

黑籽南瓜NBS类抗病基因的鉴别及关键基因分析

丁玉梅^{1,2}, 高婷³, 暴会会³, 谢俊俊³, 姚春馨^{1,2}, 周晓罡^{1,2}, 侯思名^{4,*}, 杨正安^{3,*}

¹云南省农业科学院生物技术与种质资源研究所, 昆明650205

²云南省农业生物技术重点实验室, 昆明650205

³昆明学院农学与生命科学学院, 昆明650214

⁴云南农业大学园林园艺学院, 昆明650201

摘要: 以云南栽培的枯萎病抗病品种绿皮黑籽南瓜(*Cucurbita ficifolia*)为材料, 采用二代转录组和全长转录组测序相结合的方法, 对黑籽南瓜NBS类抗病基因进行鉴别和筛选。结果显示: 以NB-ARC作为参考氨基酸序列, 共鉴定了43条*CfNBS* (NBS-type gene from *C. ficifolia*)类基因全长序列, 分属于TNL、CNL、TN、RPW8-N和N类5个亚基因家族, 典型的TNL和CNL类分别有2个和13个。系统进化树分析表明, *CfNBS*类基因可以分为4大类群, 黑籽南瓜的NBS类抗病基因数量较少但其基因进化类型比其他瓜类物种丰富。与二代转录组进行比对, 筛选获得11个差异表达的黑籽南瓜NBS类关键基因, 包括4个抗病蛋白、2个蛋白激酶、2个TMV抗性蛋白和3个未知功能蛋白, qRT-PCR分析表明有10个*CfNBS*类关键基因在枯萎病菌接种后48和96 h出现上调或下调表达, 可能参与了黑籽南瓜对枯萎病菌侵染不同时间点的抗病应答过程。11个*CfNBS*类关键基因的GO (Gene Ontology) 功能富集分析表明, 其涉及的生物学过程显著富集在防卫反应、谷胱甘肽转运、改良氨基酸转运等10条GO条目中, 涉及分子功能富集在ADP结合、受体丝氨酸/苏氨酸激酶结合、细胞壁结构成分3个GO条目中。而富集通路最多的是与TMV抗性蛋白同源的2个基因(CL19588contig1和CL21402contig1), 说明这2个基因在抗病应答过程中起到了重要作用。11个*CfNBS*类关键基因qRT-PCR组织表达特异性分析表明, 在根、茎、叶和果实中表达量最高的基因分别是CL34065Contig1、CL52011Contig1、CL6035Contig1和CL19588Contig1。以上结果可为开展黑籽南瓜NBS类抗病基因的克隆和功能验证, 以及解析黑籽南瓜响应枯萎病菌胁迫的抗性应答机制提供参考。

关键词: 黑籽南瓜; 枯萎病; 转录组; NBS类基因; qRT-PCR

黑籽南瓜(*Cucurbita ficifolia*)是南瓜属(*Cucurbita*)一年或多年生草本藤蔓性植物, 其对低温、干旱、盐碱、土壤贫瘠等非生物逆境有较强抗性或耐性, 对生物逆境如瓜类枯萎病也有很强的抗性, 已作为嫁接砧木应用于瓜类枯萎病的防治(梁祖珍等2014)。瓜类枯萎病是由尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)寄生引起的一种真菌土传病害, 是影响瓜类产量和品质的重要病害之一。选育抗病品种是解决瓜类枯萎病的根本途径, 挖掘黑籽南瓜蕴含的优良抗病基因资源对瓜类的抗病分子育种具有重要意义。在应对病原微生物入侵时, 寄主植株通常进化出可以特异性识别病原菌分泌的效应因子的抗病蛋白, 激活效应因子触发的次级免疫反应(Howden和Hitema 2012), 从而导致局部组织或细胞的程序性死亡, 引起植物超敏反应, 更为有效地遏制病原菌的扩散(Jones和Dangle 2006)。

虽然病原菌产生的效应因子众多, 但寄主植

物的抗病基因或蛋白的结构却十分保守, 根据结构特点可将植物抗病蛋白分为5类(闫佳2018): 富含亮氨酸重复结构的跨膜受体蛋白、富含亮氨酸重复结构的蛋白激酶、丝氨酸/苏氨酸激酶、毒素还原酶以及核苷酸结合位点和富亮氨酸重复(nucleotide binding site plus leucine-rich repeat, NBS-LRR)的抗病蛋白。在众多的抗病基因中, NBS类基因是植物基因组中数目最多的抗病基因家族。根据NBS-LRR蛋白的结构特点又可将其分为3类, 即典型NBS-LRR结构抗病蛋白、非典型NBS-LRR结构抗病蛋白和含特殊结构域的NBS-LRR抗病蛋白。

收稿 2020-04-28 修定 2020-07-10

资助 国家自然科学基金(31460516)、云南高水平大学园艺学创新人才培养基地(云教高([2015]57)、云南省高校联合基金(2018FH001-026)。

* 共同通讯作者: 侯思名(55374318@qq.com)、杨正安(454483788@qq.com)。

典型NBS-LRR抗病蛋白根据其N端结构的不同又分为TNL (TIR-NB-LRR)和CNL (CC-NB-LRR)。非典型NBS-LRR结构抗病蛋白缺少TIR/CC (toll/interleukin-1 receptor like/coiled coil)、NBS结合位点或LRR (leucine rich repeat)结构域。目前,已从玉米(*Zea mays*) (Johal和Briggs 1992)、甘蔗(*Saccharum officinarum*) (阙友雄等2009)、甘薯(*Dioscorea esculenta*) (陈观水等2006)、黄瓜(*Cucumis sativus*) (丁国华等2005)、中国南瓜(*Cucurbita moschata*) (高丽华等2007)、西瓜(*Citrullus lanatus*) (郭绍贵等2008)、甜瓜(*Cucumis melo*) (王贤磊等2011)和瓠瓜(*Lagenaria siceraria*) (赵芹等2015)等植物中获得部分NBS类抗病基因或抗病同源序列。笔者2018年仅从黑籽南瓜中克隆到1条NBS类抗病基因同源序列*HQGA2* (丁玉梅等2018),对于黑籽南瓜中可能蕴含的更多NBS类抗病基因尚未开展研究。

现代高通量转录组测序技术的发展,不仅可以系统分析植物抗性基因的差异表达特性,还可以筛选和鉴定起关键作用的抗性基因。为此,本研究对接种枯萎病菌后的绿皮黑籽南瓜幼苗进行二代转录组测序,同时对正常生长状态下的幼苗进行全长转录组测序,并将两个转录组测序相结合进行生物信息学分析鉴别和挖掘出黑籽南瓜NBS抗病候选基因和关键抗病基因,为分离克隆黑籽南瓜优良抗病基因和瓜类抗病分子育种奠定前期基础,同时可为阐明瓜类寄主响应枯萎病菌胁迫的抗性应答机制提供信息。

1 材料与方法

1.1 实验材料和菌种

以绿皮黑籽南瓜(*Cucurbita ficifolia* Bouché.)为材料,种子来源于云南省建水县。育苗营养土购自广州市生升有限责任公司。枯萎病菌为尖孢镰刀菌黄瓜专化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*)生理小种4,来自南京农业大学植物营养系菌种保藏室。

1.2 黑籽南瓜二代转录组测序

1.2.1 枯萎病菌接种及实验设计

枯萎病菌培养、黑籽南瓜幼苗培养及接种方法按笔者已建立的方法进行,采用浸根加灌根法

(丁玉梅等2019)。于接种枯萎病菌后48和96 h采集接种处理的幼苗功能叶片,立即置于液氮中速冻,并贮藏于-80°C超低温冰箱中保存。两个时间点和对照均设3次重复,每个重复10株。

1.2.2 总RNA的提取及二代转录组测序

提取黑籽南瓜接种处理后48和96 h以及对照样本RNA。总RNA的提取采用mirVana™ miRNA Isolation Kit (Ambion-1561)试剂盒进行。采用Illumina HiSeq 2500平台测序,委托上海欧易生物有限公司完成。

1.2.3 差异表达基因(differential expression genes, DEGs)筛选

对照和接种后48和96 h,按2个处理组分析数据,即CK-VS-48和CK-VS-96。用拼接得到的转录本Unigene建库,根据序列相似性比对的方法使用软件Bowtie2 (Langmead和Salzberg 2012) (<http://bowtie-bio.sourceforge.net/bowtie2/manual.shtml>)和Express (Roberts和Pachter 2013) (<http://www.rna-seqblog.com/express-a-tool-for-quantification-of-rna-seq-data/>)求各Unigene在各样本中的表达丰度。以FPKM法(fragments per kb per million reads)计算不同样本中每个Unigene的表达量后(Trapnell等2010),利用RNA-seq数据比较分析某一个基因在处理组中是否存在差异表达,以 $P < 0.05$ 且差异表达倍数 $|\log_2 \text{Foldchange}| > 1.5$ 为标准筛选DEGs。

1.3 黑籽南瓜全长转录组测序

选取未经侵染的两叶一心的黑籽南瓜幼苗叶片放于-80°C冰箱备用。提取叶片总RNA,用SMARTer™ PCR cDNA Synthesis Kit合成mRNA的全长cDNA,使用BluePippin进一步筛选全长cDNA片段,构建出不同大小的cDNA文库,再次利用PCR扩增放大筛选的全长cDNA。对全长cDNA进行末端修复,连接SMRT哑铃型接头。进行核酸外切酶消化,通过重复使用BluePippin对结果进行二次筛选,最终获得测序文库。在完成构建文库之后,检测库的质量。库检合格后,用Pacific Bio-Sciences公司的单分子实时(Single Molecular Real Time, SMRT)测序技术完成测序工作。

1.3.1 全长转录组的数据分析

分析全长转录组由3个阶段组成:全长序列识

别、isoform水平聚类以获得一致性序列和一致序列polishing。根据序列中的接头将所有的原始序列转换成RoI (reads of insert)序列, 在RoI序列中是否存在3'端引物、5'端引物和PolyA, 将序列分成全长序列和非全长序列。ICE (iterative isoform-clustering)算法用于聚类来自同一转录本的RoI序列, 并且具有相似序列的RoI聚成一簇, 每一个簇都将得到一条一致性序列。使用非全长序列校正得到的一致序列, 以获得高质量的序列用于后续分析。由于cDNA文库构建的限制, 可能会造成序列5'端的缺失, 合并只有5'末端外显子存在差异, 但其余外显子均为相同的序列, 并取其中最长的序列作为Unigene转录本, 即得到最终的转录本序列。

1.3.2 NBS类基因的鉴别

黑籽南瓜NBS类基因的鉴定采用在全长转录组测序中获得的Unigene本地数据库进行。运用TBtools软件中的ORF Prediction功能预测所有Unigene的ORF并翻译成蛋白序列; 运用BioEdit软件将预测的蛋白构建成一个本地蛋白数据库, 以核苷酸结合衔接子NB-ARC (nucleotide-binding adaptor shared by APAF-1, R protein and CED-4, NB-ARC) (PF00931)作为参考氨基酸序列, 在本地数据库里进行BLASTP搜索, 为了充分挖掘抗性基因, E值为默认值1.0。获得的序列通过NCBI上的BLASTP进行身份验证后, 再通过NCBI Web CDS Search进一步对NBS类基因的NBS保守结构域进行预测, 对不含NBS结构域的基因进行删除, 筛选获得的基因为NBS类候选基因, 统称为黑籽南瓜*CfNBS*类(NBS gene from *C. ficifolia*, *CfNBS*)基因。

1.3.3 NBS类基因系统进化分析

提取具有完整NBS结构域的*CfNBS*类基因编码的蛋白序列, 选取在进化树中位置已知、且具有抗病性的NBS编码的*R*基因蛋白序列作为参考序列; 分别从这些序列中截取从磷酸结合环(P-loop)到GLPL之间的氨基酸序列, 进行多序列比对; 用MEGA5.0软件, 通过邻接法和泊松模型, bootstrap replications值设定为1 000 (Li等2010), 构建进化树, 分析*CfNBS*类基因的系统进化及与其他瓜类NBS类基因的进化关系(Lee等2011)。

1.3.4 *CfNBS*类差异表达关键基因的鉴定

将二代转录组和全长转录组之间的ID对应, 通过二代转录组找到DEGs, 采用BioEdit软件将二代转录组中的Unigene建成本地库, 将1.3.2中全长转录组中筛选到的候选基因与二代本地库进行Blast比对, 阈值采用默认值, 最终获得二代转录组的对应Unigene ID; 将所获得的ID分别与CK-VS-48、CK-VS-96处理组中的DEGs进行比对, 从而获得差异表达的*CfNBS*类关键抗病基因。

1.3.5 *CfNBS*类关键基因的GO (Gene Ontology)功能注释和富集分析

通过基因ID列表获得不同样本*CfNBS*类基因的表达量信息, 对2个处理组(CK-VS-48和CK-VS-96)中分别进行*CfNBS*类家族基因表达分析, 为了得到可靠的显著富集的DEGs, 将筛选条件设为 $P < 0.05$, 且 $|\log_2 \text{Foldchange}| > 1.5$ 。以样本为横坐标, 基因为纵坐标进行基因表达的聚类分析。通过GO数据库对*CfNBS*类关键基因进行功能注释。

GO是多种生物本体语言中的一种, 分别从生物学过程(biology process, BP)、分子功能(molecular function, MF)及细胞组分(cellular component, CC)3个方面对基因产物和蛋白质功能进行限定和描述。对NBS类DEGs进行GO富集分析, 对其功能进行描述(结合GO注释结果)。统计每个GO条目中所包括的DEGs数, 并用超几何分布检验方法计算每个GO条目中DEGs富集的显著性, 计算的结果返回一个富集显著性的 P 值, $P < 0.05$ 时为DEGs在该GO条目中出现了显著富集。

1.4 *CfNBS*类关键基因的qRT-PCR分析与组织表达特性分析

1.4.1 总RNA提取

提取接种枯萎病菌后48和96 h以及对照幼苗功能叶片总RNA用于NBS类关键基因qRT-PCR验证。提取正常生长黑籽南瓜植株的根、茎、叶和果实中的总RNA用于NBS类关键基因的组织表达特性分析。每个处理设3次重复。用RNA plant Plus植物总RNA提取试剂盒提取总RNA (天根生化科技有限公司, 北京)。

1.4.2 NBS类关键的引物和qRT-PCR反应体系

用Primer 5.0软件设计*CfNBS*类关键基因和引

物(表1)。qRT-PCR采用CHamQ qRT-PCR Master Mix试剂盒,反应体系(10 μL)为: 2×super Real Pre-mixture 5 μL, 上下游引物(10 μmol·L⁻¹)各0.2 μL, cDNA 1 μL, ddH₂O 3.6 μL。qRT-PCR反应程序为: 95°C预变性5 min; 95°C变性10 s, 60°C退火15 s, 72°C延伸20 s, 40个循环。每个反应进行3次重复。以β-actin为内参基因。

1.4.3 qRT-PCR数据分析

不同样品得到的数据经内参基因的ΔΔC_T法均一化处理后(丁爱琴等2018), 用2^{-ΔΔC_T}计算得到NBS类关键基因的相对表达量, 即ΔC_T=C_{T目的片段}-C_{T内参基因}, ΔΔC_T=C_{T处理平均}-ΔC_{T对照平均}。SPSS 19.0统计软件对数据进行t测验, 检验差异显著性(P<0.05), 用Excel 2016作图。对不同组织间NBS类关键基因相对表达量采用Duncan新复极差法进行多重比较(P<0.05)。

2 实验结果

2.1 CfNBS类基因的鉴定

以NB-ARC作为参考氨基酸序列, 在全长转录组本地数据库里进行BLASTp, 从黑籽南瓜50 526条全长Unigene库中筛选出74条NBS类基因, 将74条NBS类基因通过NCBI的CDS进行NBS类基因的鉴定, 剔除不含NBS保守结构域的基因, 最终从黑籽南瓜CDS中获得了43条CfNBS类基因序列, 均包含了NB-ARC中的APAF-1、R蛋白和CED-4核心结构域。将这些序列依次命名为CfNBS1~43。

2.2 CfNBS类基因的分类

根据43条CfNBS类基因推导的编码蛋白N端、C端和LRR结构域特征, 将其划分为5种类型(表2), 其中有13条CfNBS类蛋白(27.90%)的N端含有CC基序和LRR结构域(CNL型); 2条包含LRR结构域(TNL型); 8条不具有LRR结构域, 为TN型; 5条CfNBS蛋白(13.95%)含有RPW8 (拟南芥抗白粉病基因8)结构域; 15条CfNBS蛋白(34.88%)含有NBS结构域(N型)。以上结果说明, 黑籽南瓜NBS类基因类型丰富, 且典型的NBS类基因中CNL类基因比TNL类基因数目多。Meyers等(2003)报道, 双子叶植物拟南芥中的149个NBS类抗病基因分为2种类型, 其中63.1%属于TNL类, 36.9%属于CNL类。从单子叶植物水稻和玉米中发现的NBS类抗病基因多数为CNL类, 极少数为TNL类(Guo等2011)。

2.3 CfNBS类基因的系统进化树分析

提取43个CfNBS基因的氨基酸序列, 于MEGA5.0中进行对齐, 为保持进化树的准确性, 去除P-loop到GLPL (AL)的NBS序列结构域片段小于90的序列, 即CfNBS5、CfNBS31、CfNBS37和CfNBS41, 共得到39条CfNBS类基因, 将39条序列与15条已知R基因蛋白序列和6条其他瓜类NBS类抗病基因蛋白序列导入共同建树。由图1可以看出, 39条黑籽南瓜NBS类基因可分为4大类群, CfNBS19作为一个单独分支, 同番茄Hero和Prf基因亲缘关系较近, 在进化时间上比其余CfNBS基因出现早。第II大类群有CfNBS2、CfNBS6、CfNBS8、

表1 用于黑籽南瓜NBS类抗病基因的qRT-PCR检测引物序列

Table 1 Primers used for verifying the candidate NBS type genes from *C. ficifolia* by qRT-PCR

基因ID	正向序列(5'→3')	反向序列(5'→3')
comp49414	AAAGCGATGGCAGCTCAA	GCCGCAAGTTTCTGTAAATG
CL6035Contig1	TTTtagtGGTGAAGTGCCTGAG	GCACGAAGCGATGCGATA
CL24111Contig1	GCTTCCTGAAGGGTTTGG	TGGCAGCTCACCTGAAAA
CL19588Contig1	CCCAGCAGATTGGAGAAG	CTCCCACTAGGAAACAAGAAAT
CL21402Contig1	AGCATATGATACCTGGGAGTG	AGGAAACGACGGTGGTGA
CL34065Contig1	CCCCTGAAGCACTATCCG	GCTGTAGCTGCCATCCCT
CL48636Contig1	TCCTGTTGAAGTGATCGGAAAC	TTGCAGCGCAGTTGTTTG
CL4282Contig1	ATTCCAAGCGGCTGAGTT	GCCTCTTCCAGGCATCAA
CL6514Contig1	GCTGAATGTGGCGCATAA	CCGCTTCGGAATACAGTTC
CL7398Contig1	ACAGTGCCTTTCCATTGCTG	TCCATGGCTCGACATTCACT
β-actin	AGCCATCTCTCATCGGTAT	CATGGTTGAACCACTACTG

表2 黑籽南瓜NBS类抗病蛋白的分类

Table 2 The classification of *CfNBS* proteins selected from transcriptom of *C. ficifolia*

预测的蛋白结构域	简写	基因数	百分比/%
TIR-NBS-LRR	TNL	2	4.65
CC-NBS-LRR	CNL	13	27.90
TIR-NBS	TN	8	18.60
RPW8-NB	RPW8-N	5	13.95
NBS	N	15	34.88

CfNBS9、*CfNBS19*、*CfNBS38*和*CfNBS43*, 该类群为RPW8-N类基因, 这一类群在进化上较为独立, 在进化时间上出现较晚, 未找到亲缘关系相近的NBS类基因; 第III大类群有10个, 包括*CfNBS1*、*CfNBS3*、*CfNBS4*、*CfNBS5*、*CfNBS7*、*CfNBS13*、*CfNBS14*、*CfNBS27*、*CfNBS29*和*CfNBS42*, 该类群主要由TN和TNL类NBS基因构成, 在进化上同拟南芥抗病基因*RPP1*、*RPS4*和拟南芥NB-ARC蛋

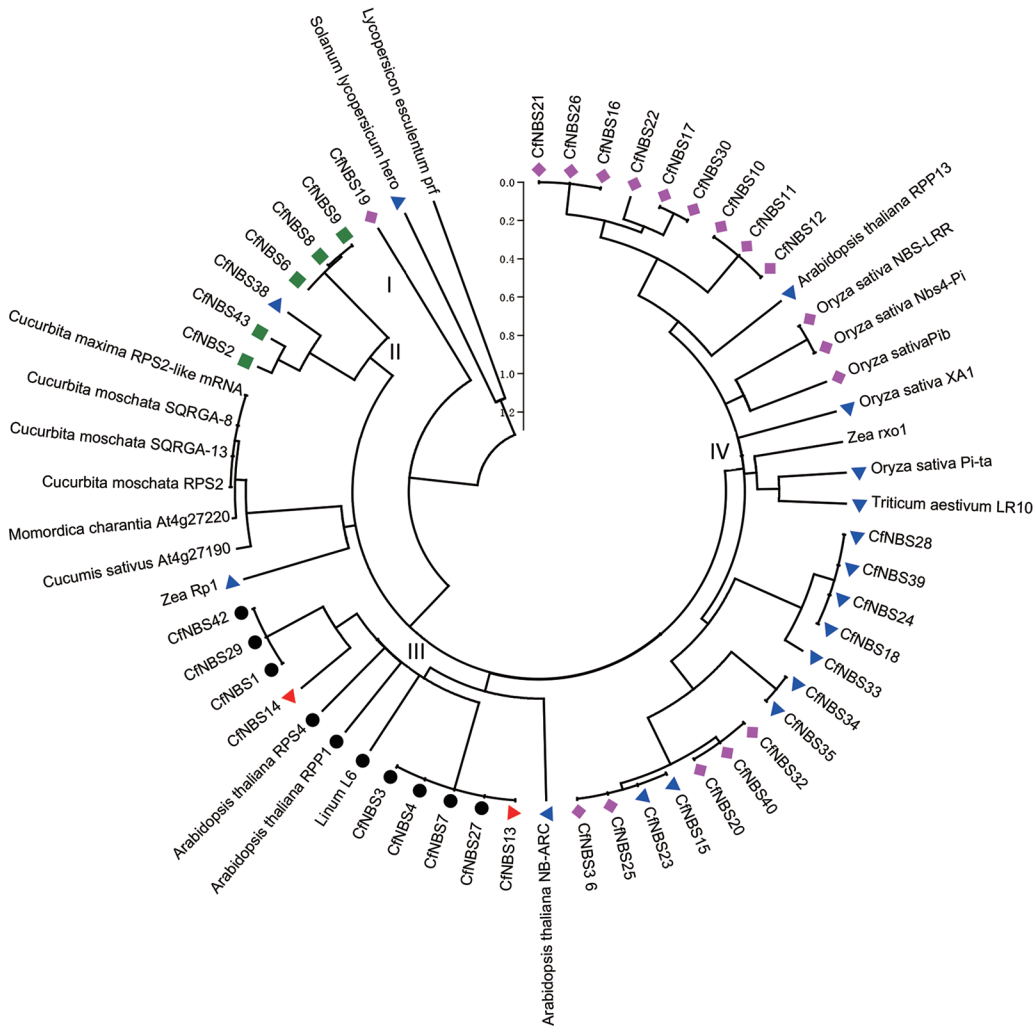


图1 黑籽南瓜*CfNBS*类基因家族的系统进化树

Fig.1 The phylogenetic tree of the *CfNBS* gene family form *C. ficifolia*

15条参考*R*基因或序列中, 拟南芥*RPP* (AAC72977)、*RPS4* (BAB11393), 亚麻*L6* (AAA91022)为TNL类型; 水稻*NBS-LRR*序列 (ABB88855)、*Nbs4-Pi* (ABC94599)、*Pib* (BAA76281)为NL类型; 番茄*Prf* (AAC49408)为XCN类型; 玉米*RPI*(AAP81262), 水稻*Xa1* (BAA25068)、*Pita* (AAK00132)、小麦*L10* (AAQ01784)、拟南芥*NBS-ARC* (NP187360)、*RPP13* (AF209732)及番茄*Hero* (CAD29728)为CNL类型。6条瓜类的NBS类基因为黄瓜*At4g27190* (XM_011650710), 中国南瓜*RPS2* (XM_023073871)、*SQPGA-13* (EF199759)和*SQPGA-8* (EF101667), 印度南瓜*RPS2-like mRNA* (XM_023141784)和苦瓜*At4g27220* (XM_022294233)。▲代表CNL类型, ■代表N或NL类型, ■代表RPW8-N类型, ●代表TN或TNL类型, ▲代表TNL类型。

白、亚麻抗病基因*L6*相近。其余的N和CNL类NBS基因构成了第IV大类群,这一类群的基因数量最多,共有23个,它们与拟南芥抗病蛋白基因*RPP13*、水稻*NBS-LRR*、*NBS4-Pi*、*Pib*、*Xa1*和*Pi-ta*、玉米*Rxo1*、小麦*LR10*抗病基因家族系统进化上相近。而其他瓜类6个NBS类抗病序列或基因均归在同一类群,包括中国南瓜*SQGA-8*和*SQGA-13*、中国南瓜*RPS2*、印度南瓜*PRS2*类mRNA、苦瓜*At4g27220*和黄瓜*At4g27190*,这些NBS类抗病基因进化类型单一,亲缘关系较近。由此表明,黑籽南瓜的NBS类抗病基因进化类型比其他瓜类物种丰富,抗病基因类型呈多样性,可以识别不同种类病原菌分泌的效应因子,这可能是黑籽南瓜抗病能力比其他瓜类作物强的原因之一。

2.4 黑籽南瓜NBS类关键基因的鉴定及功能注释

将全长转录组中筛选到的43个*CfNBS*类基因与二代转录组本地库进行比对筛选黑籽南瓜NBS类差异表达基因,最终获得11个差异表达的*CfNBS*类关键基因(表3),其中有4个基因注释为抗病蛋白(Comp49414_c0_seq1_3、CL7398contig1、CL48636Contig1和CL52011Contig1),2个注释为蛋白激酶HSL1 (CL24111Contig1和CL4282Contig1),2个注释为TMV抗性蛋白(CL24111Contig1和CL4282Contig1)和3个叶绿体未知功能蛋白(CL6514Contig1、CL6035Contig1和CL34065Contig1),这些*CfNBS*类关键基因参与了黑籽南瓜响应枯萎病菌胁迫不同时间点的应答过程。Comp49414_

c0_seq1_3、CL24111Contig1和CL4282Contig1在显症前期(接种后48 h)参与了抗病应答过程, CL48636Contig1和CL34065Contig1在接种后48和96 h均参与了抗病过程,其余6个基因在病症扩展期(接种后96 h)参与抗病过程。蛋白激酶HSL1 (CL24111Contig1和CL4282Contig1)在接种后48 h上调表达,推测这2个基因在抗病过程中发挥了信号转导作用。

2.5 黑籽南瓜NBS类关键基因的GO功能富集分析

通过GO数据库对11个*CfNBS*类关键基因进行功能富集,这些基因被显著富集到10个生物学过程和3个分子功能过程(表4)。GO功能分析显示,共有6个*CfNBS*类基因涉及的生物学过程显著富集在防卫反应、谷胱甘肽转运、改良氨基酸转运等10条GO条目中;涉及分子功能富集在ADP结合、受体丝氨酸/苏氨酸激酶结合、细胞壁结构成分3个GO条目中。富集到通路最多的是2个TMV抗性蛋白基因(CL19588contig1和CL21402contig1),共有7个通路富集到这两个基因,说明这两个基因在病原菌感染过程中发挥了重要的抗病作用。另外,CL34065Contig1也被富集到了5个通路中,而3个抗性蛋白(Comp49414_c0_seq1_3、CL7398contig1和CL48636Contig1)和2个蛋白激酶HSL1 (CL24111Contig1和CL4282Contig1)并没有被GO功能显著富集。

2.6 *CfNBS*类关键基因的qRT-PCR分析

接种枯萎病菌后48和96 h的11个*CfNBS*关键

表3 黑籽南瓜接种枯萎病菌后48和96 h差异表达*CfNBS*类基因注释

Table 3 Gene annotaion of *CfNBS* genes from *C. ficifolia* after 48 and 96 h inoculation by *F. oxysorum*

基因ID	基因长度/bp	CK-VS-48 log ₂ FC	CK-VS-96 log ₂ FC	基因注释
Comp49414_c0_seq1_3	2 799	-1.68	-	Probable disease resistance protein At4g33300
CL7398contig1	4 303	-	3.99	Disease resistance protein At4g27190
CL52011Contig1	1 601	-	3.11	Disease resistance protein RPS6
CL48636Contig1	2 330	1.70	1.93	F-box/LRR-repeat protein At1g67190
CL24111Contig1	3 525	1.57	-	Receptor-like protein kinase HSL1
CL4282Contig1	2 109	3.55	-	Receptor-like protein kinase HSL1
CL19588Contig1	4 592	-	1.52	TMV resistance protein N
CL21402Contig1	1 449	-	2.23	TMV resistance protein N
CL6514Contig1	3 933	-	-1.82	Leucine-rich repeat extensin-like protein 4
CL6035Contig1	2 722	-	-1.55	Leucine-rich repeat receptor-like protein CLAVATA2
CL34065Contig1	2 055	-2.26	-1.98	Protein CLT3, Chloroplastic

表4 黑籽南瓜接种枯萎病菌后富集到不同GO通路中的*CfNBS*类关键基因
Table 4 *CfNBS* genes enriched to different GO pathways of *C. ficifolia* infected by *F. oxysporum*

注释	GO条目名称	GO ID	富集的基因	P值
生物学过程	防御反应(defense response)	0006952	CL34065Contig1, CL19588Contig1 CL21402Contig1, CL52011Contig1	0.007
	谷胱甘肽转运(glutathione transport)	0034635	CL34065Contig1	0.012
	改性氨基酸转运(modified amino acid transport)	0072337	CL34065Contig1	0.016
	共生体诱导的寄主细胞程序性死亡 (host programmed cell death induced by symbiont)	0034050	CL19588Contig1, CL21402Contig1	0.018
	植物超敏反应(plant-type hypersensitive response)	0009626	CL19588Contig1, CL21402Contig1	0.018
	硫化物转运(sulfur compound transport)	0072348	CL34065Contig1	0.044
	细胞程序性死亡(programmed cell death)	0012501	CL19588Contig1, CL21402Contig1,	0.047
	细胞死亡(cell death)	0008219	CL19588Contig1, CL21402Contig1,	0.047
	免疫反应(immune response)	0006955	CL19588Contig1, CL21402Contig1,	0.047
	协同因子转运(cofactor transport)	0051181	CL34065Contig1	0.049
分子功能	ADP结合(ADP binding)	0043531	CL19588Contig1, CL21402Contig1, CL52011Contig1	4.01×10 ⁻⁷
	丝氨酸/苏氨酸受体激酶结合 (receptor serine/threonine kinase binding)	0033612	CL6035Contig1	0.021
	细胞壁组分(structural constituent of cell wall)	0005199	CL6514Contig1	0.031

基因qRT-PCR结果见图2。除CL24111contig1未能扩增出条带外, 其余10个基因均在接种后48和96 h上调表达或下调表达。CL6514Contig1变化趋势同转录组结果相反外, 其余基因表达趋势同转录组数据变化趋势基本一致, 说明这10个基因均参与了黑籽南瓜对枯萎病菌侵染的抗病应答过程, 其中有6个基因(CL7398contig1、CL52011contig1、CL48636contig1、CL21402contig1、CL4282contig1和CL19588contig1)受枯萎病菌在接种后诱导48或96 h上调表达。

2.7 CfNBS类关键基因的组织表达特性分析

11个黑籽南瓜*CfNBS*类关键基因在根、茎、叶和果实中的相对表达量见图3。从图中可以看出, 在根、茎、叶和果实中表达量最高的基因分别为CL34065Contig1、CL52011Contig1、CL6035-Contig1和CL19588Contig1。总体来看, 这些基因在叶和根中的表达量较高, 而在茎和果实中表达量较低。在叶片中表达量相对较高的是CL4282Contig1、CL6035Contig1和CL7398Contig1。有7个基因在根中表达量相对较高, 分别是Comp49414_c0_seq1_3、CL52011Contig1、CL48636Contig1、CL-24111Contig1、CL21402Contig1、CL6514Contig1

和CL34065Contig1。在果实中表达量相对较高的基因是CL19588Contig1和CL52011Contig1。

3 讨论

随着对植物抗病基因及其编码蛋白产物的结构与功能的阐明, 以及植物抗病信号转导途径中其他组分的进一步解读, 人们对有关植物-病原互作、抗病基因进化的分子机制的研究不断深入。尽管基因产物针对的病原体及致病因子截然不同, 但植物抗性基因的结构却相对保守, 常见的有蛋白激酶(protein kinase, PK)、跨膜结构域(transmembrane domain, TM)和核苷酸结合位点(nucleotid site, NBS)等。其中, NBS类基因是植物中普遍存在的抗病基因, 在植物抵抗各种病原物侵袭的过程中发挥着重要作用。不同植物基因组中*R*基因的数量差异很大。一些基因组如苹果(*Malus pumila*) (Arya等2014)和小麦(*Triticum aestivum*) (Bouktila等2014)的基因组, 含有大约1 000个*R*基因。相比之下, 番木瓜(*Carica papaya*)、黄瓜、西瓜和甜瓜的序列基因组中的*R*基因不到100个(Huang等2009; Garcia-Mas等2012)。本研究在对转录组测序基础上鉴定出43个黑籽南瓜NBS类抗病候选基因, 从

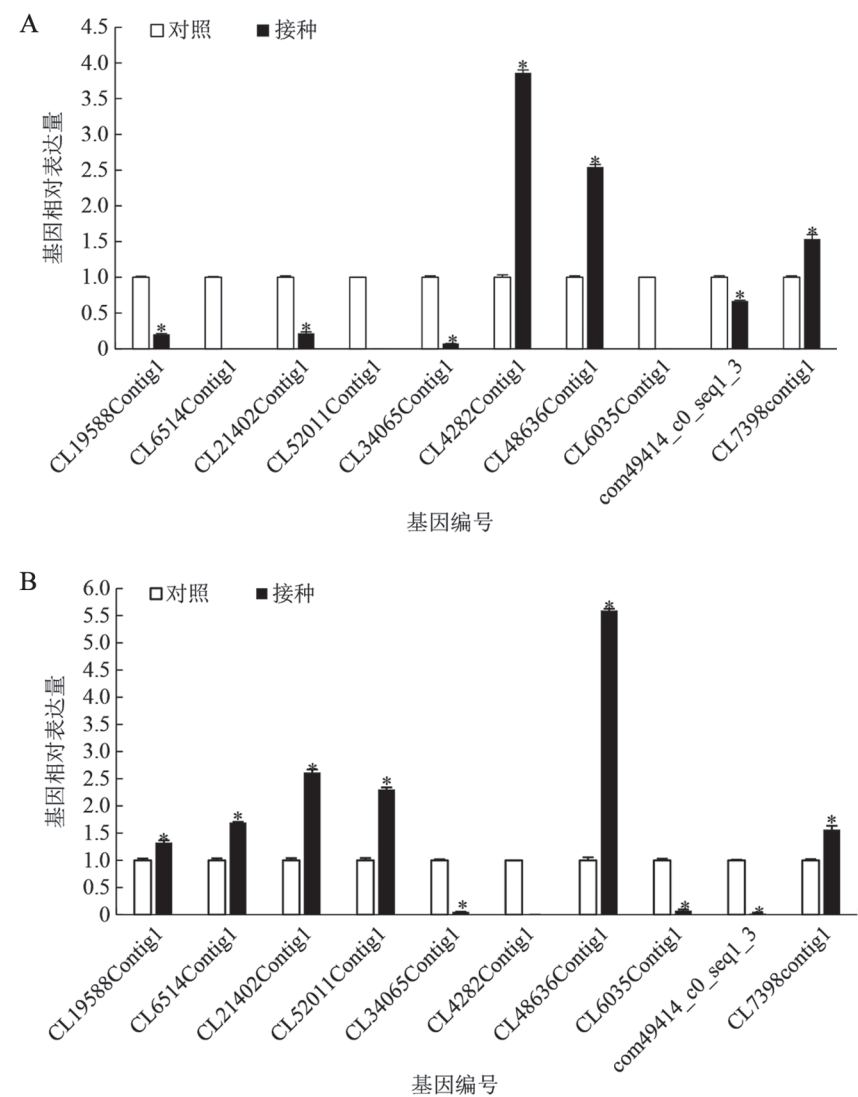
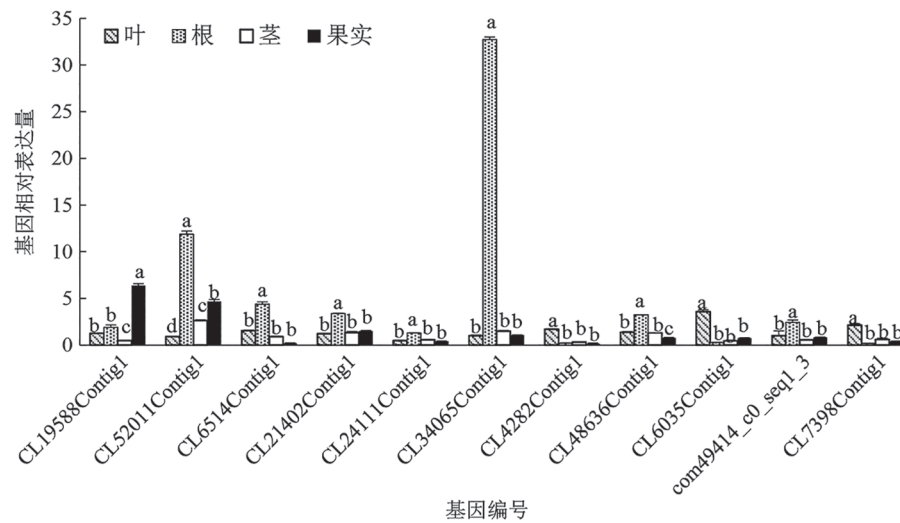


图2 黑籽南瓜接种枯萎病菌后48 h (A)和96 h (B)的*CfNBS*类关键基因的表达

Fig.2 Relative expression levels of different *CfNBS* of *C. ficifolia* infected by *F. oxysporum* for 48 h (A) and 96 h (B)
表达量以3次重复平均值 $\pm$ SE呈现; *表示同一时间接种处理与对照在0.05水平差异显著; 图A中的CL6514Contig1、CL6035Contig1、CL52011Contig1和图B中CL4282Contig1未扩增出条带。

NBS基因类型来看, 其中典型的NBS-LRR抗病基因TNL和CNL类型分别有2和13个, 其余的亚基因家族中含NBS抗病基因最多的为N亚家族, 有15个(34.88%)。黑籽南瓜是云南的一种特有的山区瓜类作物, 长期处于野生或半野生栽培状态, 具有抗病、耐寒等多种优良性状。从黑籽南瓜的NBS类基因数量来看, NBS类基因少于其他瓜类(约100个), 但系统进化分析发现, 黑籽南瓜的NBS类基因进化类型多样且进化出现时间早, 这可能是黑

籽南瓜比其他瓜类作物抗病性强的原因之一, 可以抵御不同病原菌分泌的效应因子。至于黑籽南瓜中有没有更多的NBS类基因有待进一步深入分析, 本研究中全长转录组能否代表基因组覆盖所有相关基因有待进一步探讨。Lin等(2013)的研究发现, 瓜类*R*基因少的原因是系谱频繁丢失和重复不足, 同时他们也发现野生葫芦科(*Cucurbitaceae*)植物瓜蒌(*Trichosanthes kirilowii*) *R*基因的一个谱系表现出由基因转换引起的嵌合结构, 在自然种

图3 黑籽南瓜*CfNBS*类11个关键基因在不同组织中的相对表达量Fig.3 Relative expression levels of the 11 key NBS type genes in different tissues of *C. ficifolia*

表达量以3次重复平均值 $\pm$ SE呈现; 不同字母表示同一基因在不同组织中的表达量在0.05水平达到差异显著性。

群中可能含有大量不同的*R*基因。黑籽南瓜属于半野生作物, 其*R*基因数少于其他瓜类, 但抗病能力则强于其余栽培瓜类, 是否与基因进化有关值得研究。

植物与病原物的互作是一个复杂生物学过程, 植物抗性产生的过程是能量消耗的过程(Tian等2003), 在其他植物中已发现*R*基因在正常状态下表达量很低, 但它们对病原物的入侵却高度敏感, 迅速引发细胞凋亡和细胞程序性死亡(DeYoung和Innes 2006)。在获得的11个差异表达的*CfNBS*类关键基因中, 仅有CL7398contig1、CL52011contig1、CL4282contig1和CL21402contig1四个基因达到了 $\log_2FC>2$ 的倍率, 但从二代转录组及qRT-PCR验证来看, 这些基因确实受到枯萎病菌的诱导上调或下调表达, 初步判定与黑籽南瓜的抗枯萎病特性相关。Comp49414-c0-seq1和CL34065contig1在接种枯萎病菌后48 h下调表达, 推测这两个基因在48 h前就发挥了抗病的作用。而注释为受体蛋白激酶HSL1的CL4282contig1也在接种枯萎病菌后48 h上调, 但在接种后96 h后没有表达, 推测该蛋白激酶主要起到了系统性防御的信号转导作用。而在接种后96 h持续上调表达的抗病蛋白At4g27190 (CL7398contig1)和TMV抗性蛋白N (CL19588Con-

tig1和CL21402Contig1), 可能在保卫防御反应中起到了重要作用。研究表明, NBS类蛋白可与ATP或GTP蛋白相结合, 如ATP合成酶的 β 亚基、核糖体延伸因子(Meyers等1999; DeYoung和Innes 2006), 参与抗病信号的转导和抗病作用(Bent等1994; Dixon等1998; DeYoung和Innes 2006), NBS结构域对于抗病蛋白的活性开闭至关重要(Williams等2011)。LRR结构具有寄主与病原菌识别的特异性(Meyers等2003)。本研究中黑籽南瓜应答枯萎病菌侵染的NBS类基因能否识别病原菌无毒基因以及参与抗病信号的转导, 其基因表达产物能否与寄主其他蛋白和病程相关蛋白互作等抗病分子机制有待进一步研究。

GO功能富集分析表明, 11个*CfNBS*类关键基因也在不同抗病过程中发挥了重要的作用, 其中富集到通路最的是2个注释为TMV抗性蛋白的基因(CL19588contig1和CL21402contig1), 共有7个通路富集, 包括了防御反应、寄主细胞程序性死亡、植物超敏反应和免疫反应等过程, 这2个基因在黑籽南瓜抵御枯萎病菌侵染的过程中起到了主要的防御作用。另外, 蛋白CLT3 (CL34065Contig1)也被富集到了5个通路中。CLT3蛋白参与从质体到胞质溶胶的硫醇转运, 也可能同时转运谷胱甘肽

及其前体 γ -谷氨酰半胱氨酸(γ -EC), 在维护根GSH池时显示了一些与CLT1的功能冗余。结合转录组分析数据, 推测CLT3蛋白参与了谷胱甘肽及其前体物质的转运过程, 该基因可能起到了平衡活性氧的作用, 但该基因的具体功能还有待进一步实验验证。本研究中, 3个抗性蛋白(Comp49414_c0_seq1_3、CL7398contig1、CL48636Contig1)和2个蛋白激酶HSL1 (CL24111Contig1和CL4282Contig1)并没有被GO功能显著富集, 可能是参考的基因组数据库数据较少, 进一步对这些新的抗病蛋白进行研究可为发现新的抗病基因提供线索。

本研究通过转录组生物信息学分析黑籽南瓜的NBS类抗病基因, 发掘出43个NBS类基因, 获得11个NBS类关键抗病基因并进行了初步验证, 下一步可结合基因注释和GO富集分析结果, 以及组织表达特异性对重点关注的NBS类基因进行分离克隆, 这些基因表达的抗病蛋白的功能作用模式、抗病信号传导途径和调控网络也需深入研究, 以进一步解析黑籽南瓜响应枯萎病菌胁迫的抗性分子机制。

参考文献(References)

- Arya P, Kumar G, Acharya V, et al (2014). Genome-wide identification and expression analysis of NBS-encoding genes in *Malus x domestica* and expansion of NBS genes family in *Rosaceae*. PLOS One, 9 (9): e107987
- Bent AF, Kinkel B N, Dahlbeck D, et al (1994). *RPS2* of *Arabidopsis thaliana*: a leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. Science, 265 (5180): 1856–1860
- Bouktila D, Habachi-Houimli Y, Khalfallah Y, et al (2014). Characterization of novel wheat NBS domain-containing sequences and their utilization, *in silico*, for genome-scale R-gene mining. Mol Genet Genomics, 289: 599–613
- Chen GS, Zhou YF, Lin S, et al (2006). Isolation and sequence analysis of NBS-type resistance gene analogues in sweet potato (*Ipomoea batatas* L.). J Tropical Subtropical Bot, 14 (5): 359–365 (in Chinese with English abstract) [陈观水, 周以飞, 林生等(2006). 甘薯抗病基因NBS类似物的分离与序列分析. 热带亚热带植物学报, 14 (5): 359–365]
- DeYoung BJ, Innes RW (2006). Plant NBS-LRR proteins in pathogen sensing and host defense. Nat Immunol, 7 (12): 1243–1249
- Ding AQ, Li SC, Liu QC, et al (2018). Cloning and expression analysis of *RhATAF1* gene in *Rosa hybrida*. Plant Physiol J, 54 (11): 1171–1178 (in Chinese with English abstract) [丁爱琴, 李绍翠, 刘庆超等(2018). 月季*RhATAF1*基因的克隆及表达特性分析. 植物生理学报, 54 (11): 1171–1178]
- Ding GH, Qin ZW, Liu HY, et al (2005). Analysis and cloning of NBS class disease resistant gene analog in cucumber. Acta Horti Sin, 32 (4): 638–642 (in Chinese with English abstract) [丁国华, 秦智伟, 刘宏宇等(2005). 黄瓜NBS类型抗病基因同源序列的克隆与分析. 园艺学报, 32 (4): 638–642]
- Ding YM, Gao T, Zhong S, et al (2018). Cloning and expression analysis of NBS type disease-resistance genes homologues from *Cucurbita ficifolia*. J Agric Biotech, 26 (8): 1305–1317 (in Chinese with English abstract) [丁玉梅, 高婷, 仲莎等(2018). 黑籽南瓜中NBS类抗病基因同源序列的克隆与表达分析. 农业生物技术学报, 26 (8): 1305–1317]
- Ding YM, Zhang J, Xie JJ, et al (2019). Expression analysis of *HQRGA2* and different of anti-oxidant enzymes in three varieties of *Cucurbita ficifolia* under stress of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. Plant Physiol J, 55 (3): 349–385 (in Chinese with English abstract) [丁玉梅, 张杰, 谢俊俊等(2019). 枯萎病菌胁迫下3种黑籽南瓜*HQRGA2*表达及抗氧化酶活性差异分析. 植物生理学报, 55 (3): 349–385]
- Dixon MS, Hatzixanthis K, Jones DA, et al (1998). The tomato Cf-5 disease resistance gene and six homologous show pronounced allelic variation in leucine-rich repeat copy number. Plant Cell, 10 (11): 1915–1925
- Gao LH, Zhou YF, Zhen WW, et al (2007). Cloning and analysis of NBS class disease resistant gene analogous in squash (*Cucurbita moschata* Duch.). J Changjiang Veget, 8: 40–43 (in Chinese with English abstract) [高丽华, 周以飞, 郑伟文等(2007). 南瓜NBS类抗病基因同源序列的克隆与分析. 长江蔬菜, 8: 40–43]
- Garcia-Mas J, Benjak A, Sanseverino W, et al (2012). The genome of melon (*Cucumis melo* L.). Proc Natl Acad Sci USA, 109 (29): 11872–11877
- Guo SG, Gong GY, Xu Y, et al (2008). Cloning and analysis of *Fusarium* wilt resistance gene analogs in watermelon. Mol Plant Breed, 6 (4): 783–800 (in Chinese with English abstract) [郭绍贵, 宫国义, 许勇等(2008). 西瓜抗枯萎病基因同源序列的克隆与分析. 分子植物育种, 6 (4): 783–800]
- Guo YL, Fitz J, Schneeberger K, et al (2011). Genome-wide comparison of nucleotide-binding site-leucine-rich repeat-encoding genes in *Arabidopsis*. Plant Physiol, 157: 757–769
- Huang SW, Li RQ, Zhang ZH, et al (2009). The genome of the cucumber, *Cucumis sativus* L. Nat Genet, 41: 1275–1281

- Howden AJM, Huitema E (2012). Effector-triggered post translational modifications and their role in suppression of plant immunity. *Front Plant Sci*, 3: 1–6
- Johal GS, Briggs SI (1992). Reductase activity encoded by the *HMI* disease resistance gene in maize. *Science*, 258 (5084): 985–987
- Jones JDG, Dangl JL (2006). The plant immune system. *Nature*, 444: 323–329
- Langmead B, Salzberg SL (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie2. *Nat Methods*, 9: 357–359
- Lee EK, Cibrian-Jaramillo A, Kolokotronis SO, et al (2011). A functional phylogenomic view of the seed plants. *PLOS Genet*, 7 (12): e1002411
- Li X, Cheng Y, Ma W, et al (2010). Identification and characterization of NBS-encoding disease resistance genes in *Lotus japonicus*. *Plant Systematics Evol*, 289 (1): 101–110
- Liang ZZ, Pan LH, Zhao B, et al (2014). Effects on three grafting rootstock on growth, quality and *Fusarium* wilt resistance of cucumber in spring. *Southern Hortic*, 25 (1): 7–8 (in Chinese with English abstract) [梁祖珍, 潘玲华, 赵兵等(2014). 3种砧木春季嫁接对黄瓜生长、品质与抗枯萎病的影响. *南方园艺*, 25 (1): 7–8]
- Lin X, Zhang Y, Kuang HH, et al (2013). Frequent loss of lineages and deficient duplications accounted for low copy number of disease resistance genes in *Cucurbitaceae*. *BMC Genomics*, 14: 335–335
- Meyers BC, Dickerman AW, Michelmore RW, et al (1999). Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. *Plant J*, 20 (3): 317–332
- Meyers BC, Kozik A, Griego A, et al (2003). Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 15 (4): 809–834
- Ntoukakis V, Balmuth AL, Mucyn TS, et al (2013). The tomato *Prf* complex is a molecular trap for bacterial effectors based on *Pto* transphosphorylation. *PLOS Pathog*, 9: e1003123
- Que YX, Xu LP, Zhang MQ, et al (2009). Cloning and expression analysis of an NBS-LRR type gene from sugarcane. *Acta Agron Sin*, 35 (6): 1161–1166 (in Chinese with English Abstract) [阙友雄, 许莉萍, 张木清等(2009). 甘蔗中1个NBS-LRR类基因的全长克隆与表达分析. *作物学报*, 35 (6): 1161–1166]
- Roberts A, Pachter L (2013). Streaming fragment assignment for real-time analysis of sequencing experiments. *Nat Methods*, 10 (1): 71–73
- Tian D, Traw MB, Chen JQ, et al (2003). Fitness cost of R-gene-mediated resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 423 (6935): 74–77
- Trapnell C, William BA, Pertea G, et al (2010). Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat Biotech*, 28 (5): 511–515
- Wang XL, Gao XW, Zhang TG, et al (2011). Cloning and analysis of melon resistant gene analog. *J Xinjiang Univ (Nat Sci Edn)*, 28 (2): 136–144 (in Chinese with English abstract) [王贤磊, 高兴旺, 张铁钢等(2011). 甜瓜抗病基因同源序列的克隆与分析. *新疆大学学报(自然科学版)*, 28 (2): 136–144]
- Williams SJ, Sornaraj P, Decourcy-Ireland E, et al (2011). An autoactive mutant of the M flax rust resistance protein has a preference for binding ATP, whereas wild-type M protein binds ADP. *Mol Plant Microbe Interact*, 24: 897–906
- Yan J, Liu YQ, Hou SW (2018). Recent advances in disease resistance proteins in plant immunity. *Chin Bull Bot*, 53 (2): 250–263 (in Chinese with English abstract) [闫佳, 刘雅琼, 侯岁稳(2018). 植物抗病蛋白研究进展. *植物学报*, 53 (2): 250–263]
- Zhao Q, Xie DS, He XM, et al (2015). Cloning of resistance gene analogs from *Lagenaria siceraria* based on conserved domains of NBS-LRR type *R* gene. *J South Chin Agric Univ*, 36 (5): 92–98 (in Chinese with English abstract) [赵芹, 谢大森, 何晓明等(2015). 基于NBS-LRR类 R 基因保守结构域克隆瓠瓜抗病基因同源序列. *华南农业大学学报*, 36 (5): 92–98]

The identification and key genes analysis of NBS type disease-resistance gene from *Cucurbita ficifolia*

DING Yumei^{1,2}, GAO Ting³, BAO Huihui³, Xie Junjun³, YAO Chunxin^{1,2}, ZHOU Xiaogang^{1,2}, HOU Siming^{4,*}, YANG Zheng'an^{3,*}

¹Biotechnology and Germplasm Institute, Yunnan Academy of Agriculture Science, Kunming 650205, China

²Key Laboratory of Agricultural Biotechnology of Yunnan, Kunming 650205, China

³Agronomy and Life Science College, Kunming University, Kunming 650214, China

⁴Horticulture and Landscape College, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China

Abstract: The black-seeded pumpkin (*Cucurbita ficifolia*) is one of characteristic germplasm crops in Yunnan that has strong resistant abilities to *Fusarium* wilt caused by *Fusarium oxysporum*. In this study, the NBS type genes of the variety 'Green Peel' which is highly resistant to *F. oxysporum* were identified and screened out by the combination analysis of second-generation and third-generation transcriptome. Using NB-ARC as the conserved domain, the results of third-generation transcriptome analysis showed that 43 *CfNBS* (NBS-type gene from *C. ficifolia*) genes were identified, which belonged to five subgene families: TNL, CNL, TN, RPW8-N and N. Among them, 2 and 13 of *CfNBS* genes were classified into the typical TNL and CNL respectively. The phylogenetic tree analysis results indicated that *CfNBS* genes could be classified into four groups, and *CfNBS* genes' evolution types were more abundant than other *Cucurbita* species despite of a smaller quantity of NBS type resistance genes. After contrasting 43 *CfNBS* genes in second-generation transcriptome, we have obtained 11 differentially expressed *CfNBS* resistant genes, including 4 disease resistance protein genes, 2 protein kinases genes, 2 TMV resistance protein genes, and 3 unknown protein genes. Among 11 *CfNBS* genes, 10 genes were up-regulated or down-regulated after inoculation with *F. oxysporum*, suggesting these genes were potentially involved in the process of the response to *F. oxysporum* stress at different infection stages. Subsequent GO (Gene Ontology) enrichment analysis results showed that 11 differentially expressed genes were significantly enriched in 10 biological process GO terms, in which the top three were defense response, glutathione transport and modified amino acid transport. And the enriched molecular function GO terms were ADP binding, receptor serine/threonine kinase binding and structural constituent of cell wall. Two genes (CL19588contig1 and CL21402contig1), which were orthologous of TMV resistance proteins, involved in the most enrichment pathways, implying the two genes played important roles in the process of diseases-resistance. The results of tissue specific expression analysis showed that the genes of CL6035Contig1, CL19588Contig1, CL52011Contig1 and CL34065Contig1 highly expressed in leaf, root, stem and fruit respectively. Our acquired results might provide concrete foundation for further research of the *CfNBS* genes, including cloning gene, identifying gene function and revealing the mechanism of *C. ficifolia* defence response to *F. oxysporum* infection.

Key words: *Cucurbita ficifolia*; *Fusarium* wilt; transcriptome; nucleotide binding site (NBS) type genes; qRT-PCR

Received 2020-04-28 Accepted 2020-07-10

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31460516), Creative and Talent Training Base for Horticulture Science of High Level University in Yunnan Province ([2015]57), Universities Joint Foundation Project in Yunnan Province (2018FH001-026).

*Co-corresponding authors: Hou SM (55374318@qq.com), Yang ZA (454483788@qq.com).