植物遗传资源学报 2019，20（6）：1621-1629
Journal of Plant Genetic Resources
DOI：10.13430/j.cnki.jpgr.20190416002

香蕉 NPR1 基因家族的鉴定及在枯萎病菌胁迫下表达分析

任陪娣[1,2]，谢碧玉[1]，陈　翠[1]，贾彩红[1]，王静毅[1]，张建斌[1]，徐碧玉[1]，王　卓[1]，金志强[1]
（[1]中国热带农业科学院热带生物技术研究所 / 农业部热带生物技术重点开放实验室，海口 571101；[2]南京农业大学园艺学院，南京 210095）

摘要：以拟南芥 NPR1 基因家族成员蛋白序列为查询序列，在香蕉基因组数据库中鉴定香蕉 NPR1 基因家族成员，并对其进行生物信息学分析及在枯萎病菌侵染下的表达分析。共鉴定得到 15 个成员，将其命名为 *MaNPR1~MaNPR15*。理化性质、保守功能结构域、重要的氨基酸残基及 motif 分析结果与其他物种所报道的有较高的一致度。香蕉 NPR1 基因家族成员种内进化树、基因结构及结构域的分类情况呈现出高度一致，表明了香蕉 NPR1 基因家族成员间有着明确的分工。种间进化树显示香蕉的 NPR1 基因分为 3 个分组，每个分组都含有拟南芥 NPR1 成员。主栽品种巴西蕉（*Musa acuminata* Colla. AAA group ′Brazilian′）易感香蕉枯萎病，从巴西蕉 CK 及巴西蕉受枯萎病侵染 2 d 的根系转录组数据中综合表达量及表达趋势选定 8 个成员，并在巴西蕉与抗（耐）Foc TR4 品种 GCTCV-119 中验证其表达模式。基因 *MaNPR4* 及 *MaNPR11* 在抗感品种中表现出明显的差异表达，在抗病品种 GCTCV-119 中随着 Foc TR4 侵染时间延长表达量不断增加，而在感病品种巴西蕉中表达量呈下降趋势。表明 *MaNPR4* 及 *MaNPR11* 参与香蕉抗枯萎病过程。本研究结果为进一步利用香蕉 NPR1 基因进行香蕉抗枯萎病遗传改良奠定基础。

关键词：香蕉；NPR1；生物信息学分析；香蕉枯萎病；表达分析

Genome-Wide Survey of the NPR1 Gene Family in Banana（*Musa* spp.）and Expression Pattern Analysis Upon Infection with Foc TR4

REN Pei-di[1,2], XIE Bi-yu[1], CHEN Cui[1], JIA Cai-hong[1], WANG Jing-yi[1], ZHANG Jian-bin[1], XU Bi-yu[1], WANG Zhuo[1], JIN Zhi-qiang[1]
（[1]*Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences/Key Laboratory of Tropical Crop Biotechnology of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Haikou 571101*; [2]*College of Horticulture of Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095*）

Abstract: Using the NPR1 gene family member′s protein sequences from *Arabidopsis* Heynh. as query, MaNPR1 gene family members were identified in the banana A genome database, and these features using bioinformatics methods and the expression upon infection with Foc TR4 were further investigated.In total, 15 family members were identified, designated *MaNPR1-MaNPR15*.Physicochemical properties, conserved functional domain, essential amino acid residues and motif analysis results of MaNPR1 gene family are highly consistent with those of other species.The classification of phylogenetic tree, gene structure and functional domain suggested a functional specificity among members of the MaNPR1 gene family.The interspecific phylogenetic tree showed that the MaNPR1 gene family were divided into three

收稿日期：2019-04-16　**修回日期：**2019-05-16　**网络出版日期：**2019-07-12
URL：http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20190416002
第一作者研究方向为香蕉与枯萎病菌互作机制，E-mail：740752493@qq.com
通信作者：王卓，研究方向为香蕉功能基因组学研究，E-mail：wangzhuocd@126.com
金志强，研究方向为香蕉分子生物学，E-mail：18689846976@163.com
基金项目：国家自然科学基金（31501624）；海南省自然科学基金资助项目（318MS090）；现代农业产业技术体系（CARS-32）
Foundation project: National Natural Science Foundation of China（31501624）, Hainan Provincial Natural Science Fund Project（318MS090）, Modern Agricultural Industry Technology System（CARS-32）

subgroups, co-residing with respective *Arabidopsis* Heynh. NPR1 members in each group.The predominant-cultivating banana variety 'Cavendish'(*Musa acuminata* Colla. AAA group) was highly susceptible to fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* f.sp.*Cubense* Tropical Race 4 (Foc TR4).By analyzing the transcriptome dataset from root transcriptome data of infected and un-infected Brazilian samples, eight differentially expressed *MaNPR1* genes were identified, which were further tested by RT-qPCR in 'Cavendish' and the resistant variety 'GCTCV-119'.Two members *MaNPR4* and *MaNPR11* showed an increasing transcriptional levels at time-points in ' GCTCV-119', in relative to the constant reduction in 'Cavendish' .That indicated an involvement of *MaNPR4* and *MaNPR11* in responses to fusarium wilt.Taken together, this study raised a potential in breeding for fusarium wilt resistance banana by use of NPR1 genes.

Key words: banana (*Musa* spp.); NPR1; bioinformatic analysis; fusarium wilt; expression patterns

NPR1 (non-expressor of PR genes) 基因是植物系统获得抗性及 PR 基因表达的激活子，是植物水杨酸 (SA，salicylic acid) 信号通路的重要组成部分；也参与了水杨酸与茉莉酸 / 乙烯信号途径的相互作用[1-3]。因此 NPR1 是植物响应病原菌侵染的核心因子。典型的 NPR1 基因含有 BTB[4]、ANK-r 结构域[5]，这与 NPR1 与其他转录因子互作密切相关，如 NPR1 与 bZIP 转录因子中的 TGA 家族之间的互作[6]。NPR1 通过 BTB 结构域与 TGA2 的抑制区结合使 TGA2 抑制 PR 基因表达的功能缺失[5]。NPR1-like C-terminal 结构域是 NPR1 基因功能分化的重要因素，该结构域包括核定位信号[7]，对于 NPR1 定位在核内从而参与转录共激活是必须的。在正常生长状态下，NPR1 蛋白通过半胱氨酸间二硫键形成寡聚体存在于细胞质中。当植物感染病原菌后，由于 SA 的积累改变了细胞中的氧化还原势，NPR1 寡聚体解聚后形成单体[8]，进入细胞核内并与 TGA 转录因子互作，形成增强子，这种 NPR1-TGA 相互作用增强了一组启动子中含有 as-1/ocs 顺式作用元件的 PR 基因的表达[9]。

在拟南芥中共鉴定出 6 个 NPR1 基因 *AtNPR1*、*AtNPR2*、*AtNPR3*、*AtNPR4*、*AtNPR5* 及 *AtNPR6*。其中 *AtNPR1*、*AtNPR2*、*AtNPR3* 及 *AtNPR4* 都参与调控 SAR 的建立[10-12]。*AtNPR5* 和 *AtNPR6* 基因又被称为 *AtBOPl* (BLADE-ON-PETIOLE1 (BOP1)) 和 *AtBOP2* 基因，它们在种内进化树单独列于一支，缺乏 NPR1-like C-terminal 结构域，与植物的生长发育有关，尤其是叶片与花器官的形成发育[13]。最近在番木瓜[11]、鳄梨[14]、苹果[15]等植物中也分析鉴定了 NPR1 基因家族。到目前为止，在香蕉中已克隆得到 5 个 NPR1 基因，包括 *MNPR1A*、*MNPR1B*[16]、*MdNPR1*[17]、*MuNPR1-1*[18] 与 *NPR1E*[19]，其中 *MNPR1A*、*MNPR1B* 两个基因在响应 SAR 诱发剂及 Foc 处理时表现出不同的表达模式[16]。但上述研究结果不完善，命名也不统一。因此，本研究参考最近香蕉 A 基因组更新的基因组的版本，系统分析香蕉 NPR1 基因家族。

香蕉 (*Musa* spp.) 是一种重要的热带亚热带水果。香蕉枯萎病是香蕉生产中的瓶颈问题，该病由尖孢镰刀菌古巴专化型 (*Fusarium oxysporum* f.sp. *Cubense*) 引起，是一种典型的土传真菌病害。该病原菌包含 4 个生理小种，其中 4 号小种危害最为严重。根据发病区域分布 4 号小种可进一步分为亚热带型 SR4 和热带型 TR4，其中热带型 (TR4) 危害最严重。该病原菌能在土壤中长期存活。选育抗病品种是对抗病害最有效的途径，因此众多研究者对多种作物中与抗逆相关的关键基因进行克隆与分析[20-22]。但香蕉是三倍体，常规育种收效甚微。目前生产上应用的耐病品种大多来自体细胞突变。香蕉基因组测序已经完成[23-24]。为在全基因组水平分析香蕉 NPR1 基因家族成员奠定基础。

1 材料与方法

1.1 香蕉 NPR1 基因的鉴定

在香蕉 A 基因组数据库中，用拟南芥 NPR1 成员蛋白序列为查询序列进行 BLASTP 搜索 (https://banana-genome-hub.southgreen.fr/home1) (E 值 ≤ 1×10^{-5})。通过 SMART 网站分析所得成员蛋白序列结构域，去除冗余序列。

1.2 蛋白理化性质分析、种内进化树构建、基因结构及结构域分析

在香蕉 A 基因组数据库发布的第 2 个版本中 (https://banana-genome-hub.southgreen.fr/home1) 获取所有成员的基因序列、CDS 序列及蛋白质序列以进行后续分析。

将所有成员基因序列与 CDS 序列上传到 GSDS

网站（http://gsds.cbi.pku.edu.cn/）分析成员基因结构。将上述成员蛋白序列上传到 ExPASy 网站（https://www.expasy.org），分析其理化性质。利用蛋白质序列，采用邻接法通过 MEGA 7 软件构建香蕉 NPR1 基因种内进化树，分析种内分支情况。将所有成员的蛋白序列上传至 SMART 网站（https://smart.embl.de/），在 SMART 网站数据库中采用 PFAM 分析蛋白结构域。

1.3　系统发生关系分析及多序列比对

以 NPR1 为关键词在 Phytozome（https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html）网站搜索其他物种 NPR1 蛋白。使用 clustalX 对香蕉 NPR1 及拟南芥、烟草及水稻 NPR1 蛋白序列进行多序列比对。选择拟南芥、烟草及水稻的 NPR1 成员与香蕉 NPR1 成员进行种间进化树的构建，系统进化树的构建采用邻接法通过 MEGA 7 软件构建。

1.4　基因定位、复制关系分析

将 NPR1 基因家族 15 个基因的 ID、基因起始位置及所在染色体 ID 的 4 个信息，以及香蕉 A 基因组 11 条染色体 ID 及序列长度上传到 Mapinspect 软件进行绘图。根据基因所在的基因组位置对香蕉中 NPR1 基因成员之间复制关系进行分析。

1.5　香蕉 NPR1 基因在巴西蕉及 GCTCV-119 表达分析

根据实验室前期测得巴西蕉接种后 0 d（对照）及巴西蕉受枯萎病侵染接种后 2 d 的根系转录组数据绘制所有成员表达量热图，以表达量大小及表达趋势表现为下调为基准选取成员进行 RT-qPCR（reverse transcription quantitative PCR）验证其在巴西蕉及 GCTCV-119 中的表达模式。主栽品种巴西蕉（*Musa acuminata* Colla. AAA group ‘Brazilian’）易感香蕉枯萎病，GCTCV-119 是一个抗（耐）香蕉枯萎病的品种[25]。

采用蘸根接菌法，使用 1.5×10^6 孢子 /mL 的 Foc TR4 孢子悬浮液浸泡侵染 5 叶 1 心抗、感病香蕉苗植株根系，侵染时间设置为 2 h。取材时间点设置为侵染 0 d、2 d、4 d 和 6 d[26]。利用多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒（天根）提取上述抗感香蕉枯萎病品种香蕉苗在枯萎病菌胁迫下的根系 RNA，并用 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit（赛默飞世尔）试剂盒反转录合成 cDNA 第 1 链。最终使用 TB Green ™ Premix Ex Taq ™ II（Tli RNaseH Plus）（宝生物工程（大连）有限公司）进行 RT-qPCR 反应，设生物学重复 3 次，反应分析溶解曲线。引物序列如表 1。

表 1　香蕉 NPR1 基因家族成员基因表达分析采用的引物

Table 1　The primers used for the expressional analysis of NPR1 genes in banana

基因名称 Gene name	上游引物（5′—3′） Forward primer（5′—3′）	下游引物（5′—3′） Reverse primer（5′—3′）
MaNPR1	AGTGCTCTACGCCTCCTTCA	TATGTCATCGGCTGCCACCT
MaNPR2	CCCTCACCTCCGACTTCCTC	CTCCACAGTTGGCCTCCTCA
MaNPR3	AAGAGCGAAAGAACCGATACAA	GAAGATGAAGCAGAGGCAGAAC
MaNPR4	AGGGAACTGGTGAGACAGAAAC	TGAACTGAAAGGAATAGGAGGA
MaNPR5	GTCGCTGAGTTGTTAGACCTTG	GATTCTTGACCCTGCTCTGTTC
MaNPR9	GCACATCGGAGTTCACCTTAG	GTGCCAGATGCTCTTCCTTGA
MaNPR11	CTTGGGCTTGCGGACGTTAA	AGGTTCGCCTTGTTCGGTTG
MaNPR13	CGGGCTTGTCGCACATAGAA	TCGGGATTCATCCGTGGGTA

2　结果与分析

2.1　香蕉中 NPR1 基因的鉴定与分析

在本研究中，共鉴定得到 15 个 NPR1 基因。根据这 15 个基因在香蕉 11 条染色体上的分布，将它们命名为 *MaNPR1~MaNPR15*。这 15 个基因编码的蛋白序列氨基酸残基数目介于 466~608 之间，预测蛋白分子质量为 50918.43~66962.49 Da，理论等电点为 5.24~6.99（表 2）。

种内进化树结果表明，香蕉中 NPR1 基因内部分化出 2 个分支（图 1A）。GSDS 分析基因结构预测内含子与外显子结果表明，*MaNPR1~MaNPR15* 内含子的数目可分 2 种情况，只含有 1 个内含子或含有 2 个及以上内含子。其中 7 个成员含有 3 个内含子，*MaNPR3*、*MaNPR11*、*MaNPR9*、*MaNPR10*、*MaNPR1*、*MaNPR6*、*MaNPR5*，仅 *MaNPR4* 含有 2 个内含子；而 *MaNPR2*、*MaNPR7*、*MaNPR8*、*MaNPR12*、*MaNPR13*、*MaNPR14*、*MaNPR15* 这 7 个成员均只含有 1 个内含子（图 1B）。

表 2 香蕉 NPR1 成员详细信息

Table 2 The detailed information of MaNPR1 member

基因名称 Gene name	基因 ID Gene_ID	所在染色体 Chromosome	基因起始位置 Gene start	基因终止位置 Gene end	氨基酸残基数目 Number of amino acid residues	分子量（Da） MW	等电点 pI
MaNPR1	Ma02_g18450	chr.02	24924471	24928590	584	64248.49	5.52
MaNPR2	Ma03_g08610	chr.03	6333217	6335379	490	52512.20	6.17
MaNPR3	Ma03_g16200	chr.03	18222199	18226824	575	64132.00	6.00
MaNPR4	Ma03_g27100	chr.03	30587703	30590820	583	65782.94	6.99
MaNPR5	Ma04_g38570	chr.04	36034511	36038932	595	65817.88	6.40
MaNPR6	Ma05_g02080	chr.05	1328641	1333397	599	66468.90	6.36
MaNPR7	Ma05_g07890	chr.05	5834544	5836510	490	52038.42	6.17
MaNPR8	Ma05_g19160	chr.05	26575674	26577795	505	54552.57	6.64
MaNPR9	Ma06_g02690	chr.06	2056515	2061471	608	66962.49	5.91
MaNPR10	Ma07_g09020	chr.07	6765395	6770510	575	63747.67	5.24
MaNPR11	Ma08_g05340	chr.08	3657536	3661222	581	64279.55	5.75
MaNPR12	Ma08_g22800	chr.08	36286566	36288518	466	50918.43	5.78
MaNPR13	Ma09_g16260	chr.09	11620957	11622896	493	52534.10	6.14
MaNPR14	Ma10_g00810	chr.10	3063251	3065332	490	52870.35	6.09
MaNPR15	Ma11_g18680	chr.11	23707999	23710093	502	54365.29	6.43

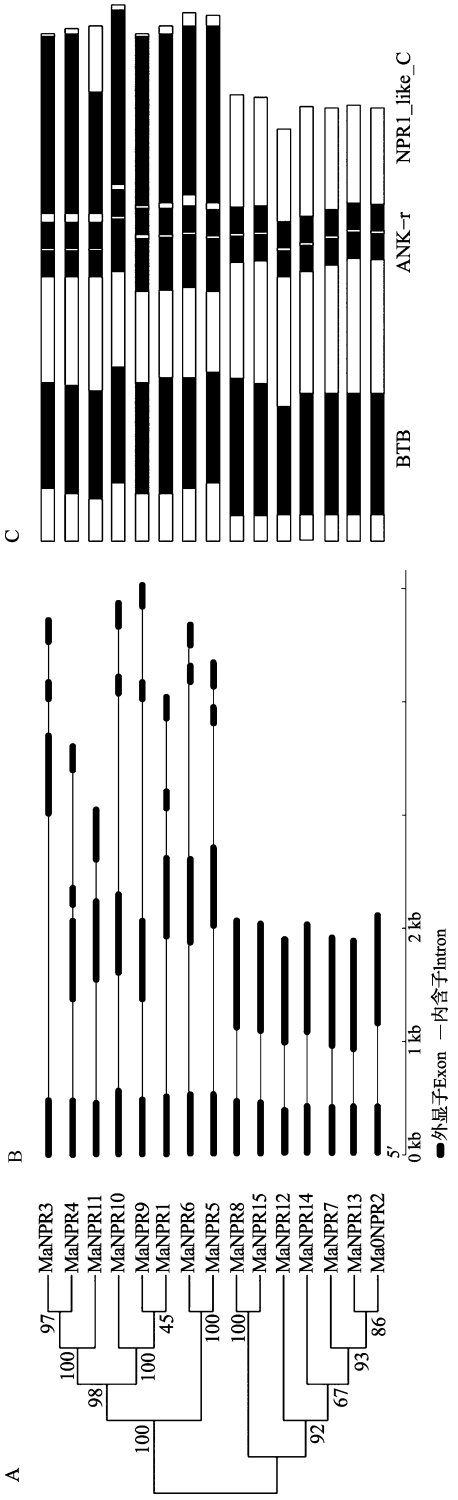
使用 SMART 网站分析 *MaNPR1~MaNPR15* 氨基酸序列，发现所有成员都含有 NPR1 基因所具有的典型结构域，BTB 结构域以及 ANK-repeat 锚蛋白重复序列结构域。结合香蕉 A 基因组 NPR1 基因种内进化树分析可见只有 8 个成员 *MaNPR3*、*MaNPR11*、*MaNPR9*、*MaNPR10*、*MaNPR1*、*MaNPR6*、*MaNPR5*、*MaNPR4* 有 NPR1_like_C-terminal 结构域，该结构域包含核定位信号 NLS 位点[7]，与其是否能在核内参与转录调节相关；而另外 7 个成员，*MaNPR2*、*MaNPR7*、*MaNPR8*、*MaNPR12*、*MaNPR13*、*MaNPR14*、*MaNPR15* 则不含有 NPR1_like_C-terminal 结构域（图 1C），这一结果与 NPR1 基因家族成员间的功能分化相关。

综合上述 3 个结果，香蕉 NPR1 基因家族成员种内进化树分支情况、基因结构及功能结构域分布呈现出高度一致，种内进化树分为 2 支，所含内含子数目分为 2 类及 NPR1_like_C-terminal 结构域的有无，这表明香蕉 NPR1 基因家族成员功能上可能与上述分类类似，有明确的分工。

2.2 多序列比对及系统发育分析

从种间进化树分支情况看，香蕉中 NPR1 基因在 3 个分支中均有成员分布，第 1 个分支有 6 个成员，此分支中有 *AtNPR1*、*AtNPR2*、*NtNPR1* 及 *OsNPR1*，且与 *OsNPR1* 发生关系最为相近，已被证实能提高植株抗病性[2]，因此推测 *MaNPR3*、*MaNPR11*、*MaNPR9*、*MaNPR10*、*MaNPR1*、*MaNPR4* 可能正调控 SAR 的建立；第 2 个分支有 *MaNPR6*、*MaNPR5* 两个成员，与 *AtNPR3*、*AtNPR4* 及 *OsNPR2*、*OsNPR3*、*NtNML1* 处于同一分支，因此推测 *MaNPR6*、*MaNPR5* 可能参与 SAR 的负调控[12]；第 3 个分支有 7 个成员，与 *AtBOP1*、*AtBOP2* 及 *NtBOP3*、*NtBOP4*、*OsNPR5* 处于同一分支，推测这 7 个基因可能与植物器官发育有关[13]。香蕉 NPR1 基因与水稻 NPR1 基因亲缘关系最为相近，这一点与香蕉和水稻都是单子叶植物，而烟草与拟南芥都是双子叶植物的分类是相近的（图 2）。

多序列比对显示 NPR1 基因重要的功能结构域、氨基酸残基在多物种间高度保守（图 3），表明了在植物中 NPR1 基因潜在的功能高度保守。结果可见，香蕉 NPR1 基因家族成员中 Cys82/Cys216 是高度保守的，在不受诱导的状态下，NPR1 低聚体不会解聚成为单体进入核内，不会诱导 SAR 的建立。NPR1 基因 N 端的类似 IκB 的磷酸二酯基序对于激活目标基因的表达有一定作用，IκB 是哺乳动物免疫中重要的转录调节因子，与 NPR1 基因结构类似[27]。香蕉 NPR1 基因家族与其他植物相同，多序列比对结果可见第 1 及第 2 分支的 8 个成员 Ser11/Ser15 残基是高度保守的，因此这 8 个 NPR1 成员蛋白能够在 SAR 诱导剂存在的情况下发生磷酸化，进而经过蛋白酶体介导的转换，并参与调节植物的免疫功能[28]。



A：香蕉 NPR1 基因家族种间进化树；B：香蕉 NPR1 基因家族成员外显子与内含子结构图；C：香蕉 NPR1 基因家族成员功能结构域分布

A：Phylogenetic analysis between the banana NPR1 gene family members，B：Exon and intron structures of the Banana NPR1 gene family members，C：Structure of the Banana NPR1 family proteins

图 1　香蕉 NPR1 基因家族成员种内进化树构建、基因结构及结构域分析

Fig.1　The classification of phylogenetic tree，gene tructure and domain analysis of banana′s NPR1 gene family members

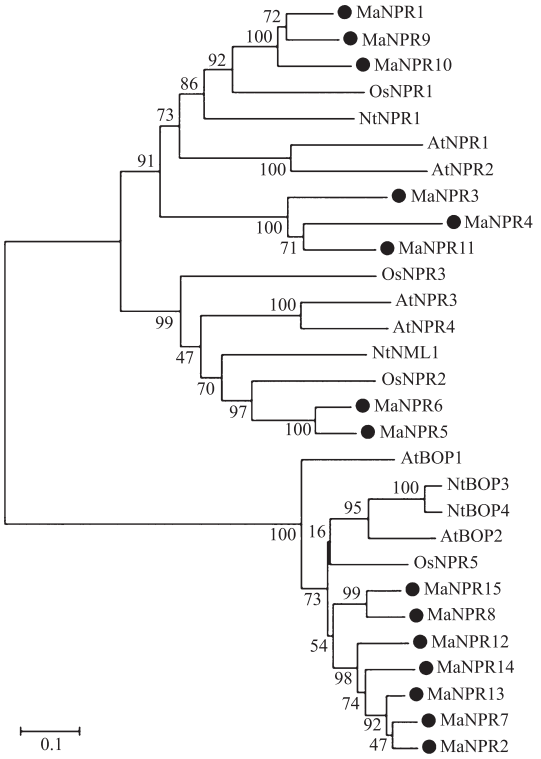


图 2　香蕉 NPR1 蛋白家族的系统发育分析

Fig.2　Phylogenetic analysis of the banana NPR1 protein family

2.3　基因定位及复制关系分析

为了确定香蕉中 15 个 NPR1 成员在基因组上的定位。利用已经发表香蕉基因组数据将香蕉中 15 个 NPR1 成员定位在香蕉基因组 11 条染色体上（图 4），结果可见香蕉中 15 个 NPR1 成员分布在除 1 号染色体之外的其余 10 条染色体上，分布较为均匀。其中，2、4、6、7、9、10、11 号染色体上均只有 1 个 NPR1 基因，3 号及 5 号染色体均含有 3 个 NPR1 基因。复制关系分析表明香蕉中 15 个 NPR1 基因中 10 个基因存在复制关系，*MaNPR1*、*MaNPR9* 及 *MaNPR10* 之间存在复制关系；*MaNPR2*、*MaNPR7* 与 *MaNPR12* 之间存在复制关系；*MaNPR4* 与 *MaNPR11* 之间存在复制关系；*MaNPR5* 与 *MaNPR6* 之间存在复制关系。

2.4　香蕉 NPR1 基因在巴西蕉及 GCTCV-119 表达分析

在巴西蕉受枯萎病菌胁迫下转录组数据中，*MaNPR1*、*MaNPR2*、*MaNPR3*、*MaNPR4*、*MaNPR5*、*MaNPR9*、*MaNPR11* 及 *MaNPR13* 这 8 个成员的 RPKM 值（RPKM 值被用于估计基因的表现量）在接种 Foc TR4 后显著差异表达（图 5）。说明这些成员可能参与香蕉响应 Foc TR4 侵染的过程。

RT-qPCR 结果可见，接种 Foc TR4 后，*MaNPR4*、*MaNPR5*、*MaNPR11* 在感病品种中下调表达，在

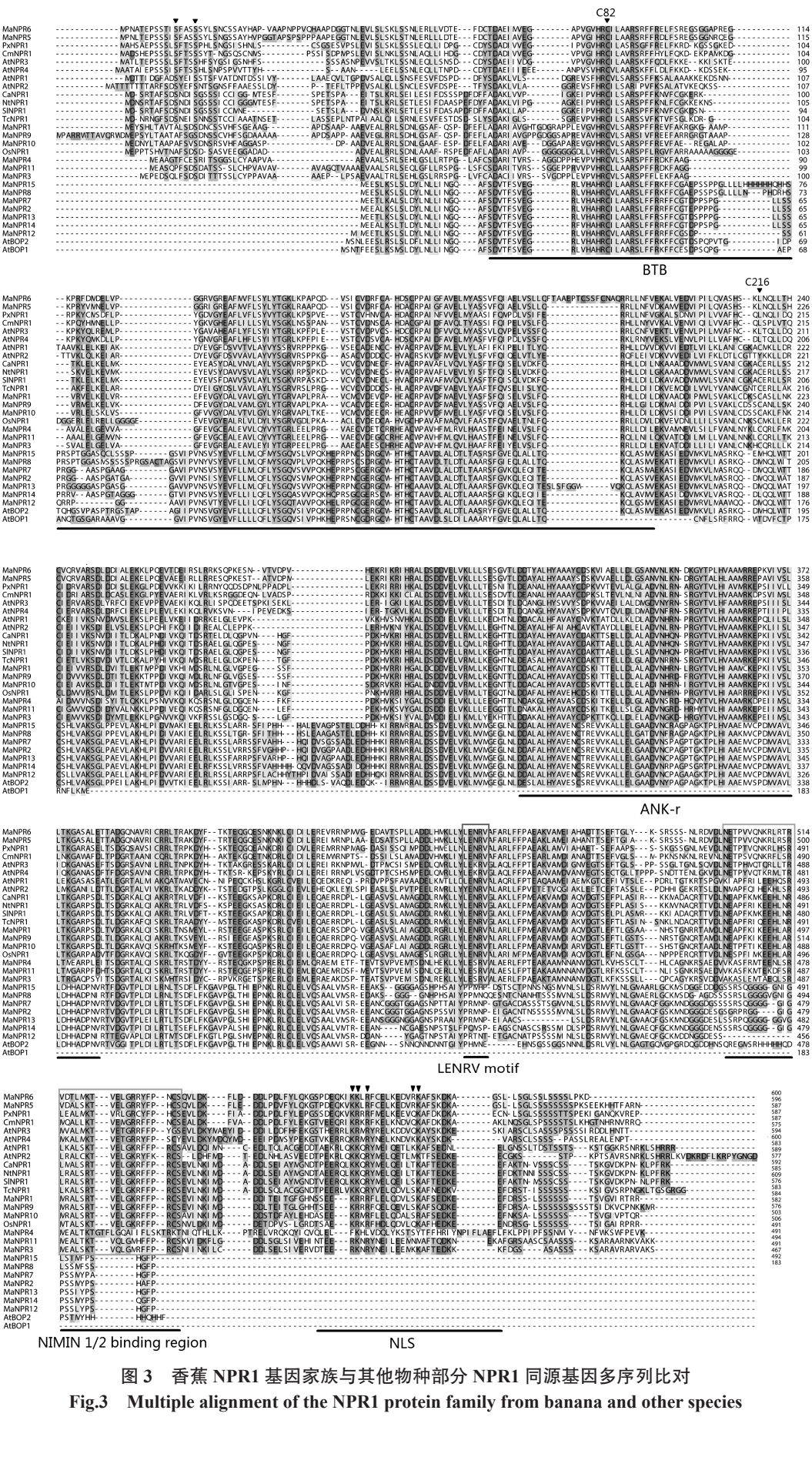


图 3 香蕉 NPR1 基因家族与其他物种部分 NPR1 同源基因多序列比对

Fig.3 Multiple alignment of the NPR1 protein family from banana and other species

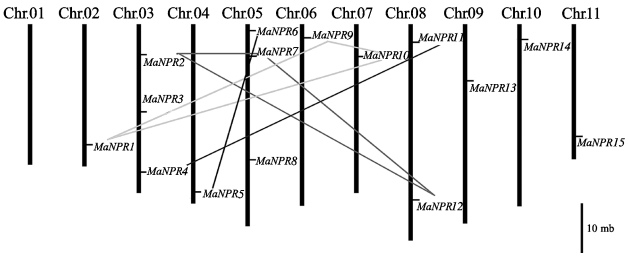


图 4　香蕉 NPR1 基因在染色体上分布及基因复制关系

Fig.4　Chromosomal distribution and duplication events of the banana NPR1 genes

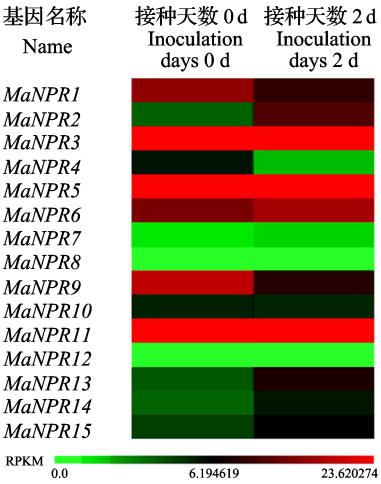


图 5　巴西蕉接种后 0 d 及接种后 2 d 根系香蕉 NPR1 基因家族成员表达热图

Fig.5　Heat map of the banana NPR1 gene family members of the Cavendish 0DPI（Day Post Inoculation）and 2DPI root

抗病品种 GCTCV-119 中表达量上调。其中 *MaNPR4* 在巴西蕉中的表达随着侵染时间延长表达量不断降低，6 d 时达到最低；而在耐病品种 GCTCV-119 中 *MaNPR4* 表达量呈上调趋势，4 d 时达最高，为 0 d（对照）时表达量 12 倍。*MaNPR5* 同 *MaNPR4*，在耐病品种 GCTCV-119 中侵染 4 d 时表达量达最高，为 0 d（对照）时表达量 6 倍。*MaNPR11* 在易感病巴西蕉中的表达量受到抑制，侵染 6 d 时表达量最低；在耐病品种 GCTCV-119 中的表达量随着侵染时间不断延长，6 d 时最高，为 0 d（对照）时表达量 5 倍（图 6）（以上各个时间点表达量与 0 d（对照）的表达量比较均值分析，均有显著差异或极显著差异）。其中 *MaNPR4* 及 *MaNPR11* 在抗和感病品种接种 Foc TR4 后均差异表达，且与抗性正相关。因此推测 *MaNPR4*、*MaNPR5*、*MaNPR11* 是香蕉 NPR1 基因家族介导香蕉抗枯萎病的关键成员。

3　讨论

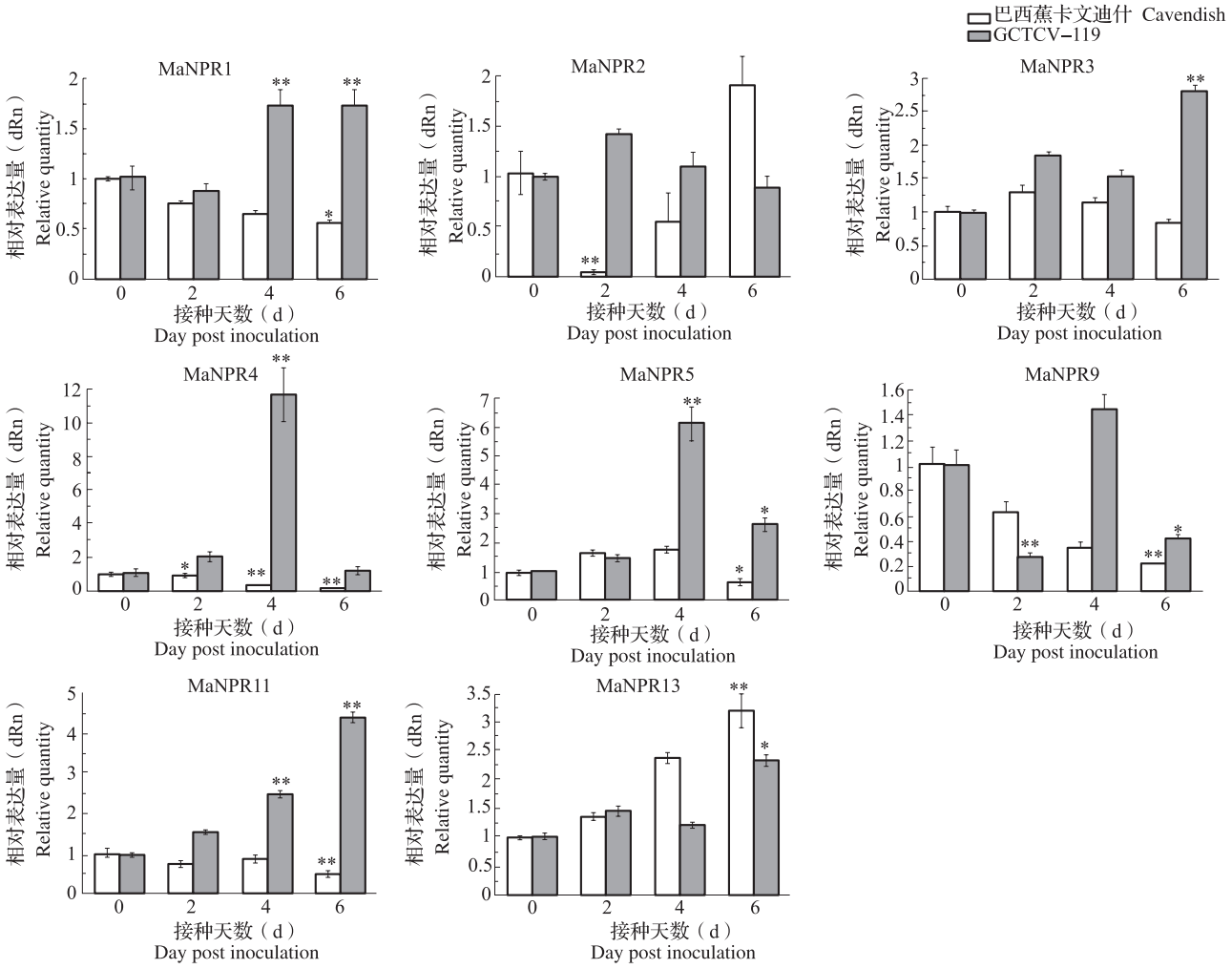
现在 NPR1 的很多同源基因不断被研究其抗病性，为其作为园艺植物抗病育种奠定理论基础。在模式植物拟南芥研究背景下，已证明 SA 介导的 PR 基因的激活是由转录调节因子 NPR1 介导的[9, 29-30]。过表达该基因增强了对许多生物和非生物胁迫的抗性[1, 31]。因此 NPR1 是抗病育种手段利用的抗病基因中的一个强有力的竞争者。

本研究首次在全基因组水平对香蕉 NPR1 基因家族进行系统分析，鉴定出 15 个 NPR1 基因成员。这些成员表现出相似的基因结构，编码的蛋白序列氨基酸残基数目介于 466~608 之间，预测蛋白分子质量为 50918.43~66962.49 Da，理论等电点为 5.24~6.99，与其他作物如鳄梨中所报道的较为一致[14]。蛋白序列分析也显示拟南芥 NPR1 基因含有的典型结构域 BTB 结构域以及 ANK-repeat 锚蛋白重复序列结构域；LENRV 等基序；与 NPR1 低聚体形成相关的氨基酸残基 Cys82/Cys216 及与介导 NPR1 降解相关的 Ser11/Ser15 在香蕉 NPR1 基因家族成员中是高度保守的，这些都是 NPR1 基因的重要组成部分[4-8]。种间进化树也显示 NPR1 蛋白进化关系分为 3 个分支，每个分支均含有拟南芥 NPR1 基因，香蕉 NPR1 基因在 3 个分支均有分布，这与番木瓜及鳄梨的进化树分支情况一致[11, 14]。上述结果充分说明了这些成员确实是香蕉 NPR1 基因。

香蕉 NPR1 基因家族成员较其他物种多，香蕉基因组发生过 3 次全基因组复制事件，NPR1 基因家族成员中 10 个成员之间存在复制关系，是导致香蕉 NPR1 基因家族成员较其他物种多的可能原因。

生物信息学分析显示，种内进化树分支情况、内含子数目及关键功能结构域的分布情况高度一致，表明香蕉 NPR1 家族不同成员发生功能分化，2 个分支各司其职，在植株生长发育过程中行使不同功能，初步判断其中与抗病性相关成员 8 个，与植物生长发育相关成员 7 个。建立多物种间 NPR1 基因系统发育关系发现并未出现新的功能分支，可见 NPR1 基因功能在植物进化过程中高度保守。且香蕉 NPR1 基因与水稻 NPR1 基因亲缘关系最为相近，这一点与香蕉和水稻都是单子叶植物，而烟草与拟南芥都是双子叶植物的分类是相近的，表明 NPR1 基因进化有向单子叶、双子叶分化的趋势。

香蕉 NPR1 基因家族成员在抗感病品种，即巴西蕉与 GCTCV-119 中具有不同的表达模式。*MaNPR4*、*MaNPR5* 及 *MaNPR11* 表现出在抗病品种中表达量上调，且其中 *MaNPR4*、*MaNPR11* 表现出在抗感品种中差异表达，表明 *MaNPR4* 及 *MaNPR11*



*：P<0.05 有显著性差异；**：P<0.01 有极显著差异

*：P<0.05 has a significant difference，**：P<0.01 has a significant difference

图 6 香蕉 NPR1 基因家族成员在巴西蕉及 GCTCV-119 接种 Foc TR4 的表达分析

Fig.6 Expression analysis of MaNPR1 gene family members of Cavendish and GCTCV-119 inoculated by Foc TR4

可能参与香蕉抗枯萎病过程。是进一步选择关键基因进行功能验证的重要依据。

参考文献

[1] Lin W C, Lu C F, Wu J W, Cheng M L, Lin Y M, Yang N S, Black L, Green S K, Wang J F, Cheng C P.Transgenic tomato plants expressing the *Arabidopsis* NPR1 gene display enhanced resistance to a spectrum of fungal and bacterial diseases. Transgenic Research, 2004, 13(6): 567-581

[2] Yuan Y X, Zhong S H, Li Q, Zhu Z R, Lou Y G, Wang L Y, Wang J J, Wang M Y, Li Q L, Yang D L, He Z H.Functional analysis of rice NPR1-like genes reveals that OsNPR1/NH1 is the rice orthologue conferring disease resistance with enhanced herbivore susceptibility.Plant Biotechnology Journal, 2007, 5(2): 313-324

[3] El Oirdi M, El Rahman T A, Rigano L, El Hadrami A, Rodriguez M C, Daayf F, Vojnov A, Bouaraba K.Botrytis cinerea manipulates the antagonistic effects between immune pathways to promote disease development in tomato.The Plant Cell, 2011, 23(6): 2405-2421

[4] Boyle P, Le S E, Rochon A, Shearer H L, Murmu J, Chu J Y, Fobert P R, Després C.The BTB/POZ domain of the *Arabidopsis* disease resistance protein NPR1 interacts with the repression domain of TGA2 to negate its function.Plant Cell, 2009, 21(11): 3700-3713

[5] Cao H, Glazebrook J, Clarke J D, Volko S, Dong X.The *Arabidopsis* NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. Cell, 1997, 88(1): 57-63

[6] Després C, DeLong C, Glaze S, Liu E, Fobert P R.The *Arabidopsis* NPR1/NIM1 protein enhances the DNA binding activity of a subgroup of the TGA family of bZIP transcription factors.The Plant Cell, 2000, 12(2): 279-290

[7] Kinkema M, Fan W, Dong X.Nuclear localization of NPR1 is required for activation of PR gene expression.The Plant Cell, 2000, 12(12): 2339-2350

[8] Tada Y, Spoel S H, Pajerowska-Mukhtar K, Mou Z, Song J, Wang C, Zuo J, Dong X.Plant immunity requires conformational charges of NPR1 via Snitrosylation and thioredoxins.Science(New York, N.Y.), 2008, 321(5891): 952-956

[9] Rochon A, Boyle P, Wignes T, Fobert P R, Després C.The

coactivator function of *Arabidopsis* NPR1 requires the core of its BTB/POZ domain and the oxidation of C-terminal cysteines. The Plant Cell, 2006, 18(12): 3670-3685

[10] Cao H, Li X, Dong X N.Generation of broad-spectrum disease resistance by overexpression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance.Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998, 95(11): 6531-6536

[11] Echeverria S P, Santamaría J M, Fuentes G, Cerón M A M, Reyna M A V, Valencia V A H.The NPR1 family of transcription cofactors in papaya: insights into its structure, phylogeny and expression. Genes & Genomics, 2012, 34(4): 379-390

[12] Zhang Y, Cheng Y T, Qu N, Zhao Q, Bi D, Li X.Negative regulation of defense responses in *Arabidopsis* by two NPR1 paralogs.Plant Journal, 2010, 48(5): 647-656

[13] Hepworth S R, Zhang Y, McKim S, Li X, Haughn G W.BLADE-ON-PETIOLE- dependent signaling controls leaf and floral patterning in *Arabidopsis*.The Plant Cell, 2005, 17(5): 1434-1448

[14] Backer R, Mahomed W, Bianca J R, Engelbrecht J, Laclette E, Berg N.Phylogenetic and expression analysis of the NPR1-like gene family from *Persea americana*(Mill.).Frontiers in Plant Science, 2015, 6: 300

[15] 焦鹏 . 苹果 NPR1 基因家族的全基因组鉴定与表达分析 . 杨凌：西北农林科技大学, 2016
Jiao P.Whole genome identification and expression analysis of apple NPR1 gene family.Yangling: Northwest A&F University, 2016

[16] Endaha R, Beyeneb G, Kiggunduc A, Bergd N V D, Schlütera U, Kunerta K, Chikwamba R.Elicitor and Fusarium-induced expression of NPR1-like genes in banana.Plant Physiology & Biochemistry, 2008, 46(11): 1007-1014

[17] Zhao J T, Huang X, Chen Y P, Chen Y F, Huang X L.Molecular cloning and characterization of an ortholog of NPR1 gene from Dongguan Dajiao(*Musa* spp. ABB).Plant Molecular Biology Reporter, 2009, 27(3): 243-249

[18] 李康，李胜军，于洋，董轶博，温瑞明，陈世凯，叶尚，裴新梧 . 香蕉 MuNPR1-1 基因的克隆与表达分析 . 生物技术通报, 2010(9): 76-81
Li K, Li S J, Yu Y, Dong Y B, Wen R M, Chen S K, Ye S, Pei X W.Cloning and analysis of SAR related gene MuNPR1-1 in banana.Biotechnology Bulletin, 2010(9): 76-81

[19] 王卓，徐碧玉，贾彩红，李健平，刘菊华，张建斌，苗红霞，金志强 . 香蕉 NPR1E 基因的克隆及表达分析 . 热带作物学报, 2015, 35(6): 18-24
Wang Z, Xu B Y, Jia C H, Li J P, Liu J H, Zhang J B, Miao H X, Jin Z Q.Molecular cloning and expression of MaNPR1E gene from banana(*Musa acuminata* L. AAA group, cv. Cavendish). Chinese Journal of Tropical Agriculture, 2015, 35(6): 18-24

[20] 陈淑雯，郝茜珣，贾彩霞，赵爱国，李大培，杨桂燕 . 核桃 WD40 转录因子 *JrATG18a* 基因的克隆及逆境响应 . 植物遗传资源学报, 2018, 19(5): 979-986
Chen S W, Hao X X, Jia C X, Zhao A G, Li D P, Yang G Y.Identification and stress response analysis of a WD40 transcription factor *JrATG18a* gene from juglan regia.Journal of Plant Genetic Resources, 2018, 19(5): 979-986

[21] 孙仁玮，刘永杰，王翔，张荃，张立平，孙辉，王永波，高建刚，杨卫兵，赵昌平，高世庆，韩俊 . 小麦 ARF 基因家族生物信息学分析及在干旱胁迫下的表达特性研究 . 植物遗传资源学报, 2018, 19(1): 122-134
Sun R W, Liu Y J, Wang X, Zhang Q, Zhang L P, Sun H, Wang Y B, Gao J G, Yang W B, Zhao C P, Gao S Q, Han J.Bioinformatics identification of auxin response factor genes and expression profiles under drought stress in wheat.Journal of Plant Genetic Resources, 2018, 19(1): 122-134

[22] 王敏霞，祝秀亮，罗美英，张增艳 . 小麦防御素基因 *TaPDF35* 的克隆与功能分析 . 植物遗传资源学报, 2017, 18(5): 925-932
Wang M X, Zhu X L, Luo M Y, Zhang Z Y.Cloning and defensive functional analysis of a wheat defensin gene *TaPDF35*.Journal of Plant Genetic Resources, 2017, 18(5): 925-932

[23] D′ Hont A, Denoeud F, Aury J M, Baurens F C, Carreel F, Garsmeur O, Noel B, Bocs S, Droc G, Rouard M, Da Silva C, Jabbari K, Cardi C, Poulain J, Souquet M, Labadie K, Jourda C, Lengellé J, Rodier-Goud M, Alberti A, Bernard M, Correa M, Ayyampalayam S, Mckain M R, Leebens-Mack J, Burgess D, Freeling M, Mbéguié-A-Mbéguié D, Chabannes M, Wicker T, Panaud O, Barbosa J, Hribova E, Heslop-Harrison P, Habas R, Rivallan R, Francois P, Poiron C, Kilian A, Burthia D, Jenny C, Bakry F, Brown S, Guignon V, Kema G, Dita M, Waalwijk C, Joseph S, Dievart A, Jaillon O, Leclercq J, Argout X, Lyons E, Almeida A, Jeridi M, Dolezel J, Roux N, Risterucci A M, Weissenbach J, Ruiz M, Glaszmann J C, Quétier F, Yahiaoui N, Wincker P.The banana(*Musa acuminata*) genome and the evolution of monocotyledonous plants.Nature, 2012, 488(7410): 213-217

[24] Martin G, Baurens F C, Droc G, Rouard M, Cenci A, Kilian A, Hastie A, Dolezel J, Aury J M, Alberti A, Carreel F, D′ Hont A.Improvement of the banana "*Musa acuminata*" reference sequence using NGS data and semi-automated bioinformatic methods.BMC Genomics, 2016, 17(1): 243

[25] Hwang S C, Ko W H.Cavendish banana cultivars resistant to fusarium wilt acquired through somaclonal variation in Taiwan. Plant Disease, 2004, 88(6): 580-588

[26] Wang Z, Zhang J B, Jia C H, Liu J H, Li Y Q, Yin X M, Xu B Y, Jin Z Q.De Novo characterization of the banana root transcriptome and analysis of gene expression under *Fusarium oxysporum* f.sp.*Cubense* tropical race 4 infection.BMC Genomics, 2012, 13(1): 650

[27] Ryals J.The *Arabidopsis* NIM1 protein shows homology to the mammalian transcription factor inhibitor I kappa B.Plant Cell, 1997, 9(3): 425-439

[28] Spoel S H, Mou Z, Tada Y, Spivey N W, Genschik P, Dong X.Proteasome-mediated turnover of the transcription coactivator NPR1 plays dual roles in regulating plant immunity.Cell, 2009, 137(5): 860-872

[29] Cao H, Bowling S A, Gordon A S, Dong X.Characterization of an *Arabidopsis* mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance.The Plant Cell, 1994, 6(11): 1583-1592

[30] Delaney T P, Uknes S, Vernooij B, Friedrich L, Weymann K, Negrotto D, Gaffney T, Gut-Rella M, Kessmann H, Ward E, Ryals J.A central role of salicylic Acid in plant disease resistance. Science(New York, N.Y.), 1994, 266(5188): 1247-1250

[31] Silva K J, Brunings A, Peres N A, Mou Z, Folta K M.The *Arabidopsis* NPR1 gene confers broad-spectrum disease resistance in strawberry.Transgenic Research, 2015, 24(4): 693-704