基因组模型的比对,其中的 7263 个 SNP 标记被指定到普通小麦的 21 条染色体上。为了评估每个 SNP 标记的质量,根据 DArT P/L 公司的说明,当 SNP 的 Call rate 值大于 0.8 时,这个标记被认为是可靠的。最终,Call rate SNP > 0.8 的 6919 个 SNP 标记的分型数据被用于遗传分析。这些标记表现出不同水平的遗传多样性,它们的 *PIC* 值的范围在 0.01 ~ 0.50 之间,平均值为 0.32。此外,这些 SNP 标记在小麦的 7 个部分同源群上的分布是不均匀的。定位在第 2 同源群上的标记最多(1633),其余的依次是第 5(1340)、第

3(1272)、第 7(1211)、第 1(1109)、第 6(1014) 和第 4 号(981) 同源群。

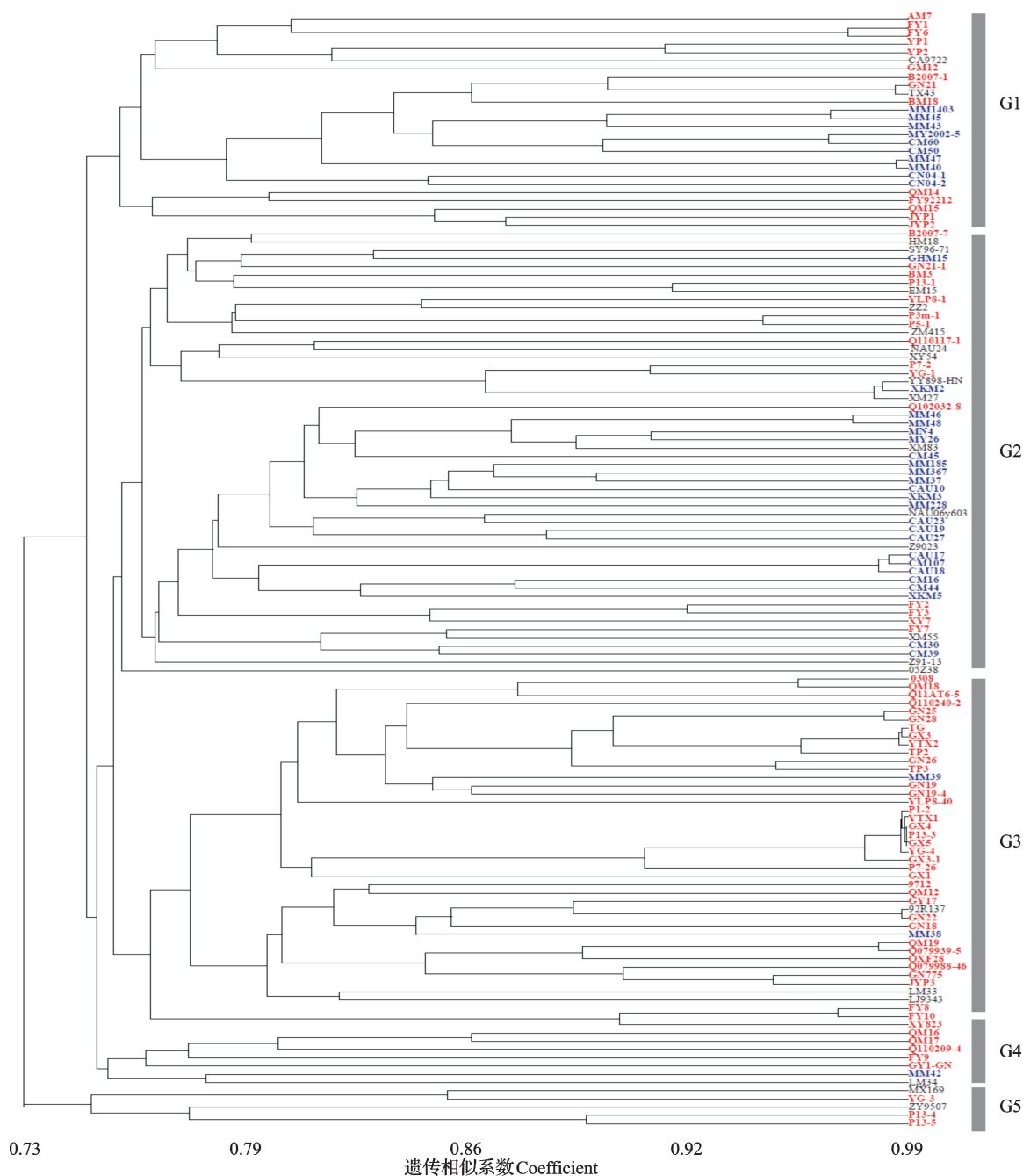
2.2 群体遗传多样性

根据 6919 个 SNP 标记的基因分型数据,计算了品种(系)间的 Jacard 遗传相似系数(GS, genetic similarity),其变异范围为 0.67 ~ 0.99, 平均值 0.76。其中,条锈病诱发品种铭贤 169 与贵州省农科院品系黔 110209-4 的 GS 值最小,为 0.67,说明二者之间亲缘关系最远。贵州省贵州大学选育的抗病品系 P13-3 与贵协 4 号的 GS 值最大(0.99),说明它们的血缘关系最近。同时,分别计算了贵州和四川小麦品种(系)的 GS 值。对于来源于贵州的 73 份小麦,其 GS 值的变异范围为 0.68 ~ 0.99, 平均值 0.75;对于来源于四川的 39 份小麦,其 GS 值的变异范围为 0.73 ~ 0.99, 平均值 0.78。

利用 UPGMA 法进行聚类分析(图 1),134 份小麦品种(系)在 GS 值 0.75 水平上形成 5 个类群。第 1 类群(G1)由来自四川和贵州的 27 个品种(系)组成,并且材料根据来源地的不同聚集在一起,如贵州品种(安麦 7 号、丰优 1 号、黔麦 14、毕麦 18、节燕普 1、硬葡 2 等)和四川品种(绵麦 40、绵麦 43、绵麦 45、川麦 50、川麦 60、CN04-1、CN04-2 等)分别聚合在一起。第 2 类群(G2)由来源于贵州、四川以及其他地区的 54 个品种(系)组成,包括 2 个亚群,其中 1 个亚群主要由来源于四川的小麦组成,而且根据不同的育种单位聚集。第 3 类群(G3)主要聚集了来源于贵州地区的 42 份小麦材料,根据选育单位的不同聚集在一起。如贵州大学选育的贵农系列小麦、以光系列和贵协系列小麦抗源,贵州省农科院选育的黔麦系列小麦,以及黔西南州农科所选育的兴育、丰优系列小麦材料。第 4 类群(G4)聚集了 7 个品种(系),包括了贵州省选育的黔麦 16、黔麦 17、黔 110209-4、固优 1、丰优 9 号等小麦品系。另外有 5 个品种(系)(铭贤 169、中优 9507、以光-3、P13-4、P13-5)与其他品系具有较远的亲缘关系,单独形成一个小型类群(G5)。

2.3 群体结构分析

为了调查小麦材料的遗传群体结构,利用全基因组的 6919 个 SNP 分型结果,进行了基于来源地的 PCoA 分析(图 2),第 1 主坐标(PCo-1)和第 2 主坐标(PCo-2)分别解释 8.0% 和 5.1% 的群体遗传变异。134 份材料聚集形成了左右 2 个群,左侧的第 1 类群(G1)包含较多的材料(87 份),但是聚集紧密。这 87 份小麦品系囊括了几乎全部的四川、其



品种名称利用不同的颜色表示,红色为贵州小麦,蓝色为四川小麦,黑色为其他地区的小麦材料
The names of cultivars were marked by the different color. Cultivars in red, blue, or black color were from Guizhou, Sichuan and other regions, respectively

图1 134份小麦品系基于Jaccard相似性系数的UPGMA聚类图

Fig. 1 UPGMA dendrogram of 134 wheat cultivars based on Jaccard similar coefficients

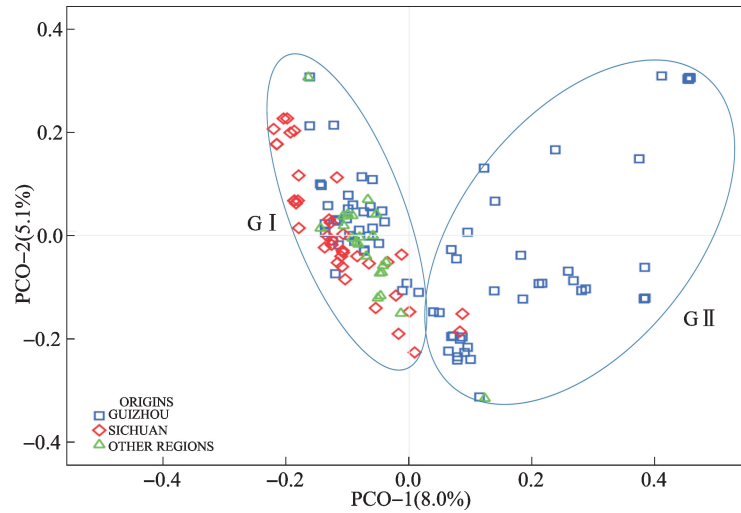
他地区的品种(系)以及部分贵州小麦品种(系)。而在图的右侧形成了第2类群(GII),它包含了较少的品种(47份),但是分散程度更为广泛,几乎全部由贵州的小麦品种(系)组成,其中贵州大学选育的小麦品系占到大约70%。

根据是否携带与Yr9和Yr26紧密连锁的分子标记位点XAF1/AF4(1500 bp)和Xgwm11(193 bp),小麦材料条锈病抗病基因标记扫描的结果见表1。在

134份小麦材料中Yr9和Yr26的标记位点出现的比例分别为38.1%和49.3%。在贵州和四川小麦材料中,出现Yr9标记位点的比例分别为34.7%和54.1%,而出现Yr26标记位点的比例分别为61.3%和37.8%。根据小麦品系是否携带这2个抗条锈病基因位点的PCoA分析结果显示在图3A和3B中。从图3A可以看出GII群几乎都由携带Yr26抗病基因位点的小麦品系所组成,而不携带Yr26基因

位点的品种(系)基本都聚集在左边的 GI 群。而在图 3B 中,情况正好相反。大多数不携带 *Yr9* 抗病基因位点的小麦品系都聚集在 GII 群中。结合图 2 和

图 3 可以发现,贵州品种(系)中,由贵州大学选育的抗病材料中,携带 *Yr26* 基因位点的频率较高,而携带 *Yr9* 基因位点的频率较低。



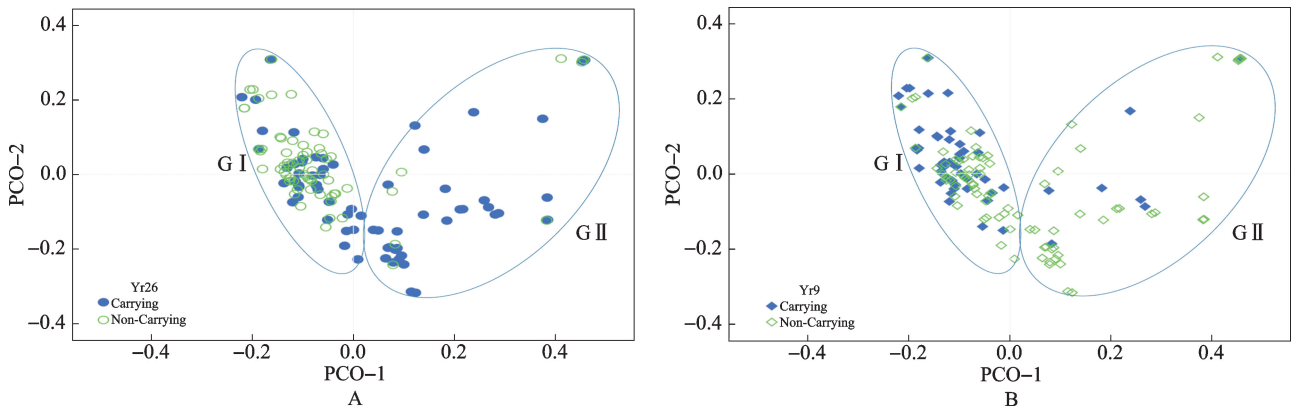
不同来源地的小麦品种用不同的颜色和性状表示。蓝色方块表示为贵州小麦,红色菱形表示为四川小麦,绿色三角形表示为其他地区的小麦品种

The cultivars are indicated by different colours and symbols.

Cultivars in blue square, red diamond and green triangle were from Guizhou, Sichuan and other regions, respectively

图 2 根据小麦来源地的全基因组主成分分析

Fig. 2 PCoA at the whole-genome level based on the origin of cultivars (lines)



A 和 B 分别是根据品种(系)是否携带 *Yr26* 基因位点(*Xgwm11*-193bp)和 *Yr9* 基因位点(*XAF1/AF4*-1500 bp)的 PCoA 分析

A: Plot based on cultivars carrying or not carrying the *Yr26* gene locus(*Xgwm11*-193 bp),

B: Plot based on cultivars carrying or not carrying the *Yr9* gene locus(*XAF1/AF4*-1500 bp)

图 3 基于是否携带抗条锈病基因位点的全基因组主坐标分析

Fig. 3 Distribution of *Yr* resistance gene carriers in different groups based on PCoA at the whole-genome level

3 讨论与结论

3.1 DArT-seq™ 技术的应用前景

DArT-seq™ 技术是 DArT P/L 公司近年来开发的基于 GBS 平台的高效、全基因组内大规模开发 SNP 标记的技术。与 DArT 标记相比,DArT-seq 能够获得更多的多态性分子标记,如 L. Zhang 等^[2]在对 111 个中国北方小麦的 DArT 标记分析中,共获

得 1637 个多态性标记。而在本研究中,利用 DArT-seq™ 对 134 份西南地区小麦品种的基因分型,共获得 8764 个多态性的 SNP 标记;6919 个 SNP 标记 (call rate > 0.8) 的平均 *PIC* 值为 0.32。而利用 DArT 也获得相似的结果,笔者曾对 87 个西南地区小麦品种系进行 DArT 标记分型,获得的平均 *PIC* 为 0.35^[38]。DArT-seq 技术与其他基于 NGS 的 GBS 技术相比较,获得的多态性 SNP 标记数较少。如

J. A. Poland 等^[39]利用 GBS 在小麦作图群体 (W97846/Opata85) 中开发了 2 万个多态性 SNPs。而对于来源于 2 个不同育种计划的 384 个美洲和欧洲的小麦, B. Lado 等^[40]利用 GBS 技术开发鉴定了 10.23 万个多态性 SNPs。这主要是由于 DArT-seq 技术是基于原先的多态性微阵列技术 (DArT), 所以获得的 SNPs 数目较少。但是检测费用相对低廉 (4 万元人民币/96 个样品), 所以对地方研究所和院校也具有较好的应用前景。

3.2 小麦抗病种质的群体多样性

拓宽小麦遗传基础是提高小麦产量和抗病性的前提。为了了解贵州和四川地区小麦抗病品种 (系) 的遗传多样性和群体结构, 本研究利用 6919 个 SNP 标记 (call rate > 0.8) 的基因型数据计算了品种间的遗传相似系数, 并进行了 UPGMA 聚类分析和主坐标分析。就这批小麦条锈病抗病品种 (系) 而言, 贵州小麦比四川小麦的遗传相似性系数较小。这可能是由于部分贵州小麦抗源是通过远缘杂交选育获得, 引进了小麦近缘或远缘种属的外源片段^[23], 从而导致贵州小麦表现了较高的遗传多样性。聚类分析表明, 研究材料聚集形成 5 个群, 主要是根据来源地的不同聚集在一起, 说明它们具有相似的血缘关系。如 G3 群包含的小麦品系几乎都来源于贵州地区。四川选育的品种主要聚集在 G2 群中的一个亚群, 如绵麦、川麦和川农系列的品种等由于拥有相似的血缘关系, 遗传距离较近。

在本研究中利用全基因组 SNP 标记的主坐标分析结果显示, 134 份小麦材料清晰地聚成 2 个群, 左边的第 1 类群 (GI) 聚集了不同来源地的小麦, 品种数目较多但是聚集更加紧密。而右边的第 2 类群 (GII) 几乎都由贵州选育的品系组成, 且主要来源于贵州大学, 数量较少却更为分散。主坐标分析也说明来自贵州、四川及其他省份的一些品种近年来由于相互引种, 遗传差异在缩小。相对于四川小麦品系而言, 贵州小麦品系之间遗传差异更大, 而且部分材料保持了异质性。例如贵州大学通过远缘杂交选育的材料, 如贵农 21、贵农 22 和贵农 775 等已在全国广泛利用, 还有近年来选育的一些新抗源, 如贵协系列和以光系列等, 在今后育种中可以加强这部分资源的应用。

贵州和四川地区的条锈病流行小种为条中 32 和 33 等^[29-30], 小麦的抗条锈性主要来源于贵农 22 和 92R 系列的 Yr26^[31-33]。但是 2009 年以来, 在四川、云南和甘肃等地陆续发现了贵农 22 致病类型条

锈菌变异小种 V26, 导致携带 Yr26 的小麦品种丧失抗性, 而 Yr9 对 V26 新毒性小种却表现出抗性^[34]。在本研究中, 抗病基因扫描显示贵州小麦材料中多数携带 Yr26 基因位点 (61.3%), 而四川材料中相对较少 (37.8%)。对于 Yr9 情况却相反, 贵州和四川小麦中携带 Yr9 基因位点的比例分别为 34.7% 和 54.1%。本试验中用于检测的分子标记与抗病基因紧密连锁, 标记和基因之间存在遗传距离, 会导致很少的交换事件发生。如 SSR 标记 gwm11 与 Yr26 紧密连锁, 它们之间的遗传距离为 1.9 cM^[37], 100 个体中大概会出现 2 个交换事件, 所以利用紧密连锁的标记基本上能反映小麦抗病基因携带的情况。但是准确的结果, 仍然需要用抗病性鉴定结果加以证实。

这批小麦抗病种质具有一个明显的群体结构特征, 就是 Yr9 和 Yr26 抗病基因的分布与 PCoA 群体结构在一定程度上相吻合。从基于抗病基因位点的 PCoA 分析结果可以发现, 聚集在 PCoA 右边的第 2 类群 (GII) 中贵州小麦抗病品系, 绝大多数都携带 Yr26 基因位点, 而较少的携带 Yr9 基因位点。这个结果说明来源于贵州大学的小麦抗源中, 注重对抗病基因 Yr26 的利用, 而 Yr9 的利用相对较低, 但是随着新毒性小种 V26 的不断蔓延, 贵州地区的小麦育种应该注重 Yr9 和 Yr26 聚合。

本研究表明, 基于 GBS 的 DArT-seqTM 是发掘小麦全基因组 SNP 标记及 SNP 基因分型的有效手段, 通过 UPGMA 聚类分析, 根据来源地和血缘关系, 聚集形成 5 个群。全基因组的主坐标分析将西南地区的小麦品种 (系) 划分为 2 个群。贵州地区小麦具有更为丰富的遗传背景, 大多数携带 Yr26 抗条锈病基因位点, 而携带 Yr9 基因位点的比例相对较低。本研究结果为西南地区小麦抗病优质育种的亲本选配提供了理论依据。

参考文献

- [1] Ijaz S, Khan I. Molecular characterization of wheat germplasm using microsatellite markers [J]. Genet Mol Res, 2009, 8 (3): 809-815
- [2] Zhang L, Liu D, Guo X, et al. Investigation of genetic diversity and population structure of common wheat cultivars in northern China using DArT markers [J]. BMC Genet, 2011, 12 (1): 42
- [3] Autrique E, Nachit M, Monneveux P, et al. Genetic diversity in durum wheat based on RFLPs, morphophysiological traits, and coefficient of parentage [J]. Crop Sci, 1996, 36 (3): 735-742
- [4] Siedler H, Messmer M, Schachermayr G, et al. Genetic diversity in European wheat and spelt breeding material based on RFLP data [J]. Theor Appl Genet, 1994, 88 (8): 994-1003
- [5] Barrett B, Kidwell K. AFLP-based genetic diversity assessment

- among wheat cultivars from the Pacific Northwest[J]. Crop Sci, 1998, 38(5):1261-1271
- [6] 郝晨阳, 王兰芬, 董玉琛, 等. 我国西北春麦区小麦育成品种遗传多样性的 AFLP 分析[J]. 植物遗传资源学报, 2003, 4(4):285-291
- [7] Soleimani V, Baum B, Johnson D. AFLP and pedigree-based genetic diversity estimates in modern cultivars of durum wheat [*Triticum turgidum* L. subsp. *durum* (Desf.) Husn.] [J]. Theor Appl Genet, 2002, 104(2-3):350-357
- [8] 李莉, 王俊峰, 颜廷进, 等. 基于 SSR 标记的山东省小麦 DNA 指纹图谱的构建[J]. 植物遗传资源学报, 2013, 14(3):537-541
- [9] 杨德光, 翁跃进, 董玉琛, 等. 部分耐盐小麦品种(系) SSR 位点遗传多样性研究[J]. 植物遗传资源学报, 2005, 6(1):9-14
- [10] 苏亚蕊, 王子成, 张大乐, 等. 黄淮麦区以 1B/1R 类品种为抗源主要育成小麦品种的遗传多样性分析[J]. 植物遗传资源学报, 2006, 7(3):321-326
- [11] Brenchley R, Spannagl M, Pfeifer M, et al. Analysis of the bread wheat genome using whole-genome shotgun sequencing[J]. Nature, 2012, 491(11):705-710
- [12] De Donato M, Peters S O, Mitchell S E, et al. Genotyping-by-sequencing (GBS): a novel, efficient and cost-effective genotyping method for cattle using next-generation sequencing [J]. PLoS ONE, 2013, 8(5):e62137
- [13] Elshire R J, Glaubitz J C, Sun Q, et al. A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species [J]. PLoS ONE, 2011, 6(5):e19379
- [14] Raman H, Raman R, Kilian A, et al. Genome-wide delineation of natural variation for pod shatter resistance in *Brassica napus* [J]. PLoS ONE, 2014, 9(7):e101673
- [15] Huang X, Feng Q, Qian Q, et al. High-throughput genotyping by whole-genome resequencing [J]. Genome Res, 2009, 19(6):1068-1076
- [16] Yu H, Xie W, Wang J, et al. Gains in QTL detection using an ultra-high density SNP map based on population sequencing relative to traditional RFLP/SSR markers [J]. PLoS ONE, 2011, 6(3):e17595
- [17] Yan J, Shah T, Warburton M L, et al. Genetic characterization and linkage disequilibrium estimation of a global maize collection using SNP markers [J]. PLoS ONE, 2009, 4(12):e8451
- [18] Chao S, Dubcovsky J, Dvorak J, et al. Population- and genome-specific patterns of linkage disequilibrium and SNP variation in spring and winter wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. BMC Genomics, 2010, 11(1):727
- [19] Zanke C, Ling J, Plieske J, et al. Genetic architecture of main effect QTL for heading date in European winter wheat [J/OL]. Front Plant Sci, 2014, doi:10.3389/fpls.2014.00217
- [20] Courtois B, Audebert A, Dardou A, et al. Genome-wide association mapping of root traits in a japonica rice panel [J]. PLoS ONE, 2013, 8(11):e78037
- [21] 马渐新, 周荣华, 董玉琛, 等. 小麦抗条锈病基因定位及分子标记研究进展[J]. 生物技术通报, 1999(1):1-6
- [22] 杨华安, 吴立人. 我国小麦条锈菌生理小种毒性基因及致病性特点分析[J]. 植物病理学报, 1990, 20(3):213-217
- [23] 程颖, 宋伟, 刘志勇, 等. 小麦品种贵农 21 抗条锈病基因的 SSR 标记[J]. 作物学报, 2008, 32(12):1867-1872
- [24] 韩德俊, 王宁, 江铮, 等. 小麦新抗源贵农 775 抗条锈性特征与遗传分析[J]. 遗传, 2012, 34(12):1607-1613
- [25] 李强, 贺苗苗, 董海丽, 等. 小麦品种贵农 22 抗条锈基因的遗传分析及分子标记[J]. 植物病理学报, 2011, 41(5):495-501
- [26] 牛永春, 吴立人. 繁 6-绵阳系小麦抗条锈性变异及对策[J]. 植物病理学报, 1997, 27(1):5-8
- [27] 张颀, 杨武云, 彭云良, 等. 小麦新品种川麦 42 抗条锈病性遗传分析[J]. 植物保护学报, 2006, 33(3):287-290
- [28] 朱华忠, 王忠伟, 伍玲, 等. 小麦品种川麦 107 对条锈病成株抗性的 QTL 定位[J]. 中国农业科学, 2010, 43(4):706-712
- [29] 向运佳, 章振羽, 沈丽, 等. 2005-2010 年四川省小麦条锈病菌毒性变化动态[J]. 西南农业学报, 2013, 26(5):1858-1863
- [30] 左希, 蒋选利, 李星星, 等. 2009 年贵州小麦条锈菌生理小种的鉴定[J]. 贵州农业科学, 2011, 39(3):91-93
- [31] 韩德俊, 王琪琳, 张立, 等. “西北-华北-长江中下游”条锈病流行区系当前小麦品种(系)抗条锈病性评价[J]. 中国农业科学, 2010, 43(14):2889-2896
- [32] 万江华, 任明见, 陈涛, 等. 108 份小麦种质抗条锈病基因的分子检测[J]. 贵州农业科学, 2011, 39(5):22-26
- [33] 伍玲, 谭君, 朱华忠, 等. 四川近年小麦区试品系中 *Yr5*, *Yr10* 和 *Yr15* 的分子标记检测[J]. 西南农业学报, 2007, 20(2):316-320
- [34] 邝文静, 张贵胜, 章振羽, 等. 小麦条锈病菌 *avrYr10/24/26/ch42* 突变体的毒性研究[J]. 西南农业学报, 2013, 26(6):2323-2331
- [35] 刘太国, 王保通, 贾秋珍, 等. 2010-2011 年度我国小麦条锈菌生理专化研究[J]. 麦类作物学报, 2012, 32(3):574-578
- [36] Francis H, Leitch A, Koebner R. Conversion of a RAPD-generated PCR product, containing a novel dispersed repetitive element, into a fast and robust assay for the presence of rye chromatin in wheat [J]. Theor Appl Genet, 1995, 90(5):636-642
- [37] Ma J, Zhou R, Dong Y, et al. Molecular mapping and detection of the yellow rust resistance gene *Yr26* in wheat transferred from *Triticum turgidum* L. using microsatellite markers [J]. Euphytica, 2001, 120(2):219-226
- [38] 张立异, 王伟, 刘冬成, 等. 西南地区普通小麦 1BL/1RS 易位系的 DArT 分子标记鉴定[J]. 麦类作物学报, 2012, 32(5):832-838
- [39] Poland J A, Brown P J, Sorrells M E, et al. Development of high-density genetic maps for barley and wheat using a novel two-enzyme genotyping-by-sequencing approach [J]. PLoS ONE, 2012, 7(2):e32253
- [40] Lado B, Matus I, Rodríguez A, et al. Increased genomic prediction accuracy in wheat breeding through spatial adjustment of field trial data [J]. G3 (Bethesda), 2013, 3(12):2105-2114