

IGS 在小麦叶锈菌中的多态性分析初探

杜冬冬¹, 张毓妹¹, 张河山¹, 杨文香^{1,2}, 刘大群^{1,2,3}

(1. 河北农业大学 植物病理学系, 河北 保定 071001; 2. 河北省农作物病虫害生物防治工程技术研究中心, 河北 保定 071001; 3. 国家北方山区农业工程技术研究中心, 河北 保定 071001)

摘要:由小麦叶锈菌引起小麦叶锈病是我国小麦重要病害之一。为研究小麦叶锈菌流行群体的毒力构成和亲缘关系,利用 IGS (Intergenic spacer) 特殊引物 (L318 和 5SK) 对 71 个小麦叶锈菌 IGS 进行扩增检测。结果表明小麦叶锈菌小种间的 IGS 存在多样性,但多样性与小种毒力之间不存在直接相关性,和小种的区域性有一定的相关性。进一步对差异带型进行分析,获得 IGS-1、IGS-2 的序列。IGS 在小麦叶锈菌种内存在多态性,这有益于开发和建立 IGS 分子标记,并为研究锈病流行群体结构和追溯年度流行的病原来源,以及该病菌的生物学进化提供依据。同时利用 IGS 可以预测病害发生的流行群体,进而有针对性的种植抗病品种来防治叶锈病大发生。

关键词:小麦叶锈病;基因间隔区多样性;地域性;毒性

中图分类号:S435.121 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2015)05-0051-06

doi:10.7668/hbxb.2015.05.009

Primary Study on Polymorphism of Wheat Leaf Rust Based IGS

DU Dong-dong¹, ZHANG Yu-mei¹, ZHANG He-shan¹, YANG Wen-xiang^{1,2}, LIU Da-qun^{1,2,3}

(1. Department of Plant Pathology, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China; 2. Biological Control Center of Plant Diseases and Plant Pests of Hebei Province, Baoding 071001, China; 3. National Engineering Research Center for Agriculture in Northern Mountainous Areas, Baoding 071001, China)

Abstract:Wheat leaf rust, caused by *Puccinia triticina*, is one of the most important and widespread diseases in China. It is necessary to study the virulence and genetic relationship of population structure of wheat leaf rust. IGS (Intergenic spacer) exists between the 28S and 5S transcription region, can be used to identify rust diseases inter-specific and intraspecific relationships with different virulences and from different sources. In this study, the use of special primers to amplify Pt's IGS region, found that IGS polymorphism exists between Pt races. And the polymorphism had no direct relationships with the races toxicity, but could concern the areas they came from. IGS-1, IGS-2 were obtained from the two band type by sequencing. The IGS polymorphism could be useful for developing and establishing IGS genetic markers and analyzing the population structure, tracking the origin of annual epidemics and providing insights into evolutionary biology of this pathogen, and planting resistant wheat cultivars to defense the epidemiology of rust.

Key words:Wheat leaf rust; IGS (Intergenic spacer) polymorphism; Regional; Virulence

小麦是世界上分布范围最广,栽培面积最大,总产量最高的粮食作物。在中国,小麦的种植面积仅次于水稻。由小麦叶锈菌(*Puccinia triticina*)引起的小麦叶锈病是影响小麦生产的主要病害之一,由于小麦叶锈菌(Pt)的突变频率较高,容易出现新的致病小种克服小麦的抗病基因而造成病害流行。条

件适宜可造成 15%~40% 甚至更大的产量损失^[1],同时严重影响着小麦籽粒的品质。由于该病害是一种远距离传播的气传病害,夏孢子在我国的传播路径及在流行上的作用一直是锈病工作者欲探明的问题,因此,有必要研究小麦叶锈菌的流行群体在区域间的动态、毒力构成和亲缘关系。

收稿日期:2015-07-17

基金项目:国家重点基础研究发展计划项目(2013CB127700);河北省现代农业产业体系小麦产业创新团队建设项目

作者简介:杜冬冬(1989-),男,河北石家庄人,硕士,主要从事分子植物病理学研究。

通讯作者:杨文香(1966-),女,河北沧州人,教授,博士,博士生导师,主要从事分子植物病理学及植物病害生物防治研究。

刘大群(1958-),男,河北石家庄人,教授,博士,博士生导师,主要从事分子植物病理学及植物病害生物防治研究。

自 Mains 和 Jackson 等^[1] 证明在小麦叶锈菌 (Pt) 存在生理分化现象以来,科学工作者对不同国家的小麦叶锈菌的生理分化进行了划分,王焕如教授自 20 世纪 70 年代起对我国的小麦叶锈菌的毒性进行监测,利用近等基因系进行毒性测定,明确了当时我国的小麦叶锈菌的主要生理小种和致病类型。温晓蕾^[2] 对 2006 年 Pt 在河北、山东、黑龙江等地区流行小种的致病类型进行研究,结果发现来自不同地区的群体构成存在明显差异,并且与地理来源存在一定的相关性。武延超^[3] 用 NTSYS 2.10 软件对我国 2007 年 Pt 主要流行群体作聚类分析树状图,也得出群体毒性多态性与地理分布有相关性。许敏青^[4] 发现,在我国近年来致病类型为 PHKT、PHTT、THKS、THKT、THTS、THTT 是我国的优势致病类型,但在不同地区间这些优势小种的分布却存在差异。根据目前的毒性监测,发现叶锈菌不同地区间的菌株毒性相近或相同,通过小种的类型在不同地区间的分布特性,推测小种在不同地区之间存在交流或这些菌株具有相同的起源,如何证明这些推论成为流行病学研究的一项任务。

随着分子生物学的发展,RAPD、AFLP、SSR 技术应用于小麦叶锈菌的毒性和遗传多样性的研究。Kolmer 等^[5] 运用 RAPD 技术^[6-7] 对加拿大 Pt 单孢子堆的 DNA 序列多态性进行标记,确定了 15 个 Pt 遗传分化类型。徐大庆等^[8] 通过比较 Pt 毒性多态性与分子多态性的聚类分析图,得到河北、江苏地区的 Pt 群体毒性和分子多态性无关。高军^[9] 利用 AFLP 标记研究 Pt 时发现,AFLP 群体遗传分化与地理来源和毒性相关,但不完全相关。蒲志刚等^[10] 对国内外 Pt 进行毒性分析并进行聚类分析,结果显示墨西哥和澳大利亚的 Pt 小种与国内的 Pt 生理小种差异明显。Kolmer 等^[11] 对阿根廷、巴西等地近 20 年的 Pt 小种进行 SSR 分析,发现与北美地区的 Pt 小种遗传结构高度相似,推测南北美叶锈菌可能具有相同的来源。赵盼盼^[12] 使用 EST-SSR 对中国 4 个地区的小麦叶锈菌进行了分析,发现河北和山东 2 个地区的小麦叶锈菌株间的遗传距离最近,相似系数最高。山东和新疆菌株的遗传距离则最远,相似系数最低。聚类结果表明,在相似系数为 0.91 处聚为 3 个类群,河北和山东的叶锈菌亲缘关系最近,叶锈菌群体间的亲缘关系与地理分布具有一定的相关性。证明在这些省份间存在基因流。由于 SSR 是检测的重复序列,不能用来进行种内的分类研究,因此在遗传多样的研究上仍需开发新的研究途径。

IGS 是位于核糖体 DNA 5S 和 28S 之间的区域,

因为其保守性经常被用来区分物种内的分类单元。核糖体 DNA (rDNA) 是研究真核生物基因组很好的区域^[13]。IGS 作为一种分子标记,对群体遗传学^[14] 致病性研究^[15] 非常有用。Yanchun W 等^[16] 2012 年对中国甘肃和国外的 *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* 小种进行了 IGS (Intergenic spacer) 标记的研究,发现在小麦条锈菌中存在 3~5 条带的多态性。然后克隆测序得到了 14 种不同的重复单元,这些重复单元中间插入单核苷酸 (A/C) 进一步构成 4 种单元组合,根据重复单元的不同排列组合,推导出病害流行的来源和轨迹以及它们在进化上的亲缘关系。Ce'line 等^[17] 利用 IGS 对小麦叶锈菌和小麦条锈菌、秆锈菌进行分析,发现小麦叶锈菌与条锈菌在 IGS 上存在差异。小麦叶锈菌与条锈菌在生活史上非常相似,IGS 在小麦叶锈菌中是否存在多态性是一个有待验证的问题。

本试验通过扩增 Pt 的 IGS 区域,分析我国来自 4 个麦区的 71 个不同毒力的叶锈菌群体在分子水平的差异,以明确不同区域内叶锈菌的遗传多样性、群体分化程度及群体间叶锈菌的亲缘关系。研究结果将探测 IGS 在小麦叶锈菌菌群间的特异性,将为今后种群间小种的遗传分析扩宽道路。研究结果为进一步开发叶锈菌 IGS 保守区和可变区的分子标记,深入探讨小麦叶锈病的菌源传播与病害流行提供依据。

1 材料和方法

1.1 小麦和叶锈菌

来自河北、四川、新疆、山东的 71 株为单胞繁殖叶锈菌,由河北农业大学分子植物病理学实验室提供。感病品种郑州 5389 和 38 个近等基因系由小麦锈病研究中心提供。

1.2 小麦叶锈菌的致病类型鉴定

在温室利用感病品种郑州 5389 对叶锈菌小种纯化扩繁后,分别种植 71 套鉴别寄主,38 个以 Thatcher 为背景的抗叶锈病近等基因系。在第一叶片完全展开时,利用扫苗法接种 71 个测试菌株,黑暗保湿 14~16 h 后在温室内培养,在接种 14 d 后,按照 Roelfs^[18] 的 6 级分级法记载侵染型,分别包括 0、1、2、3、4。根据 Long 等^[19] 的四字命名法对测试小麦叶锈菌进行命名。

1.3 叶锈菌 DNA 的提取

采用 CTAB 法提取锈菌 DNA^[20],研磨后加入 SDS、NaCl、CTAB,65 °C 温育 1 h。氯仿:异戊醇 (24:1) 抽提 2 次,用 NaAc 和无水乙醇沉淀 DNA。

ND-1000 UV-Vis 分光光度仪检测 DNA 质量和浓度,保存在 -20 ℃ 待用。

1.4 IGS 扩增

引物: L318 5'-GCTACGATCCACTGAGG TTC-3'; 5SK 5'-CTTCGCAGATCGGACGGGA-3'。

扩增体系为 25 μL,其中 DNA 2.0 μL,TaqE 0.5 μL,正反向引物 (L318 5'-GCTACGATCCACTGAGG TTC-3'; 5SK 5'-CTTCGCAGATCGGACGGGA-3') 各 0.5 μL,dNTP 2.0 μL,Buffer 2.5 μL,最后加入 ddH₂O 17 μL。

扩增程序: 95 ℃ 1 min; 95 ℃ 1 min, 55 ℃ 1 min, 72 ℃ 3 min 30 s, 30 个循环; 最后 72 ℃ 延伸 10 min, 4 ℃ 保存。

1.5 扩增产物电泳检测

用 0.5% 的 TBE 配置 1% 的琼脂糖胶, 1% TBE 作为电泳缓冲液, 100 V 电压下电泳 45 min, 在 UVIpro 紫外凝胶成像仪下, 曝光 200 ms, 检测条带位置大小。

为了保证条带更清晰准确, 采用 6% 的聚丙烯酰胺凝胶, 在恒定 300 V 电压, 电泳 1 h, 溴酚蓝到达胶版底部。取出胶块, 用 ddH₂O 冲洗干净, 用 AgNO₃ 染色, 用 NaOH 和 37% 甲醛显影。观察记录条带大小。

1.6 PCR 产物的回收

按照 TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver. 4.0 试剂盒回收。首先扩增产物在 1.2% 的琼脂糖凝胶中电泳, 紫外灯下分割含有目的条带的胶块。加入到胶块融化液 DR-I 缓冲液中,

75 ℃ 融化, 过柱子收集 DNA。

1.7 目的片段与载体的连接

凝胶回收片段与 Pgem-T easy Vector (Promega) 连接, 插入片段与载体的摩尔体积比为 2 ~ 10: 1, 反应体系: 2 × 快速连接缓冲液 (5.0 μL), T4 DNA 连接酶 (1.0 μL), Pgem-T easy Vector (1.0 μL), 35 ng 或 25 ng DNA (3.0 μL) 将上述组分混匀后, 于 PCR 仪上 16 ℃ 连接过夜。

1.8 大肠杆菌感受态细胞的转化

将感受态细胞 DH5α 于冰上解冻; 加入连接产物, 42 ℃ 热激 90 s, 冰上冷却 2 min。将转化产物涂布在 LB 固体培养基上, 加入 Amp、IPTG、X-gal 蓝白斑筛选。37 ℃ 静置过夜培养 12 ~ 16 h。白色菌斑即为阳性克隆。从转化 LB 平板上挑取阳性克隆, 接种于含 Amp 的 LB 液体培养基中, 37 ℃, 180 r/min 振荡培养过夜。

1.9 测序与数据统计

将转化得到的菌液密封送至深圳华大公司, 进行双脱氧法 DNA 测序。所得数据输入 DNAMAN 多重序列比较, 运用相似性等序列特征分析菌种间的关系。

2 结果与分析

2.1 小麦叶锈菌致病类型鉴定

在温室对小麦叶锈菌致病类型进行鉴定, 利用 38 个近等基因系小麦对 Pt 小种进行毒力鉴定, 结果根据四字命名法统计在表 1 中。来自 4 个地区的菌株按照表 1 的顺序进行了分子检测。

表 1 四川、新疆、山东地区 IGS 检测 Pt 小种

Tab. 1 Pathtype of tested Pt races collected from Sichuan, Xinjiang, Shandong areas

| 点样编号 Number of samples | 地理来源 Geographical origin | 毒力 Virulence | 点样编号 Number of samples | 地理来源 Geographical origin | 毒力 Virulence |
|---------------------------|-----------------------------|-----------------|---------------------------|-----------------------------|-----------------|
| 1 | 四川剑阁 | PHFS | 13 | 新疆石河子 | THTT |
| 2 | 四川剑阁 | PHTT | 14 | 新疆乌鲁木齐 | THRR |
| 3 | 四川梓潼 | THTT | 15 | 新疆石河子 | THTT |
| 4 | 四川梓潼 | PHTT | 16 | 新疆奎屯 | THKQ |
| 5 | 四川宜宾 | THTT | 17 | 山东莱阳 | THTS |
| 6 | 四川剑阁 | FHRT | 18 | 山东莱阳 | THRS |
| 7 | 四川剑阁 | PKPQ | 19 | 山东莱阳 | PHKT |
| 8 | 四川攀枝花 | PHST | 20 | 山东烟台 | PHKT |
| 9 | 新疆石河子 | THTT | 21 | 山东烟台 | THKT |
| 10 | 新疆石河子 | THTS | 22 | 山东莱阳 | THTS |
| 11 | 新疆奎屯 | PHTS | 23 | 山东青岛 | PHTT |
| 12 | 新疆伊宁 | THSR | | | |

2.2 IGS 扩增

用 IGS 引物对来自四川、新疆、山东、河北 4 个

省份的 71 个菌株进行了逐一扩增, 发现河北地区部分菌株和其他菌株间存在多态性。四川、新疆、山东

地区菌群均扩增出单一条带(图1),条带位置和前人扩增结果一致,点样顺序见表1。后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,检测结果一致;河北省的部分菌株在800~900 bp之间出现多态性,扩增出2条带(图2)。来自河北省的致病类型为THTS、PHHP、THTS、PHST、THTS、PHTT、FHTT、PHKS、PGTQ、THTS、PHTT、THPT、TGKT、PHST、THTT、THTS的菌株均表现为2条带,在聚丙烯酰胺凝胶电泳中亦表现2条带。

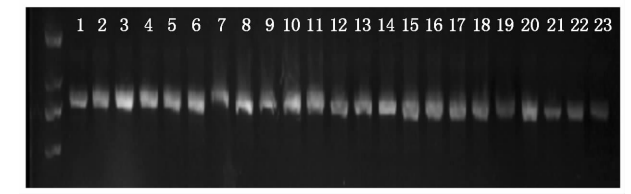


图1 四川、新疆、山东地区菌群琼脂糖扩增的部分结果
Fig.1 The agarose gel electrophoresis results of Pt races came from Sichuan, Xinjiang, Shandong areas

比较结果发现毒力对IGS多态性没有影响。例如,新疆石河子的THTT和河北的THTT虽然毒力相同,但是带型却不一致(图1的7号泳道,图2的15号泳道)。在测试的48个河北地区菌株中,有16个菌株出现多态性,频率为33.3%。占检测所有菌株的比例为7.4%。而根据图2本研究中扩增中国河北地区Pt小种时却产生了2种带型,所以对出现的多态性片段进行了回收测序。

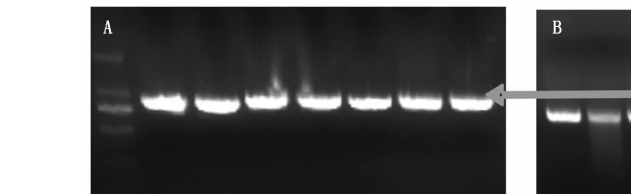


图2 河北地区部分菌群琼脂糖扩增检测结果
Fig.2 The agarose gel electrophoresis results of Pt races came from Hebei area

2.3 回收检测结果

选择来自河北的THTS、PHTT、THPT、TGKT、PHST、THTT、THTS的IGS扩增双条带(分别对应图2中的1,11,12,13,14,15,16号泳道的小种,以及图1中1,2号泳道小种)以及其他地区表现的单条带IGS进行回收测序,回收检测结果如图3所示。对带型为单条带的IGS片段也进行了回收测序。

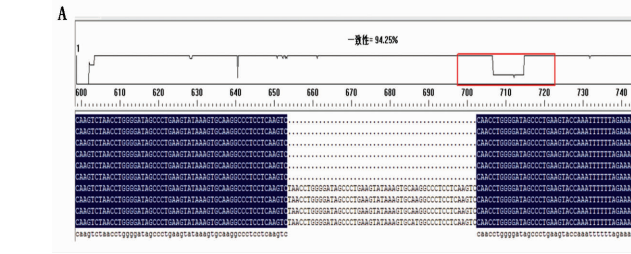
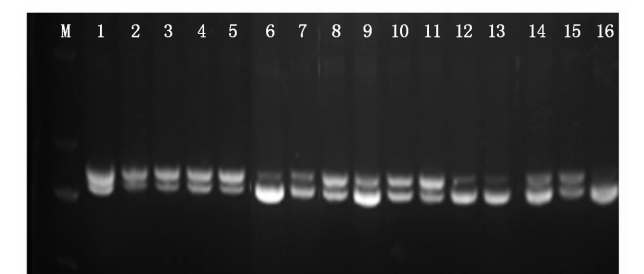


图3 对2种带型的IGS回收后检测
Fig.3 Extraction of two types of IGS

2.4 测序与数据分析

选择连接成功的IGS-1、IGS-2菌株,送样上海生工公司测序,探究2条带之间的差异来源。测序



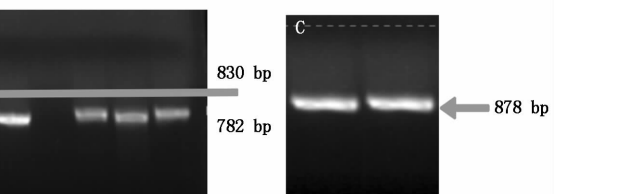
1~16 点样顺序. M、THTS、PHHP、THTS、PHST、THTS、PHTT、FHTT、PHKS、PGTQ、THTS、PHTT、THPT、TGKT、PHST、THTT、THTS。
1-16 samples order. M, THTS, PHHP, THTS, PHST, THTS, PHTT, FHTT, PHKS, PGTQ, THTS, PHTT, THPT, TGKT, PHST, THTT, THTS.

图2 河北地区部分菌群琼脂糖扩增检测结果
Fig.2 The agarose gel electrophoresis results of Pt races came from Hebei area

2.3 回收检测结果

选择来自河北的THTS、PHTT、THPT、TGKT、PHST、THTT、THTS的IGS扩增双条带(分别对应图2中的1,11,12,13,14,15,16号泳道的小种,以及图1中1,2号泳道小种)以及其他地区表现的单条带IGS进行回收测序,回收检测结果如图3所示。对带型为单条带的IGS片段也进行了回收测序。

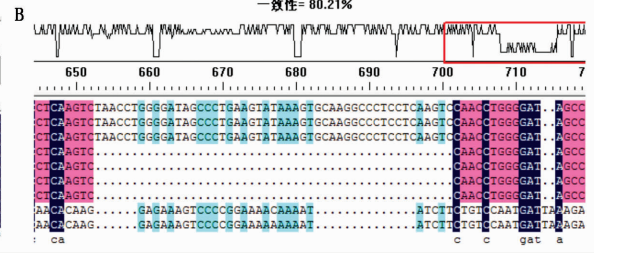
凝胶回收片段与Pgem-T easy Vector(Promega)连接,将连接产物转化入大肠杆菌感受态细胞DH5α中,摇床培养,直接将菌液进行扩增,IGS-1中前4个菌株连接成功,IGS-2有6个菌株连接成功。片段大小为750~1 000 bp。



A. 2条带型中较大条带IGS-1;B. 片段较小条带IGS-2;C. 单条带型的回收结果。
A. The larger one the two bands IGS-1; B. The smaller one IGS-2; C. The band of single band type.

2.4 测序与数据分析

选择连接成功的IGS-1、IGS-2菌株,送样上海生工公司测序,探究2条带之间的差异来源。测序



A. 2条带之间的差异片段;B. 2种带型比对结果。
A. The different sequence part of the two bands; B. The similarity of the two haplotypes.

图4 DNAMAN对2种条带的分析

Fig.4 The analysis of two bands by DNAMAN

对可以看出,IGS-1 和 IGS-2 之间的差异出现在 650, 700 bp 处,表现为 IG51 中多插入了一段 48 bp 的序列。其他部分比较保守。比对到单条带型(最下边 2 条基因序列,来自图 1 中的 1、2 号泳道)的 IGS 序列,相似度达到 80.21% (如图 4-B)。单条带 IGS 分别与 IGS-1 (81.19%) 和 IGS-2 (84.19%) 相似度较高。

3 讨论与结论

真核生物中 rDNA 是一个串联的重复基因家族。每一个重复单元包含 4 个高度保守的 rRNA 基因: 28S 大亚基 (LSU)、18S 小亚基 (SSU)、5.8S rDNA、5S rDNA。ITS1 在 18S 和 5.8S 基因之间,ITS2 在 5.8S 和 28S rDNA 之间^[21-22],较大的基因间隔区 (IGS)在转录单元 28S 和 5S rDNA 之间^[23]。大多数真核生物中 rDNA 复制数在 30 ~ 30 000 bp^[24]。因为 rDNA 的高复制数和密集的数据库可变性,这些区域依据不同的分类学水平,为生物分类学提供了分析地理学关系的方法。SSU 和 LSU 基因进化相对缓慢,可以用来分析亲缘关系较远的有机体,比如门、纲、科、属。ITS 和 IGS 区域进化较快,一个属的不同种可能不同。rDNA 的保守性在保持核糖体生物起源和序列方面起到重要作用。虽然大多数研究表明 rRNA 多基因家族进化遵循着严格的保守模式,但是在锈菌中存在例外,比如 *Pst* 中含有 8 个不同大小的 IGS1^[18]。

IGS 比前人 SSR 技术更加精确的区分种内不同个体,本研究中对 *Pt* 扩增 28S 和 5S 之间的区域,发现来自河北地区的 16 个 *Pt* 生理小种具有多态性。而 Ce'line 等^[17]2002 年研究结果显示,秆锈菌和叶锈菌的 IGS 区域不存在多态性。这可能是其选择的菌株数量少或者菌株之间的差异造成的。然后我们测序 IGS 中带型为 2 种类型,分单带和双条带的序列,发现 IGS-1 和 IGS-2 序列差异。和 IGS-1 序列相比,IGS-2 除了在 650,700 bp 处缺失部分的片段外,其他核苷酸序列保守型较高。它们出现差异的原因可能是因为 *Pt* 是一种双核真菌,这 2 种带型分别出现在不同的细胞核中。这种现象最早在 1999 年 Martin 等^[25]研究 IGS2 在双色蜡蘑外生菌根中存在杂合性,并且会以 1:1 的比例遗传给后代单倍体。也不能排除另外一种可能,重组作用使得每个细胞核包含 2 种离散的核糖体单元,IGS-1 和 IGS-2。要弄清 IGS 的长度异质性是由于位于不同的核造成的,还是姐妹染色单体重组产生的需要进一步的研究论证。

Pt 的 IGS 标记至今尚未见报道,本试验发现

IGS-1 和 IGS-2 序列高度相似,只有 IGS-1 中多插入了一段 48 bp 的序列,使得 IGS 扩增出现多态性,这为小麦叶锈菌开发建立 IGS 标记提供了依据。而在新疆、四川、山东菌株虽然毒力和河北的一致,但是没有扩增出相应的 IGS 多态性,排除取样的偶然性误差,可能是由于 *Pt* 流行群体间的基因交流主要发生在同一个地区,与小种的毒力没有相关性。接下来的研究将测序不同地区小种之间序列的差异,利用软件寻找其中的重复单元排序多样性,并且构建系统生命树,从进化角度来阐述小麦叶锈菌在各地区和不同毒力谱之间存在的亲缘关系。

IGS 分析发现河北地区的菌株 IGS 具有多态性,而其他地区尚未发现。并且河北地区多态性的出现和小种毒力并无明显的相关性。

参考文献:

- [1] Mains E B, Jackson H S. Two strains of *Puccinia triticina* on wheat in the United States [J]. *Phytopathology*, 1921, 11: 40 - 45.
- [2] 温晓蕾. 2006 年我国小麦叶锈菌生理小种鉴定及毒性分析 [D]. 保定: 河北农业大学, 2008.
- [3] 武延超. 2007 年我国小麦叶锈菌致病类型鉴定及毒性分析 [D]. 保定: 河北农业大学, 2009.
- [4] 许敏青. 我国部分地区小麦叶锈菌群体 SSR 遗传多样性分析 [D]. 保定: 河北农业大学, 2012.
- [5] Kolmer J A, Liu J Q. Virulence and molecular polymorphism in international collection of the wheat leaf rust fungus *Puccinia triticina* [J]. *Phytopathology*, 2000, 90 (4): 427 - 436.
- [6] Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers useful as genetic markers [J]. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18 (22): 6531 - 6535.
- [7] Welsh J, Mcelelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers [J]. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18 (24): 7213 - 7218.
- [8] 徐大庆, 黄国红, 杨文香, 等. 小麦叶锈菌毒性及分子多态性分析 [J]. *农业生物技术学报*, 2002, 10 (1): 41 - 45.
- [9] 高 军. 小麦叶锈菌 (*Puccinia recondita* f. sp. *tritici*) 毒性及 AFLP 分析 [D]. 保定: 河北农业大学, 2003.
- [10] 蒲志刚, 刘太国, 张 敏, 等. 小麦叶锈菌生理小种 MFR 的分子鉴定研究 [J]. *植物病理学报*, 2004, 34 (5): 449 - 454.
- [11] Kolmer J A, Ordoñez M E, Germán S E. Genetic differentiation within the *Puccinia triticina* population in South America and comparison with the North American population suggests common ancestry and intercontinental migration [J]. *Phytopathology*, 2010, 100 (4): 376 - 383.

- [12] 赵盼盼. 中国冀、鲁、川、新小麦叶锈菌群体 EST-SSR 遗传多样性分析[D]. 保定:河北农业大学,2013.
- [13] Yuan J H, Liu T G, Chen W Q. Postulation of leaf rust resistance genes in 47 new wheat cultivars at seedling stage[J]. *Scientia Agricultural Sinica*, 2007, 40: 1925 – 1935.
- [14] Biffen R H. Mendel's law of inheritance and wheat breeding[J]. *Journal of Agricultural Science*, 1905, 1: 4 – 48.
- [15] Stackman E. A study in cereal rust; physiological races [R]. University of Minnesota Agricultural Experimental Station Bulletin, 1914, 138: 1 – 56.
- [16] Yanchun W, Baojun H, Qiang Z, *et al.* Discovery of multiple IGS haplotypes within genotypes of *Puccinia striiformis* [J]. *Fungalbiology*, 2012: 522 – 528.
- [17] Ce'line R A, Claude D V P, Yves B, *et al.* Characterisation of a length polymorphism in the two intergenic spacers of ribosomal RNA in *Puccinia striiformis* f. sp. tritici, the causal agent of wheat yellow rust[J]. *Mycological research*. 2002, 106(8): 918 – 924.
- [18] Roelfs A P. Race Specificity and methods of study[J]. *The Cereal Rusts: Origins, Specificity, Structure and Physiology*, 1984, 1: 131 – 164.
- [19] Long D L, Kolmer J A. A North American system of nomenclature for *Puccinia recondita* f. sp. tritici [J]. *Phytopathology*, 1989, 79(5): 525 – 529.
- [20] 高 军. 小麦叶锈菌 (*Puccinia recondita* f. sp. tritici-na) 毒性及 AFLP 分析 [D]. 保定:河北农业大学, 2003.
- [21] White T J, Bruns T, Lee S, *et al.* Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [M]//Innis M A, Gelfand H, Sninsky J S, *et al* PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. New York: Academic Press, 1990: 315 – 322.
- [22] Simon L, Lalonde M, Bruns T D. Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, 58: 291 – 295.
- [23] Long E O, Dawid I B. Repeated genes in eukaryotes[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 1980, 49: 727 – 764.
- [24] Prokopowich C D, Gregory T R, Crease T J. The correlation between rDNA copy number and genome size in eukaryotes[J]. *Genome*, 2003, 46: 48 – 50.
- [25] Martin F, Selsos M A, Le Tacon F. The nuclear rDNA intergenic spacer of the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor*: structural analysis and allelic polymorphism[J]. *Microbiology*. 1999, 154: 1605 – 1611.

《天津农业科学》征订启事

《天津农业科学》是天津市农业科学院信息研究所主办的综合性学术期刊,创刊于 1974 年。国际刊号: ISSN 1006 – 6500, 国内刊号: CN: 12 – 1256/S。本刊为月刊,大 16 开,150 页,每期定价 5 元,全年 60 元。

本刊为中国核心期刊(遴选)数据库收录期刊,中国学术期刊综合评价数据统计源期刊,全国优秀农业期刊。

开设栏目有:植物生理与生物技术、作物栽培与设施园艺、植物保护、土壤肥料与节水灌溉、畜牧兽医与水产养殖、园林绿化、贮藏加工、农产品安全、农业经济与信息技术、农业科研管理、三农问题研究、农业区划等。

适合各级农业科研人员、农技推广人员、农业行政管理干部、农业大中专院校师生参阅。

欢迎订阅,欢迎投稿!

地 址:天津市南开区白堤路 268 号农科大厦 1905 室

邮 编:300192

电话/传真:022 – 23678601

E – mail: tjnykx@163.com

开 户 行:建设银行南开新技术产业园区支行

户 名:天津市农业科学院信息研究所

账 号:1200 1650 4720 5000 1435