



# 大豆类受体激酶基因 *GmNIK* 的克隆与表达分析

方 飞, 杨云华, 王丽群, 晋彤彤, 向文扬, 智海剑

(南京农业大学 大豆研究所/农业部大豆生物学与遗传育种重点实验室/国家大豆改良中心/作物遗传与种质创新国家重点实验室, 江苏 南京 210095)

**摘 要:**大豆花叶病毒( soybean mosaic virus, SMV)病是我国大豆产区主要的病害之一, SC18 是南方地区 SMV 流行株系。发掘对 SC18 株系的抗性基因对改良大豆品种的抗性具有重要意义。本实验室前期将科丰一号对 SC18 的抗性基因精细定位到大豆 2 号染色体 80 kb 的区间, 发现该区间存在 1 个含亮氨酸重复结构的类受体激酶(LRR-RLK)基因 *GmNIK*。为研究大豆 *GmNIK* 编码基因的结构和表达特性, 从抗病品种科丰一号中克隆了 *GmNIK* 基因并对其序列进行生物信息学分析, 利用 qRT-PCR 分析 *GmNIK* 在大豆不同组织和不同时期的相对表达量以及 SMV 诱导下的表达特性。结果表明: *GmNIK* 完整 ORF 为 1 866 bp, 编码 1 个由 621 个氨基酸组成的具有典型 LRR-RLK 结构的蛋白。其氨基酸序列与已克隆的 R 基因的共受体具有高度同源性, 与同属豆科植物的苜蓿和花生的 *NIK* 基因亲缘关系较近; *GmNIK* 启动子区包含防御和逆境应答元件、水杨酸应答元件等多种顺式作用元件, 能够响应大豆花叶病毒 SC18 的侵染, 在大豆营养生长期, 根毛、根、茎以及叶中均有表达。SC18 侵染后抗病和感病品种叶片中 *GmNIK* 的转录水平存在差异, 初步预测该基因与大豆对 SC18 株系的抗性有关。该研究可为大豆中抗大豆花叶病毒基因的发掘以及明确抗性机制奠定部分基础。

**关键词:**大豆; *GmNIK*; SMV; 生物信息学; LRR-RLK; 表达特性

## Cloning and Analysis of Receptor-like Kinase Gene *GmNIK* in Soybean

FANG Fei, YANG Yun-hua, WANG Li-qun, JIN Tong-tong, XIANG Wen-yang, ZHI Hai-jian

(Soybean Research Institute, Nanjing Agriculture University/Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Soybean, Ministry of Agriculture/National Center for Soybean Improvement/National Key Laboratory for Crop Genetic and Germplasm Enhancement, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** Soybean mosaic virus (SMV) is one of the major diseases in soybean producing areas of China, and SC18 is an epidemic strain in the southern region. It is important to find the resistance related genes to SC18 strains for improving the resistance of soybean. We have mapped the related segment resistant to SC18 on the 80 kb interval of soybean chromosome 2, and found that there was a receptor-like protein kinase (LRR-RLK) gene *GmNIK* which contained leucine repeat. To explore the structure and expression characteristics of soybean *GmNIK*-coding gene, we cloned the *GmNIK* gene from the resistant variety Kefeng 1 and analyzed the gene with bioinformatics methods. In addition, we analyzed the relative expression of *GmNIK* in different tissues and different periods of soybean and detected the expression characteristics under SMV induction by qRT-PCR. The results showed that the ORF of *GmNIK* was 1 866 bp, and encoded a protein of 621 amino acids with a typical LRR-RLK structure. The amino acid sequence of *GmNIK* was highly homology with the co-receptor of the cloned R genes, and was closely related to the *NIK* gene in alfalfa and peanut of leguminous plants. The *GmNIK* promoter region contained defense and stress response element, SA response element and other cis-acting elements, which induced this gene could respond to the infection of SC18. It can be detected that the gene expressed in root hairs, roots, stems and leaves. After infected by SC18, transcription levels of *GmNIK* in leaves of resistant and susceptible varieties were different, it was predicted that *GmNIK* was related to the resistance of soybean to SC18 strain. This study lays a foundation for the identification of soybean resistance genes against soybean mosaic virus and the discovery of resistance mechanisms against soybean mosaic virus.

**Keywords:** Soybean; *GmNIK*; SMV; Bioinformatics; LRR-RLK; Expression characteristics

大豆[*Glycine max* (L.) Merr.]作为一种重要的油料和经济作物,具有丰富的营养学价值。高温、干旱和低温等非生物胁迫以及真菌、细菌和病毒等生物胁迫都会严重影响大豆产量和品质。大豆花叶病毒(SMV)病是导致我国大豆产量损失的重要病害之一。大豆花叶病毒属于马铃薯 Y 病毒

属(*Potyvirus*),其基因组由一条线性正义单链 RNA 组成,大小约 9.6 kb,整个基因组按 1 个开放阅读框进行翻译,形成 1 个大小约为 360 kD 的多聚蛋白前体,随后被自身编码的 3 个蛋白水解酶切割加工成 11 个成熟蛋白<sup>[1]</sup>。大豆花叶病毒引起的大豆发病症状受多种因素影响,包括大豆的基因型、病毒类

收稿日期:2019-03-26

**基金项目:**转基因生物新品种培育科技重大专项(2016ZX08004-004);国家自然科学基金(31571690);中央高校基本科研业务费专项资金(KYT201801);长江学者和创新团队发展计划(PCSIRT\_17R55);现代农业产业技术体系建设专项(CARS-04);江苏省现代作物生产协同创新(JCIC-MCP);国家重点研发计划(2017YFD0101501)。

**第一作者简介:**方飞(1993-),男,硕士,主要从事大豆抗病遗传育种研究。E-mail: 2016101172@njau.edu.cn。

**通讯作者:**智海剑(1957-),男,博士,教授,博导,主要从事大豆抗病遗传育种研究。E-mail: zhj@njau.edu.cn。

型、侵染时期以及环境因素等。大豆感染 SMV 后,植株叶片褪绿发黄,叶绿素明显降低,叶片皱缩,叶绿体等细胞器结构被破坏,光合效率下降,从而造成植株矮化,结荚数下降,籽粒变小。据报道,SMV 严重爆发时能够引起大豆产量下降 90%<sup>[2]</sup>。SC18 属于致病力相对较弱的株系,主要流行于我国南部和东北部大豆产区,对该地区大豆产量有较严重的影响<sup>[3-4]</sup>。

近些年,各国学者在 SMV 抗性基因鉴定方面取得了显著的进展。研究证明大豆对大部分 SMV 株系的抗性是单显性基因控制,并且具有专一性,1 个抗性基因只能对特定的病毒株系具有抗性<sup>[5]</sup>。在国外,*Rsv1* 抗性位点对大豆花叶病毒 G1 ~ G3 株系具有抗性,对 G5 ~ G7 株系却表现感病,*Rsv2* 抗性位点对 G1 ~ G4 株系和 G7 株系表现抗病,对 G5 株系和 G6 株系为感病,*Rsv3* 抗性位点则对 G5 ~ G7 株系表现抗病,对 G1 ~ G4 株系表现感病。在国内,*Rsc3*、*Rsc4*、*Rsc7*、*Rsc8* 等多个抗性位点名称就是根据该位点所抗的株系而命名的。研究发现,在众多抗病基因所在区段内,都存在一类含亮氨酸重复的蛋白激酶(LRR-RLKs)基因,如定位于 13 号染色体的 *Rsv1* 抗性位点富集着许多含 NBS-LRR 结构域的候选基因,定位于 14 号染色体 *Rsv3* 和 *Rsc4* 抗性位点也同样具有多个含亮氨酸重复的蛋白激酶基因<sup>[6-8]</sup>。LRR-RLKs 是一类定位于膜上的受体蛋白,在感知外界刺激后将信号转导到细胞内的过程中发挥重要的作用。拟南芥 FLS2 具有 LRR-RLKs 典型的结构,其胞外结构域 LRR 能够识别病原菌的鞭毛蛋白,从而启动拟南芥的抗病防御反应<sup>[9]</sup>。水稻 Xa26 在免疫黄单胞菌引起的水稻白叶枯病中发挥重要作用,Xa26 赋予的抗性可能受遗传背景影响<sup>[10]</sup>。

本实验室以科丰一号品种为试验材料,在抗 SC18 的定位区段内发现了 6 个候选基因。抗病品种科丰一号和感病品种南农 1138-2 的 *GmNIK* 基因编码序列存在多个 SNP 位点,SMV 诱导下 *GmNIK* 基因在两个品种中的表达特点存在差异,表明 *GmNIK* 是抗病候选基因之一<sup>[11]</sup>。本研究通过对该基因序列进行生物信息学分析,了解该基因编码蛋白的理化性质,同时研究其组织表达和 SMV 诱导表达,并研究该基因在不同植物中的进化关系和基因启动子所含有的顺式作用元件,尝试探究其与 SMV 抗性之间的关系,为发掘大豆中抗大豆花叶病毒基因及明确其抗性机制奠定部分基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 SC18 株系感病品种南农 1138-2

和抗病品种科丰一号均由国家大豆改良中心提供。  
1.1.2 载体与菌株 TA 克隆载体 pMD20-T 购自 TAKARA 公司,大肠杆菌 DH5 $\alpha$  购自北京康为生物科技有限公司,大豆花叶病毒 SC18 株系由国家大豆改良中心保存。

1.2 方法

1.2.1 大豆 *GmNIK* 基因的克隆 利用 Trizol 法 (Invitrogen, USA) 提取科丰一号总 RNA,用 HiScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 进行 cDNA 第一链的合成。根据 soybase (<https://soybase.org/search/>) 预测的参考基因序列信息,利用 Primer Premier 5.0 设计特异性引物。引物序列为 *GmNIK*-F: TTTACCATG-GCTCTGACTC 和 *GmNIK*-R: AATCTTCGCCTCCATC-TATT,由滁州通用公司合成。

以合成的 cDNA 为模板,用基因特异性引物和 PrimeStar Max DNA polymerase PCR 扩增。扩增产物凝胶电泳检测,与目标大小一致的条带切胶回收,纯化后与 pMD20-T 连接,连接产物转化 DH5 $\alpha$ ,涂布含氨苄青霉素抗性的平板,第 2 天挑取单克隆并 PCR 检测,检测为阳性的单克隆送至公司测序。最终获得 *GmNIK* 编码区全序列。

1.2.2 *GmNIK* 启动子克隆 根据在线网站 phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) 序列预测的大豆基因组信息,设计特异性引物,以科丰一号大豆 DNA 为模板,克隆 *GmNIK* 转录起始密码子上游 2 000 bp 的 DNA 序列,利用在线网站 PlantCARE 分析启动子序列。引物序列为 NIK-promoter-F: TAAGGCATGTACTTTTGACTTG 和 NIK-promoter-R: TTCTGAGTTATCTATTCCCCAC。

1.2.3 *GmNIK* 基因序列的生物信息学分析 利用软件 BioXM 2.7 对 *GmNIK* 的 cDNA 克隆片段进行开放阅读框(ORF)预测,并将其翻译成氨基酸序列。利用 ExPASy 提供的 ProParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 预测蛋白的理化性质;利用 signal IP(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 在线网站预测信号肽;利用 TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 在线网站预测跨膜区。

利用在线网站 plantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 进行 *GmNIK* 启动子序列分析。利用在线网站 InterPro Scan (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence-search>) 对 *GmNIK* 蛋白结构进行预测;利用软件 DN-AMAN 8.0 与已克隆的 *R* 基因或其共受体基因编码氨基酸序列进行多序列比对;利用 Mega 5.0 进行基因进化分析。

1.2.4 *GmNIK* 组织表达分析 种植南农 1138-2 和科丰一号各 4 盆,光照 16 h,黑暗 8 h,28  $^{\circ}$ C 培养。

通过 qRT-PCR 分析出苗期 (VE)、子叶期 (VC)、第一叶期 (V1) 和第二叶期 (V2) *GmNIK* 在两个大豆品种的根毛、根、茎和叶中的表达水平,以大豆看家基因 *Tubulin* 为内参基因。根据克隆得到的 *GmNIK* 的编码区序列,利用 Primer Premier 5.0 设计特异性荧光定量引物。引物序列为 qPCR-NIK-F: GTTGTT-GACAAGGACCTGAAA 和 qPCR-NIK-R: GCTT-GGGCAAGTAATGAAGAGT。采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  的方法计算 *GmNIK* 相对表达量,利用 SPSS 19.0 软件进行显著性分析。

1.2.5 *GmNIK* 的诱导表达分析 种植南农 1138-2 和科丰一号各 6 盆,光照 16 h,黑暗 8 h,28 ℃ 培养。真叶期接种大豆花叶病毒 SC18,以接种磷酸缓冲液 PBS 为对照,并取接种 0,2,4,6,8,10,12,24,36,48 和 72 h 的大豆叶片组织,提取总 RNA,检测不同时间点 *GmNIK* 基因在抗感品种中的表达量,分析变化规律。

2 结果与分析

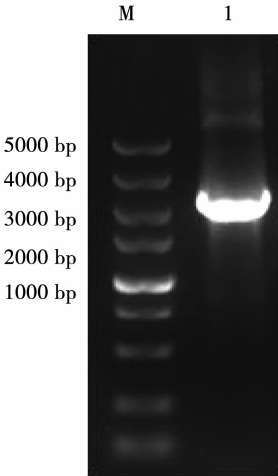
2.1 *GmNIK* 基因扩增

科丰一号 *GmNIK* 基因 cDNA 片段电泳检测结果如图 1 所示,cDNA 长度为2 166 bp,与预期大小一致。

2.2 *GmNIK* 蛋白理化性质及结构预测

经测序比对,*GmNIK* 蛋白的完整 CDS 区由 1 866个核苷酸组成,编码 621 个氨基酸。预测结果

显示:N 端含两个亮氨酸重复结构域,分别位于31 ~ 70 和 122 ~ 181 位氨基酸,C 端含一段丝氨酸/苏氨酸(Ser/Thr)蛋白激酶结构域,位于 301 ~ 568 位氨基酸(图 2)。理化性质预测表明该蛋白的相对分子质量为68 860.79,等电点是 6.92。分子式为 C<sub>3062</sub> H<sub>4858</sub> N<sub>842</sub> O<sub>914</sub> S<sub>24</sub>,带负电的残基(Asp + Glu)64 个,带正电的残基 63 个,不稳定系数为 39.46,说明该蛋白为稳定蛋白。在 *GmNIK* 蛋白 3 ~ 47 和 247 ~ 268 氨基酸区域内存在跨膜区,N 端有 1 个信号肽(图 3 和 4)。



M:DNA marker; 1:cDNA

图 1 *GmNIK* 基因 cDNA 片段 PCR 电泳检测  
Fig. 1 Amplification product of *GmNIK* gene cDNA

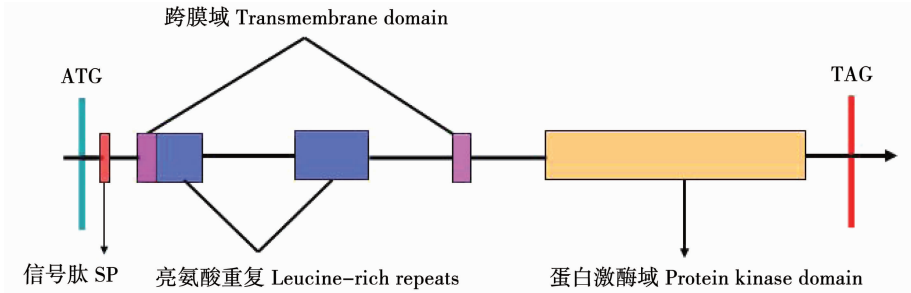


图 2 *GmNIK* 蛋白结构  
Fig. 2 Structure of *GmNIK* protein

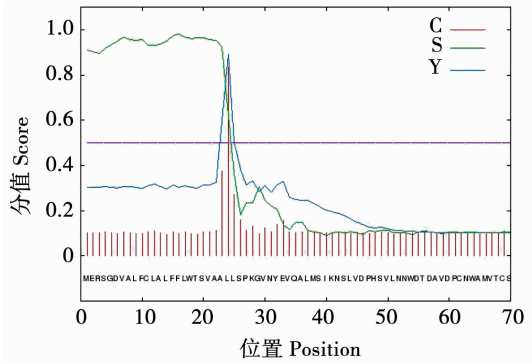


图 3 *GmNIK* 蛋白信号肽预测  
Fig. 3 Signal peptide prediction of *GmNIK* protein

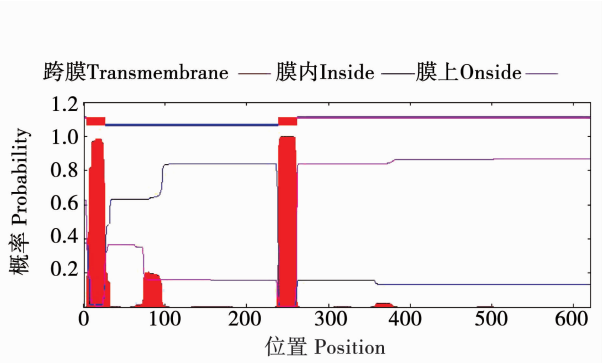
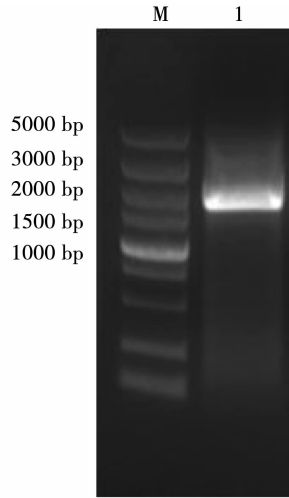


图 4 *GmNIK* 蛋白跨膜区预测  
Fig. 4 Transmembrane region prediction of *GmNIK* protein

2.3 *GmNIK* 基因的启动子序列分析

启动子通常位于基因起始密码子( ATG) 上游 1 500 ~ 2 000 bp,启动子通常包含调控基因转录的顺式作用元件,反式作用因子能够与顺式作用元件特异性识别,从而调控基因的转录。因此,分析 *Gm-  
NIK* 的启动子序列有利于进一步对基因的表达模式与功能进行预测。PCR 扩增起始密码子上游2 000 bp DNA 序列,电泳检测结果如图 5 所示。启动子分析结果表明:启动子区不仅含有必须的 TATA box 转录起始位点、CAAT-box 转录增强区,还包括 MYB 逆境应答、MYC 转录调控因子、TC-rich repeats 防卫和逆境应答、TCA-element 水杨酸( SA) 应答、W box 病原菌诱导子反应元件等顺式作用元件( 表 1)。说明 *GmNIK* 可响应外界刺激的诱导。



M;DNA marker;1:*GmNIK* 基因的启动子序列。  
M;DNA marker;1:The promoter sequence of *GmNIK* gene.

图 5 *GmNIK* 启动子 PCR 电泳检测  
Fig. 5 PCR amplification product of *GmNIK* promoter

表 1 <i>GmNIK</i> 基因启动子区顺式作用元件分布			
Table 1 Distribution of cis-acting elements in the promoter region of <i>GmNIK</i>			
调控元件 Regulatory element	位置 Position	核心序列 Core sequence	功能预测 Predicted functions
TATA box	83 ( - )	TATAAA	转录起始位点
	329 ( + )		The site of transcription start
ARE	392 ( + )	AAACCA	低氧胁迫诱导
	1714 ( + )		Cis-acting regulatory element essential for the anaerobic induction
CAAT-box	134 ( - )	CAAAT	转录增强区域
	261 ( + )		Common cis-acting element in promoter and enhancer regions
GCN4 motif	1751 ( - )	TGAGTCA	胚乳表达调控元件 Cis-regulatory element involved in endosperm expression
MYB	1835 ( - )	CAACCA	逆境应答相关 Stress response regulation
MYC	426 ( - )	CATTTG	转录调控因子 Transcriptional regulator factor
TC-rich repeats	665 ( - )	GTTTTCTTAC	防卫和逆境应答
	1716 ( + )		Cis-acting element involved in defense and stress responsiveness
TCA-element	1849 ( - )	TCAGAAGAGG	水杨酸( SA) 应答过程 Cis-acting element involved in salicylic acid responsiveness
W box	919 ( + )	TTGACCT	病原菌诱导子反应元件 Pathogen inducer response element
AE-box	1998 ( - )	AGAAACTT	光应答部分元件 Part of a module for light response

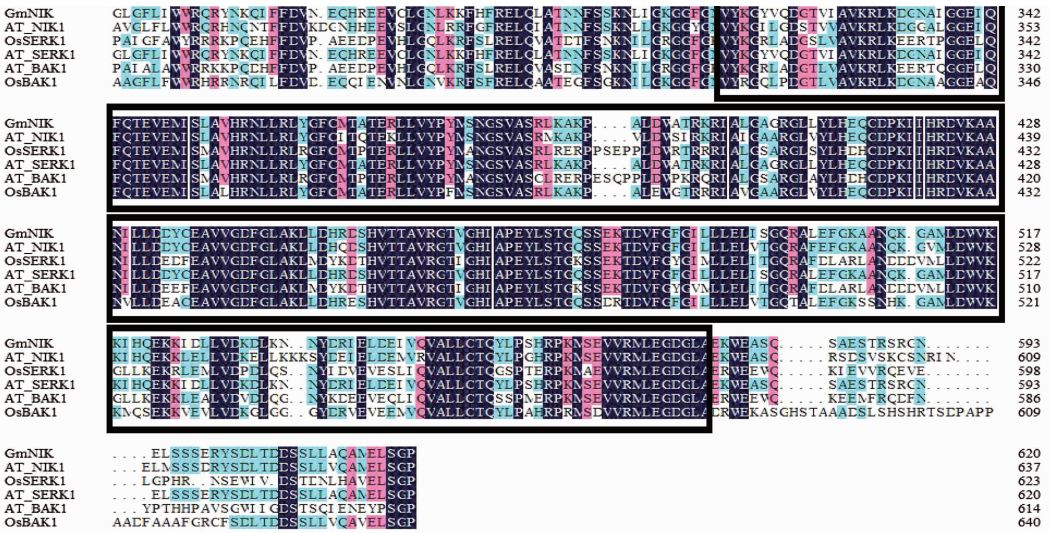
续表 1

调控元件 Regulatory element	位置 Position	核心序列 Core sequence	功能预测 Predicted functions
AAAC-motif	1923 ( + )	CAATCAAAACCT	光应答元件 Light responsive element
TCT-motif	1489 ( + )	TCTTAC	光应答元件 Light responsive element

2.4 GmNIK 同源基因编码蛋白多序列比对

GmNIK 属于 LRR-RLKs 类基因,多序列比对结果表明 GmNIK 与已克隆的 R 基因或其共受体基因编码氨基酸序列具有高度氨基酸序列相似性,这类基因包括水稻中的 OsSERK1 (somatic embryogenesis receptor kinase 1)<sup>[12]</sup> 和 OsBAK1 (BR1-associated ki-

nase 1)<sup>[13]</sup>,拟南芥中的 ATSERK1 和 ATBAK1<sup>[14]</sup>。在亮氨酸重复结构域(LRR region)和蛋白激酶结构域(protein kinase region)部分,它们的氨基酸序列一致性较高(图 6)。GmNIK 与拟南芥中的 ATNIK1 和 ATNIK2 氨基酸序列相似性分别是 71.9% 和 74.1%。



红色框内表示的是亮氨酸重复区,黑色框内表示的是丝氨酸/苏氨酸激酶区。  
The red and black box indicate the region of LRR and Ser/Thr protein kinase, respectively.

图 6 GmNIK 与 R 基因及其共受体基因编码氨基酸序列比对

Fig. 6 Comparison of coded amino acid sequences between GmNIK and R gene and its coreceptor gene

2.5 GmNIK 蛋白进化分析

氨基酸序列比对结果显示:大豆 GmNIK 氨基酸序列与苜蓿(Medicago truncatula)、花生(Arachis hypogaea)、木瓜(Carica papaya)、穿桑(Morus notabilis)、葡萄(Vitis vinifera)、柑橘(Citrus clementina)、陆地棉(Gossypium raimondii)、苹果(Malus domestica)、猕猴桃(Actinidia chinensis var. chinensis)、罂粟(Papaver somniferum)、拟南芥(Arabidopsis thaliana)中的同源基因编码蛋白同源性分别为 92%、88%、82%、82%、81%、81%、80%、80%、79%、78% 和 74%(图 7)。这些同源基因编码蛋白的进化分析结果表明大豆 GmNIK 与同属豆科植物的苜蓿和花生在同一分支上,亲缘关系较近。

2.6 SC18 抗感大豆品种 GmNIK 组织表达分析

如图 8 所示,大豆根毛、根、茎和叶间表达量差异显著( $P < 0.05$ ),其中茎中的表达量最高,叶中的表达量最低,说明该基因可能与茎的发育或物质运输存在关联;不同生长阶段间表达量差异显著( $P < 0.05$ ),其中第二叶期表达量最高,出苗期表达量最低,说明该基因可能与大豆生长发育存在关联;不同品种间表达量差异不显著,感病品种南农 1138-2 和抗病品种科丰一号中的表达水平相当。综合来看,抗病品种科丰一号第二叶期茎中的表达量最高,感病品种南农 1138-2 在出苗期根毛中的表达量最低,推测 GmNIK 可能在大豆不同发育时期及不同组织间发挥不同的调控功能。

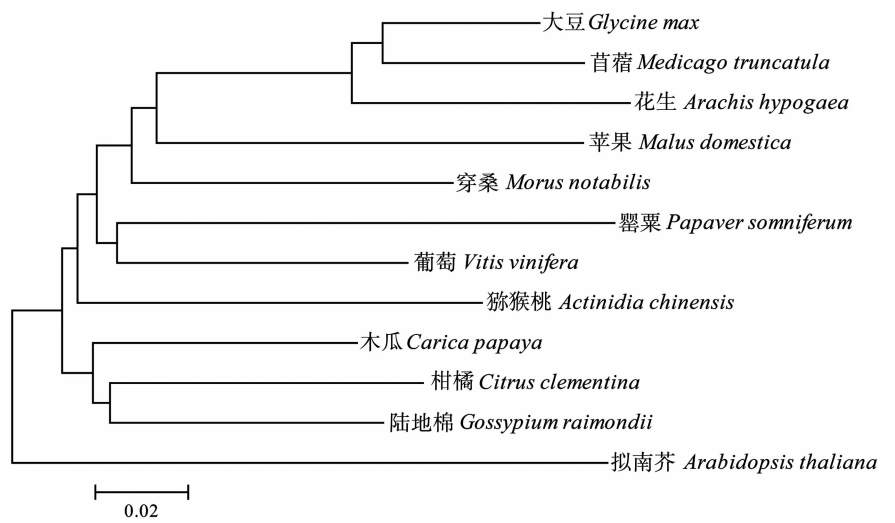


图 7 *GmNIK* 蛋白系统进化分析  
Fig. 7 Phylogenetic analysis of *GmNIK*

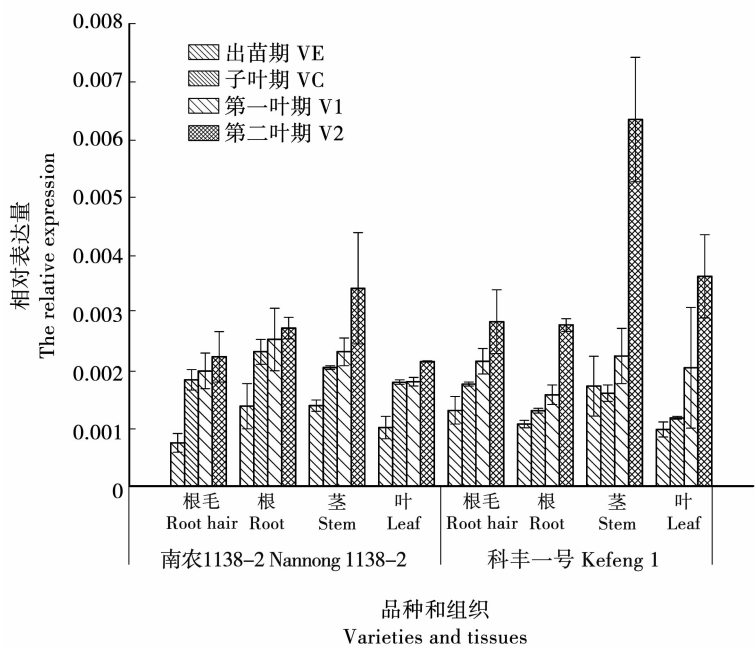


图 8 SC18 抗病和感病大豆品种 *GmNIK* 组织表达分析  
Fig. 8 *GmNIK* expression analysis in different tissue of resistant and sensitive varieties to SC18

2.7 SC18 诱导下 *GmNIK* 表达分析

将接种 0 h 的抗病品种和感病品种的表达量设定为 1,qRT-PCR 结果如图 9 所示,在接种 SMV 后,*GmNIK* 的转录水平在抗感品种间都发生了变化。接种 SMV 后 2~8 h,南农 1138-2 的表达量逐渐上升,8 h 之后表达量逐渐下降,而科丰一号在接种后 2~10 h 表达量呈现不断上升的趋势,在 6~10 h 表达量上升显著,10 h 时表达量上升了 3 倍,10 h 后逐渐下降。科丰一号和南农 1138-2 表达量上调最高的时间点分别是 10 h 和 8 h,这两个时间点科丰一号的相对表达量是南农 1138-2 的近 2 倍。根据基因上调表达的时间,说明该基因对 SC18 的抗病过

程发生在接种后 10 h 内。  
Li 等<sup>[11]</sup>在对 SC18 抗病候选区段内的候选基因 *GmNIK* 的诱导表达分析结果显示,科丰一号和南农 1138-2 抗病候选基因的上调峰值分别出现在接种后 6 和 3 h。本研究中抗感品种中基因上调的峰值则分别在 10 和 8 h,相对有所延迟,可能是由于病毒的活性、环境温度以及大豆接种时期的不同而造成这种差异。根据基因诱导表达结果初步预测,抗病品种科丰一号和感病品种南农 1138-2 都能够响应 SC18 的侵染,但差异显著,这是否是科丰一号对 SMV 表现出抗病的原因需要结合其它试验进一步验证。



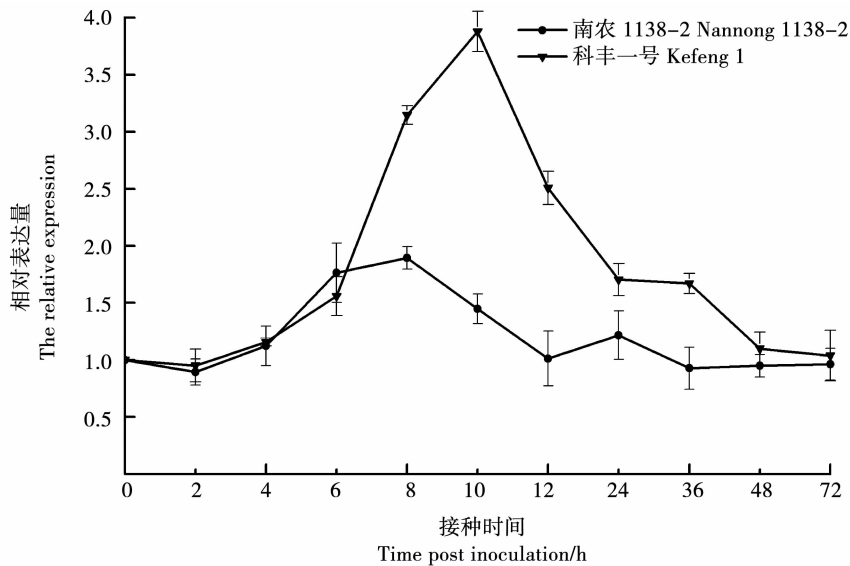


图9 SC18 诱导下抗感品种 *GmNIK* 的表达分析  
Fig. 9 Expression analysis of *GmNIK* induced by SC18 in resistant and susceptible varieties

3 讨论

大豆 *GmNIK* 氨基酸序列与 *OsSERK1*、*ATBAK1* 以及 *ATNIK* 具有同源性,尤其在功能结构域 LRR 结构域和 Ser/Thr 蛋白激酶结构域部分,它们同属 LRR-RLKs 基因家族。Hu 等<sup>[15]</sup> 研究发现,*OsSERK1* 不仅在水稻体细胞胚胎发生中发挥作用,同时组成型表达 *OsSERK1* 的转基因水稻对稻瘟病的抗病能力也有所提升。Kørner 等<sup>[16]</sup> 发现烟草花叶病毒 (TMV)、油菜花叶病毒 (ORMV) 和芜菁皱缩病毒 (TCV) 3 种 RNA 病毒能够引起拟南芥 *bak1* 突变体的感病症状加重,说明 *ATBAK1* 对拟南芥抗病性具有重要作用。Fontes 等<sup>[17]</sup> 首次报道了拟南芥 *AT-*NIK** 基因能够与双生病毒核穿梭蛋白 (nuclear shuttle protein, NSP) 特异性识别,抑制 *ATNIK* 基因 C 端的丝氨酸/苏氨酸激酶活性,从而阻断抗病信号的传递,同时拟南芥 *nik* 突变体对双生病毒的感病症状更为严重,证实了 *ATNIK* 参与了抗病毒反应过程。*GmNIK* 基因是否与这些基因一样,在大豆花叶病毒的抗病过程中发挥作用需要进一步研究。

大豆 *GmNIK* 的启动子区含有的水杨酸应答反应元件可能是激活抗大豆花叶病毒信号通路的关键。水杨酸 (SA) 是植物体内合成的一种酚类物质,它作为一种信号分子在一些重要的代谢过程中发挥重要作用。据报道,烟草花叶病毒 (TMV) 和外源的 SA 处理均能诱导烟草体内抗病相关蛋白的上调表达<sup>[18]</sup>。Hajimorad 等<sup>[19]</sup> 发现 SMV-N 能够引起大豆抗病品种 PI96983 体内 SA 合成相关基因的上调表达<sup>[18]</sup>。Liu 等<sup>[20]</sup> 发现沉默大豆 *GmMAPK4* 后,大豆

体内的 SA 信号通路中的基因明显上调,并产生了对大豆霜霉病和 SMV 的抗病性。W-box 和 TC-rich repeat 顺式作用元件也被证明在植物抗病和抗逆过程中发挥作用<sup>[21-22]</sup>。SMV 能够诱导大豆 *GmNIK* 基因表达水平上调,表明在 SMV 侵染后,某种信号分子 (可能是 SA 合成相关基因) 与 *GmNIK* 启动子区顺式作用元件发生了相互作用,增强了基因的转录,SA 能否诱导 *GmNIK* 转录水平的增强有待进一步验证。

本研究分析了大豆 *GmNIK* 基因的基本信息并对其功能做初步预测,为进一步研究其抗病性和抗病机制奠定基础。后续对于大豆 *GmNIK* 基因功能的验证可借助多种手段,利用病毒引起的基因沉默 (VIGS) 技术可实现特定基因的沉默,但是该方法不能完全抑制基因的功能。利用基因编辑技术定向敲除 *GmNIK* 基因,则能完全抑制该基因功能,从而验证其抗病性。

*GmNIK* 基因属于 LRR-RLKs 基因,据报道, LRR-RLKs 基因的 C 端蛋白激酶结构域在许多植物抗病或抗逆过程中发挥重要的作用。Mariano 等<sup>[23]</sup> 发现番茄金色花叶病毒 (tomato golden mosaic virus, TGMV) 和番茄皱叶黄化病毒 (tomato crinkle leaf yellows virus, TCrLYV) 的核穿梭蛋白 (NSP) 能够与土豆 NIK 蛋白和大豆 NIK 蛋白发生相互作用,而缺失了 C 端 Ser/Thr 蛋白激酶结构域的 NIK 蛋白则不能与 NSP 相互作用。Fontes 等<sup>[17]</sup> 和 Mariano 等<sup>[23]</sup> 的研究说明了 NIK 蛋白的激酶结构域在植物抗病过程中的重要作用,若大豆 *GmNIK* 在抗 SMV 过程中发挥作用,那么 SMV 是否和双生病毒一样,其编

码的某个蛋白与 *GmNIK* 蛋白存在相互作用,相互作用的关键结构域是不是 C 端的激酶域以及哪些是 *GmNIK* 抗病通路中的下游组分都有待进一步研究。

4 结 论

本研究表明,大豆 *GmNIK* 基因的完整编码框为 1 866 bp, 编码 1 个由 621 个氨基酸组成的典型 LRR-RLKs 结构的蛋白,其氨基酸序列与已克隆的 *R* 基因共受体基因 *OsSERK1*、*OsBAK1* 和拟南芥抗双生病毒相关基因 *ATNIK* 的编码氨基酸序列具有高度同源性,大豆 *GmNIK* 基因与同属豆科的苜蓿和花生中的 *NIK* 基因亲缘关系最近;*GmNIK* 启动子区含有防御和逆境应答、水杨酸应答等多种顺式作用元件,*GmNIK* 基因能够响应大豆花叶病毒株系 SC18 的侵染,且抗病品种科丰一号中的表达水平显著高于感病品种南农 1138-2。推测大豆 *GmNIK* 基因可能参与了大豆对大豆花叶病毒的抗病过程。本研究对进一步研究该基因的功能、解析抗病机制和抗病品种的遗传改良具有重要意义。

参考文献

[1] Chowda-Reddy R V, Sun H, Hill J H, et al. Simultaneous mutations in multi-viral proteins are required for soybean mosaic virus to gain virulence on soybean genotypes carrying different *R* genes [J]. *PLoS One*, 2011, 6(11): e28342.

[2] Wang X, Eggenberger A L, Nutter F W, et al. Pathogen-derived transgenic resistance to soybean mosaic virus in soybean[J]. *Molecular Breeding*, 2001, 8(2): 119-127.

[3] Li K, Yang Q H, Zhi H J, et al. Identification and distribution of soybean mosaic virus strains in southern China[J]. *Plant Disease*, 2010, 94(3): 351-357.

[4] 李凯,夏迎春,王大刚,等. 黑龙江省大豆花叶病毒(SMV)株系的动态变化分析[J]. *大豆科学*,2014,33(6):880-774. (Li K, Xia Y C, Wang D G, et al. Analysis of dynamic change of soybean mosaic virus strains in Heilongjiang province of China [J]. *Soybean Science*, 2014, 33(6): 880-884. )

[5] Yang Y, Zheng G, Han L, et al. Genetic analysis and mapping of genes for resistance to multiple strains of soybean mosaic virus in a single resistant soybean accession PI 96983 [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2013, 126(7): 1783-1791.

[6] Ma F F, Wu X Y, Chen Y X, et al. Fine mapping of the *Rsv1-h* gene in the soybean cultivar Suweon 97 that confers resistance to two Chinese strains of the soybean mosaic virus[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2016, 129(11): 2227-2236.

[7] Suh S J, Bowman B C, Jeong N, et al. The *Rsv3* locus conferring resistance to soybean mosaic virus is associated with a cluster of coiled-coil nucleotide-binding leucine-rich repeat genes[J]. *The Plant Genome*, 2011, 4(1): 55-64.

[8] Wang D, Ma Y, Liu N, et al. Fine mapping and identification of the soybean *RSC4* resistance candidate gene to soybean mosaic virus[J]. *Plant Breeding*, 2011, 130(6): 653-659.

[9] Gómez-Gómez L, Boller T. FLS2: An LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*[J]. *Molecular Cell*, 2000, 5(6): 1003-1011.

[10] Sun X, Cao Y, Yang Z, et al. *Xa26*, a gene conferring resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice, encodes an LRR receptor kinase-like protein[J]. *The Plant Journal*, 2004, 37(4): 517-527.

[11] Li K, Ren R, Adhimoolam K, et al. Genetic analysis and identification of two soybean mosaic virus resistance genes in soybean [*Glycine max* (L.) Merr][J]. *Plant Breeding*, 2015, 134(6): 684-695.

[12] Chen X, Zuo S, Schwessinger B, et al. An XA21-associated kinase (OsSERK2) regulates immunity mediated by the XA21 and XA3 immune receptors [J]. *Molecular Plant*, 2014, 7(5): 874-892.

[13] Li J, Wen J, Lease K A, et al. BAK1, an *Arabidopsis* LRR receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modulates brassinosteroid signaling[J]. *Cell*, 2002, 110(2): 213-222.

[14] Roux M, Schwessinger B, Albrecht C, et al. The *Arabidopsis* leucine-rich repeat receptor-like kinases BAK1/SERK3 and BKK1/SERK4 are required for innate immunity to hemibiotrophic and biotrophic pathogens [J]. *The Plant Cell*, 2011, 23(6): 2440-2455.

[15] Hu H, Xiong L, Yang Y. Rice *SERK1* gene positively regulates somatic embryogenesis of cultured cell and host defense response against fungal infection[J]. *Planta*, 2005, 222(1): 107-117.

[16] Körner C J, Klauser D, Niehl A, et al. The immunity regulator BAK1 contributes to resistance against diverse RNA viruses[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2013, 26(11): 1271-1280.

[17] Fontes E P B, Santos A A, Luz D F, et al. The geminivirus nuclear shuttle protein is a virulence factor that suppresses transmembrane receptor kinase activity[J]. *Genes & development*, 2004, 18(20): 2545-2556.

[18] Yalpani N, Silverman P, Wilson T M, et al. Salicylic acid is a systemic signal and an inducer of pathogenesis-related proteins in virus-infected tobacco [J]. *The Plant Cell*, 1991, 3(8): 809-818.

[19] Hajimorad M R, Hill J H. Rsv1-mediated resistance against soybean mosaic virus-N is hypersensitive response-independent at inoculation site, but has the potential to initiate a hypersensitive response-like mechanism[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2001, 14(5): 587-598.

[20] Liu J Z, Horstman H D, Braun E, et al. Soybean homologs of MPK4 negatively regulate defense responses and positively regulate growth and development[J]. *Plant Physiology*, 2011, 157(3): 1363-1378.

[21] Laloi C, Mestres-Ortega D, Marco Y, et al. The *Arabidopsis* cytosolic thioredoxin *h5* gene induction by oxidative stress and its W-box-mediated response to pathogen elicitor[J]. *Plant Physiology*, 2004, 134(3): 1006-1016.

[22] Gao P, Bai X, Yang L, et al. Over-expression of osa-MIR396c decreases salt and alkali stress tolerance[J]. *Planta*, 2010, 231(5): 991-1001.

[23] Mariano A C, Andrade M O, Santos A A, et al. Identification of a novel receptor-like protein kinase that interacts with a geminivirus nuclear shuttle protein[J]. *Virology*, 2004, 318(1): 24-31.