



# 腐霉根腐病抗性候选基因 *GsDYRK2* 研究及大豆 DYRK 基因生物信息学分析

刘建新<sup>1</sup>, 郭新宇<sup>2</sup>, 马 乐<sup>3</sup>, 杨 光<sup>1</sup>, 毕影东<sup>1</sup>, 樊 超<sup>1</sup>, 刘 森<sup>1</sup>, 张忠林<sup>4</sup>

(1. 黑龙江省农业科学院 耕作栽培研究所/黑龙江省寒地野生大豆资源利用工程技术研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150086; 2. 哈尔滨工程大学 绿化中心, 黑龙江 哈尔滨 150001; 3. 东北林业大学 生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150040; 4. 黑龙江省林业科学院 伊春分院, 黑龙江 伊春 153000)

**摘要:**为挖掘大豆腐霉根腐病抗性基因,对野生大豆腐霉根腐病抗性候选基因—双特异性酪氨酸磷酸化调节激酶基因 *GsDYRK2* 进行研究,在大豆全基因组信息中比对该基因的同源基因家族并进行初步生物信息学分析,进一步对 18 份野生大豆材料接种大豆腐霉根腐病菌并进行鉴定和基因实时表达检测,分析 *GsDYRK2* 表达量与野生大豆资源腐霉根腐病抗性的关系。结果表明:*GsDYRK2* 与 *GmDYRK2* 序列相似度最高为 98.21%,由 722 个氨基酸残基组成,分子质量为 82 573.92 Da,等电点为 4.63,脂肪系数为 75.18,不稳定系数为 49.01,为不稳定蛋白,且为亲水性蛋白。大豆 DYRK 家族成员编码的蛋白质序列长度为 409 ~ 1 179 aa,分子量为 46 356.53 ~ 132 314.75 Da,理论等电点为 4.63 ~ 8.66,不稳定系数为 34.88 ~ 51.26,脂肪系数为 70.90 ~ 87.01。*GsDYRK2* 蛋白序列仅含 PKc\_DYRK\_like 一个一级结构域。二级结构类型及含量为:无规卷曲(48.06%) >  $\alpha$  螺旋(36.7%) > 延伸链(11.91%) >  $\beta$  转角(3.32%)。大豆 DYRK 家族可分为 4 个亚家族,分别为 Yat、DYRK1、DYRK2 和 DYRKp。*GsDYRK2* 和 *GmDYRK2* 均定位于细胞核,*GmDYRK7* 定位于细胞质,其它大豆 DYRK 蛋白均定位于细胞核。大豆 DYRK 基因启动子区域主要有 18 种顺式作用元件,可能与激素信号调控及非生物胁迫相关。经腐霉根腐病抗性鉴定,18 份野生大豆中,1 级抗病材料 1 份,2 级抗病材料 12 份,3 级抗病材料 5 份;qRT-PCR 检测结果显示,*GsDYRK2* 基因的表达量与野生大豆腐霉根腐病抗性有明显的正相关性。研究结果说明 *GsDYRK2* 基因的表达量可作为抗腐霉根腐病野生大豆资源辅助筛选的手段之一。

**关键词:***GsDYRK2*; 大豆 DYRK 基因; 生物信息学分析; 野生大豆; 腐霉根腐病; 抗性种质筛选

## Study on Pythium Root Rot Resistance Candidate Gene *GsDYRK2* and Bioinformatics Analysis of Soybean DYRK Genes

LIU Jian-xin<sup>1</sup>, GUO Xin-yu<sup>2</sup>, MA Le<sup>3</sup>, YANG Guang<sup>1</sup>, BI Ying-dong<sup>1</sup>, FAN Chao<sup>1</sup>, LIU Miao<sup>1</sup>, ZHANG Zhong-lin<sup>4</sup>

(1. Institute of Crop Cultivation and Tillage, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences/Engineering Technology Research Center for Utilization of Wild Soybean Resources in Cold Region, Harbin 150086, China; 2. Gardening Center of Harbin Engineering University, Harbin 150001, China; 3. College of Life Science, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China; 4. Yichun Branch of Heilongjiang Academy of Forestry, Yichun 153000, China)

**Abstract:** In order to explore the resistance gene to soybean pythium root rot, we studied the resistance candidate gene *GsDYRK2* of wild soybean, compared and preliminary analyzed the homologous gene family of the gene in the whole genome with bioinformatics of soybean. We further inoculated 18 wild materials with soybean pythium root rot pathogen and identified, and detected the gene expression with real time PCR, and then analyzed the relationship between *GsDYRK2* relative expression level and the resistance to pythium root rot of wild soybean. The results showed that, the sequence similarity of *GsDYRK2* and *GmDYRK2* was 98.21%, composed of 722 amino acid residues, molecular weight was 82 573.92 Da, isoelectric point was 4.63, fat coefficient was 75.18, instability coefficient was 49.01, and it was a hydrophilic protein. The protein sequences length of DYRK family members were 409 – 1 179 aa, the molecular weight was 46 356.53 – 132 314.75 Da, the theoretical isoelectric point was 4.63 – 8.66, the instability coefficient was 34.88 – 51.26 and the fat coefficient was 70.90 – 87.01. The *GsDYRK2* sequence contains only one PKc\_DYRK\_like domain. The secondary structure and content was random curl (48.06%) >  $\alpha$ -helix (36.7%) > extension chain (11.91%) >  $\beta$ -angle (3.32%). Soybean DYRK family can be divided into four subfamilies including Yat, DYRK1, DYRK2 and DYRKp. Subcellular localization showed that both *GsDYRK2* and *GmDYRK2* were localized in the nucleus, *GmDYRK7* was localized in cytoplasm and other soybean DYRK proteins were localized in nucleus. The promoter region of the soybean DYRK gene consisted of 18 *cis*-regulatory element, and soybean DYRK genes may be related to hormone signal regulation and abiotic stress. The resistance of 18 wild soybeans to pythium root rot was identified. Among them, a material was with resistance grade 1, twelve materials were with resistance grade 2, five materials were with resistance grade 3. And the qRT-PCR result showed that there was a positive correlation between the expression of *GsDYRK2* gene and the resistance of wild soybean to pythium root rot. This study showed that the expression of *GsDYRK2* gene could be used as an assistant screening method for wild soybean resistant to pythium root rot.

**Keywords:** *GsDYRK2*; DYRK gene of soybean; bioinformatics; wild soybean; pythium root rot; resistant gemplasm screening

收稿日期:2021-09-03

基金项目:黑龙江省自然科学基金(JQ2019C003);黑龙江省农业科学院院级课题(2019JJPY009);高端外国专家引进计划(G2021020)。

第一作者:刘建新(1976—),女,博士,副研究员,主要从事作物分子育种研究。E-mail:Wendyliujx@163.com。

大豆根腐病( soybean root rot)作为一种土传病害,目前在国内外大豆种植区普遍发生,给大豆生产带来了巨大损失,尤其在 我国大豆主产区东北地区,此病害常年均有发生,严重时可导致减产 60%,甚至造成绝产<sup>[1]</sup>。黑龙江省该病的发病面积约为 70 万 hm<sup>2</sup>,且随着重茬面积的增大,该病害发生程度也日趋严重,给生产造成了极大危害<sup>[2]</sup>。然而由于大豆根腐病的病原菌通常以孢子的形式存活于土壤中,并且即使离开寄主也可长期存活,存活时间可以达到 5 年以上,从而进一步加重了该病害的防治难度<sup>[3-4]</sup>。由于大豆腐霉根腐病病菌分离比例低,且与其它菌种致病性状相似等不利因素的影响,导致了大豆腐霉根腐病的研究还不够深入,因此亟待深入研究该病的致病机理,同时挖掘大豆种质资源的相应抗病基因,从而为开展大豆腐霉根腐病的抗病育种奠定基础,相关研究工作的开展对于提升我国大豆品种的市场竞争力也具有重要的理论和实际意义<sup>[5-6]</sup>。

目前在黄姜、芸豆等植物中已经克隆得到腐霉病相关抗性基因<sup>[7-8]</sup>,而大豆腐霉根腐病抗性基因研究还仅限于初步定位研究,而且候选基因克隆及功能研究还鲜见报道。本课题组通过前期北方高

寒地区野生大豆资源筛选获得了高抗资源和种间杂交群体,利用基于高密度分子标记的全基因组关联分析方法定位到了野生大豆腐霉根腐病抗性候选基因-双特异性酪氨酸磷酸化调节激酶基因(DYRK),然而该基因是否与栽培大豆及野生大豆腐霉根腐病抗性密切相关还不明确,有待于进一步证实。本研究从 NCBI 数据库中获取野生大豆 *GsDYRK2* 基因,查找大豆(William 82)中的 DYRK 全基因组信息,进行生物信息学分析预测,同时检测该基因在不同野生大豆资源中的表达情况,并分析其表达量与腐霉根腐病抗性关系,旨在为大豆抗腐霉根腐病育种研究奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

- 1.1.1 病菌菌株 大豆腐霉根腐病菌株由南京农业大学植保学院实验室提供,保存于黑龙江省寒地野生大豆资源利用工程技术研究中心。
- 1.1.2 野生大豆 供试野生大豆来源于黑龙江省寒地野生大豆资源利用工程技术研究中心的野生大豆种质资源库,共计 18 份,每份 24 粒种子,破壳处理。野生大豆材料信息详见表 1。

表 1 供试野生大豆信息  
Table 1 The information of *Glycine soja* materials in this study

资源库编号 Code in rescoure bank	采集地点 Location	荚型 Pod type	炸荚性 Shattering	籽色 Seeds color	百粒重 100-seed weight/g	蛋白质含量 Protein content/%	脂肪含量 Fat content/%
FF007	哈尔滨民主乡高速路口	直	弱	黑	1.26	46.05	7.81
FF011	哈尔滨呼兰北出口	直	弱	黑	5.10	41.74	13.62
FF018	哈尔滨双城张达屯	直	强	黑	1.30	49.51	6.03
FF053	哈尔滨市宾县吉祥村道口	直	弱	黑	1.14	48.83	6.15
FF054	哈尔滨市宾县吉祥村	直	弱	黑	1.40	47.06	7.48
FF064	佳木斯市桦南县曙光农场小五分队	直	弱	黑	1.18	50.25	6.91
FF077	七台河市勃利县双河镇恒太乡	直	强	黑	1.36	47.21	7.91
FF098	哈尔滨市阿城区八户桥边	直	弱	黑	1.14	46.80	7.63
FF203	讷河市高速 7 km	直	强	黑	1.34	48.06	6.93
FF216	拜泉县中兴村	直	强	黑	1.34	48.39	6.00
FF233	望奎县卫星村	直	弱	黑	1.44	51.35	6.71
FF280	双鸭山友谊县长安村	直	弱	黑	1.42	47.43	5.89
FF339	民主乡东郊渔村	直	弱	黑	1.08	48.42	5.98
FF379	依兰县	直	弱	黑	1.42	47.43	5.89
FF504	鹤岗	直	强	黑	1.64	44.37	8.09
FF588	鸡西虎林市虎头镇公园旁	直	弱	黑	1.64	48.30	6.70
FF604	哈尔滨市依兰县达连河镇 3 村	直	弱	黑	1.46	45.41	6.48
FF609	佳木斯桦南县桦南镇镇丰村	直	弱	黑	1.52	50.37	6.41

1.2 方法

1.2.1 基因的生物信息学分析 在 NCBI([https://](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/)

[www.ncbi.nlm.nih.gov/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/))网站,以 *GsDYRK2* 基因序列号(XM\_028361302.1)为参考,查找大豆基因组

的同源序列。下载 Pfam (<https://pfam.xfam.org/>) 数据库中大豆 DYRK 基因家族保守结构域,在大豆全基因组水平上进行搜索,合并搜索结果作为候选基因。验证是否存在保守结构域,去除冗余序列以及不完整序列,最终确认大豆 DYRK 基因家族序列。将 *GsDyrk2* 序列提交至 NCBI-CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>) 进行结构域分析。

采用 ExPASy (<http://expasy.org/>) 软件预测分析基因编码蛋白的理论等电点、氨基酸数、分子量和氨基酸数等理化性质。同时利用在线软件 (ProtScale, <https://web.expasy.org/protscale/>) 进行亚细胞定位预测和亲/疏水性预测分析。

系统进化树构建:利用 Clustal X 软件对拟南芥和 *GsDyrk* 基因序列进行多重分析。基于比对结果,利用 MEGA 5.2 软件的相邻连接法 (Neighbor-Joining) 构建系统进化树。

使用 SOPMA 及 SWISS-MODEL 在线软件对 *GsDyrk2* 序列进行二、三级结构进行预测。利用在线软件 MEME (2.3.2, <http://meme.sdsc.edu/meme>) 分析大豆 DYRK 基因的结构。选取大豆 DYRK 基因上游 1 500 bp 启动子区域序列,利用 EPD (Eukaryotic Promoter Database) 数据库进行启动子顺式作用元件分析。

1.2.2 大豆腐霉根腐病菌侵染野生大豆 大豆腐霉根腐病菌的培养:将 25 g 长粒大米 (龙稻 18) 与 18 mL 无菌水装入灭菌袋中,121 ℃、40 min 灭菌处理。于无菌操作台上将保存腐霉菌的培养基切割成 1 cm×1 cm 的方块,并将培养基块加入降至室温的灭菌米粒中,混匀,26 ℃ 培养,每天混匀 1 次,3 d 后即可得到长满菌丝的米粒。将米粒放置于锡纸上铺平,于无菌操作台中烘干,作为接种菌种备用<sup>[9]</sup>。

大豆腐霉根腐病菌接种:在苗钵中加入混合土 (蛭石:草炭土=1:1),加水至饱和。采用米粒接种法<sup>[9]</sup>,将 2 粒带菌的米粒放入苗钵中央,轻覆一层蛭石,于 26 ℃ 的温室中培养 3 d,在土壤表层可见菌丝体出现。在米粒周围 1.5 cm 处点播野生大豆种子 3 处,每处各 1 粒。每个品种播 8 苗钵,其中 4 钵接种腐霉菌,4 钵为对照。覆盖一层蛭石,于温室中培养,温度 26 ℃,光照 14 h,光强 12 000 lx。接种 14 d 后,观察发芽生长情况,并调查植株的根系情况、矮化率等,判定植株的抗性等级,同时取叶片样品做好标记后迅速置于液氮中,取出后保存在 -80 ℃ 超低温冰箱中。

1.2.3 野生大豆表型调查 株高测量:以子叶节为初始点,至植株最高点之间的距离。对照和处理组

各取 5 株,计算平均值。

矮化率计算:矮化率 (%) = (对照组株高 - 处理组株高) / 对照组株高 × 100。

病级鉴定:大豆腐霉根腐病抗性鉴定病害等级判定标准为:0 级:植株无病害,根无病斑;1 级:主根及侧根腐烂,矮化率 < 10%;2 级:主根及侧根腐烂,植株矮化,矮化率 < 20%;3 级:主根及侧根腐烂,植株矮化,矮化率 < 50%;4 级:主根及侧根腐烂,植株矮化,矮化率 < 80%;5 级:种子腐烂,无植株<sup>[1]</sup>。

1.2.4 *GsDyrk2* 基因表达量 qRT-PCR 分析 RNA 提取及反转录:将野生大豆叶片迅速在液氮中研磨,采用试剂盒 (PrimeScript™ RT reagent kit with gDNA Eraser Takara) 进行 RNA 的提取。

qRT-PCR:根据 *GsDyrk2* (NC\_041003.1) 基因的开放阅读框 (ORF) 序列,使用 Primer Premier 5 软件设计 *GsDyrk2* 基因引物 (F: 5'-CTGAA-GAGTGCCTGGATCCA-3'; R: 5'-TGTGCCTGAACAA-CCCTACT-3') 和大豆 18S 内参基因引物 (F: 5'-GAGGTAGCTTCGGCGCAACT-3'; R: 5'-GCAGGT-TAGCGAAATGCGATAC-3')。在 Roche 480 荧光定量 PCR 仪上进行 qRT-PCR,以 18S 基因作为内参基因,每个试验 3 个生物学重复。定量 PCR 试剂使用 LightCycler® 480 SYBR Green I Master,PCR 体系参照罗氏相关试剂盒说明书进行。总反应体系为 20 μL:cDNA 模板 2 μL、上下游引物各 0.8 μL、2×TB Green Premix Ex Taq II (Takara) 10 μL、补 H<sub>2</sub>O 至总体积。在 Real-Time PCR 仪 (Bio-Rad 公司) 上设置反应程序:95 ℃ 1 min;95 ℃ 20 s,58 ℃ 1 min,40 次循环。所有处理 3 次重复。

### 1.3 数据分析

利用比较 Ct 值法<sup>[10]</sup>,根据实时定量结果进行基因表达分析。利用 Excel 2003 进行数据分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 基因的生物信息学分析

2.1.1 *GsDyrk2* 与 *GmDyrk* 成员序列比对分析 通过 BLAST 比对分析及保守序列筛选,在大豆全基因组中鉴定出 11 个大豆 DYRK 家族成员。根据其在染色体上的先后顺序依次命名为 *GmDyrk1* ~ *GmDyrk11*。*GsDyrk2* 与 *GmDyrk2* 序列相似度最高,为 98.21%,基本可以判定为同一个基因。

2.1.2 蛋白质理化性质分析及亚细胞定位预测 *GsDyrk2* 序列由 722 个氨基酸残基组成,其分子质量为 82 573.92 Da,等电点为 4.63,脂肪系数为 75.18,不稳定系数为 49.01,该值大于 40,为不稳定蛋白,且为亲水性蛋白。

GmDYRK 家族蛋白质序列的长度为 409 ~ 1 179 aa,分子量为 46 356. 53 ~ 132 314. 75 Da,同时理论等电点为 4. 63 ~ 8. 66,不稳定系数为 34. 88 ~ 51. 26,脂肪系数 70. 90 ~ 87. 01。其中 GmDYRK8 和 GmDYRK9 为亲水性蛋白,其余皆为疏水性蛋白。亚细胞定位结果显示,GsDYRK2 和 GmDYRK2 均定位于细胞核。GmDYRK7 定位于细胞质,其它 GmDYRK 均定位于细胞核(表 2)。

表 2 大豆 DYRK 蛋白质的理化性质及亚细胞定位

Table 2 The physicochemical properties and subcellular localization of soybean DYRK protein								
蛋白名称 Protein name	基因序列号 Gene sequence number	氨基酸数量 Number of amino acid	分子量 Molecular weight/Da	理论等电点 Theoretical isoelectric point	不稳定系数 Instability coefficient	脂肪系数 Fat coefficient	亲/疏水性 Hydrophilia/Hydrophobicity	亚细胞定位 Subcellular position
GmDYRK1	GLYMA01G158200	445	49970. 23	8. 66	43. 71	80. 72	疏水性	细胞核
GmDYRK2	GLYMA02G257600	720	82206. 43	4. 63	49. 03	74. 44	疏水性	细胞核
GmDYRK3	GLYMA05G248500	1099	123342. 95	4. 79	43. 73	75. 91	疏水性	细胞核
GmDYRK4	GLYMA08G057200	856	96748. 49	4. 77	41. 13	76. 52	疏水性	细胞核
GmDYRK5	GLYMA08G266300	898	99609. 30	8. 10	51. 26	70. 90	疏水性	细胞核
GmDYRK6	GLYMA09G169500	1145	128558. 56	4. 97	43. 31	73. 03	疏水性	细胞核
GmDYRK7	GLYMA09G197700	445	49839. 99	8. 00	42. 45	83. 93	疏水性	细胞质
GmDYRK8	GLYMA10G064600	422	47111. 41	6. 38	34. 88	75. 14	亲水性	细胞核
GmDYRK9	GLYMA12G083800	409	46356. 53	6. 22	36. 04	75. 77	亲水性	细胞核
GmDYRK10	GLYMA16G219100	1179	132314. 75	4. 96	41. 68	73. 40	疏水性	细胞核
GmDYRK11	GLYMA16G111500	445	49751. 12	7. 96	43. 83	87. 01	疏水性	细胞核

2. 1. 3 大豆 DYRK 家族系统进化和分类 DYRK 家族可分为 4 个亚家族,分别为 Yak、DYRK1、DYRK2 及 DYRKp。选取水稻、绿豆、拟南芥、豇豆及大豆 DYRK 家族成员进行系统进化分析,由于 DYRK1 亚家族成员大部分来源于动物以及真菌类生物,因此系统进化树中未出现 DYRK1 亚家族。系统发育分析表明,该进化树分类与拟南芥自身的进化树结果一致,说明该进化树的可靠性。如图 1 所示,绿豆与大豆亲缘关系最近。大豆 DYRK 基因

家族中大多数成员属于 Yak 亚家族,包括 GmDYRK1、GmDYRK5、GmDYRK7、GmDYRK8、GmDYRK9 和 GmDYRK11;仅 GmDYRK2 属于 DYRK2 亚家族;而 GmDYRK3、GmDYRK4、GmDYRK6 和 GmDYRK10 则属于 DYRKp 亚家族。同时可以看出,大豆的 Yak 家族与拟南芥和水稻的相应基因亲缘关系较近,而大豆的 DYRKp 家族中主要与拟南芥关系较近。绿豆、豇豆和大豆的 DYRK2 亲缘关系均较近。

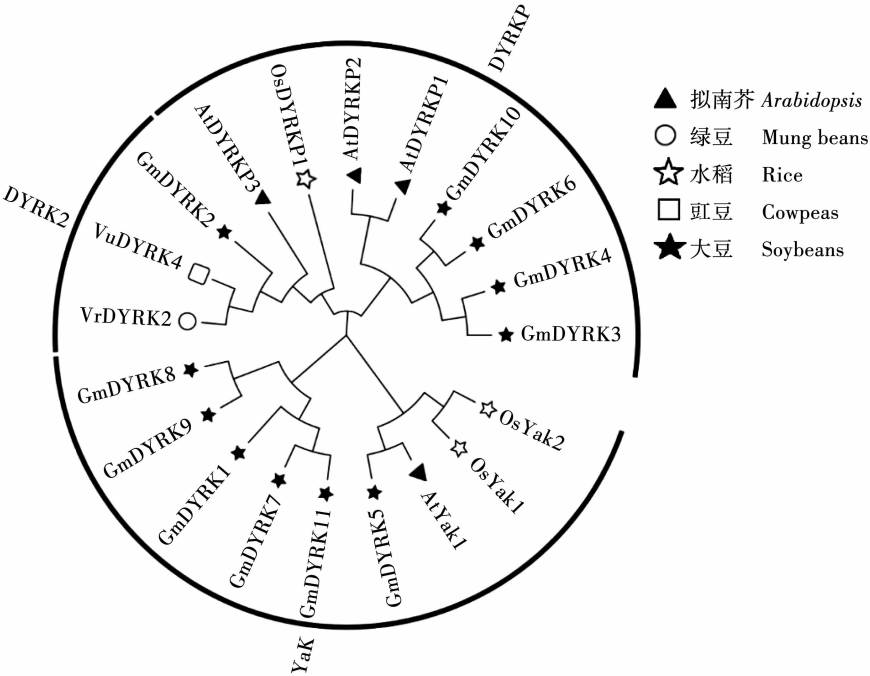


图 1 拟南芥、水稻、绿豆、豇豆和大豆 DYRK 基因家族成员系统进化树

Fig. 1 The phylogenetic tree of DYRK gene family members of Arabidopsis ,rice ,mung beans ,cowpeas and soybeans

2.1.4 基因结构分析 *GsDYRK* 序列仅含 PKc\_DYRK\_like 一个结构域。二级结构的含量中,无规卷曲 (48.06%) >  $\alpha$  螺旋 (36.7%) > 延伸链 (11.91%) >  $\beta$  转角 (3.32%)。

*GmDYRK* 基因家族成员基因结构及保守结构域分析结果如图 2 所示,同一亚族的 *DYRK* 基因具有

相似的基因结构,但不同亚族之间的基因结构存在较为明显的差异。不同亚族之间的大豆 *DYRK* 基因的保守基序种类、数目存在差异,其中 Yak 及 DYRKp 亚家族内保守基序具有高度保守性,说明基因家族成员之间的进化关系十分密切。

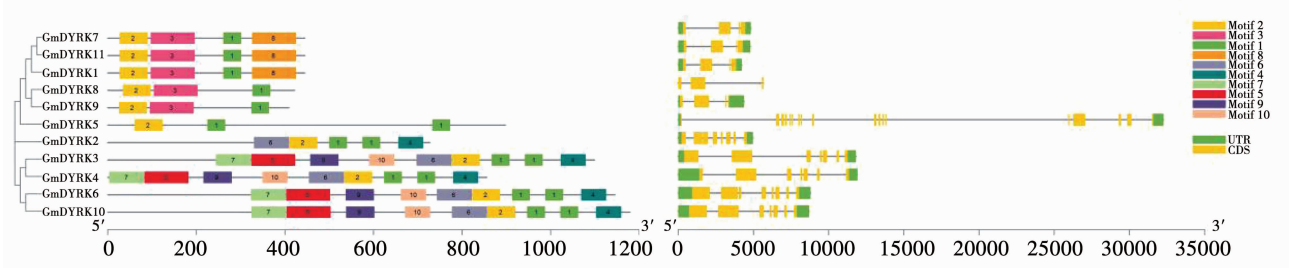


图 2 大豆 *DYRK* 家族基因结构及保守基序

Fig. 2 The gene structure and conserved motifs of soybean *DYRK* family

2.1.5 大豆 *DYRK* 家族基因染色体定位 染色体定位结果如图 3 所示;*DYRK* 基因家族分布在 8 条染色体,其中 chr1、chr2、chr5、chr10 和 chr12 染色体

上均只有 1 个基因,chr8、chr9 和 chr16 染色体上各包含 2 个基因。

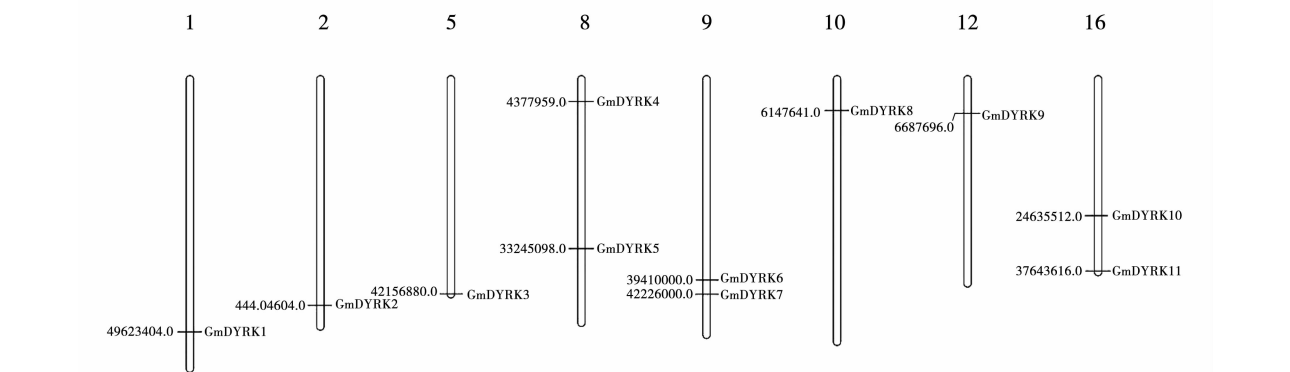


图 3 大豆 *DYRK* 基因家族的染色体定位

Fig. 3 The chromosome location of soybean *DYRK* gene family

2.1.6 大豆 *DYRK* 家族基因启动子顺式作用元件分析 大豆 *DYRK* 基因上游 1 500 bp 启动子区域序列顺式作用元件预测结果如图 4 所示,共预测出 18 种顺式作用元件,主要包含光响应、MeJa 响应、脱落酸响应、防御和应激响应、厌氧响应等,其中光

响应作用元件数量最多,推测其可能受到光信号的调控。此外,大豆 *DYRK* 家族中大多数成员含多种激素响应元件和防御与应激响应元件,表明大豆 *DYRK* 基因可能与激素信号调控及非生物胁迫相关。

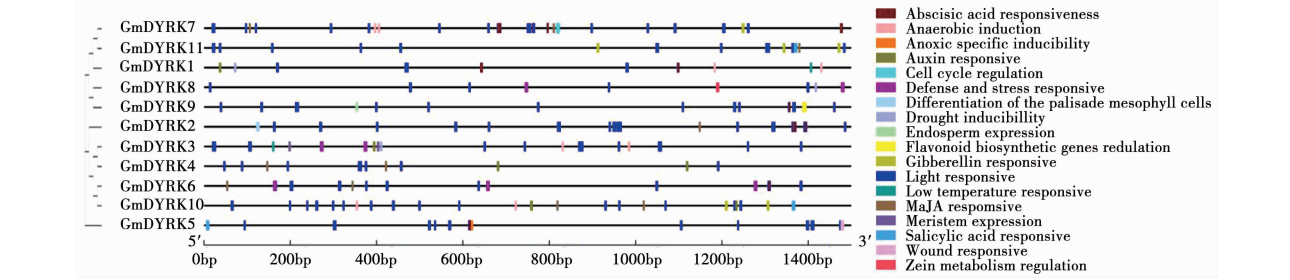


图 4 大豆 *DYRK* 基因启动子顺式作用元件分布

Fig. 4 The distribution of *cis*-elements in soybean *DYRK* gene promoter

## 2.2 野生大豆腐霉根腐病抗性与 *GsDyrk2* 基因表达量关系分析

2.2.1 野生大豆腐霉根腐病抗病等级鉴定 根据18份野生大豆种质资源的矮化率和根部腐烂情况判定抗病级别的结果如表3所示,其中1份材料抗病等级为1级,材料资源库编号FF018,矮化率为8.4%;12份材料抗病等级为2级,为FF007、FF054、FF064、FF077、FF098、FF203、FF233、FF280、FF379、FF504、FF604和FF609,矮化率为10%~20%;5份材料抗病等级为3级,为FF011、FF053、FF216、FF339和FF588,矮化率大于20%。在18份材料中,矮化率最高的为FF011,是一种半野生大豆材料,矮化率最低的是FF018,矮化率为8.4%。

表3 野生大豆材料抗病级别鉴定  
Table 3 The identification of disease resistance grade of wild soybean varieties

资源库编号 Code in rescoure bank	矮化率 Stuntedness rate/%	抗病级别 Disease resistance level
FF007	17.70	2
FF011	36.52	3
FF018	8.40	1
FF053	25.99	3
FF054	12.51	2
FF064	11.87	2
FF077	11.21	2
FF098	11.57	2
FF203	14.39	2
FF216	31.43	3
FF233	16.48	2
FF280	17.80	2
FF339	32.28	3
FF379	13.50	2
FF504	17.73	2
FF588	21.08	3
FF604	10.71	2
FF609	10.77	2

2.2.2 接种腐霉菌后 *GsDyrk2* 基因表达量检测 选取FF018、FF064、FF233、FF504、FF588和FF609等6份资源进行qRT-PCR分析。FF018抗病级别最高,其Dyrk基因的表达式最高,为3.17;FF064、FF233、FF504和FF609抗病等级为2,其相对表达

量分别为2.21、1.18、1.15和3.11;FF588抗病级别为3级,基因表达式最低,为0.57(表4)。结果说明野生大豆资源的抗病等级与Dyrk基因的表达式基本呈正相关,抗病等级越高,基因表达式越高。

表4 Dyrk 基因的表达结果  
Table 4 The express results of Dyrk

资源库编号 Code in rescoure bank	基因相对表达式 Gene relative expression level	矮化率 Stuntedness rate	抗病级别 Disease resistance level
FF018	3.17	8.40	1
FF064	2.21	11.87	2
FF233	1.18	16.48	2
FF504	1.15	17.73	2
FF588	0.57	21.08	3
FF609	3.11	10.77	2

## 3 讨论

目前,有关Dyrk基因的报道主要是关于对动物及人类的研究,而对于植物的研究相对较少<sup>[7-8]</sup>。尤其是有关野生大豆Dyrk基因所参与的抗病调控信号通路及基因功能的相关研究还鲜见相关报道。因此如何挖掘其应用于大豆育种实践的潜力还是一个漫长的过程,而这一问题的解决也无疑是解决大豆腐霉根腐病基础研究与育种脱节问题的关键。国内目前还未形成一套用于鉴定大豆腐霉根腐病抗性的体系和品种,但是接种方法已经成熟<sup>[9]</sup>。本研究针对抗性级别不同且来源于不同地区的野生大豆材料进行腐霉根腐病菌株接种鉴定,并采用qRT-PCR分析*GsDyrk2*基因的表达量,结果表明*GsDyrk2*基因表达式检测有助于鉴定野生大豆对腐霉根腐病的抗性级别,可应用于腐霉根腐病野生大豆抗性资源的筛选。

在我国大豆腐霉根腐病发病较重,但在栽培大豆中鲜有抗源,因此亟待挖掘具有抗病性的大豆种质资源。为了开展大规模的抗性资源筛选工作,本研究对18份野生种质资源进行抗性鉴定,发现其中1份材料抗病等级为1级,12份材料抗病等级为2级,3份材料抗病等级为3级。因此说明野生大豆资源里具有丰富的抗源,应该深入挖掘,从而为引入栽培种大豆奠定基础。但是也必须认识到不同抗性来源的野生大豆抗性不同,需要在今后的工作中进行深入探索发现。而且具有1级和2级抗性的

材料来源于不同地区,例如主要有佳木斯、阿城、勃利等地区,这一特点进一步说明在黑龙江省的多个地区均存在具有大豆腐霉根腐病抗性的野生大豆资源,也应该在今后的工作中广泛收集,以丰富我国的抗性资源材料库,从而可以为抗病基因的进一步鉴定及抗病品种的创制提供丰富的抗性资源。

### 4 结论

大豆全基因组中鉴定出 11 个大豆 Dyrk 基因家族成员,分布在 8 条染色体上,依次命名为 *GmDyrk1* ~ *GmDyrk11*, *GsDyrk2* 与 *GmDyrk2* 序列相似度最高,为 98.21%,基本可以判定为同一个基因。大多数 *GmDyrk* 成员属于 Yak 亚家族,Yak 及 Dyrkp 亚家族内保守基序具有高度保守性。*GsDyrk2* 和 *GmDyrk2* 均定位于细胞核,*GmDyrk7* 定位于细胞质,其它 *GmDyrks* 均定位于细胞核。启动子顺式作用元件分析表明,大多数成员可能与激素信号调控及非生物胁迫相关。从 18 份野生大豆资源中鉴定出 1 份腐霉根腐病抗病等级为 1 级的材料,不同野生大豆材料 *GsDyrk2* 基因的表达量与腐霉根腐病抗性有较明显的正相关性,可将 *GsDyrk2* 基因的表达量作为抗腐霉根腐病野生大豆辅助筛选手段之一。

### 参考文献

[1] 魏嵘,王伟威,李馨园,等. 大豆抗腐霉根腐病的生理差异研究[J]. 大豆科学, 2017, 36(3): 425-429. (WEI L, WANG W W, LI X Y, et al. Physiological differences in soybean resistance to pythium root rot [J]. Soybean Science, 2017, 36 (3): 425-429. )

[2] 杨晓贺,张瑜,丁俊杰,等. 黑龙江省东部地区大豆根腐病调查研究初报[J]. 大豆科学, 2015, 34 (6): 1093-1096. (YANG X H, ZHANG Y, DING J J, et al. Preliminary investigation report on soybean root rot in the eastern of Heilongjiang Province [J]. Soybean Science, 2015, 34 (6): 1093-1096. )

[3] ROSSO M L, RUPE J C, CHEN P, et al. Inheritance and genetic mapping of resistance to pythium damping-off caused by *Pythium aphanidermatum* in ‘Archer’ soybean[J]. Crop Science, 2008, 48: 2215-2222.

[4] ONGOM P O, NKALUBO S T, GIBSON P T, et al. Evaluating genetic association between fusarium and pythium root rots resistances in the bean genotype EWR 719 [J]. African Crop Science Journal, 2012, 20 (S1): 31-39.

[5] 毕影东,李炜,杨光,等. 大豆抗腐霉根腐病候选基因挖掘 [C].//第十九届中国作物学会学术年会论文摘要集. 武汉, 2020: 93. DOI:10.26914/c.cnkihy.2020.047822. (BI Y D, LI W, YANG G, et al. Mining candidate genes for soybean resistance to pythium root rot [C]. Abstracts of Papers from the 19th Annual Conference of China Crop Society. Wuhan, 2020: 93. DOI:10.26914/c.cnkihy.2020.047822. )

[6] 马淑梅. 黑龙江省大豆根腐病致病病原种类分布及抗病种质鉴定[J]. 中国农学通报, 2012, 28(27): 230-235. (MA S M. Pathogenic pathogen categories distribution and germplasm resistance identification of soybean root rot in Heilongjiang Province [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2012, 28 (27): 230-235. )

[7] FORZANI C, DUARTE G T, VAN LEENE J. Mutations of the AtYAK1 kinase suppress TOR deficiency in *Arabidopsis* [J]. Cell Reports, 2019, 27: 3696-3708.

[8] Schulz-Raffelt M, Chochois V, Auroy P, et al. Hyperaccumulation of starch and oil in a *Chlamydomonas* mutant affected in a plantspecific Dyrk kinase [J]. Biotechnology for Biofuels, 2016, 9(1):55.

[9] 毕影东,来永才,刘明,等. 一种大豆腐霉根腐病抗性资源精准鉴定方法: CN201910537491 [P]. 2019-09-16 [2021-09-03]. <https://zhuanli.tianyancha.com/d78d9f6774325ee541d0bce122-d04bc4>. (BI Y D, LAI Y C, LIU M, et al. Accurate identification method of root rot resistance resources of Tofu Bean Curd; CN2019-10537491 [P]. 2019-09-16 [2021-09-03]. <https://zhuanli.tianyancha.com/d78d9f6774325ee541d0bce122d04bc4>. )

[10] 徐碧霞,郭巧生,朱再标,等. 老鸦瓣实时定量 PCR 内参基因的筛选和验证 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46 (4): 938-943. (XU S X, GUO Q S, ZHU Z B, et al. Selection and validation of reference genes for quantitative Real-time PCR analysis in *Amanita edulis* [J]. China Journal of Chinese Medica, 2021, 46 (4): 938-943. )