人参NBS-LRR抗病基因家族全基因组分析

初旻¹, 徐然², 苏贺³, 廖保生¹, 吴明丽¹, 徐江^{1*}

1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700;

2. 武汉轻工大学生物与制药工程学院, 武汉 430023;

3. 广州中医药大学第二附属医院, 广东省中医药科学院, 广州 510006

* 联系人, E-mail: jxu@icmm.ac.cn

收稿日期: 2017-11-06; 接受日期: 2017-12-27; 网络版发表日期: 2018-02-22

摘要 人参(*Panax ginseng* C. A. Meyer)为传统名贵中药材, 具有很高的药用价值和经济价值. 人参药用部位为多年生宿根, 生长周期长, 土壤病害多, 品质和产量受到严重制约. 抗病基因是植物免疫过程中参与识别病菌、抵抗侵染及扩散的基因, 是植物抗病性的分子生物学基础和选育抗病品种的重要分子标记. 本文以人参全基因组草图为基础, 运用生物信息学方法, 根据基因结构及序列特征成功预测7个家族, 共1652个人参抗病基因. 通过与其他8种被子植物抗病基因家族比较, 对人参抗病基因结构、家族进化特征进行初步分析. 并使用13个转录本数据, 系统分析人参抗病基因在不同部位和不同生长年限的表达模式, 发现人参抗病基因具有明显的功能分化和器官特异性. 以锈菌(*Cylindrocarpon destructans*)侵染不同时间后转录本表达模式, 对病原体特异识别抗病基因NBS-LRR家族及其他基因进行关联分析, 解析人参防御过程中次生代谢活动与病原微生物防御反应的协同作用, 本工作将为人参产业的可持续发展奠定基础.

关键词 人参, 抗病基因, 本草基因组

人参(*Panax ginseng* C. A. Meyer)是五加科人参属多年生植物, 具有抗肿瘤、抗疲劳、抗氧化、调节免疫力和保肝护肝等药理作用^[1,2]. 人参生长年份长, 生长环境复杂, 易受多种病害侵染, 使其品质和产量受到严重制约^[3,4]. 目前, 人参育种技术不发达, 抗病抗逆品系缺乏, 病害防治主要通过人为施加化学制剂, 在短期内可以起到防治作用, 长期施用导致病害抗药性, 土壤微生态失衡, 加剧病害传播. 病原微生物是人参病害的主要诱因, 如人参锈病, 是由半知菌亚门丝孢目参柱孢(*Cylindrocarpon panacicola*)、坏损柱孢(*Cylindro-*

carpon destructans)引起^[5,6]; 人参立枯病是由半知菌亚门, 无孢目立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)感染导致^[7]; 而半知菌亚门, 丝孢目的人参链格孢(*Alternaria panax*)则是人参黑斑病的主要致病原^[8]. 抗病基因(resistance gene)是植物免疫过程中参与识别病菌、抵抗侵染及扩散的基因, 是植物抗病性的分子生物学基础和选育抗病品种的重要分子标记. 因此, 了解人参抗病性的分子生物学基础将对人参栽培、克服连作障碍、优良品系选育等提供技术支持和理论帮助.

在与病原物生物长期的对抗过程中, 植物演化出

引用格式: 初旻, 徐然, 苏贺, 等. 人参NBS-LRR抗病基因家族全基因组分析. 中国科学: 生命科学, 2018, 48: 423–435

Chu Y, Xu R, Su H, et al. Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding gene in *Panax ginseng* (in Chinese). *Sci Sin Vitae*, 2018, 48: 423–435, doi: 10.1360/N052017-00197

了一套针对病原微生物高效的识别与防御系统, 抗病基因是该系统中最重要的一环^[9]。抗病基因编码蛋白通过特定结构域或结构单元发挥识别病原微生物及免疫激活功能, 按其结构域和功能可分为三大类, 核苷酸结合域-富含亮氨酸的重复结构类(nucleotide binding site-leucine-rich repeat, NBS-LRR)、跨膜受体-富含亮氨酸的重复结构类(transmembrane receptor-leucine-rich repeat, TM-LRR)及包括转运蛋白类、凝集素类等家族在内的其他类^[10]。NBS-LRR类按其N端结构可以被进一步分为含双螺旋结构类(coiled coil-NBS-LRR, CNL)、含果蝇(*Drosophila melanogaster*)蛋白Toll和哺乳动物蛋白质白细胞介素1受体类似结构类(TIR-NBS-LRR, TNL)以及不含以上两种结构的其他类(NBS-LRR, NL)。3种NBS-LRR类都以进入宿主细胞的致病效应因子为靶点, 引发“致病因子触发免疫途径”(effector triggered immunity, ETI)。相似地, TM-LRR也可分为类受体激酶类(receptor like kinases, RLKs)和类受体蛋白类(receptor like proteins, RLPs)^[11]。RLKs和RLPs识别几丁质、鞭毛、脂多糖等致病微生物分子模式结构, 因此被称为模式识别受体, 激发“模式触发免疫途径”(pathogen/microbe associated molecular pattern triggered immunity, PTI)^[12-14]。在植物体免疫过程中, PTI途径与ETI途径时常相互交叉, 共同调控内质网Ca²⁺的释放、活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)的富集、植物激素合成、MAPK激酶级联反应和其他防御相关基因的表达等一系列抗病反应, 阻止病害的侵染和扩大^[15]。例如, 玉米(*Zea mays*)非特异抗病基因*NDR1*以及3个等位基因*rp1*, *rp1-D21*和*rp-NC3*参与抵抗多种玉米锈病^[16]; 番茄(*Lycopersicon esculentum* Mill.)特异性抗病基因*Pto*专一识别叶斑病致病微生物*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pst)^[17,18]。

本草基因组(herb genomics)计划是针对具有重大经济价值和典型次生代谢途径的药用植物进行的全基因组测序和后基因组学研究^[19,20]。目前, 赤芝(*Ganoderma lucidum* karst)^[21]、紫芝(*Ganoderma sinense*)^[22]、丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bge.)^[23]及铁皮石斛(*Dendrobium officinale* Kimura et Migo)^[24,25]等中药基源植物已完成基因组的测序工作。本研究基于人参基因组草图数据分析, 预测了7个家族1652个人参抗病基因。通过与其他8种经典被子植物抗病基因家族比较, 对人参抗病基因结构、家族进化特征进行初步分析。使用13个来自

不同器官和不同生长时期的转录本数据, 系统分析人参抗病基因表达模式, 研究人参抗病基因的功能分化和器官特异性。针对人参易感病根腐病致病真菌人参锈菌(*Cylindrocarpon destructans*), 分析不同时间感染后抗病基因转录模式, 研究在人参防御锈菌过程中次生代谢活动与病原微生物防御反应的协同作用, 并进一步探索人参三萜皂苷的合成途径与抗真菌防御反应的关联。

1 材料与方法

1.1 抗病基因的鉴别及家族分析

应用人参全基因组草图, 基于从头注释流程, 获得42006个基因。与PRGdb数据库^[26](<http://www.prgdb.org>)数据库中的16488个抗病基因进行比对, 得到人参抗病基因候选基因($E < 10^{-6}$); 所有候选抗病基因氨基酸序列经Pfam^[27]蛋白家族数据库再次比对, 标注TIR(果蝇Toll蛋白/哺乳动物蛋白质白细胞介素1受体类似结构Pfam: PF01582.18)、NB-ARC(核苷酸结合域Pfam: PF00931)以及LRR(富含亮氨酸的重复结构Pfam: PF00560.31/PF12799.5/PF13306.4/PF13516.4/PF13855.4)结构域, 其次, 通过COLIS Server (http://www.ch.embnet.org/software/COLIS_form.html)标注CC(coiled coil)结构域。

模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*, TAIR10)、水稻(*Oryza sativa*, v7_JGI)及中果咖啡(*Coffea canephora*, v1.1)、胡萝卜(*Daucus carota*, v2.0)、桃树(*Prunus persica*, v2.1)、番茄(iTAG2.4)、可可(*Theoroma cacao*, v1.1)、葡萄(*Vitis vinifera*, Genoscope.12X)其他6种经典植物全基因组信息来源于Phytozome 12.1(<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>), 以相同方法与PRGdb数据库进行比对, 注释各家族抗病基因。

1.2 NBS-LRR基因结构和家族分析

以隐马尔可夫模型预测核苷酸结合域共有蛋白序列, 与候选NBS-LRR基因进行比对, 抽取73个候选基因中核苷酸结合域蛋白序列(Pfam: PF00931.20), 进行Clustal W多序列比对。比对结果用MEGA6构建无根系统进化树, 采用最大似然法(maximum likelihood, ML), 设定Jones-Taylor-Thornton模型, 自展循环数1000次。

基因结构分析及可视化使用TBtools crossplatform

V0.49999, 同时标注Pfam蛋白家族数据库预测的标准结构域. MEME Suite V4.12.0预测蛋白质结构单元, 选取氨基酸序列长度为6~50, $E < 2 \times 10^{-30}$ 的保守单元进行分析和标注.

1.3 基因表达模式分析

选取9个不同器官(主根、根茎、茎、叶片、小叶柄、叶梗、果实、种子、果梗)及4个不同年限人参根(5, 12, 15, 25年)的转录本原始数据(NCBI accession number SRP066368)作为分析数据^[28]. 真菌侵染实验数据采用4年生人参侧根以人参锈腐菌(*C. destructans*)处理后7个时间点转录本作为数据来源, 时间点分别是处理后0天(对照组), 处理后0.25, 0.5, 1, 4, 7和12天^[6]. FRKM (fragments per kilobase of exon per million mapped reads)鉴别差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs), 使用Cuffdiff (<http://cufflinks.cbc.umd.edu/>)^[29]进行分析, 定义表达差异倍数对数值大于2且错误发现率(FDR)<0.05为DEGs.

GO (gene ontology)富集使用在线工具Goatools (<https://github.com/tanghaibao/Goatools>)进行, 定义Bonferroni校正 $P < 0.05$ 为显著富集. 分级聚类分析使用R-hclust, 参数为默认值. 权重共表达网络分析(weighted correlation network analysis, WGCNA)构建基因共表达模式, Cytoscape (v3.5.1)可视化共表达模型.

2 结果分析

2.1 人参抗病基因家族分析

通过将人参42006个基因与PRGdb数据库中的16488个抗病基因比对, 得到7个类型共1652个人参抗病基因, 分别为: CNL家族基因(含双螺旋结构-核苷酸结合域-富含亮氨酸的重复结构类, coiled coil-NBS-LRR) 50个、TNL家族基因(含果蝇蛋白Toll和哺乳动物蛋白质白细胞介素1受体类似结构域-核苷酸结合域-富含亮氨酸的重复结构类, TIR-NBS-LRR) 21个、NL家族基因(含核苷酸结合域-富含亮氨酸的重复结构类, 但非CNL或TNL) 2个、RLP家族基因(含胞外富含亮氨酸的重复结构和胞内丝/苏氨酸激酶结构类) 130个、RLK家族基因(含胞外富含亮氨酸的重复结构的跨膜受体蛋白类) 877个、Kinase家族基因(含蛋白激酶类似结构类)139个, 以及包括ABC转运蛋白类似抗

病基因、凝集素类抗病基因、Mlo家族抗病基因、MtN3 slv族抗病基因等其他类433个(图1).

与其他8种被子植物相比, 人参RLK家族基因887个, 占抗病基因总数的53.09% (其他8种植物占比34.88%~46.32%), Kinase家族139个, 占人参抗病基因总数的8.41% (其他8种植物占比2.90%~5.49%), 显示出在进化过程中明显的扩张趋势. 而三类NBS-LRR家族抗病基因总数73个, 占人参抗病基因总数的4.29% (其他8种植物占比12.85%~33.08%)亚家族, 呈现强烈收缩趋势. 两个扩张家族均属于TM-LRR类抗病基因, 在胞外识别几丁质、鞭毛、脂多糖等致病微生物分子模式, 通过PTI途径引发基本免疫反应. NBS-LRR家族抗病基因在胞内识别致病因子或自身蛋白变化触发ETI途径. 两条途径通过相互交叉的信号通路调控免疫进程, 引起时长和强度不同的免疫反应. 人参生长周期长, 宿根生长过程中需接触多种土壤微生物, 丰富的TM-LRR类抗病基因(1007, 占人参抗病基因总数的60.96%, 其他8种植物占比47.31%~59.74%)和相应收缩的NBS-LRR家族有利于精确识别致病微生物, 确保植物体正常生长^[30-33].

2.2 NBS-LRR基因结构和家族分析

NBS-LRR包括CNL类家族基因、TNL类家族基因, 以及NL类家族基因. 由于长期面对复杂多变的微生物环境, NBS-LRR家族抗病基因是植物中变异最为

图1 人参及其他8种被子植物抗病基因家族成员数目及各家族分布(网络版彩图)

广泛的基因家族之一。本研究对73个NBS-LRR基因的氨基酸全长序列进行多序列比对, 采用ML构建NBS-LRR基因家族分子系统发育树。分别将CNL, TNL划分为4个和3个亚家族(图2A)。对连2个NL基因在内的所有NBS-LRR基因进行基因结构、主要结构域(图2B)和保守结构单元(图2C)的分布分析。

由图2可以看出, CNL类抗病基因按序列相似度可以分为I, II, III, IV 4个亚家族, 分别包括12, 15, 14和9个抗病基因, TNL类可分为I, II, III 3个亚家族, 分别包含9, 7和5个抗病基因。含外显子最多的是TNL II亚家族(平均外显子数5.14), 其次是TNL I亚家

族(平均外显子数4.44), CNL家族普遍拥有较少的外显子, 最多的是CNLIV亚家族(平均外显子数4.22), 最少的是CNLIII亚家族(平均外显子数2.50)。CNLIII亚家族全部抗病基因核苷酸结合域处在同一外显子内, 内含子集中在3'端, 0相位内含子比例高达85.71%, 同时对称外显子比例为31.43%。在TNL II亚家族, 高比例的0相位内含子(86.21%)和对称外显子(55.56)协同出现(表1), 提示CNLIII及TNL II亚家族基因在翻译过程中出现高可变剪切异型体的可能。

22个NBS-LRR基因(32.53%)未预测到典型NB-ARC结构域(图2B中黄色区域), 集中在CNLIV,

图2 NBS-LRR类抗病基因系统进化树、基因结构及保守结构域

A: NBS-LRR类抗病基因系统进化树, 采用ML, Jones-Taylor-Thornton模型, 自展循环数1000次; B: 基因结构及保守结构域分布; C: 预测保守结构单元及其在NBS-LRRs分布

TNL I 和 TNL II 亚家族中; TNLIII 亚家族全部成员预测到典型 TIR 结构域(图2B中红色区域); 12个NBS-LRR基因预测到典型LRR8结构(图2B中蓝色区域); 7个NBS-LRR蛋白(PG11628, PG12182, PG12609, PG28965, PG37866H, PG17793和PG00310)含有RPW8 (resistance to powdery mildew 8)结构, 其中4个聚集在CNLIV中. 通过MEME氨基酸序列分析, 预测到10个保守结构单元(表2). 其中Motif3, Motif5和Motif8含有富含亮氨酸(Leucine)且长度为11氨基酸的重复序列, 是典型LRR结构单元. 复合型结构单元Motif5-Motif4在CNL I 和CNL II 亚家族中高频出现. 复合型结构单元Motif2-Motif6-Motif10在Pfam预测NBS区域广泛存在, 其中Motif2含GMGGJGKT序列, 符合P-loop模型(GxxxGKT/S); Motif6含LVVLD序列, 与ATP/GTP结合结构域中Kinase2结构单元特征相符; Motif10 (序列: HELKLLSEEESWELFLKKAFF)符合ATP/GTP结合结构域Kinase 3a结构单元RNBS-C (xEVxxLSEDEA-

WELxxKxA)特征^[34-37]. 未发现农作物中常见的亮氨酸拉链(Leucine Zipper, L-X6-L-X6-L). 由此可见, 在73个NBS-LRR基因中预测的多个保守结构单元的种类和相对位置, 与已知植物NBS-LRR家族共有蛋白结构相符.

2.3 人参NBS-LRR抗病基因在不同器官的表达聚类分析

分析显示, NBS-LRR类抗病基因在包括不同年限人参根在内的13个转录本中的表达模式: 73个NBS-LRR类基因中67个至少在一个样本中得到表达, 6个在13个器官中未见表达的NBS-LRR类基因(PG24186, PG24187, PG11945, PG11946, PG28754和PG32920)都属于CNL类抗病基因, 其中5个是CNL II 亚家族基因. 13个器官按NBS-LRR类基因的表达模式可以划分为3支: 不同年限根和种子6个样本聚为一支, 多数NBS-LRR类基因表达不活跃; 果实、主茎和根茎聚为一支,

表 1 NBS-LRR类抗病基因亚家族

亚家族	基因数	外显子总数	外显子平均数	0相位内含子数	0相位内含子比率(%)	对称外显子数	对称外显子比率(%)
CNL I	12	37	3.08	15	62.50	6	16.22
CNL II	15	43	2.87	20	71.43	10	23.26
CNLIII	14	35	2.5	18	85.71	11	31.43
CNLIV	9	38	4.22	18	62.07	5	13.16
NL	2	9	4.5	4	57.14	2	22.22
TNL I	9	40	4.44	21	67.74	10	25.00
TNL II	7	39	5.14	25	86.21	20	55.56
TNLIII	5	14	2.8	7	77.78	1	7.14

表 2 NBS-LRR类抗病基因保守结构单元

	序列	长度	兼并N数	E值
Motif1	LEELGREIVKCKGLPLAIVVLGGILKTK	29	38	4.2×10^{-370}
Motif2	VVSIYGMGGJGKTTLAKKJYN	21	37	1.6×10^{-359}
Motif3	NLSKLNJEDCKLEELPEGJGFLTSLETL	29	53	2.7×10^{-339}
Motif4	LYQLWIAEGMVLSKDRREGETMMDVAERYLGELAHRSMVQV	41	14	7.30×10^{-302}
Motif5	LKPCFLYLGSFPEDE	15	33	6.50×10^{-189}
Motif6	KCLVVLDDVWSNDAW	15	42	5.00×10^{-186}
Motif7	SCRLHDLMRDLSLSKAKEEBFFKVIDFRRAHBDQH	35	18	2.40×10^{-224}
Motif8	KILNLSHSKYLTRTPDFSGVPNLERLILKGCASLVEVCESI	41	17	4.00×10^{-205}
Motif9	SNLEEDPMPVLEKJPNLRILALNGNAYLGKEMVCSANGFPQ	41	14	2.60×10^{-213}
Motif10	HELKLLSEEESWELFLKKAFF	21	41	5.60×10^{-195}

NBS-LRR类基因表达活跃; 其余各级叶柄和叶片聚为第三支。

由热图(图3)可见, *PG11944*, *PG32919*和*PG02366*, *PG35043*, *PG35044*, *PG15025*分别在叶片和叶柄特异表达, 6个特异表达基因全部都属于CNL家族, 5个分布于CNL II 亚家族; *PG00736*, *PG22643*和*PG07283*分别在5年生根, 12年生根和18年生根中表达量达到检测最大值, 其中*PG00736*和*PG22643*属于TNL III 亚家族, *PG07283*属于CNL IV 亚家族; 而在种子和果实中, 4个CNL基因(*PG35955*, *PG21242*, *PG13764*和*PG112331*)特异性表达。由此可见, NBS-LRR类抗病基因在不同器官中表达模式存在显著差异, CNL家族在人参植株地上部分最为活跃, 包括繁殖器官和营养器官, 并且以CNL II 亚家族为主(特异表达基因占比60%); TNL类基因主要活跃在长期与土壤微生物接触的地下部分中, 特异表达基因占比75%。

2.4 人参锈腐菌诱导人参NBS-LRR家族抗病基因的表达

应用人参锈腐菌(*C. destructans*)侵染后不同时间点人参根转录本数据, 分析NBS-LRR家族抗病基因在抗根腐病过程中的表达模式。由图3可知, 73个NBS-LRR基因按表达模式可以分为6个类群: T1组, 在未处理组表达量较高并在短时内(0.25天)保持, 包括8个CNL, 2个TNL和1个NL, 分布除TNL III 之外的所有亚家族。T2组, 处理后0.25天之内表达量迅速达到峰值, 包括8个CNL和3个TNL。其中, 2个CNL II 基因*PG24187*, *PG39599*和1个CNL III 亚家族基因*PG06950*, 达到所有观测范围内的最高FPKM值。T3组, 处理中前期表达量明显增加并持续到处理后第4天, 包括5个CNL, 5个TNL和1个NL, 其中*PG39601*在处理0.5天达到极大值, KOG注释参与凋亡相关通路; *PG37886*在处理1天达到峰值, GO注释显示参与转录调控和植物激素及Ca²⁺相应, 两者皆属于CNL IV 亚家族。T4组, 表达量出现两次增加, 分别出现在处理后0.5天和处理后7天, 包括3个CNL, 1个TNL。T5组, 人参锈腐病处理后(>7DPI)表达量明显增高, 如*PG02366*和*PG32919*, GO注释提示前者参与植物细胞凋亡通路, 后者为拟南芥抗病基因*rps2*的同源基因。T6组, 与T4组相似, 出现两次表达量短暂升高现象, 分别处在处理后短时0.25天和中期, 如峰值出现在0.25DPI的*PG22427*和峰值出

现在4.0DPI的*PG08564*。由此可见, 多个NBS-LRR基因在人参锈腐菌(*C. destructans*)诱导后表达量出现明显变化, 参与免疫过程, 抵抗真菌侵染。

GO富集分析显示, *C. destructans*侵染后, 抗真菌防御(defense response to fungus)、茉莉酸介导信号途径(jasmonic acid mediated signaling pathway)和乙烯应激反应(response to ethylene stimulus)功能基因发生显著富集, 提示次生代谢活动与病原微生物防御反应的协同作用。同时, 31个ROS相关基因(GO:0000302/0072593)表达量变化明显, 其中*PG08116*和*PG37201*表达量增长最为迅速, 分别在14DPI增加了4.199及4.69倍。15个PCD相关基因(GO:0043067/0012501)表达量变化迅速, 如*PG34859*在0.25DPI内达到峰值后缓慢下降。

人参皂苷合成途径关键酶与人参抗病基因的共表达网络分析显示, 在抗锈腐菌侵染过程中, 两个3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶A还原酶(3-hydroxy-3-methyl glutaryl coenzyme A reductase, HMGR, EC:1.1.1.34)、*PG16235*以及*PG02251*与抗病基因出现明显协同表达(图4B)。

由此可见, 人参在防御锈腐菌侵染过程中, NBS-LRR家族基因在不同时间表达量具有明显差异, ROS, PCD, JA应答和乙烯应激相关功能基因表达相应增加, 次生代谢活跃, 人参皂苷途径关键合成酶HMGR表达上调, 显示三萜皂苷合成活动与病原微生物防御反应的协同作用, 为效应触发免疫途径的一部分。

3 讨论

我国药用植物有一万多种, 约占中药材资源总数的87%^[38], 是所有经济植物中最的一类。然而, 药用植物大多遗传背景不清、基因组信息缺乏、功能基因的研究较为薄弱^[39]。近年来, 在本草基因组(herb genomics)计划推动下, 药用植物的基因组学研究已经取得了长足的进步。目前, 多个中药基原植物, 如赤芝、紫芝、丹参及铁皮石斛等重要药用植物的基因组已完成测序。本文以人参全基因草图为基础, 进行基因组范围内的抗病基因筛查, 系统分析人参抗病基因家族的进化关系及结构特点; 结合多个转录本数据的比较, 分析各基因及基因家族的表达模式, 分析人参抗病基因在健康状态下不同时空的表达模式和根腐病菌(*C. de-*

图 3 人参NBS-LRR类抗病基因不同器官中表达的聚类分析

structans) 侵染状态下的表达特征.

3.1 人参抗病基因家族

人参具有扩张的跨膜受体-富含亮氨酸的重复结构类抗病基因(RLK)家族和收缩的核苷酸结合域-富含亮氨酸的重复结构类抗病基因(CNL, TNL和NL)家族. 前者在胞外识别几丁质、鞭毛、脂多糖等致病微生物分子模式, 因此称为表面模式受体(surface pattern recognition receptors, PRRs), 通过PTI途径引发基本免疫反应, 阻止非特化致病微生物. 特化致病微生物针对植物基本免疫反应演化出相应的致病因子策略, 拮抗PRRs进入植物细胞内部干扰PTI途径从而瓦解基本免疫反应. 这迫使植物协同演化出进一步的防御机制, 即NBS-LRR抗病基因在胞内识别致病因子或监视自身相关蛋白变化触发ETI途径. ETI可以恢复甚至增强PTI免疫反应, 引起超敏反应和细胞凋亡, 导致感染点植物细胞死亡和系统性免疫反应^[40].

ETI与PTI通路互有交叉, 引起时长和强度不同的免疫反应. 在ROS的生成、Ca²⁺的释放、MAPK反应甚至转录调控层面上, ETI引起的免疫反应都比PTI持续时间长且范围更广(图5A)^[41,42]. 这可能是由于PTI由细胞外识别介导, 为避免非致病微生物引起过度防御, PTI通常会采用胞内负反馈机制, 使其引起的防御反应随时间减弱^[43,44]. 而在ETI中, 致病因子进入植物细胞内是一种确定的信号, ETI可抑制PTI的反馈机制放大和强化基础防御反应, 并介导超敏反应^[45].

人参宿根在生长周期内接触多种土壤微生物, 演化出符合自身特点的抗病机制. 扩张的TM-LRR类抗病基因家族(1007, 占人参抗病基因总数的60.96%)和相应缩减NBS-LRR家族(73, 占人参抗病基因总数的4.42%)可以精确识别以及区分各种微生物, 避免过度的防御反应. 转录本分析也表明, 多数NBS-LRR类抗病基因在各年生根中的表达不活跃, 此现象在RLK家族抗病基因中并未出现.

3.2 人参NBS-LRR抗病基因

NBS-LRR类抗病基因按其N端结构可进一步分为CNL, TNL以及没有典型结构的NL亚家族. 与哺乳动物体内的NOD-LRR相似, NBS-LRR中的NB-ART结构域是蛋白的活化开关, 当此区域与ADP结合时为

“OFF”, 与ATP结合时为“ON”(图5B)^[46]. 一般情况下, NBS-LRR类抗病蛋白处于抑制状态, 此时蛋白N端的TIR结构域或CC结构域与C端的LRR结构域向内折叠, 遮挡住NBS区域, 防止其进行ADP/ATP转换. 当特异致病因子进入植物细胞内并与相应NBS-LRR蛋白的LRR结合, 暴露NBS区域进行开关转换, 改变蛋白构象暴露N端结构与下游信号组件结合, 激活免疫反应(图5B)^[47].

由于NBS-LRR类抗病蛋白引起的免疫反应强烈而持久, 植物体采用许多手段来调控此类基因的表达和其蛋白的活化. 例如, 在拟南芥中, 两个TNL基因*CHS1*和*CHL1*通过可变剪切产生同源二聚体, 反向调控对应的ETI进程^[48]; 而TNL-RPS6可变剪切产生的剪短蛋白可以促进相应全长蛋白诱导的免疫反应^[49]. 人参CNLIII亚家族中, 0相位内含子比例高达85.71%, 同时其对称外显子比例达到31.43%; TNL II亚家族, 高比例的0相位内含子(86.21%)和对称外显子(55.56%)也协同出现(表1). 0相位内含子与对称外显子的高频协同出现可导致多种可变剪切异型体, 为ETI免疫进程的精确调控提供基础.

73个NBS-LRR蛋白结构域分析过程中, 除典型NBS结构域、TIR结构域和LRR8结构保守出现外, 还发现7个NBS-LRR蛋白(PG11628, PG12182, PG12609, PG28965, PG37866H, PG17793和PG00310)含有RPW8结构, 其中4个聚集在CNLIV中, 此结构域最早在拟南芥中两个多态抗病基因*RPW8.1*, *RPW8.2*中发现, 对多种白粉病菌具有广谱抗病效应^[50]. 同时发现多个常见结构单元, 如P-loop, Kinase2等, 但农作物中常见的亮氨酸拉链(leucine zipper, L-X6-L-X6-L)并未发现^[51,52].

在对人参NBS-LRR抗病基因结构和表达量的分析过程中, 发现多个潜在假基因(如PG24187, PG11945, PG28754等)的存在, 可读框以终止密码子为内含子的片段打断, 同时在各组织、处理中表达量均未检出. 由于需要面对致病微生物快速变异带来的巨大选择压, 抗病基因是植物体中变异最为迅速的基因群之一, 而假基因正是抗病基因的变异来源之一, 这些假基因一般没有功能, 通过与等位基因或旁系同源基因发生基因重组和转换推动抗病基因的变异^[53,54].

本研究以人参全基因组草图为基础, 预测7个结构及功能不同的人参抗病基因家族, 对人参抗病基因结

图 5 机制及分子模型(网络版彩图)

A: 推测人参NBS-LRR诱导效应出发免疫途径的机制; B: NBS-LRRs效应因子识别开关的分子模型

构、家族进化特征进行初步分析, 系统分析人参NBS-LRR抗病基因在不同器官和不同生长年限的表达模式, 发现人参NBS-LRR抗病基因具有明显的功能分化和器官特异性. 针对人参易感病根腐病, 对病原体特异识别抗病基因NBS-LRR家族及其他基因行进关联分

析, 解析人参防御过程中次生代谢活动与病原微生物防御反应的协同作用, 推测人参NBS-LRR诱导效应触发免疫途径. 以期为了解人参抗病性的分子生物学基础、筛选人参抗病性状的分子标记及优良品系选育等提供技术支持和理论帮助.

参考文献

- 1 Hemmerly T E. A Ginseng farm in Lawrence County, Tennessee. *Econ Bot*, 1977, 31: 160–162
- 2 Leung K W, Wong A S T. Pharmacology of ginsenosides: a literature review. *Chin Med*, 2010, 5: 20–27
- 3 沈亮, 徐江, 董林林, 等. 人参栽培种植体系及研究策略. *中国中药杂志*, 2015, 40: 3367–3373
- 4 Xiao C, Yang L, Zhang L, et al. Effects of cultivation ages and modes on microbial diversity in the rhizosphere soil of *Panax ginseng*. *J Ginseng*

- Res, 2016, 40: 28–37
- 5 Rahman M, Punja Z K. Factors influencing development of root rot on Ginseng caused by *Cylindrocarpon destructans*. *Phytopathology*, 2005, 95: 1381–1390
 - 6 Gao Y, He X, Wu B, et al. Time-course transcriptome analysis reveals resistance genes of *Panax ginseng* induced by *Cylindrocarpon destructans* infection using RNA-Seq. *PLoS ONE*, 2016, 11: 1–18
 - 7 孙明江, 吕晓宏. 立枯灵防治人参立枯病试验报告. *中药材*, 1997, 20: 56–58
 - 8 陈长卿, 李桐, 李欣莲, 等. 人参内生细菌NJ13在宿主体内定殖特性及对人参黑斑病的防治效果. *中国中医药杂志*, 2014, 39: 1782–1787
 - 9 Grant M R, McDowell J M, Sharpe A G, et al. Independent deletions of a pathogen-resistance gene in *Brassica* and *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 15843–15848
 - 10 Mackey D, Belkadir Y, Alonso J M, et al. *Arabidopsis* RIN4 is a target of the type III virulence effector AvrRpt2 and modulates RPS2-mediated resistance. *Cell*, 2003, 112: 379–389
 - 11 Kobe B, Deisenhofer J. The leucine-rich repeat: a versatile binding motif. *Trends Biochem Sci*, 1994, 19: 415–421
 - 12 Chisholm S T, Coaker G, Day B, et al. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*, 2006, 124: 803–814
 - 13 Sekhwal M K, Li P, Lam I, et al. Disease resistance gene analogs (RGAs) in plants. *Int J Mol Sci*, 2015, 16: 19248–19290
 - 14 Hammond-Kosack K E, Jones J D G. Plant disease resistance genes. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1997, 48: 575–607
 - 15 Cui H, Tsuda K, Parker J E. Effector-triggered immunity: from pathogen perception to robust defense. *Annu Rev Plant Biol*, 2015, 66: 487–511
 - 16 Hulbert S H. Structure and evolution of the *rpl* complex conferring rust resistance in maize. *Annu Rev Phytopathol*, 1997, 35: 293–310
 - 17 Mackey D, Holt Iii B F, Wiig A, et al. RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1-mediated resistance in *Arabidopsis*. *Cell*, 2002, 108: 743–754
 - 18 Liu J L, Liu X L, Dai L Y, et al. Recent progress in elucidating the structure, function and evolution of disease resistance genes in plants. *J Genet Genomics*, 2007, 34: 765–776
 - 19 陈士林, 孙永珍, 徐江, 等. 本草基因组计划研究策略. *药学报*, 2010, 45: 807–812
 - 20 陈士林, 宋经元. 本草基因组学. *中国中药杂志*, 2016, 41: 3881–3889
 - 21 Chen S, Xu J, Liu C, et al. Genome sequence of the model medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *Nat Commun*, 2012, 3: 177–186
 - 22 Vogel J P, Garvin D F, Mockler T C, et al. Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Nature*, 2010, 463: 763–768
 - 23 Xu H, Song J, Luo H, et al. Analysis of the genome sequence of the medicinal plant *Salvia miltiorrhiza*. *Mol Plant*, 2016, 9: 949–952
 - 24 Liang Y, Xiao W, Hui L, et al. The genome of *Dendrobium officinale*, illuminates the biology of the important traditional Chinese orchid herb. *Mol Plant*, 2014, 8: 922–934
 - 25 Zhang G Q, Xu Q, Bian C, et al. The *Dendrobium catenatum* Lindl. genome sequence provides insights into polysaccharide synthase, floral development and adaptive evolution. *Sci Rep*, 2016, 6: 19029–19039
 - 26 Walter S, Guglielmo R, Marco D S et al. PRGdb: a bioinformatics platform for plant resistance gene analysis. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38: 814–821
 - 27 Petz M, Them N, Huber H, et al. La enhances IRES-mediated translation of laminin B1 during malignant epithelial to mesenchymal transition. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40: 290–302
 - 28 Wang K, Jiang S, Sun C, et al. The spatial and temporal transcriptomic landscapes of Ginseng, *Panax ginseng* C. A. Meyer. *Sci Rep*, 2015, 11: 18283–18295
 - 29 Trapnell C, Hendrickson D G, Sauvageau M, et al. Differential analysis of gene regulation at transcript resolution with RNA-seq. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 46–53
 - 30 Periyannan S, Moore J, Ayliffe M, et al. The gene *Sr33*, an ortholog of barley *MLA* genes, encodes resistance to wheat stem rust race Ug99. *Science*, 2013, 341: 786–788
 - 31 Saintenac C, Zhang W, Salcedo A, et al. Identification of wheat gene *Sr35* That confers resistance to Ug99 stem rust race group. *Science*, 2013, 341: 783–786
 - 32 Liu W, Frick M, Huel R, et al. The stripe rust resistance gene *Yr10* encodes an evolutionary-conserved and unique CC-NBS-LRR sequence in wheat. *Mol Plant*, 2014, 7: 1740–1755
 - 33 Cao A, Xing L, Wang X, et al. Serine/threonine kinase gene *Stpk-V*, a key member of powdery mildew resistance gene *Pm21*, confers powdery

- mildew resistance in wheat. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 7727–7732
- 34 Zhang C, Liu L, Wang X, et al. The *Ph-3* gene from *Solanum pimpinellifolium* encodes CC-NBS-LRR protein conferring resistance to *Phytophthora infestans*. *Theor Appl Genet*, 2014, 127: 1353–1364
- 35 Meyers B C, Kozik A, Griego A, et al. Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2003, 15: 809–834
- 36 Zhou F, Guo Y, Qiu L J. Genome-wide identification and evolutionary analysis of leucine-rich repeat receptor-like protein kinase genes in soybean. *BMC Plant Biol*, 2016, 16: 58–71
- 37 Yang Y, Labbé J, Muchero W, et al. Genome-wide analysis of lectin receptor-like kinases in *Populus*. *BMC Genomics*, 2016, 17: 699–715
- 38 中国药材公司. 中国中药资源. 北京: 科学出版社, 1995
- 39 李滢, 孙超, 罗红梅, 等. 基于高通量测序454 GS FLX的丹参转录组学研究. *药学报*, 2010, 45: 524–529
- 40 Jones J D G, Dangl J L. The plant immune system. *Nature*, 2006, 444: 323–329
- 41 Leister R T, Ausubel F M, Katagiri F. Molecular recognition of pathogen attack occurs inside of plant cells in plant disease resistance specified by the *Arabidopsis* genes *RPS2* and *RPM1*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 15497–15502
- 42 Wu Y, Wood M D, Tao Y, et al. Direct delivery of bacterial avirulence proteins into resistant *Arabidopsis* protoplasts leads to hypersensitive cell death. *Plant J*, 2003, 33: 131–137
- 43 Böhm H, Albert I, Fan L, et al. Immune receptor complexes at the plant cell surface. *Curr Opin Plant Biol*, 2014, 20: 47–54
- 44 Chang C, Yu D, Jiao J, et al. Barley MLA immune receptors directly interfere with antagonistically acting transcription factors to initiate disease resistance signaling. *Plant Cell*, 2013, 25: 1158–1173
- 45 Spoel S H, Dong X. How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nat Rev Immunol*, 2012, 12: 89–100
- 46 Griebel T, Maekawa T, Parker J E. NOD-like receptor cooperativity in effector-triggered immunity. *Trends Immunol*, 2014, 35: 562–570
- 47 Inoue H, Hayashi N, Matsushita A, et al. Blast resistance of CC-NB-LRR protein Pbl is mediated by WRKY45 through protein-protein interaction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 9577–9582
- 48 Dinesh-Kumar S P, Baker B J. Alternatively spliced N resistance gene transcripts: their possible role in tobacco mosaic virus resistance. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 1908–1913
- 49 Kim S H, Kwon S I, Saha D, et al. Resistance to the *Pseudomonas syringae* effector HopA1 is governed by the TIR-NBS-LRR protein RPS6 and is enhanced by mutations in SRFR1. *Plant Physiol*, 2009, 150: 1723–1732
- 50 Xiao S, Ellwood S, Calis O, et al. Broad-spectrum mildew resistance in *Arabidopsis thaliana* mediated by RPW8. *Science*, 2001, 291: 118–120
- 51 Ballvora A, Ercolano M R, Weiss J, et al. The *R1* gene for potato resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) belongs to the leucine zipper/ NBS/LRR class of plant resistance genes. *Plant J*, 2002, 30: 361–371
- 52 Salmeron J M, Oldroyd G E D, Rommens C M T, et al. Tomato Prf is a member of the leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes and lies embedded within the Pto kinase gene cluster. *Cell*, 1996, 86: 123–133
- 53 Liu J J, Ekramoddoullah A K M. Isolation, genetic variation and expression of TIR-NBS-LRR resistance gene analogs from western white pine (*Pinus monticola* Dougl. ex. D. Don.). *Mol Genet Genomics*, 2003, 270: 432–441
- 54 Michelmore R W, Meyers B C. Clusters of resistance genes in plants evolve by divergent selection and a birth-and-death process. *Genome Res*, 1998, 8: 1113–1130

Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding gene in *Panax ginseng*

CHU Yang¹, XU Ran², SU He³, LIAO BaoSheng¹, WU MingLi¹ & XU Jiang¹

¹ Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

² College of Biology and Pharmaceutical Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China;

³ China Academy of Chinese Medical Sciences Guangdong Branch, The Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

Panax ginseng C. A. Meyer is a highly valued medicinal plant whose roots have been widely used for thousands of years as a traditional herb to enhance physical performance. Ginseng root production requires several years of cultivation, resulting in a long period of exposure to soil-borne pathogens, which significantly reduce the quality and yield. Plants have evolved resistance genes (*R* genes) encoding proteins that mediate resistance to microorganism, which allow for the recognition of specific pathogen effectors, activating the plant defense systems. In this study, 1652 *R* genes distributed across seven families were identified in *P. ginseng* using the principles of sequence similarity and domain conservation. Furthermore, the exon/intron organization, motif composition, and motif arrangement were considerably conserved among the members of the same subfamilies in the constructed phylogenetic tree of NBS-LRR genes in ginseng. Expression profiling analysis of PgNBS-LRRs suggested that these genes appeared to be differentially expressed in an organ-specific or temporal pattern. In addition, differentially expressed NBS-LRR genes were involved in ginseng defense systems. Genes involved in ginsenoside biosynthetic pathway during *Cylindrocarpon destructans* infection were also investigated. Overall, this study will provide a blueprint for the future efforts toward improving disease resistance of *P. ginseng*.

***Panax ginseng*, resistance gene, herb genomics**

doi: 10.1360/N052017-00197