DOI: 10.3724/SP.J.1006.2021.04131

甘蔗抗黄锈病 G1 标记的分子检测及候选抗病基因 WAK 的分析

王恒波 陈姝琦 郭晋隆 阙友雄*

福建农林大学农业农村部福建甘蔗生物学与遗传育种重点实验室 / 国家甘蔗工程技术研究中心, 福建福州 350002

摘 要: 甘蔗黄锈病是屈柄锈菌(*Puccinia kuehnii* Butler)引起的一种世界性真菌病害, 导致产量减少和糖分降低, 给甘蔗产业造成严重损失。本研究采用抗黄锈病分子标记 G1, 检测我国和世界上重要的甘蔗栽培品种、野生种和近缘属的抗黄锈病基因, 并对扩增的代表性特异条带进行克隆测序、功能注释和聚类分析, 推测其抗性基因的起源和进化。G1 检测结果表明, 国内 124 份甘蔗栽培品种检测到 G1 标记的有 83 份, 占 66.9%; 国外 46 份甘蔗栽培品种检测到 G1 标记的有 31 份, 占 67.4%。34 份甘蔗野生种和近缘属中检测到 G1 标记的有 17 份, 占 50%, 其中割手密种含有该基因比例最高, 为 100%。功能注释揭示, G1 标记的候选基因编码一种细胞壁连接的类受体激酶, 并在甘蔗栽培品种的单倍体蛋白组数据库中鉴定到 3 个相似度较高的蛋白, 这些蛋白都有细胞壁受体激酶结构的胞外域、跨膜域和激酶活性的胞内域。聚类结果则清晰展示了抗病候选基因的起源及进化关系, 具体可分为 3 组, 第 1 组来源于割手密种和大茎野生种; 第 2 组来源于大茎野生种、热带种和河八王属; 第 3 组来源于割手密种、大茎野生种、中国种和栽培品种。研究结果为抗黄锈病甘蔗品种的选育提供重要的抗源支撑, 并为抗性分子机制的解析奠定基础。

关键词: 检测; 分子标记; 类受体激酶; 黄锈病; 甘蔗

Molecular detection of G1 marker for orange rust resistance and analysis of candidate resistance WAK gene in sugarcane

WANG Heng-Bo, CHEN Shu-Qi, GUO Jin-Long, and QUE You-Xiong*

Key Laboratory of Sugarcane Biology and Genetic Breeding (Fujian), Ministry of Agriculture and Rural Affairs / National sugarcane Engineering Technology Research, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian, China

Abstract: Sugarcane orange rust is an important fungal disease caused by *Puccinia kuehnii* Butler, which could lead to a reduction in sugarcane production and sugar content and cause serious losses to the sugarcane industry in worldwide. In this study, the molecular marker G1 was used to detect orange rust resistance genes in cultivars, ancestral species and the related genus of *Saccharum* in the world. The representative amplified bands were cloned, sequenced, functionally annotated, and clustered, and the origin and evolution of resistance genes was then analyzed. The results showed that 83 and 34 were detected with G1 marker, accounting for 66.9% and 67.4% in 124 Chinese and 46 foreign sugarcane cultivars, respectively. Among 34 sugarcane ancestral species and the related genus of *Saccharum*, 17 were detected by G1 marker, accounting for 50%, of which the highest percentage (100%) was in *Saccharum spontaneum*. Functional annotation revealed that G1 target gene encoded a wall-associated receptor-like kinase (WAK), and three proteins with high similarity were identified from the haploid proteome database of sugarcane cultivars. These proteins all contain the extracellular domain, transmembrane domain and intracellular domain with kinase activity of typical cell wall receptor structures. Phylogenetic analysis of nucleotide sequences clearly showed the origin and evolution of the candidate resistance WAK genes. Specifically, the WAK genes amplified by G1 marker could be divided into three groups. The first group is from *S. spontaneum* and *Saccharum robustum*. The second group is from *S. robustum*, *Saccharum officinarum* and

本研究由引进国际先进农业科学技术计划(948计划)项目(2014-S18), 国家现代农业(糖料)产业技术体系建设专项(CARS-17)和福建农林大学校科技发展专项(KFA18025A)资助。

This study was supported by the Program of Introducing International Super Agricultural Science and Technology (948 Program) (2014-S18), the China Agricultural (Sugar Crop) Research System (CARS-17), and the Fujian Agriculture and Forestry University Science and Technology Development Special Fund (KFA18025A).

* 通信作者(Corresponding author): 阙友雄, E-mail: queyouxiong@126.com

第一作者联系方式: E-mail: wanghengbo_0354@126.com

Received (收稿日期): 2020-06-18; Accepted (接受日期): 2020-10-14; Published online (网络出版日期): 2020-11-02.

URL: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20201030.1639.006.html>

Narenga porphyrocoma. The third group is from *S. spontaneum*, *S. robustum*, *Saccharum sinense* and cultivars. These results provided an important support for breeding of sugarcane cultivars resistant to orange rust, and lay a foundation for further analysis of molecular mechanism of resistance genes.

Keywords: detection; molecular markers; wall-associated receptor-like kinase; orange rust; sugarcane

甘蔗作为世界上最重要的糖料和能源作物之一,供应全世界食糖总产的 80%和生物能源的 60%^[1]。同时,甘蔗也是植物遗传学、多倍体基因组学研究的一种热点植物。甘蔗锈病是一种重要的流行性真菌病害,给蔗糖产业带来巨大经济损失,包括 2 个类型,即分别由黑顶柄锈菌(*Puccinia melanocephala* Syd. et P. Syd.)和屈恩柄锈菌(*Puccinia kuehnii* Butler.)^[2]引起的褐锈病和黄锈病。甘蔗黄锈病最早在澳大利亚发现,2000 年大流行于甘蔗栽培品种 Q124^[3]。与甘蔗褐锈病相比,甘蔗黄锈病发病的区域范围相对较窄,主要分布在澳大利亚、美国、印度、巴西等国家的部分地区^[3-5],近年来发病蔗区呈现逐年扩大趋势,引起甘蔗科技工作者尤其是育种家的广泛关注和高度重视。王晓燕等^[6]于 2014 年在我国云南蔗区首次发现甘蔗黄锈病,表明该病害在中国蔗区也存在流行发生的风险。因此,对我国甘蔗种质资源的黄锈病抗性,在精准检测的基础上,进行系统地分析评价和抗性溯源,具有十分重要的理论和实践意义。

甘蔗为遗传背景复杂、基因组庞大的多倍体植物,尚未有利用基因定位方法获得抗病基因的报道。目前,利用分子标记辅助育种技术,选育和种植抗病品种是防治甘蔗病害最为经济有效的方法之一。例如:在法国的栽培品种 R570 上,发现和定位到抗褐锈病的 *Bru1* 基因,被证实对多个国家和地区的褐锈病分离物具有广谱抗性,现已开发出与 *Bru1* 基因紧密连锁的 2 个分子标记(R12H16 和 9O20-F4),已经作为诊断标记在甘蔗抗褐锈病品种的选育中得到了广泛的应用^[7-8]。此外, Yang 等^[1]在利用 CP95-1039 和 CP88-1762 杂交的拟“F₁”分离群体,鉴定到 1 个对表型贡献率为 58%的 QTL 位点(qORR109),进而开发了抗黄锈病基因的分子诊断标记 G1,为鉴定甘蔗黄锈病种质资源提供了一个重要的技术方法。Yang 等^[1]根据 Unigene 序列(转录本 ID: Seq_695109)设计了基因特异性标记 G1,其候选基因和高粱的 *Sobic.002G166150* 以及拟南芥的 *RFO1* (RESISTANCE TO FUSARIUM OXYSPORIUM 1)基因属同源基因,它是一类编码细胞壁关联受体激酶^[9]。迄今,除了抗褐锈病的 *Bru1* 和抗黄锈病 G1 标记外,甘蔗中还报道了 5 个抗花叶病和 11

个抗黑穗病的 DNA 标记^[10], 1 个主效的抗甘蔗黄叶病基因位点^[11],但都仅限于抗性位点的发现,尚未开发成可用的分子标记,难以用于甘蔗抗病基因的快速鉴定和抗病种质的高效筛选。

目前,国外甘蔗杂交育种计划中, *Bru1* 标记常常被用于评估甘蔗种质资源和杂交后代无性系的褐锈病抗性^[6]。但是,关于甘蔗黄锈病抗性标记的应用,除了纳入美国的育种计划外,其他国家都还未有深入的研究,也尚未有相关研究结果的报道。在我国,甘蔗黄锈病是一种新发现的甘蔗真菌病害^[6],但关于甘蔗种质资源中抗黄锈病基因的分子检测未见其他报道。为深入了解我国和世界上重要的甘蔗栽培品种、野生种和近缘属中的抗黄锈病基因的分布状况,并阐述抗病候选基因的起源及进化关系,本研究拟采用抗黄锈病标记 G1 对中国及世界范围内重要的甘蔗栽培品种、野生种及近缘属材料,进行抗黄锈病的分子检测,进而对该标记扩增的代表性片段进行克隆测序、功能注释和聚类分析。旨在为国内外甘蔗种质资源的黄锈病抗性鉴定积累技术和经验,为甘蔗对黄锈病抗性的起源和演化研究奠定基础,最终为甘蔗抗黄锈病的分子育种和抗性基因的功能鉴定提供重要的研究基础和科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

用于黄锈病抗性分子检测的甘蔗栽培品种、野生种和近缘属种质总共 204 份,其中包括 170 份栽培品种、28 份甘蔗属材料(割手密种、大茎野生种和热带种)和 6 份近缘属(蔗茅属、芒属和河八王属)种质。国内甘蔗品种 124 份,来自 8 个不同育种机构,包括四川 6 份、江西 1 份、台湾 15 份、海南 13 份、福建 9 份、广西 47 份、云南 10 份和广东 23 份;国外甘蔗品种 46 份,其中美国 30 份,其他国家 16 份。详见附表 1 和附表 2。所有材料都来自国家甘蔗种质资源圃(National Germplasm Repository of Sugarcane)。

1.2 蛋白组数据的获取

从法国农业研究所甘蔗基因组中心(<http://sugarcane-genome.cirad.fr/>)直接获得甘蔗栽培品种单倍

体R570 蛋白组数据。高粱蛋白组数据来源于网址(<https://phYuetang.ozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>), 拟南芥的蛋白组数据库来源于网址(https://www.arabidopsis.org/download/index-auto.jsp?dir=/download_files/Proteins)。菠萝的蛋白组数据库来源于网址(<http://pineapple.angiosperms.org/pineapple/html/download.html>)。拟南芥的 WAK 基因(ID: AT1G21270.1-AtWAK2, AT1G21250.1-AtWAK1(PRO25), AT1G79670.1-AtWAKL22, RFO1)来源于 Zhang 等^[12]的报道。水稻的 *OsWAK50* 基因(ID: LOC_Os04g51040.1)和 *OsDEES1* 基因(ID: LOC_Os09g38850.1)分别来自孙俪静等^[13]和 Wang 等^[14]的报道。

1.3 黄锈病抗性标记 G1 的 PCR 扩增和分析

1.3.1 引物合成 依据 Yang 等^[1]开发的黄锈病抗性标记 G1 方法对所选的 204 份甘蔗栽培品种、野生种及近缘属种质进行检测。G1 标记上游引物为 5'-ACCATGGAAATCCATACGuitangC-3', 下游引物为 5'-GGCCAACACTTAGGCCAATA-3'。由生工生物工程(上海)股份有限公司合成引物。G1 标记预期扩增产物长度为 911 bp。

1.3.2 DNA 提取和 PCR 扩增体系 采用 CTAB 法^[15]从蔗叶中提取基因组 DNA。PCR 的反应体系配置参考端木卜文等^[16]的方法, 即每 25 μL 反应体系中含有 DNA 模板 2 μL 、上游和下游引物各(10 $\mu\text{mol L}^{-1}$) 0.5 μL 、ddH₂O 9.5 μL 、2 $\times$ Taq Plus Master Mix (Dye) 12.5 μL , 其中 2 $\times$ Taq Plus Master Mix (Dye)试剂购自北京康为世纪生物科技有限公司。所有扩增均在 T100 Thermal CYachengler (Bio-Rad Research, USA)扩增仪上进行。PCR 反应参照 Yang 等^[1]建立的扩增程序, 94 预变性 5 min; 95 变性 30 s, 55 退火 30 s, 72 延伸 45 s, 35 个循环; 最后在 72 下延伸 5 min, 4 保存。所有 PCR 扩增产物用 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测。100 bp DNA Ladder (100~1500 bp)购自北京康为世纪生物科技有限公司。

1.4 黄锈病抗性标记 G1 候选基因的克隆、测序和鉴定

1.4.1 扩增产物的回收、克隆与测序 利用 2%琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 扩增产物, 挑选差异性扩增条带, 胶回收目标 DNA 片段, 纯化后, 连接到 pMD18-T 载体上, 从每个连接转化的反应板上挑取 5 个阳性克隆, 扩增培养后由生工生物工程(上海)股份有限公司进行双向测序。

1.4.2 细胞壁连接的类受体激酶 WAK 的鉴定

以高粱细胞壁关联的受体激酶(WAK) Sobic.

002G166150 的蛋白为种子序列, 进行本地 BlastP 比对甘蔗栽培品种(R570)单倍体蛋白组数据库, 蛋白质筛选标准 e-value 值为 10^{-2} , 相似性为 40%以上, 获得与高粱 Sobic.002G166150 的相似度较高蛋白序列。

1.5 生物信息学分析方法和工具

利用 Pfam (<http://pfam.janelia.org/>)和 SMART (<http://smart.emblheidelberg.de/>)在线软件预测保守结构域, 确保其 N-末端含有一个或多个细胞壁 GUB_WAK_bind 结构域、跨膜域、C-末端 Pkinase 结构域。采用 DNAMAN 6.0 将水稻、拟南芥、高粱和甘蔗的 WAK 蛋白进行多序列比对, 找出保守的氨基酸残基。采用 MEME 在线软件(<http://meme-suite.org/tools/meme>)预测 WAK 蛋白的保守结构域。通过 Clustal W 软件对 4 个物种的 WAK 蛋白的氨基酸序列进行比对, 将比对结果运用 MEGA7.0 软件(<http://www.megasoftware.net/>)利用最大似然法(Maximum Likelihood)构建系统进化树, 执行参数为 Poission 模式(Dayhoff model)、全部删除(complete deletion)和 1000 次重复有根树(Bootstrap method 1000)。选用 Adobe Illustrator CS6 软件进行加工和处理图片。

2 结果与分析

2.1 甘蔗栽培品种抗黄锈病标记 G1 的 PCR 检测

基于抗黄锈病标记 G1, 对国内外甘蔗栽培品种共 170 份进行 PCR 检测发现, 中国栽培品种 124 份, 含有抗性标记 G1 的有 83 份(占比 66.9%); 国外栽培品种 46 份, 含有抗性标记 G1 的有 31 份(占比 67.4%), 其中来自美国的 30 个甘蔗栽培品种中, 含有抗性标记 G1 的有 21 份(占比 70%), 阳性率高于中国甘蔗栽培品种。

2.2 甘蔗野生种与近缘属材料的抗黄锈病标记 G1 的 PCR 检测

对 28 份甘蔗属野生种进行抗黄锈病标记 G1 检测发现, 含有抗性标记的有 15 份, 阳性率为 53.6%。甘蔗属野生种的检测结果分别是印度种(1/3, HATUNI)、中国种(1/3, 桂林竹蔗)、大茎野生种(2/6, MOL-6081 和福建大野)、割手密种(11/11)呈现阳性结果, 但是占甘蔗栽培品种染色体组 70%~80% 的热带种没有检测到 911 bp 的阳性结果。利用 G1 标记对 6 份甘蔗近缘属材料进行检测发现, 蔗茅属(1/2, 贵州 78-2-12)、河八王属(1/2, 广西 89-13)呈现阳性

图 1 G1 标记在部分栽培品种中的扩增结果

Fig. 1 Electrophoretic patterns of G1 primers amplified in some *Saccharum* hybrid

1: HoCP 94-806; 2: 赣南 99-591; 3: 粤糖 00-236; 4: 桂糖 05-827; 5: 桂糖 00-257; 6: 崖城 97-46; 7: 湛蔗 80-101; 8: CP 67-412; 9: 桂糖 05-322; 10: 崖城 94-46; 11: 桂糖 08-278; 12: 桂糖 00-245; 13: CP 89-1509; 14: 桂糖 05-3846; 15: 桂糖 29; 16: 崖城 93-26; 17: CP 72-2086; 18: 崖城 94-30; 19: CP 92-1213; 20: HoCP 92-624; 21: 桂糖 05-2605; 22: 崖城 96-24; 23: 湛蔗 22; 24: 崖城 99-6; M: 100 bp DNA ladder.

1: HoCP 94-806; 2: Gannan 99-591; 3: Yuetang 00-236; 4: Guitang 05-827; 5: Guitang 00-257; 6: Yacheng 97-46; 7: ZZ 80-101; 8: CP 67-412; 9: Guitang 05-322; 10: Yacheng 94-46; 11: Guitang 08-278; 12: Guitang 00-245; 13: CP 89-1509; 14: Guitang 05-3846; 15: Guitang 29; 16: Yacheng 93-26; 17: CP 72-2086; 18: Yacheng 94-30; 19: CP 92-1213; 20: HoCP 92-624; 21: Guitang 05-2605; 22: Yacheng 96-24; 23: ZZ 22; 24: Yacheng 99-6; M: 100 bp DNA ladder.

结果, 而芒属的 2 个材料检测结果为阴性。表明, G1 标记关联的候选基因也分布于甘蔗野生种和近缘属材料中, 其中所有参试割手密种质 G1 检测结果都为阳性。

2.3 G1 标记 PCR 扩增产物序列的获得与分析

利用 G1 标记检测甘蔗种质过程中发现, 在部分种质扩增到了与目标条带(911 bp)不一致的非特异性条带, 如图 2 中的泳道 2、4、6、11、13、19、20 所代表的分别为广西 89-13、印度 1 号、LA-purple、桂林竹蔗、四川 79-1-26、福建 89-1-1 和福建大野。通过比较分析, 挑选 12 个具有代表性的差异条带进行胶回收和克隆测序, 每个样品均挑选 5 个阳性克隆测序。从 12 个甘蔗种质中得到了 34 个候选基因的单倍型, 不同基因型种质有 1~5 个等位基因, 扩增片段大小范围分别是 678~693、911~914、

1073~1075 和 1303~1505 bp (图 3)。聚类结果表明, G1 标记所在基因型可以分为 3 组, 第 1 组来源于割手密种和大茎野生种; 第 2 组来源于大茎野生种、热带种和河八王属, 其中热带种 LA-purple 的 678 bp 片段和河八王属的 693 bp 片段间亲缘关系较近, 可能由共同祖先分化而来; 第 3 组是来源于割手密种、大茎野生种和栽培品种, 核酸片段间相似度较高, 多态性低, 表明甘蔗栽培品种的抗性候选基因主要来源于割手密种。

2.4 G1 标记候选基因编码蛋白 WAK 的鉴定和结构特征分析

将 2.3 中克隆得到的所有 DNA 片段都在 NCBI 上进行序列比对发现, 所有克隆片段基因都比对到高粱 XM_002459982.2 基因上, 通过高粱上的注释发现它是一种细胞壁类受体激酶基因。同时, G1

图 2 G1 标记在部分甘蔗野生种中的扩增结果

Fig. 2 Electrophoretic patterns of G1 markers amplified in *Saccharum* genus

1: 贵州 78-2-12; 2: 广西 89-13; 3: 广东 64 号; 4: 印度 1 号; 5: 广西 79-8; 6: LA-purple; 7: 路达仕; 8: 云南 95-19; 9: Katha; 10: 云南 95-35; 11: 桂林竹蔗; 12: 四川 79-2-11; 13: 四川 79-1-26; 14: 贵州 78-2-28; 15: 贵州 78-1-11; 16: 广东 30 号; 17: 广东 21 号; 18: 福建 89-1-16; 19: 福建 89-1-1; 20: 福建大野; 21: NG 77-004; 22: 57NG208; 23: 云南大野; 24: 51NG3; M: 100 bp DNA ladder.

1: Guizhou 78-2-12; 2: Guangxi 89-13; 3: Guangdong 64; 4: Yindu 1; 5: Guangxi 79-8; 6: LA-purple; 7: Loethers; 8: Yunnan 95-19; 9: Katha; 10: Yunnan 95-35; 11: Guilinzhuzhe; 12: Sichuan 78-2-11; 13: Sichuan 79-1-26; 14: Guizhou 78-2-28; 15: Guizhou 78-1-11; 16: Guangdong 30; 17: Guangdong 21; 18: Fujian 89-1-16; 19: Fujian 89-1-1; 20: Fujiandaye; 21: NG77-004; 22: 57NG208; 23: Yunnandaye; 24: 51NG3; M: 100 bp DNA ladder.

图 3 利用 G1 标记对不同甘蔗属种质扩增序列的系统进化树分析
Fig. 3 Phylogenetic tree analysis of amplified sequences from *Saccharum* genus using G1 marker

标记所在基因与拟南芥的 *RFO1* 基因属于直系同源基因^[9], 表明本研究的 G1 标记的候选基因也可能是一类水平抗性基因, 不是种间特异性抗性基因。

将高粱 XM_002459982.2 与 Sobic.002G166150 的蛋白序列进行比较发现, 两者相似性为 96.8%, 前者蛋白序列的 N 端比后者仅多了 30 个氨基酸残基, 可能是由不同注释方法引起的差异。以高粱 Sobic.002G166150 的蛋白为种子序列, 进行本地 BlastP 比对甘蔗栽培品种(R570)单倍体蛋白组数据

库, 得到 3 个相似度较高的蛋白序列 Sh_208E10_p000080 (相似度 53%)、Sh_239A14_p000040 (相似度 49.5%)和 Sh_222N03_p000030 (相似度 43.4%) (命名为 ScWAK1、ScWAK2 和 ScWAK3)。通过 Pfam 软件分析发现, 3 个蛋白都具有典型的植物细胞壁关联激酶结构特征, 包括细胞壁受体结构(GUB_WAK_bind) 的胞外域、跨膜域和具有激酶活性的胞内域(图 4)。再与拟南芥(WAK2, PRO25 和 RFO1)、水稻(OsDEES1)已鉴定的植物细胞壁关联激酶进行

蛋白序列比对(图 5)发现, Sh_239A14_p000040 蛋白在跨膜区的前端有 EGF 重复结构域, 在胞内域也具有典型的 ATP 结合基序和激酶活性位点。

2.5 甘蔗 G1 标记候选蛋白与其他物种中已鉴定 WAK 蛋白的聚类分析

聚类分析结果表明, 3 个甘蔗的 WAK 蛋白序列和高粱、水稻聚类为一组, 表明它们可能具有相似功能(图 6)。而拟南芥的 2 个成员(WAK2 和 PRO25)为一组, 且二者是由串联重复事件产生。但水稻的 OsWAK50 和拟南芥的 RFO1 聚为一组, 表明二者可能起源于单双子叶分化之前, 序列相似性仅为 32.2%。MEME 软件的预测结果显示, 来自栽培品种 R570 的 Sh_208E10_p000080、Sh_239A14_p000040 和 Sh_222N03_p000030 蛋白和高粱、水稻的 WAK 蛋白一样具有 10 个基序, 除了 OsDEES1 蛋白少了 C 端的一个 motif 5, 其余 2 组的 4 个 WAK 蛋白有 9 个完整的基序。根据 Wang 等^[14]研究结果, 水稻中有 4 个 OsDEES1 的旁系同源基因, 都具有完整的 C 端, 表达谱分析表明, OsDEES1 及旁系同源基因有不同的表达模式, 导致不同功能。综上分析, 本研究推测甘蔗栽培品种的 3 个 ScWAK 蛋白也可能与 OsDEES1 具有相似的功能。

为了进一步了解 WAK 蛋白在物种间的进化关系, 从拟南芥的蛋白数据库得到了 21 个 WAKL 蛋白^[12], 水稻中获得 125 个 WAK/WAKL^[17], 甘蔗栽培品种 R570 中得到了 134 个, 菠萝蛋白数据库中鉴定到 20 个, 高粱中鉴定了 73 个。通过生物信息分析发现, 在单双子叶物种中, WAK/WAKL 基因数量存在显著差异, 且单子叶植物的 WAK 基因多于双子叶的拟南芥, 但缺少 ρ 全基因组复制事件的菠萝 WAK 基因数目为 20, 与拟南芥相差不大, 这表明 WAK 基因数量的扩增现象可能发生在 ρ 全基因组复制事件之后。

3 讨论

现代甘蔗栽培品种是热带种(*S. officinarum* L., $2n=80$, $x=10$) 和 割 手 密 种 (*S. spontaneum* L., $2n=40\sim128$, $x=8$) 杂交产生的杂交种, 再与热带种进行回交产生杂种后代, 具有遗传背景高度杂合、多倍体和非整倍体性, 且染色体数目在 100~130 之间^[18]。割手密种具有耐寒性、抗病性和再生能力强等优良特性, 经“高贵化”育种方法将甘蔗野生种质血缘引入甘蔗栽培品种^[19]。甘蔗栽培品种中来源割手密种的染色体数目大约占 10%~15%, 种间重组的染色体数目大约占 5%~10%。甘蔗黄锈病是近年来发生在蔗区的一种新的甘蔗流行性病害, 感病甘蔗品种的产量损失严重, 培育抗病品种是防控该病害最有效的策略。甘蔗育种从花穗杂交到品种审定往往需要 12 年左右时间, 具有投入大、周期长等缺点。因此, 了解甘蔗育种亲本和其他野生或近缘属种质资源中抗黄锈病基因的分布状况, 不仅有利于筛选抗性亲本和科学组配杂交组合, 还能提高抗黄锈病分子育种的效率, 对于培育优良抗病品种、高效地防控甘蔗病害具有重要意义。Yang 等^[1]利用群体遗传学方法证实, 甘蔗黄锈病的抗性是由多个基因控制, 借助高密度遗传图谱, 定位到 3 个抗黄锈病基因位点(qORR109、qORR102 和 qORR4), 分别解释表型变异的 58%、8%和 12%, 其中前 2 个位点对抗病性具有正效应, 而后 1 个位点为负效应。此外, Yang 等^[1]还对应设计了 96 对 SSR 标记和 61 对基因特异性标记, 经反复测试, 开发了 qORR109 位点特异性高的 G1 标记, 该标记与黄锈病抗性存在显著的关联。根据候选基因编码的蛋白序列比对后发现, G1 标记的候选基因编码的蛋白序列与高粱 Sobic.002G166150 的蛋白序列相似度最高, 属于细胞壁关联激酶类, 推测 G1 的候选基因可能是一类水平抗性基因, 不是种间特异性抗性基因。

图 4 甘蔗 ScWAK2 蛋白结构域示意图

Fig. 4 Schematic diagram of the domain composition of ScWAK2 protein

ED: 胞外域; TM: 跨膜域; ID: 胞内域。

ED: extracellular domain; TM: transmembrane region; ID: intracellular domain; EGF2: EGF2-like region; EGF-Ca: calcium-binding EGF-like domain.

AtWAK2		0
AtWAK1_PRO25		0
AtWAKL22_RFO1		0
OsDEES1		0
Sobic.002G166150	MGGAEASDVAAGRQQRRIGNGERPAAPVASSITTAAPAGCPGSRGDLTFDFPFGI GPNCSRSDFELFCNDTTPQPKLFMSDGGTQVINDITVVTEN	100
Sh_239A14_p00004	MVRRELAISLQGHGAHTTSSNYSSLSAATLACQCTSCGNLSFEYFPGIGPDRRCFRGDFRFLFCNSTGQHPKLF	75
Consensus		
AtWAK2	MKV	3
AtWAK1_PRO25	MKV	3
AtWAKL22_RFO1	MKRRRLFFSVLLSILTLFINGPLITTAQSP	30
OsDEES1	MMTIIQPPAMAMAMAMALLLLLLQLWSVEAQAAPPASPDCPRCGDVSPYFPFGIRDGCHLPGRFLTC	69
Sobic.002G166150	AASSDDSVSIFDTYITISLSSVYWSLPLISLGNSELYSGLMFSGCDFDVHWINHPVNTPTSASSCTATCPDGEFFNITAPDYCGSDSTGCCITISFG	200
Sh_239A14_p00004	LHDGTTEVVEISIGTKYASEIFHASFSQVPIRPGIDVYNMSLKAPGNSFAITMNMDDIVVGCDDLVLKHKQDTGSFIICTVNCDNNTIAERACLQESC	175
Consensus		
AtWAK2	QEGLEFVVAVFY.LAYTQLVK..GQPRKECQTRCGNVAVEYFPFGTSPGCIYPGDESFNLTCEQEKLFFGNMFINMSLSGQLRVIRVRSRVCYDSQGRQT	100
AtWAK1_PRO25	QEGLEFVAIFFSGLACTQLVKQHPGNCNKCNITIEYPPGISSGCIYPGNESFSITCKEDRPHVLSIDIEVANFNHSGQLQVLNRSSTCYDEQGRKT	103
AtWAKL22_RFO1	PSSTSCNRICGGIEIPFPFGIGRRDCFLNDWYEVVCSNTTSGKSLAPFLYKINRELVSITLRSSIDSSYGVVHKSPVTSGGSCQRVPKPLPLNTLTKGK	130
OsDEES1	DATHTPPRLMLNGNLQVVDISLANSTVRALDLAGAVNTYDVKLAPSGSGTWSISLGTIVAGAGPYVVEQRNRLVVTGCVNQATLAGENTNIIIGCCSF	169
Sobic.002G166150	DEGFSQSSFLSSVLQKFEVRHHSADSKLHFHNSLLRDYTNVTAASLSAKWGIIDQLCASAIDNTYACVSSSIICQNNIMGMVGYNCKKRRYMG	300
Sh_239A14_p00004	PDGCGFIYSNTYVQALEFQFVLHRRSRAEITSSNSIILWDQINITVS.VPMTWSITDHTRCPSNNDGRNRSACVSEHSDCMEQPTFDHG.YACQCNNGYL	273
Consensus		
AtWAK2	DYIAQRITTLGNFTLSELNRFTVVGCSNYAFIRTSVGEKYSTGCISICDSATTNKGSCSGEGCCQIPVPRGYSFVRVKPHS..FHNHPVHLFNPCTYAFI	198
AtWAK1_PRO25	EEDSS.FTLENLSLANNKLTAVGCNALSLLDTFGMQNYSTACLSLDCSPPEADGECNGRCRVDVSAPLDSYTFETTSGRKHMSTSFHDFSCTYAFI	202
AtWAKL22_RFO1	SEFFITSDNRLYVGCNRLALITDIESQITGCESSDCGDKSRLLDKICGGYTCCQAKIPADRPQVIGVDLESSGGNTTGGNCRVAFINETYSFANVTEP	230
OsDEES1	CPVSEMTFVAATVPVVGAGADNATDGGFICSGTSCCTETPIAIGRPSYLVQFLSLDQNCLETGLKLPVAVRIAEGRWGF..VAGELLNTSSDSAAALRT	267
Sobic.002G166150	NPYIIDGCKPFGGYSFQHKSNCT..RTCGTIDIPFFGLGEECFAREEFQLNCNNTASPPTLILLDSVYNVHANVINEEG..LIEYTRPDQETNPDIIG	396
Sh_239A14_p00004	NPYIHDGYTKDEYKNPKPVKENCs.QCCGNTVFPFFGLGEECSARLLQLKCSDPANSVLLYDDLHVTVIIDLNESLIGIKFNLWDYLAILLHMNTI	372
Consensus		
AtWAK2	VEDGMFDFHALEDLNNLRNVTTFPVVLDWSIGDKTKQCYEYRGVCGGNSTCFDSTGGTYNCKCLEGFEGNPFLPNCQDINECIS...R.....	286
AtWAK1_PRO25	VEDDKFNFSSTEDLLNLRNVMRFPVLLDWSVGNTCEQVGSTSCIGGNSTCLDSTPRNGYICRCNEGFDPNPLSAGCDVNECTTSSITHR.....	294
AtWAKL22_RFO1	EQFYTNFTVIELGWYFDTSDSRLTPVPGCVNLTETGIYTSAPSCVCEYGNESFGYSGNVCNQIG.YRGNPVLPGGQIDDECEEGK.....	318
OsDEES1	PPVVLVWVVSPTLEAVLQGVITGQFADRRNMSCPADAAARSACRSNSFCSNVTGNRYRGYVRCRRRGYGGNPVYAGGQDIDECCKLAG.....	355
Sobic.002G166150	INDNLLYGRDLVLSYGDNVAVQVVAQLTCEDDAKRLLSGYACASANEICITGHDVGVGRSCARGHGNPNVNSSCVDIDECCLQP.....	483
Sh_239A14_p00004	YNEPVLVFDPLESASQWAVANLTCQMAKQNASGYACVSNHSTCLs...VISSSEGVYGRCKSPGFEGNPFLPNCQDIDECCKLQSRSPGICRGAVCHNTI	470
Consensus		
AtWAK2	HNCSEHSTCENTKGSFNCNCPGSRGKDSINSCTRKVRPE.....YFRWTCIFLGTIGFVSIMIGISLQCKIKHRKNTLRQKFEQNG	371
AtWAK1_PRO25	HNCSDPKTCRNKVGFGYCKCQSGYR...LDTTTMSCKRK.....EFAWTTILIVTTIGFVILVACIQRRMKHLKDTKLREQFEQNG	376
AtWAKL22_RFO1	LSSCEGTCVNVPGSWRCGLNGVK.....IKP.....LFGVLVGLFPLFLVLGIWGLIKFVKRRKIKRRMFKRRNG	388
OsDEES1	RCYGECTNTPGDIYQCRCPRGARGD...PRIPNGCVKTN.....LGLSVGICVGSAGLLVMGLGAFLKRRVKQRARMLRQKFEQNG	436
Sobic.002G166150	NICPEMNNNAGNYTCIPCYGTWYDPVQRCCTRRKHQN.....LLLGIAIGLSVGLGILLVGLFIRKRVRRNRINRQKLLKRYBQK	568
Sh_239A14_p00004	GSFTCTCEPRHAIYDISANQCTPASKENLMLGECICQFCTRERGLNICKLRDIILVGIILGLSCGLGILLGLSAIVLIRRWKRVNKKLRRKYBQK	570
Consensus		
AtWAK2	EGF2	
AtWAK1_PRO25	GMITICRVSG.AGPNNDVVKIFTEKGMKEFANGYHESRLGCGGCGTVYKGLIFINSIVAIRKARLGNRSQVECFINEVILLSQINHRNVKVLGGCLET	470
AtWAKL22_RFO1	GMITICRLSG.AGPNNDVVKIFTEKGMKPAFYAESRLGCGGCGTVYKGLIFINSIVAIRKARLGNRSQVECFINEVILLSQINHRNVKVLGGCLET	475
OsDEES1	GILLKQCLTT.RGGNVQSSKIFSSKELEKADNFNMNRLGCGGCGTVYKGLIFGRIVAVRRSVLDEDEKVEEFINEVGLLSQINHRNVKVLGGCLET	487
Sobic.002G166150	GILLKQCLVS..QKADIAERKIIPLSELEKANNFDKSRBLGCGGCGTVYKGLIFLHVVAIRKSKAEVQREIDEFINEVAILLSQINHRNVKVLGGCLET	534
Sh_239A14_p00004	GILLKQCLVS..SDETQSDNRIPLSELEKANNFDPTRALGCGGCGTVYKGLIFGRIVAVRRSVLDEDEKVEEFINEVAILLSQINHRNVKVLGGCLET	666
Consensus	GILLKQCLISDDENSSERTKIFLSELEKANNFDPTRALGCGGCGTVYKGLIFGRIVAVRRSVLDEDEKVEEFINEVAILLSQINHRNVKVLGGCLET	670
AtWAK2	ATP-B	
AtWAK1_PRO25	EVPLLVYEFINSGTTFDHLG...SLYDSSITWEHRLRIATEVAGSTAYLHSSASIPITHRCHRTANILLDKNLAKVAIFGASRLIPMDKEQLTILVGG	567
AtWAKL22_RFO1	EVPLLVYEFINSGTTFDHLG...SMIDSSITWEHRLRIATEVAGSTAYLHSSASIPITHRCHRTANILLDKNLAKVAIFGASRLIPMDKEELNEMVGG	572
OsDEES1	EVPLLVYEFINSGTTFDHLG...SDDYTMVDRIRISVEIAGALAYLHSAASTPVYHRDVKTNILLDEKYRAKVSFPGASRSINVDQTHLTILVAG	584
Sobic.002G166150	EVPLLVYEFINSGTTFDHLG...EGPMSPEDRIRIATEVAGSTAYLHSAVSPPIITHRCHSHNILLDGLSTIKVSNFGRSFCIPAEQTGITVAVGG	630
Sh_239A14_p00004	EVPLLVYEFINSGTTFDHLG...GHQSNNEFLSSDDSRIRATEVAGSTAYLHSAVSVSVHSDVSSNILLDGLSTIKVSNFPGASRLIPIDQTHVSNVGG	766
Consensus	EVPLLVYDFINSGTTFEILIT..YSSSGYSLSNDCLRIATEVAGSTAYLHSAVSMSPHSDVSSNILLDGLSTIKVSNFPGASRLIPIDQTHVSNVGG	768
AtWAK2	KAS	
AtWAK1_PRO25	TLGYLDEBYYNGLLNRKSDVYSFGVVLIELLSGQKALCFERPHCPKNVSCASATKNRNFHEITDGQVMNEDNQREIQEAPRIASCTRIMGEBRPM	667
AtWAKL22_RFO1	TLGYLDEBYYNGLLNRKSDVYSFGVVLIELLSGQKALCFERPHCPKNVSCASATKNRNLDEIGGEVMDNLEIKQIQAARIVACTRIMGEBRPM	672
OsDEES1	TLGYLDEBYYNGLLNRKSDVYSFGVVLIELITGKPFVSMRPEENRGVSHFNEAMKQNRVLDTSDRSKEGTLEQVLVAKILARGLISIKGKRBRPM	684
Sobic.002G166150	TLGYLDEBYYNGLLNRKSDVYSFGVVLIELITRKKPFYSYRSPD.DESVTHFTALLTCGNLGLDLPQVKEEG.EEVKEIVAVIAGAKILKVRBRPM	728
Sh_239A14_p00004	TLGYLDEBYYNGLLNRKSDVYSFGVVLIELITRKKPFITTSASGSKQNSNHFLEWMSRSPITEIHAPEVLDQASQDEISTVASTAQECLRLQGERBRPM	866
Consensus	TLGYLDEBYYNGLLNRKSDVYSFGVVLIELITRKKQVFTTESGTRKQNLNHFLEWMSRSPITEIHAPEVLEATEFEIKVASTAQECLRLQGERBRPM	868
AtWAK2	KEVAALALRVKTKYKWSQYRETGEIEHLLGVQILSAQGETSSSIGYDSIRNVTTLDIEAGR.....	732
AtWAK1_PRO25	KEVAALALRVKTKYKWSQYREPE..NEHLIGGHILSAQGETSSSIGYDSIRNVTTLDIEAGR.....	735
AtWAKL22_RFO1	REVSVLELIRSSPEDLELHIEEEDDEECAMENMDDSWSDMTAPASFLDLSPKLDVEPLVPQRTW.....	751
OsDEES1	R.....	729
Sobic.002G166150	KQVEMKICLLRNKDLRSNCGTTESSY..EIQPPGPTRIALTHRRQSLTDGNNRANVASSGCYSLEQFLESASLPR.....	940
Sh_239A14_p00004	KQVITITQLLLAERMNSHVDTEGNEQ..YIQPLVTRRALASHRQSFVSSENKAKVAPQRSTITLAWSESFRYQLVYHVRCIIGIYYRLLKWLVLTP	966
Consensus		
AtWAK2		732
AtWAK1_PRO25		735
AtWAKL22_RFO1		751
OsDEES1		729
Sobic.002G166150		940
Sh_239A14_p00004	KSYVYRYMTTVRAS	980
Consensus		

图 5 拟南芥、水稻、高粱和甘蔗 WAK 蛋白的序列比对

Fig. 5 Multiple sequences alignment of WAK protein from *Arabidopsis*, rice, sorghum, and sugarcane

EGF1: 表皮生长因子重复序列; EGF2: 钙结合类表皮生长因子结构域; TM: 跨膜域; ATP-B: ATP 结合位点; KAS: 激酶活性位点。

EGF1: EGF1-like region; EGF2: calcium-binding EGF-like domain; TM: transmembrane region; ATP-B: ATP-binding region; KAS: kinase active site are underlined.

图 6 甘蔗与其他物种间 WAK 蛋白的系统进化分析和结构域预测

Fig. 6 Phylogenetic analysis and motif prediction of WAK protein from sugarcane and other species

本研究中, 利用 G1 标记对 204 个甘蔗栽培品种、野生种和近缘属种质的检测结果表明, 我国甘蔗栽培品种中抗性标记检出率为 66.9%, 国外的甘蔗栽培品种检出率为 67.4%。检出结果与 Yang 等^[1]在 F_1 分离群体中检测结果(检出率为 65.8%)基本类似。我们推测, 黄锈病的抗性候选基因广泛分布于大多数甘蔗栽培品种中, 这可能是甘蔗黄锈病相对其他甘蔗病害发病面积相对较小的主要原因之一。但是, 端木卜文等^[16]在 180 份甘蔗材料中检测到 G1 标记, 占比 5.6%, 与我们的甘蔗栽培品种中占比 66.9%相比, 结果相差较大。

野生种是现代甘蔗栽培品种中抗病基因的重要来源^[20], 亟须对其进行抗病鉴定、筛选优良抗源并进一步挖掘抗病基因资源, 最终为抗病分子育种提供重要抗源材料。同时, 我们基于抗病诊断标记 G1, 追踪甘蔗野生种质中其标记候选基因的起源和进化, 对深入分析甘蔗抗病遗传基础和选育优良抗病品种具有重要价值。本研究中, 对 34 份甘蔗野生种及近缘属材料进行抗黄锈病标记 G1 检测发现, 含有抗性标记的有 17 份(阳性率为 50%), 其中 28 份甘蔗属材料中检测到抗性标记的有 15 份(阳性率为 53.6%)、6 份甘蔗近缘属中有 2 份材料(来自蔗茅属和河八王属)呈现阳性结果。表明 G1 标记的候选基因在甘蔗野生种和近缘属中都广泛分布, 其中割手密种质中抗性候选基因占最多, 这与前人研究中针对甘蔗种质资源中褐锈病的抗源分析结果基本一致^[21]。

运用 G1 标记扩增抗性基因的单倍型进行聚类

分析表明, 34 个扩增基因片段按大小, 可分为 4 类, 其中 678~693 bp 扩增基因片段来源于热带种 LA-purple 和割手密种广西 89-13, 而 1073~1075 bp 来源于大茎野生种 Mol-6081, 三者都同属于聚类分析的第 2 组。911~914 bp 扩增基因片段来源于割手密种四川 79-1-26 和福建大茎野生种、中国种和栽培品种, 都同属于聚类分析的第 3 组, 也进一步阐明甘蔗栽培品种中的抗性基因主要来源割手密种。1303~1305 bp 扩增基因片段来源于割手密种四川 79-1-26 和大茎野生种 Mol-6081, 而 1500 bp 扩增基因片段来源于大茎野生种 Mol-6081, 且 2 种扩增片段类型亲缘关系较近, 都属于聚类分析的第 1 组。从甘蔗栽培品种 G1 标记的扩增结果来看(图 1), 抗性基因片段主要有 3 种类型, 一种是 G1 标记的候选基因扩增片段为 911 bp, 另外 2 种分别为大约 1300 bp 和 1500 bp, 即使没有扩增 911 bp 候选基因片段, 也有 1300 bp 和 1500 bp 扩增片段。表明, 除了来源于割手密种的染色体外, 甘蔗栽培品种也具有来源于大茎野生种的染色体片段。热带种被认为是从大茎野生种家驯化而来, 不仅两者具有相同的起源中心(新几内亚)和染色体基数 $x=10$ ^[22], 而且利用 SSR 分子标记技术对甘蔗属进行聚类分析的研究证实, 热带种与大茎野生种具有较近的亲缘关系^[23], 本研究结果从侧面也证明了其结论的准确性。

Verica 等^[24]利用 WAK1 的蛋白序列对拟南芥和水稻数据库进行比对, 找到一类与 WAK 结构相似的 WAK 类似基因(WAK like genes, WAKLs), 除了

少数基因缺少某些序列外(跨膜域和信号肽等), 大部分基因具有 WAK 的典型结构特征, 且水稻中 WAKL 基因的数量远多于拟南芥^[17]。根据 He 等^[25]研究结果, 在拟南芥 1 号染色 30 kb 内鉴定到了 5 个高度相似的 WAK 基因(依次 WAK4、WAK5、WAK3、WAK1 和 WAK2), 同时, WAKL1-7 基因间都是成簇排列, 表明 WAK/WAKL 基因家族都发生了多次串联复制事件。本研究中, 甘蔗栽培品种 R570 的基因组是基于高粱基因组组装而成的一套单倍体基因组, 仅有 4660 BAC 大片段序列, 鉴定了 134 个 WAK/WAKL 蛋白, 目前尚无法确定编码这些蛋白的基因复制类型。将甘蔗、高粱、水稻与拟南芥的 WAK 蛋白进行序列比对发现, 与拟南芥蛋白 WAK 相比, 来自 C₄ 作物高粱和甘蔗的 WAK 蛋白 N 端胞外域都具有额外的 140 氨基酸, 可能存在其他特殊的功能, 而 C 端的氨基酸数量与拟南芥、高粱的 WAK 蛋白的氨基酸基本一致, 但该结果与 Wang 等^[14]报道的水稻 OsDEES1 分析结果不一致。需要特别注意的是, WAK 蛋白在胞内激酶结构域相似性较高(69.1%), 表明该家族比较保守, 在细胞内可能传递或介导相似的信号通路; 但是胞外域同源性就很低, 大约 27.3%~33.6%之间, 表明这类蛋白的胞外域结构变异大, 可以结合不同类型的配基, 来应答不同的环境信号, 分析结果与 He 等^[25]报道相一致。

甘蔗褐锈病和黄锈病抗性都属于数量性状, 受多基因控制^[1,21,26]。前人根据主效基因的定位结果, 分别建立了与甘蔗褐锈病和黄锈病抗性紧密连锁的分子标记(R12H16、9O20-F4 和 G1)及其检测方法^[1,11]。研究表明, 褐锈病抗性标记检测与表型鉴定之间的关联分析准确性较低, 即表型鉴定为抗病的甘蔗植株其分子标记检测结果可能为阴性^[26], 这些结果暗示除了 *Bru1* 外, 还有其他抗性基因的存在^[20,26]。造成这些结果的原因是已经建立的甘蔗遗传图谱密度较低^[1,11], 但数量性状抗性则由多个基因位点控制^[1,21,26], 因此需要进一步增加遗传图谱密度, 找出所有控制抗性的基因位点, 并建立多个抗性位点的标记检测方法, 这种情况下分子标记检测与表型鉴定之间的关联分析才显得更有意义^[26]。本研究中, 黄锈病抗性属于多基因控制, 仅进行单一分子标记检测与表型鉴定的关联验证, 意义和价值不大。进一步的研究, 需要在加密甘蔗遗传图谱的基础上, 获得控制甘蔗黄锈病抗性的所有基因位点并开发出系列标记, 进而将所有这些标记的检测结果与表型

鉴定结果相互验证、相互映衬, 以获得真实可靠的甘蔗黄锈病抗性鉴定结果, 为甘蔗抗黄锈育种奠定良好的基础。

4 结论

本研究揭示了 G1 标记的候选基因广泛分布于甘蔗栽培品种、野生种和近缘属, 其中割手密种含有该基因比例最高。基于比较基因组学, 从甘蔗栽培品种 R570 蛋白数据库中鉴定到 3 个与候选抗黄锈病 WAK 基因编码蛋白相似度较高的蛋白, 蛋白结构特征和保守结构域分析表明, 该蛋白为一种细胞壁连接的类受体激酶。聚类分析揭示 G1 标记扩增的候选基因可分为 3 组, 第 1 组来源于割手密种和大茎野生种; 第 2 组来源于于大茎野生种、热带种和河八王属; 第 3 组来源于割手密种、大茎野生种和栽培品种, 推测甘蔗栽培品种的 G1 标记候选基因主要来源于割手密种。以上结果为甘蔗抗黄锈病基因的图位克隆及抗性溯源甚至抗性分子机制的解析积累了重要的理论和实践基础。

附表 请见网络版: 1) 本刊网站 <http://zwxb.China.crops.org/>; 2) 中国知网 <http://www.cnki.net/>; 3) 万方数据 <http://c.wanfangdata.com.cn/Periodical-zuowxb.aspx>。

References

- [1] Yang X, Islam M S, Sood S, Maya S, Hanson E A, Comstock J, Wang J. Identifying quantitative trait loci (QTLs) and developing diagnostic markers linked to orange rust resistance in sugarcane (*Saccharum* spp.). *Front Plant Sci*, 2018, 9: 350.
- [2] Ryan C C, Egan B T. CHAPTER XIII-rust. In: Ricaud C, Egan B T, Gillaspie A G, Hughes C G, eds. *Diseases of Sugarcane*. Amsterdam: Elsevier, 1989. pp 189–210.
- [3] Braithwaite K S, Croft B J, Magarey R C, Scharaschkin T. Phylogenetic placement of the sugarcane orange rust pathogen *Puccinia kuehnii* in a historical and regional context. *Aust Plant Pathol*, 2009, 38: 380–388.
- [4] Elmhirst J F, Verma N. First report of anthracnose of salal caused by *Colletotrichum acutatum* in British Columbia. *Plant Dis*, 2007, 92: 175–175.
- [5] Barbasso D, Jordão H, Maccheroni W, Boldini J, Bressiani J, Sanguino A. First report of *Puccinia kuehnii*, causal agent of orange rust of sugarcane, in Brazil. *Plant Dis*, 2010, 94: 1170–1170.
- [6] 王晓燕, 李文凤, 黄应昆, 张荣跃, 单红丽, 罗志明, 尹炯. 云南蔗区首次发现由屈恩柄锈菌引起的甘蔗黄锈病. *中国农学通报*, 2015, 31(18): 273–277.
Wang X Y, Li W F, Huang Y K, Zhang R Y, Shan H L, Luo Z M, Yin J. First report of orange rust of sugarcane caused by *Puccinia*

- kuehnii* in Yunnan sugarcane field. *Chin Agric Sci Bull*, 2015, 31(18): 273–277 (in Chinese with English abstract).
- [7] Le Cunff L, Garsmeur O, Raboin L M, Pauquet J, Telismart H, Selvi A, Grivet L, Philippe R, Begum D, Deu M, Costet L, Wing R, Glaszmann J C, D'Hont A. Diploid/polyploid syntenic shuttle mapping and haplotype-specific chromosome walking toward a rust resistance gene (*Brul*) in highly polyploid sugarcane ($2n$ approximately $12x$ approximately 115). *Genetics*, 2008, 180: 649–660.
- [8] Asnaghi C, Roques D, Ruffel S, Kaye C, Hoarau J Y, Télismart H, Girard J C, Raboin L M, Risterucci A M, Grivet L, D'Hont A. Targeted mapping of a sugarcane rust resistance gene (*Brul*) using bulked segregant analysis and AFLP markers. *Theor Appl Genet*, 2004, 108: 759–764.
- [9] Diener A C, Ausubel F M. RESISTANCE TO *FUSARIUM OXYSPORUM* 1, a dominant *Arabidopsis* disease-resistance gene, is not race specific. *Genetics*, 2005, 171: 305–321.
- [10] Wei X, Jackson P A, McIntyre C L, Aitken K S, Croft B. Associations between DNA markers and resistance to diseases in sugarcane and effects of population substructure. *Theor Appl Genet*, 2006, 114: 155–164.
- [11] Costet L, Le Cunff L, Royaert S, Raboin L M, Hervouet C, Toubi L, Telismart H, Garsmeur O, Rousselle Y, Pauquet J, Nibouche S, Glaszmann J C, Hoarau J Y, D'Hont A. Haplotype structure around *Brul* reveals a narrow genetic basis for brown rust resistance in modern sugarcane cultivars. *Theor Appl Genet*, 2012, 125: 825–836.
- [12] Zhang S, Chen C, Li L, Meng L, Singh J, Jiang N, Deng X W, He Z H, Lemaux P G. Evolutionary expansion, gene structure, and expression of the rice wall-associated kinase gene family. *Plant Physiol*, 2005, 139: 1107–1124.
- [13] 孙丽静, 张芊, 路铁刚, 孙颖. 利用酵母双杂交系统筛选水稻类受体激酶 OsWAK50 胞内域相互作用蛋白. *生物化学与生物物理进展*, 2012, 39: 438–447.
- Sun L J, Zhang X, Lu T G, Sun Y. Screen of receptor-like kinase OsWAK50 intracellular interacting proteins by yeast two-hybrid system. *Prog Biochem Biophys*, 2012, 39: 438–447 (in Chinese with English abstract).
- [14] Wang N, Huang H J, Ren S T, Li J J, Sun Y, Sun D Y, Zhang S Q. The rice wall-associated receptor-like kinase gene *OsDEES1* plays a role in female gametophyte development. *Plant Physiol*, 2012, 160: 696–707.
- [15] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res*, 1980, 8: 4321–4326.
- [16] 端木卜文, 黄郑辉, 吴小斌, 高小宁, 谢振文, 齐永文. 甘蔗 (*Saccharum* species hybrid) 种质资源褐锈病和黄锈病抗性位点分子检测. *分子植物育种*, 2019, 18: 2626–2632.
- Duan-Mu B W, Huang Z H, Wu X B, Gao X N, Xie Z W, Qi Y W. Molecular detection of resistance loci to brown rust and orange rust in sugarcane germplasm resources. *Mol Plant Breed*, 2019, 18: 2626–2632 (in Chinese with English abstract).
- [17] Shiu S H, Karlowski W M, Pan R, Tzeng Y H, Mayer K F X, Li W H. Comparative analysis of the receptor-like kinase family in *Arabidopsis* and rice. *Plant Cell*, 2004, 16: 1220–1234.
- [18] Hermann S R, Aitken K S, Jackson P A, George A W, Piperidis N, Wei X, Kilian A, Detering F. Evidence for second division restitution as the basis for $2n + n$ maternal chromosome transmission in a sugarcane cross. *Euphytica*, 2012, 187: 359–368.
- [19] Piperidis G, Piperidis N, D'Hont A. Molecular cytogenetic investigation of chromosome composition and transmission in sugarcane. *Mol Genet Genomics*, 2010, 284: 65–73.
- [20] 李文凤, 王晓燕, 黄应昆, 张荣跃, 单红丽, 罗志明, 尹炯. 101 份中国甘蔗主要育种亲本褐锈病抗性鉴定及 *Brul* 基因的分子检测. *作物学报*, 2016, 42: 1411–1416.
- Li W F, Wang X Y, Huang Y F, Zhang R Y, Shan H L, Luo Z M, Yin J. Identification of resistance to brown rust and molecular detection of *Brul* gene in 101 main sugarcane breeding parents in China. *Acta Agron Sin*, 2016, 42: 1411–1416.
- [21] 李文凤, 王晓燕, 黄应昆, 张荣跃, 单红丽, 尹炯, 罗志明. 31 份甘蔗野生核心种质资源褐锈病抗性鉴定及 *Brul* 基因的分子检测. *作物学报*, 2015, 41: 806–812.
- Li W F, Wang X Y, Huang Y K, Zhang R Y, Shang H L, Yin J, Luo Z M. Identification of resistance to brown rust and molecular detection of *Brul* gene in 31 wild core sugarcane germplasms. *Acta Agron Sin*, 2015, 41: 806–812 (in Chinese with English abstract).
- [22] D'Hont A, Ison D, Alix K, Roux C. Determination of basic chromosome numbers in the genus *Saccharum* by physical mapping of ribosomal RNA genes. *Genome*, 2011, 41: 221–225.
- [23] Brown J, Schnell R J, Power E, Douglas S. Analysis of clonal germplasm from five *Saccharum* species: *S. barberi*, *S. robustum*, *S. officinarum*, *S. sinense* and *S. spontaneum*. A study of inter- and intra-species relationships using microsatellite markers. *Genet Resour Crop Evol*, 2007, 54: 627–648.
- [24] Verica J A, He Z H. The cell wall-associated kinase (WAK) and WAK-like kinase gene family. *Plant Physiol*, 2002, 129: 455–459.
- [25] He Z H, Cheeseman I, He D, Kohorn B D. A cluster of five cell wall-associated receptor kinase genes, *Wak1-5*, are expressed in specific organs of *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol*, 1999, 39: 1189–1196.
- [26] Racedo J, Perera M F, Bertani R, Funes C, González V, Cuenya M I, D'Hont A, Welin B, Castagnaro A P. *Brul* gene and potential alternative sources of resistance to sugarcane brown rust disease. *Euphytica*, 2013, 191: 429–436.