

刘 潮, 褚洪龙, 韩利红, 等. 桑树 NBS-LRR 类基因家族的全基因组鉴定及其调控 microRNAs 分析[J]. 江苏农业学报, 2019, 35(3): 544-553.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2019.03.007

桑树 NBS-LRR 类基因家族的全基因组鉴定及其调控 microRNAs 分析

刘 潮, 褚洪龙, 韩利红, 杨云锦, 高 永, 唐利洲

(曲靖师范学院云南高原生物资源保护与利用研究中心/生物资源与食品工程学院/云南省高校云贵高原动植物多样性及生态适应性进化重点实验室, 云南 曲靖 655011)

摘要: 利用生物信息学方法, 全面分析了桑树 NBS-LRR 类基因家族组成、结构、进化、组织表达, 并对该家族基因的调控 microRNA (miRNA) 进行了预测。共筛选到 112 个桑树 NBS-LRR 类基因, 根据功能域主要分为 NBS、CC-NBS、CC-NBS-LRR、NBS-LRR 4 种类型。内含子数和相位分析结果显示, 基因结构类型多样。聚类分析结果显示不同聚类组间存在较多的类型交叉现象。该家族基因存在组织表达特异性。大部分桑树 NBS-LRR 类基因均具有被 miRNAs 调控的可能性, miR472b 和 miR482b 在调控该家族基因表达中可能发挥了主要作用。桑树 NBS-LRR 家族基因结构和进化的复杂性决定了其功能的多样性, miRNA 在控制该家族基因表达的适应性成本中发挥作用。

关键词: 桑树; NBS-LRR; 生物信息学; miRNA

中图分类号: S792.99

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2019)03-0544-10

Genome-wide identification of NBS-LRR genes and regulation analysis by microRNAs in mulberry

LIU Chao, CHU Hong-long, HAN Li-hong, YANG Yun-jin, GAO Yong, TANG Li-zhou

(Center for Yunnan Plateau Biological Resources Protection and Utilization/College of Biological Resource and Food Engineering/Key Laboratory of Yunnan Province Universities of the Diversity and Ecological Adaptive Evolution for Animals and Plants on Yungui Plateau, Qujing Normal University, Qujing 655011, China)

Abstract: The composition, structure, evolution, tissue expression of the nucleotide-binding site (NBS) leucine-rich repeat (LRR) gene family in mulberry, and the relationship between microRNA (miRNA) and the family gene were analyzed by bioinformatics. A total of 112 NBS-LRR genes of mulberry were identified, which were divided into four types (NBS, CC-NBS, CC-NBS-LRR and NBS-LRR) according to functional domains. The results of intron number and phase analysis showed that the types of genetic structure were various. Cluster analysis results showed that many types gene were mixed. The family genes were specific in tissue expression. Most of the NBS-LRR genes in mulberry were potential targets

of miRNAs, and miR472b and miR482b played a major role in regulating the gene expression of the family. The complexity of the genetic structure and evolution of the NBS-LRR family of mulberry determines the diversity of its function. miRNA may play a role in reducing the adaptive cost of gene expression.

Key words: mulberry; nucleotide-binding site leucine-rich repeat (NBS-LRR); bioinformatics; miRNA

收稿日期: 2018-07-09

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31460561, 31760013, 31860005, 31860057); 云南省地方本科高校基础研究联合专项 (2017FH001-034, 2017FH001-037); 国家级大学生创新创业训练计划项目 (201610684004, 201710684012)

作者简介: 刘 潮 (1980-), 男, 河北景县人, 博士, 副教授, 研究方向为分子植物病理学。 (E-mail) liuchao@mail.qjnu.edu.cn

通讯作者: 唐利洲, (E-mail) tanglizhou@163.com

植物在与病原的长期协同进化过程中,发展出了一整套高度复杂的免疫系统,以识别并对抗病原的侵袭。植物先天免疫系统包括 2 层防御系统:第 1 层是植物通过细胞表面的模式识别受体 (Pattern recognition receptors, PRRs) 对保守的病原/微生物相关分子模式 (Pathogen/microbe associated molecular pattern, P/MAMP) 的识别,称为病原相关分子模式引发的免疫 (PAMP-triggered immunity, PTI)^[1-3];第 2 层的免疫一般发生在细胞内部,主要依靠抗性基因 (Resistance gene) 编码的多态性抗病蛋白识别无毒因子而实现,这些蛋白质多数是胞内富含亮氨酸重复序列和核苷酸结合位点蛋白 (Nucleotide binding site and leucine-rich repeat proteins, NBS-LRR proteins),能直接或间接识别病原特异性效应蛋白,而激发相似的防御反应,称为效应子引发的免疫 (Effector-triggered immunity, ETI)^[1]。与 PRRs 相比,R 蛋白在进化上出现相对较晚,在与病原互作中持续出现了大量新成员。典型的 NBS-LRR 类基因编码的蛋白质具有一些共同的结构域:位于中心区的 NBS 结构域、C 端的 LRR 结构域、N 端与 Toll/白细胞介素受体 (Toll-interleukin-1 receptor, TIR) 同源的结构域或卷曲螺旋 (Coiled coil, CC) 结构域。其中中心区的 NBS 作为一个信号转换器,通过与 ADP 或 ATP 的结合而改变蛋白质的钝化或激活状态,使信号关闭或开放;C 端的 LRR 结构域是植物 R 蛋白中最具多态性的部分,与其识别效应子的特异性相关^[4];N 端的 CC 或 TIR 结构域则在下游信号的激活中发挥关键作用^[5-6]。NB-ARC 结构域是在细菌和真核生物中发现的信号基序,存在于植物抗病基因和动物细胞凋亡调节基因中^[7],这一结构域无论是在植物还是动物的 NBS-LRR 蛋白中都十分保守^[4],并成为克隆各种作物抗病基因类似物 (Resistance gene analogs, RGAs) 的 NBS 区域重要的序列依据。

有研究表明,小 RNA 在植物的先天免疫中发挥作用^[8]。植物抗病基因存在适应性成本,NBS-LRR 的高表达对植物的生长是不利的^[9]。MicroRNA 是一类 21 nt 的小分子 RNA,miRNA 通过转录或转录后水平调控 NBS-LRR 类基因的表达^[10-11]。在进化上,NBS-LRR 类基因与其调控的 miRNA 在基因组水平上保持动态平衡,从而控制了 NBS-LRR 的潜在适应性成本^[12]。同一家族 miRNA 往往有靶向保守区域,因此一个 miRNA 可靶向多个

NBS-LRR 类基因^[13-14]。

川桑 (*Morus notabilis*) 是桑科桑属落叶乔木,分布于中国中部和北部各省。桑叶养蚕在中国有着悠久的历史,是中国丝绸文化的基础。桑树木材可用于制作器具,树皮可作为造纸原料,桑椹可供食用、酿酒。田间栽培中,经常出现桑萎缩病、疫病、褐斑病、赤锈病和青枯病等多种病害,往往造成植株发育不良、桑叶产量降低和品质变劣等问题,严重影响蚕桑产业的健康发展。目前,随着川桑基因组数据的公布^[15],大量桑树抗病基因的研究结果先后发表^[16-19],然而关于桑树 NBS-LRR 家族基因的研究鲜见报道。本研究利用生物信息学方法对桑树基因组中 NBS-LRR 类基因进行鉴定,并分析该家族基因结构、系统发育、组织表达及其调控 miRNA 特征,为 NBS-LRR 类基因功能的揭示和开发利用提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 桑树 NBS-LRR 类基因的获取

以拟南芥 NBS-LRR 类基因序列为查询序列,搜索桑树基因组数据库 (<https://morus.swu.edu.cn/morusdb/>),下载桑树 NBS-LRR 类基因序列。

1.2 桑树 NBS-LRR 类基因的鉴定与分类

通过 GenBank 数据库在线工具 CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 鉴定蛋白质结构域。使用 Pfam (<http://pfam.xfam.org/>) 和 COILS Server (http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html) 对候选 NBS-LRR 类基因编码蛋白质结构域进行确认,包括 NBS、TIR、LRR、CC 等,排除不含 NBS 结构域的基因。根据蛋白质结构域类型,将 NBS-LRR 类基因进行分类。

1.3 桑树 NBS-LRR 类基因和编码蛋白质结构分析

所有桑树 NBS-LRR 类基因碱基序列和编码的氨基酸序列均从桑树基因组数据库下载。使用 GSDS 在线软件 (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/index.php>) 绘制基因结构示意图。通过 MEME SUITE 在线工具 (<http://meme-suite.org/tools/meme>) 预测桑树 NBS-LRR 蛋白质氨基酸序列的保守 Motif,参数为默认设置。

1.4 桑树 NBS-LRR 蛋白氨基酸序列比对与系统发育分析

对所有蛋白质使用 ClustalX 进行氨基酸序列比

对。应用 MEGA 5.0 软件,采用邻接法 (Neighbor-Joining, NJ) 构建系统进化树。

1.5 桑树 NBS-LRR 类基因表达分析

通过桑树基因组数据库下载获得候选 NBS-LRR 类基因转录组数据,分别对其在根、树皮、冬芽、雄花和叶中表达进行分析。

1.6 miRNA 靶标 NBS-LRR 类基因预测

根据序列互补原则对 NBS-LRR 类基因的调控 miRNA 进行预测。使用 psRNATarget 在线软件 (<http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/>) 对文献中 111 个桑树 miRNA^[20-21] 的靶标 NBS-LRR 类基因进行预测。

2 结果与分析

2.1 桑树 NBS-LRR 类基因的鉴定与分类

通过搜索桑树基因组数据库,共获得含有 NBS 核心结构的桑树 NBS-LRR 类候选基因 112 个,占桑树基因组总基因数 (29 261 个) 的 0.4%,其中编码的

蛋白质具有 NBS、LRR 和 CC 完整结构域的基因共 33 个,占 NBS-LRR 类基因的 29.5% (表 1)。编码的蛋白质含有 LRR 结构域的有 63 个,不含 LRR 结构域的基因有 49 个。桑树 NBS-LRR 类基因比例与拟南芥比较接近,而明显少于其他一些物种^[12]。物种间 NBS-LRR 类基因数量存在较大差异,这可能与植物在进化过程中 NBS-LRR 类基因经受的选择压力有关。

研究发现,桑树 NBS-LRR 类基因主要分为 NBS、CC-NBS、CC-NBS-LRR、NBS-LRR 4 种结构类型。除了具有 NBS、TIR、LRR、CC 结构域之外,还包含 DUF、P-loop、zf-RVT 和 RPW8 等结构域类型。发现 L848_014445、L848_013225、L848_013226 含有 RPW8 结构域,RPW8 为拟南芥白粉病广谱抗性蛋白家族功能域,这些基因可能与植物的白粉病抗性有关。功能注释分析结果显示,编码抗病蛋白 RPM1 基因 34 个,编码抗病蛋白 RGA 基因 24 个,编码抗病蛋白 RPP13 基因 12 个,此外还有非活性疾病易感蛋白 LOV1、晚疫抗性蛋白、TMV 抗性蛋白 N 等。

表 1 部分植物基因组中 NBS-LRR 类基因分类

Table 1 Classification of NBS-LRR genes in plant genome

| 编码的蛋白质结构域 | NBS-LRR 类基因 | | | | |
|-------------------|-------------|-----|-----|-----|-----|
| | 桑树 | 拟南芥 | 水稻 | 杨树 | 葡萄 |
| CC-NBS (CN) | 16 | 1 | 34 | 13 | 10 |
| CC-NBS-LRR (CNL) | 33 | 41 | 213 | 184 | 95 |
| NBS (N) | 33 | 8 | 35 | 52 | 20 |
| NBS-LRR (NL) | 29 | 25 | 187 | 200 | 149 |
| TIR-NBS (TN) | 1 | 14 | 1 | 25 | 3 |
| TIR-NBS-LRR (TNL) | 0 | 79 | 0 | 80 | 18 |

2.2 桑树 NBS-LRR 类基因结构与系统发育分析

利用基因结构显示系统对桑树 NBS-LRR 类基因结构进行分析,发现该家族基因结构类型多样。大部分 CC-NBS-LRR 类型基因只含有 1 个外显子,编码序列长度一致性较高,而 NBS 类型基因内含子数和内含子相位类型较复杂,编码序列长度差异较大 (图 1)。

使用 MEME 在线软件对桑树 NBS-LRR 蛋白质基序进行分析 (表 2)。Motif 1 位于 NBS 功能域 N 末端,也是 AAA 功能域 (ATPases associated with a variety of cellular activities) 的一部分,参与膜融合、蛋白质水解和 DNA 复制等多种细胞过程;

Motif 2~Motif 5 和 Motif 10 位于 NBS 功能域中间部分,也是 AAA 功能域的组成部分;Motif 7 位于 NBS 功能域的 C 端,大部分桑树 NBS-LRR 蛋白均含有这些 Motif,也有少部分桑树缺少该类 Motif;Motif 6 位于 LRR 功能域内,也是 SCOP d1fqva2 功能域的一部分,属于 RNI-like 超家族,由相似重复构成的规则结构,形成右手 β - α 超螺旋的 LRR 功能域,NBS-LRR 蛋白质中含有 0 至多个 Motif 6,最多的 L848_025528 蛋白质含有 8 个;Motif 8 和 Motif 9 分别位于 CC 结构的 N 端和中部,在下游信号的激活中发挥作用,CC-NBS 和 CC-NBS-LRR 类蛋白质含有至少 1 个该类 Motif。

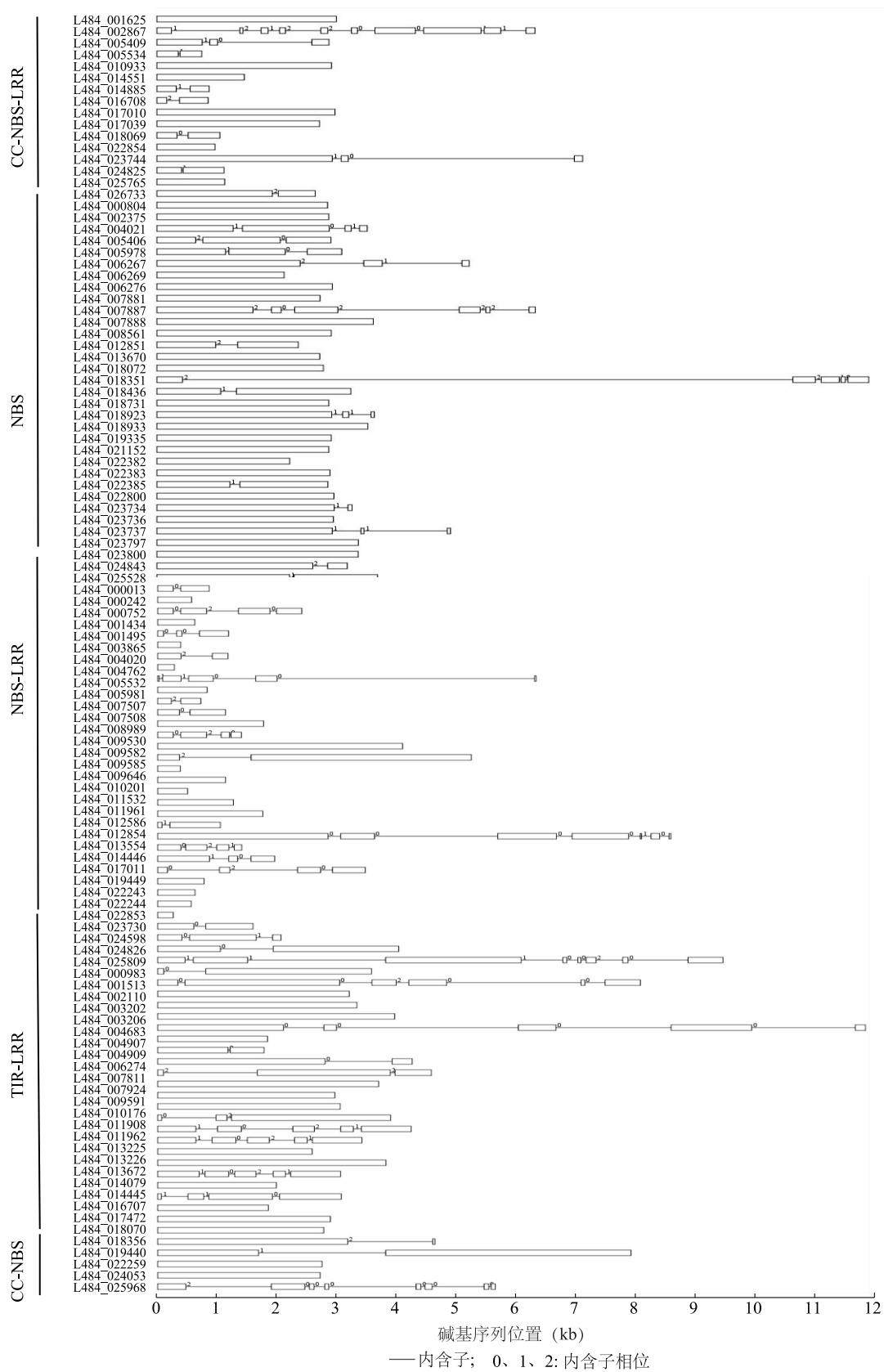












图 1 桑树 NBS-LRR 类基因结构

Fig.1 Gene structure of NBS-LRR in mulberry

表2 桑树NBS-LRR蛋白质保守基序信息
Table 2 Information of conserved motif of NBS-LRR protein in mulberry

| 基序 | 序列标签 | 保守序列 |
|----------|---|-------------------------------------|
| Motif 1 |  | VISJVGMGGLGKTTLAKKVYN |
| Motif 2 |  | KSILKILSLSYNDLPYYLKRCFLYFGIFP |
| Motif 3 |  | LEKJGKEIVRKCGGLPLAIVTVGGLLSTK |
| Motif 4 |  | KKHFDCRAWVTVSQS |
| Motif 5 |  | LQGKRYLLVLDDVWN |
| Motif 6 |  | PEEIGNLFHLRYLDLRGTVKKLPKSI |
| Motif 7 |  | EDYEIRKERLIRLWIAEGFIK |
| Motif 8 |  | LTEEVNLLKGVREEVESLKDELEIIQAFLKDAEAK |
| Motif 9 |  | VWLKQLREAAAYDIEDVIDEYJYHVAQRRH |
| Motif 10 |  | KGSKIJVTTTRNEEVA |

去掉部分相似度较低的序列,选择 92 个桑树 NBS-LRR 类基因构建 NJ 系统进化树,对基因进化关系进行分析。结果(图 2)显示,桑树 NBS-LRR 类基因主要分为 4 个大的聚类组,4 种主要 NBS-LRR 类基因聚类存在交叉现象,部分 CC-NBS 和 NBS-LRR 类基因聚类到 CC-NBS-LRR 组中,部分 CC-NBS-LRR 和 NBS 类基因聚到 CC-NBS 组中,部分 NBS、CC-NBS-LRR 和 CC-NBS 类基因聚到 NBS-LRR 组中,NBS 组中含有多个其他 3 种基因类型成员。说明进化过程中不同类型的 NBS-LRR 类基因间可能存在遗传信息的交换或共进化现象。每个小聚类组中,NBS 类型基因的进化枝长要短于同组其他类型基因,表明该组基因可能来源于该 NBS 类型基因。

2.3 桑树 NBS-LRR 类基因的组织表达

为了解桑树 NBS-LRR 类基因的组织表达特征,下载并分析了桑树基因组数据库中转录组数据。共检测到 93 个基因在不同组织中有表达(图 3)。其中基因 *L484_013225* 和 *L484_014445* 在所有检测组织中均有较高表达,这 2 个基因均含有 RPW8 结构域,属于 RPW8-NBS-LRR 结构域类型,可能在桑树基础抗病中发挥主要作用。*L484_022383*、*L484_013226*、*L484_017039*、*L484_025528*、*L484_018436*、

L484_017010、*L484_010201* 等基因在树枝树皮、雄花和叶中表达量较高,而在根(除 *L484_022383* 和 *L484_013226* 外)和冬芽中表达量稍低。基因 *L484_013672* 仅在根和树枝树皮中检测到较高表达。部分基因仅在特定组织中检测到较低表达。总体而言,较多的 NBS-LRR 类基因在树枝树皮、雄花和叶等组织中表达值较高,其次是根,而冬芽中多数 NBS-LRR 类基因的表达较低或未检测到表达。说明不同的 NBS-LRR 类基因在桑树的不同组织中发挥作用,部分基因存在组织表达特异性。

2.4 miRNA 对 NBS-LRR 类基因的调控分析

根据序列互补原则,利用 psRNATarget 在线软件对桑树 miRNA 与 NBS-LRR 类基因的调控关系进行序列比对分析,筛选到 614 个 miRNA 与 NBS-LRR 类基因存在调控关系,发现 101 个桑树 miRNA 可调控 106 个 NBS-LRR 类基因。较低的期望值表示 miRNA 与靶基因序列匹配较好。非配对靶标位点最大能量(UPE)为解开靶基因 mRNA 靶位点二级结构所需的能量,较低的 UPE 值表示 miRNA 结合或裂解靶基因的可能性较高。本研究选择期望值小于 3 的部分比对结果进行展示(表 3)。miR472b 和 miR482b 可对多个 NBS-LRR 类基因靶标位点进行结合,*L484_022259* 同时被 miR472b 和 miR482a-3p

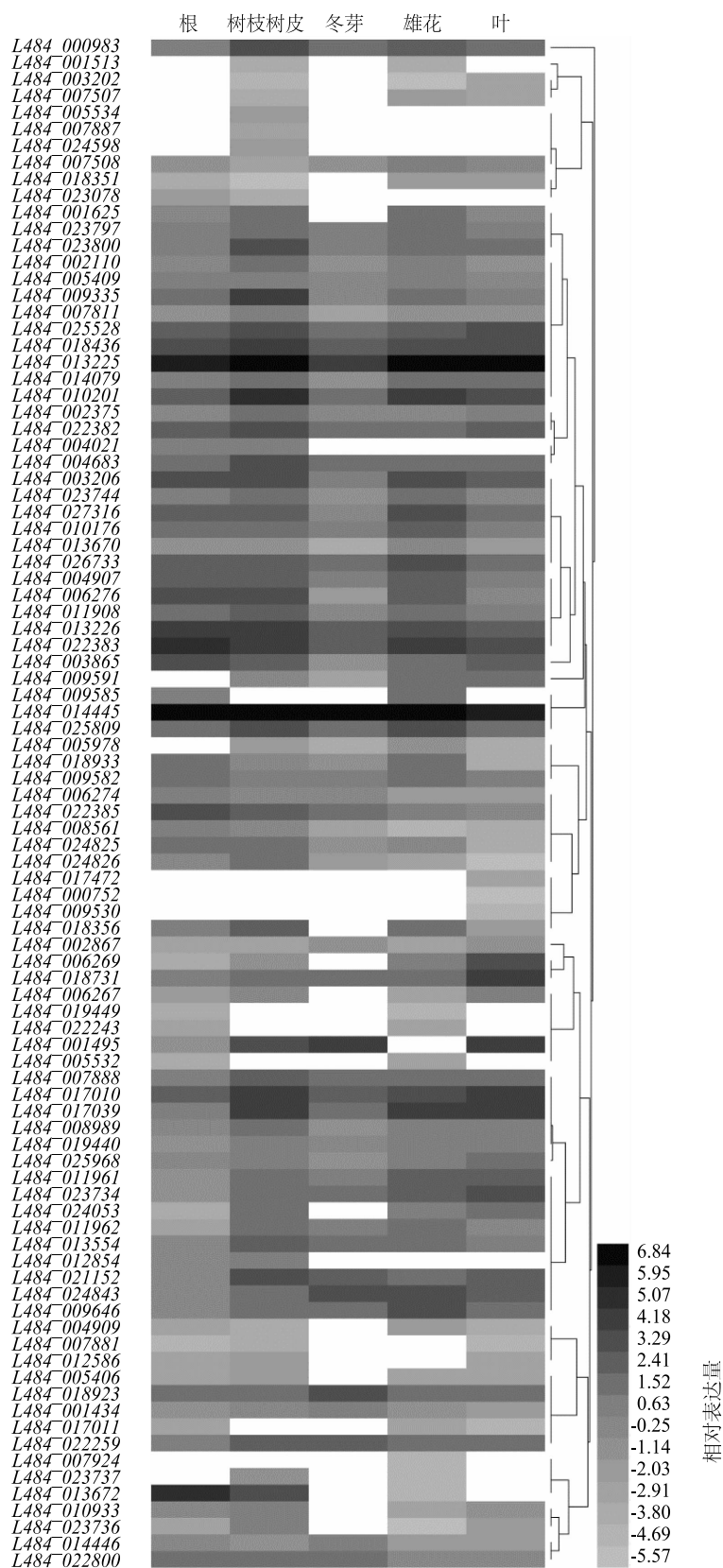


图 3 桑树 NBS-LRR 类基因组织表达特征

Fig.3 Expression profiles of NBS-LRR genes in different organs of mulberry

Table 3 Bioinformatic analysis of partial miRNA target sites in mulberry

| miRNA | 靶基因 | 期望值 | UPE | | 靶位点配对 | | 表达抑制模式 |
|------------|--------------------|-----|--------|-------|--|------------------------------|------------|
| miR472b | <i>L484_027316</i> | 2.0 | 14.884 | miRNA | 22 CCAUACCCACCACAACCCUUUU :: : : : : : : : : : : : : : : : 靶基因 | 538 GGAUGGGUGGUGUUGGAAAGA | 559 1 裂解 |
| miR472b | <i>L484_019440</i> | 2.5 | 19.451 | miRNA | 22 CCAUACCCACCACAACCCUUUU :: : : : : : : : : : : : : : : : 靶基因 | 526 GGCAUGGGCGGUGUUGGAAAAA | 547 1 裂解 |
| miR472b | <i>L484_022259</i> | 2.5 | 20.184 | miRNA | 22 CCAUACCCACCACAACCCUUUU :: : : : : : : : : : : : : : : : 靶基因 | 544 GGAAUGGGUGGCGUGGGGAAGA | 565 1 转录抑制 |
| miR472b | <i>L484_004762</i> | 2.5 | 23.095 | miRNA | 19 UACCCACCACAACCCUUUU : : : : : : : : : : : : : : : : 靶基因 | 1 AUGGGUGGUAAUUGGAAAAA | 19 1 转录抑制 |
| miR482a-3p | <i>L484_017472</i> | 2.5 | 17.784 | miRNA | 22 AGCCUUACCCGCCGGAACCCUU : : : : : : : : : : : : : : : : 靶基因 | 560 UGGGAUUGGGCGGCUUGGAAA | 581 1 转录抑制 |
| miR482a-3p | <i>L484_025528</i> | 2.5 | 19.466 | miRNA | 22 AGCCUUACCCGCCGGAACCCUU : : : : : : : : : : : : : : : : 靶基因 | 656 UGGGAUUAGGCGGUCUUGGGAA | 547 1 裂解 |
| miR482b | <i>L484_001625</i> | 2.5 | 15.690 | miRNA | 22 CCAUACCCUCCAGAGCCGUUCU : : : : : : : : : : : : : : : : 靶基因 | 553 GGUAUGGGAGGGUUGGGCAAGA | 574 1 转录抑制 |
| miR482b | <i>L484_004907</i> | 2.5 | 16.442 | miRNA | 22 CCAUACCCUCCAGAGCCGUUCU : : : : : : : : : : : : : : : : 靶基因 | 661 GGGAUUGGGCGGUAUUGGCAAGA | 682 1 转录抑制 |
| miR5293 | <i>L484_008989</i> | 2.5 | 9.824 | miRNA | 22 AGAAGAAGAAGAGUGAAGGAGG : : : : : : : : : : : : : : : : 靶基因 | 1 708 CCUCCUUCUUUUCAUUUCCUUC | 1 729 1 裂解 |
| miR156b | <i>L484_009530</i> | 3.0 | 18.420 | miRNA | 20 CACGAGUGAGAGAAGACAGU : : : : : : : : : : : : : : : : 靶基因 | 731 UUGCUGAUUUUCUUCUGUCC | 750 1 裂解 |
| miR395b | <i>L484_013554</i> | 3.0 | 20.028 | miRNA | 21 CCUCAAGGGGGUUUGUGAAGU : : : : : : : : : : : : : : : : 靶基因 | 2 105 AAACUUUCCUAAACAUUUCA | 2 125 1 裂解 |
| miR472b | <i>L484_010176</i> | 3.0 | 20.445 | miRNA | 22 CCAUACCCACCACAACCCUUUU : : : : : : : : : : : : : : : : 靶基因 | 484 GGAAUGGGAGGGUGGGGAAAA | 505 1 转录抑制 |
| miR482a-3p | <i>L484_022259</i> | 3.0 | 20.168 | miRNA | 22 AGCCUUACCCGCCGGAACCCUU : : : : : : : : : : : : : : : : 靶基因 | 542 AUGGAAUGGGUGGCGUGGGGAA | 563 1 裂解 |
| miR482b | <i>L484_018933</i> | 3.0 | 21.120 | miRNA | 22 CCAUACCCUCCAGAGCCGUUCU : : : : : : : : : : : : : : : : 靶基因 | 592 GGGAUGGGAGGACUUGGAAAGA | 613 1 转录抑制 |
| miR482b | <i>L484_017039</i> | 3.0 | 23.481 | miRNA | 22 CCAUACCCUCCAGAGCCGUUCU : : : : : : : : : : : : : : : : 靶基因 | 556 GGGAUGGGGGACUCGGAAAGA | 577 1 转录抑制 |
| miR482b | <i>L484_026733</i> | 3.0 | 22.124 | miRNA | 22 CCAUACCCUCCAGAGCCGUUCU : : : : : : : : : : : : : : : : 靶基因 | 562 GGGAUGGGCGGCGUGGGCAAGA | 583 1 转录抑制 |
| miR5021 | <i>L484_014551</i> | 3.0 | 12.969 | miRNA | 20 AGAAGAAGAAGAAGAGGGGAG : : : : : : : : : : : : : : : : 靶基因 | 379 UCUUCUUGUUCUUCUUCUUA | 398 1 裂解 |

UPE表示非配对靶标位点最大能量,“:”表示完全匹配,“.”表示不完全匹配,“空格”表示不匹配。

个 NBS-LRR 类基因被成功克隆后^[23],大量 NBS-LRR 类基因陆续被研究和报道,研究集中在 NBS-LRR 类基因的多样性及进化上^[24]。本研究通过搜索桑树基因组数据库,共获得 112 个具有 NBS 核心结构域的桑树 NBS-LRR 类候选基因,其中 63 个同时具有 NBS 和 LRR 功能域。NBS 结构域参与信号转导,具有高度保守和序列一致的基序,而 LRR 结构域参与病原体配体的识别,通常是高度可变的^[25]。进化分析结果显示,桑树 NBS-LRR 类基因聚类存在类型间的交叉,成员较少的聚类组中基因类型一致性较高,而成员较多的聚类组中往往有多个类型的基因。聚类组中类型和结构一致的基因可能是由共同的 NBS-LRR 类祖先基因复制而来,而同一聚类组中不同类型的基因可能是由异位重组而来,异位重组导致该聚类组基因的扩张^[24]。有些抗病基因需要 2 个 NBS-LRR 类基因共同介导,例如水稻中 *Pikm1TS* 和 *Pikm2TS* 共同介导抗病基因 *Pikm*^[26],*RRS1* 和 *RPS4* 在十字花科植物多种细菌性病害抗性中共同发挥作用^[27]。这可能与 NBS-LRR 类基因的适应性成本有关,也是该家族基因进化复杂性的体现。

多个 NBS-LRR 类基因被鉴定为广谱抗性基因,过表达 NBS-LRR 类基因,显著增强了植物的抗病性^[28]。本研究中,NBS-LRR 类基因的组织表达存在差异,基因 *L484_013225* 和 *L484_014445* 在多个组织中均有较高表达,这 2 个基因编码的蛋白质均含有白粉病抗性蛋白功能域 RPW8,可能在桑树的基础抗病中起作用,而 *L484_022383* 等基因在部分组织中表达较高,可能在桑树的特定组织器官或特定时期生长发育或抗病中发挥作用,也有些基因组织表达水平较低或未检测到表达,这些基因可能与植物特定时期的抗病过程或者处于非激活状态。

miRNA 作为调节子在 NBS-LRR 类基因的表达调控中发挥作用^[24]。植物 NBS-LRR 类基因的高表达导致能量损耗而影响植物生长,植物进化出 miRNA-NBS-LRR 系统来调控 NBS-LRR 的表达^[12]。Lu 等^[29]首次报道了 miRNA 对 NBS-LRR 类基因的调控,随后大量 miRNA 与其靶 NBS-LRR 类基因的作用关系被明确^[8]。番茄 miR482 通过靶 NBS-LRR 受体的 P-loop,与 168 个抗性基因中的 58 个发生作用^[30]。在番茄、马铃薯和烟草中至少搜索到 10 个 miRNA 家族及其靶抗性基因之间的作用关系,说明

miRNA 调节抗性基因表达在植物基因组中普遍存在^[31]。通过对桑树 miRNA 与 NBS-LRR 类基因调控关系的分析,发现大部分桑树 NBS-LRR 类基因均具有被 miRNA 调控的潜在可能,有 17 个 miRNA 与靶标序列匹配期望值小于 3,其中 miR472b 和 miR482b 均有 5 个靶 NBS-LRR 预测结合位点,这些 miRNA 在桑树生长发育和抗病中的调控作用值得进一步深入研究。

参考文献:

- [1] JONES J D G, DANGL J L. The plant immune system[J]. Nature, 2006, 444(7117): 323-329.
- [2] BOLLER T, HE S Y. Innate immunity in plants: an arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens[J]. Science, 2009, 324(5928): 742.
- [3] SANABRIA N M, HUANG J C, DUBERY I A. Self/non-self perception in plants in innate immunity and defense[J]. Self/nonself, 2010, 1(1): 40-54.
- [4] QI D, INNES R W. Recent advances in plant NLR structure, function, localization, and signaling[J]. NLR-protein functions in immunity, 2015, 4: 348.
- [5] BERNOUX M, VE T, WILLIAMS S, et al. Structural and functional analysis of a plant resistance protein TIR domain reveals interfaces for self-association, signaling, and autoregulation[J]. Cell Host Microbe, 2011, 9: 200-211.
- [6] MAEKAWA T, CHENG W, SPIRIDON L N, et al. Coiled-coil domain-dependent homodimerization of intracellular barley immune receptors defines a minimal functional module for triggering cell death[J]. Cell Host Microbe, 2011, 9: 187-199.
- [7] VAN DER BIEZEN E A, JONES J D G. The NB-ARC domain: a novel signalling motif shared by plant resistance gene products and regulators of cell death in animals[J]. Current Biology, 1998, 8(7): 226-228.
- [8] FEI Q, ZHANG Y, XIA R, et al. Small RNAs add zing to the Zig-Zag-Zig model of plant defenses[J]. Molecular Plant-microbe Interactions, 2016, 29(3): 165-169.
- [9] STOKES T L, KUNKEL B N, RICHARDS E J. Epigenetic variation in *Arabidopsis* disease resistance[J]. Genes & Development, 2002, 16(2): 171.
- [10] HA M, KIM V N. Regulation of microRNA biogenesis[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2014, 15(8): 509-524.
- [11] MA W, CHEN C, LIU Y, et al. Coupling of micro RNA-directed phased small interfering RNA generation from long noncoding genes with alternative splicing and alternative polyadenylation in small RNA-mediated gene silencing[J]. New Phytologist, 2018, 217(4): 1535-1550.
- [12] ZHANG Y, XIA R, KUANG H, et al. The diversification of plant NBS-LRR defense genes directs the evolution of microRNAs that

- target them[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2016, 33(10): 2692-2705.
- [13] ZHAI J, JEONG D H, DE P E, et al. MicroRNAs as master regulators of the plant NB-LRR defense gene family via the production of phased, trans-acting siRNAs[J]. *Genes & Development*, 2011, 25(23): 2540-2553.
- [14] KHALFALLAH Y, BOUKTILA D, HABACHI-HOUMLI Y, et al. Regulation of NBS-LRR genes by microRNAs in wheat: Computational identification of candidate MIR-2118 genes and evidence of flexibility[J]. *Cereal Research Communications*, 2017, 45(1): 1-10.
- [15] HE N, ZHANG C, QI X, et al. Draft genome sequence of the mulberry tree *Morus notabilis* [J]. *Nature Communications*, 2013, 4: 2445.
- [16] HUANG Y, ZOU Q, WANG Z B. Computational identification of miRNA genes and their targets in mulberry[J]. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2014, 61(4): 537-542.
- [17] BARANWAL V K, NEGI N, KHURANA P. Genome-wide identification and structural, functional and evolutionary analysis of WRKY components of mulberry [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 30794.
- [18] 刘 潮, 韩利红, 宋培兵, 等. 桑树 WRKY 转录因子的全基因组鉴定及生物信息学分析[J]. *南方农业学报*, 2017, 48(9): 1691-1699.
- [19] GAI Y P, ZHAO H N, ZHAO Y N, et al. MiRNA-seq-based profiles of miRNAs in mulberry phloem sap provide insight into the pathogenic mechanisms of mulberry yellow dwarf disease[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 812.
- [20] WU P, HAN S, ZHAO W, et al. Genome-wide identification of abiotic stress-regulated and novel microRNAs in mulberry leaf[J]. *Plant Physiology & Biochemistry*, 2015, 95: 75-82.
- [21] JIA L, ZHANG D, QI X, et al. Identification of the conserved and novel miRNAs in Mulberry by high-throughput sequencing[J]. *PLoS ONE*, 2014, 9(8): e104409.
- [22] KUANG H, WOO S S, MEYERS B C, et al. Multiple genetic processes result in heterogeneous rates of evolution within the major cluster disease resistance genes in lettuce[J]. *Plant Cell*, 2004, 16(11): 2870-2894.
- [23] WHITHAM S, DINESH-KUMAR S P, CHOI D, et al. The product of the tobacco mosaic virus resistance gene N; similarity to toll and the interleukin-1 receptor[J]. *Cell*, 1994, 78(6): 1101-1115.
- [24] YANG X, WANG J. Genome-wide analysis of NBS-LRR genes in sorghum genome revealed several events contributing to NBS-LRR gene evolution in grass species[J]. *Evolutionary Bioinformatics*, 2016, 12: 36433.
- [25] MACE E, TAI S, INNES D, et al. The plasticity of NBS resistance genes in sorghum is driven by multiple evolutionary processes[J]. *BMC Plant Biology*, 2014, 14(1): 253.
- [26] ASHIKAWA I, HAYASHI N, YAMANE H, et al. Two adjacent nucleotide-binding site-leucine-rich repeat class genes are required to confer Pikm-specific rice blast resistance [J]. *Genetics*, 2008, 180(4): 2267-2276.
- [27] NARUSAKA M, SHIRASU K, NOUTOSHI Y, et al. RRS1 and RPS4 provide a dual resistance-gene system against fungal and bacterial pathogens[J]. *The Plant Journal*, 2009, 60(2): 218-226.
- [28] ZHANG C, CHEN H, CAI T, et al. Overexpression of a novel peanut NBS-LRR gene AhRRS5 enhances disease resistance to *Ralstonia solanacearum* in tobacco [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2017, 15(1): 39-55.
- [29] LU C, KULKARNI K, SOURET F F, et al. MicroRNAs and other small RNAs enriched in the Arabidopsis RNA-dependent RNA polymerase-2 mutant [J]. *Genome Research*, 2006, 16(10): 1276-1288.
- [30] SHIVAPRASAD P V, CHEN H M, PATEL K, et al. A microRNA superfamily regulates nucleotide binding site-leucine-rich repeats and other mRNAs[J]. *The Plant Cell*, 2012, 24(3): 859-874.
- [31] LI F, PIGNATTA D, BENDIX C, et al. MicroRNA regulation of plant innate immune receptors [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, 109(5): 1790-1795.

(责任编辑:张震林)