

小果野蕉(*Musa acuminata*)全基因组NBS抗病基因的鉴定与分析

刘梦雅^{1,2}, 李伟明³, 吴伟^{1*}, 葛学军¹

(1. 中国科学院华南植物园, 中国科学院植物资源保护与可持续利用重点实验室, 广州 510650; 2. 中国科学院大学, 北京 100049; 3. 中国热带农业科学院南亚热带作物研究所, 广东 湛江 524091)

摘要: 为探讨小果野蕉(*Musa acuminata*)中 NBS 基因的功能, 基于新近发表的小果野蕉全基因组序列, 对 NBS 基因家族进行鉴定、分类和染色体定位, 解析基因的复制特征、系统发育关系及上游启动子调控元件类别, 推测这些基因在小果野蕉中可能的功能。结果表明, 在小果野蕉全基因组中鉴定出 125 个 NBS 基因, 包括 78 个标准和 47 个非标准 NBS 基因。多数 NBS 基因在染色体上以基因簇形式存在, 串联复制是 NBS 基因家族扩张的主要动力。系统发育分析表明标准 NBS 基因形成两大分支, 77 个标准 NBS 基因有 EST 表达支持。这为群体水平的抗病基因型筛选提供了本底信息, 促进栽培香蕉分子抗病育种进程。

关键词: 小果野蕉; 生物信息学; 基因组; NBS 抗病基因

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2014.05.010

Identification and Characterization of NBS-encoding Disease Resistance Genes in *Musa acuminata* Genome

LIU Meng-ya^{1,2}, LI Wei-ming³, WU Wei^{1*}, GE Xue-jun¹

(1. Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Sustainable Utilization, South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. South Subtropical Crops Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Zhanjiang 524091, China)

Abstract: In order to understand the function of nucleotide-binding site disease resistance genes (NBS) in *Musa acuminata*, based on recent publication of draft genome sequence of *M. acuminata*, the genome-wide NBS-encoding genes were identified, classified and chromosome located. The characteristics of gene duplications, phylogeny construction, distribution of adjacent promoter elements, expression evidences, and homologous function inferences were analyzed. The results showed that 125 NBS genes were identified from whole genome of *M. acuminata*, including 78 regular and 47 non-regular NBS genes. They were clustered into two clades phylogenetically, and most of the regular NBS-encoding genes resided in gene clusters and tandem duplications were predominant. Expression clues were found among 77 regular genes according to the public EST database. These would provide some fundamental information about the NBS-encoding genes in *Musa* species, and promote molecular disease-resistant breeding of cultivate banana.

Key words: *Musa acuminata*; Bioinformatics; Genome; NBS-encoding disease resistance gene

收稿日期: 2014-01-14 接受日期: 2014-05-11

基金项目: 国家自然科学基金项目(31261140366, 31101535); 中国科学院植物资源保护与可持续利用实验室青年基金项目(Y2013720108014) 资助

作者简介: 刘梦雅(1988~), 女, 硕士研究生, 主要从事香蕉基因组的生物信息学分析。E-mail: mengya_liu@126.com

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: wuei@scbg.ac.cn

香蕉是热带和亚热带重要的水果和粮食作物,与人们的生产生活与经济发展息息相关。香蕉栽培种(AAA, AAB, ABB)主要是二倍体小果野蕉(*Musa acuminata*, AA)和野蕉(*M. balbisiana*, BB)的种内或种间杂交体^[1]。近几十年来,大量病害威胁着香蕉的生产,尤其以 *Fusarium oxysporum* 为病原体的枯萎病最为严重^[2]。枯萎病是香蕉毁灭性的土传维管束病害,其高感染率、蔓延范围广的特性往往会导致香蕉大面积绝产。具有保守核苷酸结合位点 NBS (Nucleotide binding site) 编码蛋白的基因是植物中广泛存在的抗病基因(Resistance gene, R), 其中一类以具有亮氨酸重复(Leucine-rich repeats, LRRs)结构域的 NBS 基因数量最多^[3-4], 称之为 NBS-LRR 类抗病基因家族(以下简称 R 基因), 拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的 *RPS2*、水稻(*Oryza sativa*)的 *Xa1*、番茄(*Lycopersicon esculentum*)的 *Prf* 都属于 NBS-LRR 类基因, 参与植物对多种病原物的抗性反应。

由于香蕉栽培种是三倍体且高度不育,通过传统杂交育种来选育抗病品种非常困难。香蕉的生命周期较长,不具有高密度遗传图谱,缺乏合适的转座子系统,至今无法使用图位克隆法和转座子标签法克隆香蕉的抗病基因。目前对香蕉抗病基因的研究主要是从栽培种和野生种中克隆 RGAs (Resistance gene analogues), Pei 等^[5]克隆得到的香蕉栽培种与野生种 NBS 类的 RGAs 都属于 non-TIR 的,由已知 R 基因构建的系统树也表明香蕉的 RGAs 与 non-TIR 类的 R 基因聚集成一支,而且 RGAs 在野生种和栽培种的分布差别也不大; Peraza 等^[6]克隆了抗尖孢镰刀菌 4 号小种的 *M. acuminata* 的抗病基因候选序列(Resistance gene candidates, RGCs),结构和系统发育的分析都表明这些 RGCs 属于 non-TIR 类,并分成 5 组。RGAs 法为了解香蕉抗病的复杂机制、R 基因进化提供了一定的线索,但它不能鉴定出 NBS 基因家族的全部成员、也无法判断哪些 RGAs 属于真正的 R 基因。

栽培作物的野生近缘种蕴藏了丰富的优良抗病基因资源,是作物遗传改良的宝贵资源。D'Hont 等^[7]对小果野蕉基因组的 NBS 进行了初步鉴定,并对这些 NBS 基因进行了简单的分类和大致的染色体定位。为了充分利用野生芭蕉近缘种的抗病资源,本研究将基于已发表小果野蕉全基因组序列,对 NBS 基因进行全面的鉴定,并从结构多样性、染

色体定位、基因复制、系统发育、启动子及 EST 表达等方面对这些基因进行系统分析。鉴于野生芭蕉属物种间基因组强烈的共线性关系,这些 NBS 基因组水平的信息将为未来在野生近缘种中克隆同源 NBS 抗病基因,以及在群体水平上筛选抗病基因型提供本底信息,促进栽培香蕉分子抗病育种进程。

1 材料和方法

1.1 NBS 编码基因的鉴定

从香蕉基因组数据库(<http://banana-genome.cirad.fr/>)下载小果野蕉(*Musa acuminata*)全基因组核苷酸序列以及已注释的 CDS (Coding sequence)与氨基酸序列。第一步进行全基因组含 NBS 结构域核苷酸序列搜索, (1) 利用 BioEdit7.0^[8]中 BLAST 模块构建全基因组核苷酸的本地库。基于剖面隐马尔可夫模型(profile Hidden Markov Models, HMMs), 利用 Pfam 数据库(<http://pfam.sanger.ac.uk/>)中 NB-ARC 保守结构域(PF00931)对构建的本地库进行 tBLASTn 同源比对(E-value=1.0); (2) 利用 EditSeq^[9]导入各比对上的核苷酸片段所在的整个染色体序列,通过对这些片段上下游各 3 kb 序列的注释,进一步确认这些比对上片段的基因注释; (3) 在 Pfam 上验证注释的氨基酸序列有无 NBS, 剔除不含 NBS 结构域的基因。第二步对已注释 CDS 与 pep 序列验证:采用 HMMs, 通过 NB-ARC 与已注释的 CDS 序列进行 tBLASTn 比对,到 pep 序列检索匹配基因的氨基酸序列,在 Pfam 上验证有无 NBS, 剔除不含 NBS 结构域的基因。第三步整合前两步结果,剔除二者重复的基因,统计 NBS 基因总数。

1.2 NBS 基因的分类

分析小果野蕉 NBS 基因的 N 端结构和 LRR 结构,鉴定其结构多样性。先用 Pfam 确定 NBS 基因是否编码 NBS、LRR、TIR 结构域,再对 NBS 基因的氨基酸序列在 COILS 服务系统(http://embnet.vital-it.ch/software/COILS_form.html, 阈值取 0.9)进行序列搜索^[10],鉴定是否编码 CC 结构域。

1.3 标准 NBS 基因的染色体定位

对获得的标准 NBS 基因,通过 BLAST (<http://genome.ucsc.edu/FAQ/FAQblat.html>)与全基因组核苷酸序列本地库同源比对,确定其在染色体上的始终

位置。然后用 MapInsect (http://www.plantbreeding.wur.nl/uk/software_mapinspect.html)作标准 *NBS* 基因的染色体定位图。

1.4 标准*NBS*基因的复制

对获得的标准 *NBS* 基因,利用 DNAMAN 构建 *NBS* 结构域的同源树,并计算同源性。Gu 等^[11]将基因复制定义为:(1) 相对较长的基因有 >70% 序列部分可以排列的;(2) 在可排列的区域序列的相似程度 >70%;(3) 紧密相连的基因中只发生过一次复制事件。依据以上 3 个准则,统计分析标准 *NBS* 基因的复制事件。

1.5 标准*NBS*基因的系统发育分析

NBS 结构域编码的氨基酸序列含有高度保守的基序,使得对小果野蕉标准 *NBS* 基因的多序列比对和系统发育树重建成为可能^[12]。根据 Pfam 分离的 *NBS* 结构域,用 CLUSTAL W^[13]对它们的氨基酸序列进行多序列比对,再用 MrBayes 3.2.2^[14]构建基因树。参数设置如下:prset aamodelpr=mixed; mcmc nchains=1 ngen=300000。

1.6 标准*NBS*基因的表达验证

为初步了解标准 *NBS* 基因在不同器官和组织中的表达模式,将每个 *NBS* 基因的 CDS 序列与 NCBI 上的香蕉 EST 数据库 [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST>, Banana(txid4641)] 分别进行 BLASTn 比对^[15]。对获得的数据按不同器官和组织进行统计分析。

1.7 标准*NBS*基因的启动子区域分析

根据 BLAST 鉴定的每个 *NBS* 基因的起始位置,分离出每个基因上游 2 kb 区域,在 PLACE 数据库^[16]中搜索,统计充分表达的、已知参与抗病反应和压力条件下的调控元件。其中,对与 WRKY 转录因子有关的 WBOX [序列为 TGAC(C/T)]^[17]、CBF (序列为 GTCGAC)和 DRE [(G/A)CCGAC]^[18]以及与 ERF-type 转录因子有关的 GCC boxes^[19]作进一步分析。

2 结果和分析

2.1 *NBS*基因的鉴定与分类

在 Pfam 数据库中根据 *NBS* 结构域同源搜索,

从小果野蕉的双单倍体基因型 DH-Pahang 基因组上鉴定出 125 个 *NBS* 基因。根据典型的 *NBS* 结构域的长度,78 个为标准 *NBS* 基因,其它 47 个为非标准 *NBS* 基因(*NBS* 结构域太短,不到正常长度的 2/3)不用于后续分析。参照拟南芥^[20]和水稻^[21]*NBS* 基因的分类,依据 N 端是否编码 CC、TIR 及 C 端是否编码 LRR,小果野蕉的标准 *NBS* 基因可分为 6 类:N、NL、CN、CNL、CNLL、CNLXN (表 1)。所有 *NBS* 基因中均未发现编码 TIR 的结构域,这与其他单子叶植物,如水稻^[21]和高粱(*Sorghum bicolor*)^[22]的结果类似,水稻中没有 *TNL* 基因,但有 3 个 *TIR-NBS* 基因、不含 LRR,说明在单子叶植物中不含或含有极少数 TIR 编码的抗病基因。情况相反的是,拟南芥^[20]总共 207 个 *NBS* 基因中有 114 个在 N 端编码 TIR 结构域,其他双子叶植物也含有很多的 TIR 编码基因。单子叶植物 *NBS* 基因缺失 TIR 结构域的原因还不清楚,很可能是祖先 *NBS* 基因在单子叶与双子叶植物共同祖先中谱系随机分选(Lineage sorting)造成的。

2.2 标准*NBS*基因的染色体定位

根据 BLAST 比对的起始位置将大部分 *NBS* 基因定位于染色体上(图 1),少数 *NBS* 基因由于基因组测序的 gaps 无法定位于某一确定染色体上,将其定位于染色体 0 上。可以看出,标准 *NBS* 基因或单独或成簇分布于染色体上,且非随机分布。染色体 3 上含较多 *NBS* 基因(11 个),且种类较多(N、NL、CN、CNL、CNLL 共 5 类),而染色体 2 仅有 2 个基因。此外,CC 类与 non-CC 类 *NBS* 基因在染色体上的分布并无明显差异。

对拟南芥和水稻研究表明,大多数 *NBS* 基因以“基因簇”(gene cluster)形式存在。Holub^[23]定义基因簇为:200 kb 内的染色体区域里存在 2 或 2 个以上基因数。据此标准,小果野蕉中约有 58.97% (46/78)的 *NBS* 基因成簇分布,共有 15 个基因簇,大部分基因簇含 2 或 3 个基因,而染色体 3 和 10 上的部分基因簇含有 6 个基因,这与拟南芥和水稻的类似,可能是串联复制或片段复制的结果。

2.3 标准*NBS*基因复制的分析

基因家族的扩张是基因复制的结果,根据作用时期和发生范围,基因复制可以分为全基因组复制、片段复制、串联复制几种形式。本研究中,39

表 1 小果野蕉全基因组 NBS 基因数量

Table 1 Numbers of NBS genes in *Musa acuminata* genome

结构 Structure	代码 Code	数量 Number
标准 NBS 基因 Regular NBS genes		
NBS	N	18
NBS-LRR	NL	13
CC-NBS	CN	17
CC-NBS-LRR	CNL	28
CC-NBS-LRR-LRR	CNLL	1
CC-NBS-LRR-X-NBS	CNLXN	1
合计 Total		78
非标准 NBS 基因 Non-regular NBS genes		
NBS	/	24
NBS-LRR	/	6
CC-NBS	/	10
CC-NBS-NBS	/	2
NBS-NBS-NBS	/	2
NBS-LRR-LRR	/	1
NBS-X	/	1
CC-NBS-X-X	/	1
合计 Total		47
总和 Sum		125

X: 未知基序。

X: Unknown gene sequences.

个小果野蕉标准 NBS 基因出现基因复制现象,形成 12 个基因家族,每个基因家族的成员平均为 3.25,最大的基因家族成员数为 6;其中 1 个家族的 NBS 基因高度同源(71%),但位于不同染色体上,在系统树上也在同一支上,归入片段复制;其余 11 个基因家族是串联复制,84.6%的成员(33/39=84.6%)位于串联基因簇上。因此串联复制是小果野蕉 NBS 基因复制的主要形式,这也与水稻或拟南芥的类似^[20-21]。将小果野蕉与拟南芥^[20]、水稻^[24]的 NBS 基因复制进行比较,结果表明(表 2),小果野蕉的多基因家族占 50%,比拟南芥(46.6%)要高;基因家族平均成员数与拟南芥的相当(3.24),但高于水稻(2.67),揭示小果野蕉全基因组内基因复制事件可能比拟南芥和水稻更多。

小果野蕉 15 个基因簇中有 10 个检测到基因复制事件,这说明大部分基因簇的形成是基因串联复制的结果。还有一些 NBS 基因没有与其他 NBS 基因聚集成簇,如 *chr9T23050*、*chr2T03610*

等,它们都是单个分布的基因(Singleton),有的 singleton 与其他染色体的 NBS 基因同源性很高,如 *chr9T23050* 与 *chr3T27817*,这是片段复制的结果。尽管小果野蕉 NBS 基因的片段复制比率较低(1/12),但这些基因却可能是产生新基因簇的先鋒者^[25]。

2.4 标准 NBS 基因的系统发育分析

通过构建系统树,可推断 NBS 基因的系统发育关系和基因家族的进化历史。根据拟南芥 NBS 结构域构建的系统树可以将 NBS 基因分为明显的两大支,正好对应于 N 端是否含 TIR^[26]。水稻 NBS 系统树则没有明显分组,它有许多辐射分支、成星状拓扑结构^[21]。图 2 是小果野蕉 NBS 基因的 NJ 树,明显分成两大支,且两个分支都含 CC 类基因(图 2 蓝色字体表示),说明小果野蕉的 NBS 基因的进化模式类似于拟南芥,但又不完全一样。

对小果野蕉 78 个标准 NBS 基因构建的系统

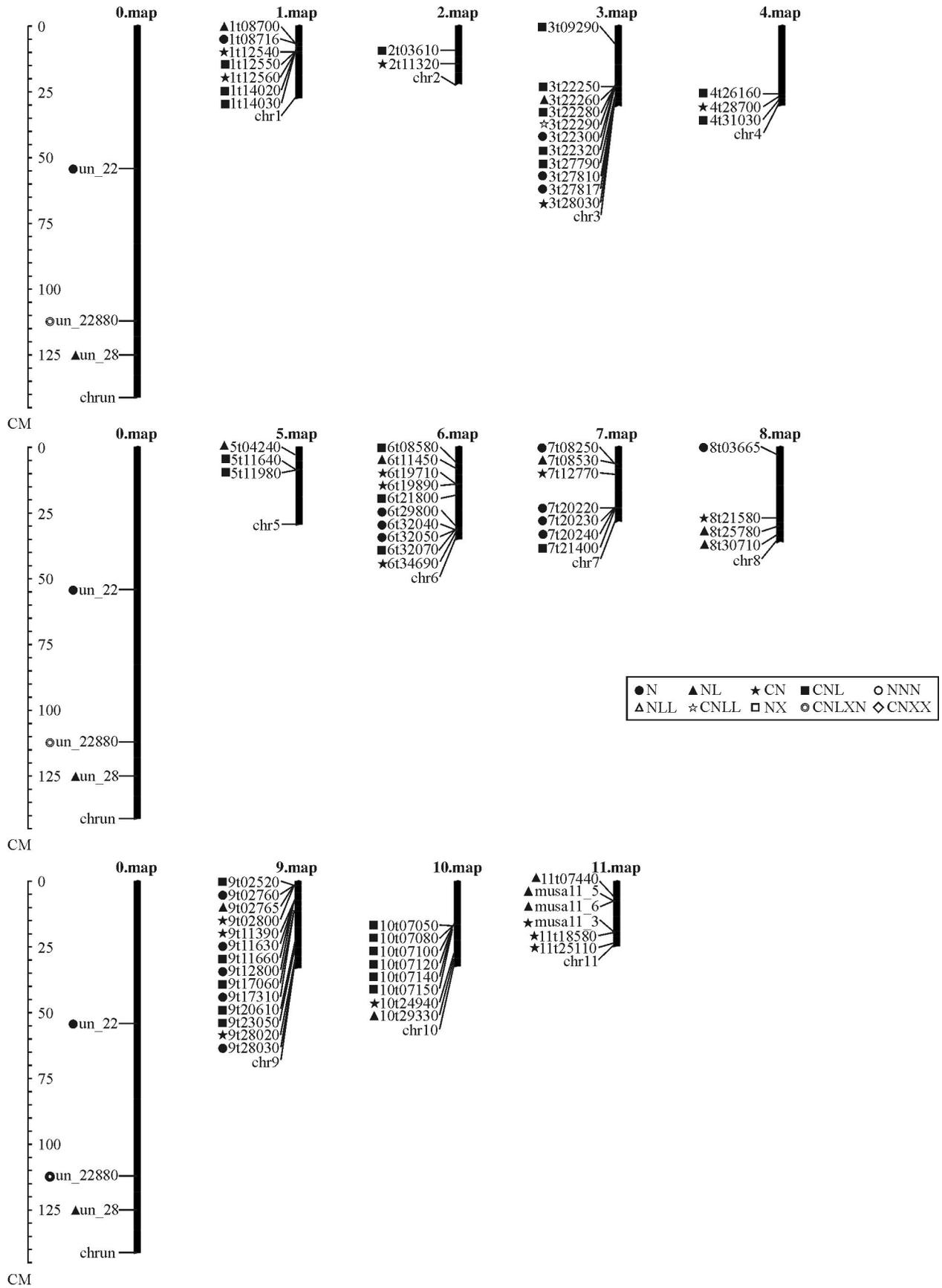


图 1 小果野蕉标准 NBS 基因在染色体上的定位

Fig. 1 Physical location of regular NBS genes in *Musa acuminata*

发育树进行分析,结果表明,同一基因家族的成员聚集在一个分支上,但是同一基因簇的基因则可能分布在多个分支上。此外,来自某一个染色体的基因往往聚集在同一分支上,但有的分支也含有小部分来自其他染色体的基因,称为“混合支”。产生混合支的原因有很多,如染色体重排、转座、大范围的基因复制或突变等^[25]。小果野蕉 *NBS* 基因在系统树上呈现不均衡的混合系统分支现象与拟南芥^[20]、水稻^[27]类似。

2.5 标准*NBS*基因的EST表达证据

对小果野蕉 78 个 *NBS* 基因的 CDS 序列与 GenBank 中栽培香蕉以及两个亲本的 EST 数据库[Banana(txid4641)]进行 BLASTN 比对,同源相似性 $\geq 95\%$ 的基因视为有表达支持^[15]。结果表明,有 77 个基因有表达支持,根据表达部位分成 5 个组,即叶子、根、果实、叶和芽分生组织、多重表达,其中,11 个仅在 1 种器官或组织中表达,其它 66 个在多个器官或组织中具有表达(即多重表达)。叶子、根、果实、叶和芽分生组织中表达的 *NBS* 基因数分别为 68、40、49、55。此外,少数基因家族内成员有完全相同的 EST 表达支持模式(*chr1T14030* 和 *chr1T14020*),大部分基因家族成员的 EST 表达支持模式不同。这说明复制基因的功能多样性可能是它们长期进化的一个主要特征。

2.6 标准*NBS*基因的启动子区域和功能分析

对小果野蕉 *NBS* 基因上游 2 kb 启动区域的

分析结果表明,共有 4 个调控元件 CBF、DRE、GCC、WBOX,这与苜蓿(*Medicago sativa*)的类似^[15]。所有标准 *NBS* 基因都含 WBOX,每个基因含 17.14 个,高于苜蓿(CNL 有 8.6 个、TNL 有 8.4 个),且 80.78% 的 *NBS* 基因含 10 个及以上的 WBOX。每个 *NBS* 基因含有 2.56 个 CBF、1.44 个 DRE、0.44 个 GCC 调控元件,约有 17.95% 的 *NBS* 同时含这 4 个调控元件。然而每个 *NBS* 基因的 EST 表达支持数和 WBOX 数间没有显著的联系,这 4 个调控元件的排列与 EST 表达之间也无明显的联系。不同的系统分支之间、甚至是同一系统树分支中高度相似基因的 EST 表达支持数目和 WBOX 数目变化也很大。

根据同源序列可能的功能相似性,我们从 NCBI 下载目前功能较为清楚的已知 *R* 基因(总共 46 个 *R* 基因,包括拟南芥的 *RPS2*、水稻的 *Xa1*、番茄的 *Prf* 等),将它们与小果野蕉中 125 个 *NBS* 基因进行批量 BLAST 比对,初步推测小果野蕉中这些 *NBS* 基因可能的功能。对同源比对结果进行严格的过滤(期望值 E-value $< 1.0 \times 10^{-6}$, 比对得分 Score > 300),结果得到 10 个与其它物种同源性很高的 *NBS* 同源基因(表 3),比如 *chr6T21800* 基因与水稻专性白叶枯病 *NBS* 抗性基因 *Xa1* 高度同源;*chr7T08530* 与拟南芥霜霉病抗性基因 *RPS5* 也具有很高的同源性;这 2 个基因和其它 8 个基因为香蕉相关抗病研究提供了重要候选基因。但是,这种同源性方法只是对小果野蕉 *NBS* 基因功能的初步判断,具体功能还有待进一步验证。

表 3 香蕉亲本小果野蕉的 *NBS* 基因与已知功能 *R* 基因的 BLAST 结果

Table 3 BLAST results of *NBS* genes in *Musa acuminata* with 46 functional *R* genes

<i>NBS</i>	<i>R</i>	一致性 Identity (%)	比对长度 Alignment length	期望值 E-value	得分 Score
chr6T21800	<i>Xa1</i>	36.76	789	3×10^{-119}	419
chr9T12800	<i>Rxo1</i>	37.13	913	5×10^{-151}	524
chr7T08530	<i>RPS5</i>	31.41	882	5×10^{-93}	332
chr7T20230	<i>RPP8</i>	31.31	923	1×10^{-105}	374
chr8T25780	<i>RPM1</i>	33.41	928	2×10^{-146}	509
chr7T21400	<i>Rpg1-b</i>	34.99	1186	1×10^{-151}	526
chr4T31030	<i>Rpl-D</i>	41.53	667	3×10^{-123}	432
chr10T29330	<i>R3a</i>	35.34	1081	1×10^{-155}	540
chr9T17310	<i>Pm3b</i>	32.94	1023	4×10^{-124}	435
chr5T11640	<i>Fom-2</i>	31.68	1051	7×10^{-120}	421

3 讨论

本研究系统地对香蕉亲本小果野蕉全基因组的NBS基因进行了鉴定与分析,鉴定出的NBS基因比D'Hont多8个。小果野蕉NBS基因在基因组上呈不均匀分布且成簇,存在“热点区域”,并且热点区域内的基因有很高的同源性(70%以上),推测其可能是串联复制、随后在分歧选择压力(Diversifying selection)下产生的^[22]。系统发育分析表明,串联复制造成同一个基因家族的成员聚集在一个分支上,与小部分来自其他染色体的基因形成混合支,主要与染色体重排、转座、大范围的基因复制有关^[25]。

串联复制和片段复制是基因家族扩张的主要动力^[28]。本研究中,小果野蕉的NBS基因复制率虽然比水稻更高,NBS基因数目却更少,已知NBS基因数量与基因组大小、编码蛋白基因总数都无关^[29]。因此,除了基因的复制频率,还有其它一些更为复杂的因素需要考虑,这一现象有待深入研究。相当一部分NBS基因成簇分布表明,串联重复相对于片段化重复是小果野蕉NBS基因家族扩张中更为重要的进化动力。

通过挖掘EST数据库可间接了解NBS基因的表达情况,结果表明,大部分的小果野蕉NBS基因是组成型表达,但是表达水平还不清楚。这说明NBS基因复制后的假基因化频率很低。由于不清楚这些NBS基因具体的功能,因此这些基因是否有功能冗余也仍然不清楚,有待进一步的验证。此外,我们使用的包含NBS基因的EST文库大部分都是在正常条件非病害胁迫下表达的,这说明很多NBS基因可能除了与抗病有关外还有其它功能。大部分的NBS基因在多种组织和器官中都有表达,说明大部分NBS基因的表达没有组织特异性。

本研究全面鉴定了小果野蕉基因组的NBS基因,揭示了NBS基因的基本进化特征,此外,根据与其它模式物种或作物中的功能已知NBS基因的序列同源性,预测了部分小果野蕉NBS基因的可能功能,为未来香蕉抗病基因的筛选提供了候选基因。

致谢 南京大学生命科学学院杨四海教授、袁阳对小果野蕉全基因组NBS基因的鉴定给予了帮助,在此表示衷心感谢!

参考文献

- [1] Simmonds N W, Shepherd K. The taxonomy and origins of the cultivated bananas [J]. Bot J Linn Soc, 1955, 55(359): 302–312.
- [2] Ploetz R C. Panama disease: Return of the first banana menace [J]. Int J Pest Manage, 1994, 40(4): 326–336.
- [3] Hammond-Kosack K E, Jones J D G. Plant disease resistance genes [J]. Annu Rev Plant Biol, 1997, 48(1): 575–607.
- [4] Dangl J L, Jones J D G. Plant pathogens and integrated defence responses to infection [J]. Nature, 2001, 411(6839): 826–833.
- [5] Pei X, Li S J, Jiang Y, et al. Isolation, characterization and phylogenetic analysis of the resistance gene analogues (RGAs) in banana (*Musa* spp.) [J]. Plant Sci, 2007, 172(6): 1166–1174.
- [6] Peraza-Echeverria S, Dale J L, Harding R M, et al. Characterization of disease resistance gene candidates of the nucleotide binding site (NBS) type from banana and correlation of a transcriptional polymorphism with resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4 [J]. Mol Breed, 2008, 22(4): 565–579.
- [7] D'Hont A, Denoeud F, Aury J M, et al. The banana (*Musa acuminata*) genome and the evolution of monocotyledonous plants [J]. Nature, 2012, 488(7410): 213–217.
- [8] Hall T A. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT [J]. Nucl Acids Symp Ser, 1999, 41(1): 95–98.
- [9] Burland T G. DNASTAR's Lasergene sequence analysis software [M]// Bioinformatics Methods and Protocols. United States: Humana Press, 1999: 71–91.
- [10] Lupas A, Van Dyke M, Stock J. Predicting coiled coils from protein sequences [J]. Science, 1991, 252(5009): 1162–1164.
- [11] Gu Z, Cavalcanti A, Chen F C, et al. Extent of gene duplication in the genomes of *Drosophila*, nematode, and yeast [J]. Mol Biol Evol, 2002, 19(3): 256–262.
- [12] Plocik A, Layden J, Kesseli R. Comparative analysis of NBS domain sequences of NBS-LRR disease resistance genes from sunflower, lettuce, and chicory [J]. Mol Phylogenet Evol, 2004, 31(1): 153–163.
- [13] Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice [J]. Nucl Acid Res, 1994, 22(22): 4673–4680.
- [14] Huelsenbeck J P, Bollback J P. Empirical and hierarchical Bayesian estimation of ancestral states [J]. Syst Biol, 2001, 50(3): 351–366.
- [15] Ameline-Torregrosa C, Wang B B, O'Bleness M S, et al. Identification and characterization of nucleotide-binding site-leucine-rich repeat genes in the model plant *Medicago truncatula* [J]. Plant Physiol, 2008, 146(1): 5–21.
- [16] Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, et al. Plant *cis*-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999 [J]. Nucl Acid Res,

- 1999, 27(1): 297–300.
- [17] Dong J, Chen C, Chen Z. Expression profiles of the *Arabidopsis* *WRKY* gene superfamily during plant defense response [J]. *Plant Mol Biol*, 2003, 51(1): 21–37.
- [18] Sakuma Y, Maruyama K, Qin F, et al. Dual function of an *Arabidopsis* transcription factor *DREB2A* in water-stress-responsive and heat-stress-responsive gene expression [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(49): 18822–18827.
- [19] Ohme-Takagi M, Suzuki K, Shinshi H. Regulation of ethylene-induced transcription of defense genes [J]. *Plant Cell Physiol*, 2000, 41(11): 1187–1192.
- [20] Meyers B C, Kozik A, Griego A, et al. Genome-wide analysis of NBS-LRR: Encoding genes in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2003, 15(4): 809–834.
- [21] Zhou T, Wang Y, Chen J Q, et al. Genome-wide identification of *NBS* genes in *japonica* rice reveals significant expansion of divergent non-TIR *NBS-LRR* genes [J]. *Mol Genet Genom*, 2004, 271(4): 402–415.
- [22] Cheng X, Jiang H Y, Zhao Y, et al. A genomic analysis of disease-resistance genes encoding nucleotide binding sites in *Sorghum bicolor* [J]. *Genet Mol Biol*, 2010, 33(2): 292–297.
- [23] Holub E B. The arms race is ancient history in *Arabidopsis*, the wildflower [J]. *Nat Rev Genet*, 2001, 2(7): 516–527.
- [24] Yang S, Zhang X H, Yue J X, et al. Recent duplications dominate NBS-encoding gene expansion in two woody species [J]. *Mol Genet Genom*, 2008, 280(3): 187–198.
- [25] Tan S L, Wu S. Genome wide analysis of nucleotide-binding site disease resistance genes in *Brachypodium distachyon* [J/OL]. *Comp Funct Genom*, 2012: 418208, doi:10.1155/2012/418208.
- [26] Richly E, Kurth J, Leister D. Mode of amplification and reorganization of resistance genes during recent *Arabidopsis thaliana* evolution [J]. *Mol Biol Evol*, 2002, 19(1): 76–84.
- [27] Monosi B, Wisser R J, Pennill L, et al. Full-genome analysis of resistance gene homologues in rice [J]. *Theor Appl Genet*, 2004, 109(7): 1434–1447.
- [28] Leister D. Tandem and segmental gene duplication and recombination in the evolution of plant disease resistance genes [J]. *Trends Genet*, 2004, 20(3): 116–122.
- [29] Porter B W, Paidi M, Ming R, et al. Genome-wide analysis of *Carica papaya* reveals a small NBS resistance gene family [J]. *Mol Genet Genom*, 2009, 281(6): 609–626.