

# 大豆 *GmBR11* 基因家族的鉴定及其对根瘤菌侵染的响应

杨家慧, 黄乐香, 刘邗贤, 苏伯鸿, 赵苗羽, 邢程顺, 刘宝辉, 赵晓晖

(广州大学生命科学学院/广东省植物适应与分子设计重点实验室, 广州 510006)

**摘要:** 大豆 (*Glycine max* (L.) Merr.) 在世界粮食和经济作物中占据重要地位, 与其他作物不同, 大豆可以与根瘤菌形成共生关系, 进行生物固氮。油菜素类固醇 (BR, brassinosteroid) 是调控植物生长发育的重要植物激素, 位于细胞膜上的受体 BR11 (Brassinosteroid insensitive 1) 在 BR 信号转导过程中起关键作用。虽然已有研究表明 BR 对大豆结瘤具有负调控作用, 但 BR 受体 *GmBR11* 在共生固氮方面的功能尚不明确。因此, 鉴定与解析 *GmBR11* 基因家族成员的特征与功能对于揭示 *GmBR11* 在大豆生长发育中的独特作用至关重要。本研究利用生物信息学方法在大豆基因组中共鉴定出 6 个 *GmBR11* 基因, 非均匀地分布在 4 条染色体上, 氨基酸数量在 1 136-1 211 aa 之间, 亮氨酸占比最高, 均为酸性的稳定蛋白。系统发育分析显示, *GmBR11* 基因家族可分为 3 个亚家族, 同一亚家族的基因结构和保守基序分布高度相似。共线性分析表明片段复制是 *GmBR11* 基因家族扩张的主要原因。*GmBR11* 基因家族的启动子上含有丰富的调控大豆光响应、激素响应、逆境响应和生长发育过程的顺式作用元件。*GmBR11* 的潜在磷酸化位点数量在 111-132 之间。预测了与 *GmBR11* 互作的蛋白有 19 个, 直接结合的有 9 个, 通过与多种蛋白互作参与到 BR 信号转导途径中调控多种生物学过程。*GmBR11* 家族基因在根和根瘤中均表达, 而且 *GmBR11a*、*GmBR11b*、*GmBRL1a* 和 *GmBRL1b* 在受到根瘤菌侵染后下调表达。本研究为大豆 *GmBR11* 基因的功能研究提供了新的理论依据, 并证明了它们在根瘤菌侵染早期发生响应, 这为深入了解 *GmBR11* 基因家族在大豆共生结瘤中的功能与分子机制提供了基础信息。

**关键词:** 大豆; *GmBR11* 基因家族; BR 受体; 结瘤; 根瘤菌

## Identification of Soybean *GmBR11* Gene Family and Its Response to Rhizobia Infection

YANG Jiahui, HUANG Lexiang, LIU Zhixian, SU Bohong, ZHAO Miaoyu, XING Chengshun, LIU Baohui,  
ZHAO Xiaohui

(School of Life Sciences, Guangzhou University/Guangdong Provincial Key Laboratory of Plant Adaptation and  
Molecular Design, Guangzhou 510006)

**Abstract:** Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) occupies an important position in food and economic crop worldwide. Unlike other crops, soybean can form a symbiotic relationship with rhizobia for biological nitrogen fixation. Brassinosteroids (BRs) is an important plant hormone that regulates plant growth and development. Brassinosteroid insensitive 1 (BR11), a receptor located on the cell membrane, plays a key role in the BR signal transduction. Although previous studies have shown that BR negatively regulates nodule formation in soybean, but the function of the BR receptor *GmBR11* in symbiotic nitrogen fixation remains unclear. Therefore, it is important to identify and elucidate the characteristics and functions of *GmBR11* gene family members to reveal the unique role of *GmBR11* in soybean growth and development. In this study, six *GmBR11* genes were identified in the soybean genome by bioinformatics methods, which were unevenly

收稿日期: 2024-12-29 网络出版日期:

URL:

第一作者研究方向为大豆分子遗传育种, E-mail: yangjh0413@163.com

通信作者: 赵晓晖, 研究方向为大豆分子遗传学与基因组学, E-mail: zhaoxh@gzhu.edu.cn

**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (32272135, 32072013)

**Foundation project:** National Natural Science Foundation of China (32272135, 32072013)

distributed on four chromosomes. The number of amino acids ranged from 1136 to 1211 aa, with leucine accounting for the highest proportion, all of which were acidic and stable proteins. Phylogenetic analysis showed that the *GmBR11* gene family could be divided into three subfamilies. The genes structure and conserved motif distribution within the same subfamily were highly similar. Synteny analysis indicated that the expansion of *GmBR11* gene family may depend on fragment repetition events. Promoter analysis showed that most *GmBR11* gene promoters contain multiple *cis*-elements related to light, hormone, stress response and growth and development. The number of potential phosphorylation sites of GmBR11 ranged from 111 to 132. The protein interaction network predicted that there were 19 proteins interacting with GmBR11 and 9 proteins directly binding, which participate in the regulation of various biological processes in the BR signal transduction pathway by interacting with various proteins. The *GmBR11* family genes were expressed in both roots and nodules, *GmBR11a*, *GmBR11b*, *GmBRL1a* and *GmBRL1b* were down-regulated after rhizobia infection. This study provided a new theoretical basis for the functional research of soybean *GmBR11* family genes, and proved that they responded in the early stage of rhizobium infection, which provided basic information for further understanding of the functions and molecular mechanisms of the *GmBR11* gene family in soybean symbiotic nodulation.

**Key words:** soybean; *GmBR11* gene family; BR receptor; nodulation; rhizobia

大豆 (*Glycine max* (L.) Merr.) 不仅因其植物蛋白质和油脂含量高而成为世界范围内的主要经济作物之一<sup>[1]</sup>, 还因其独特的固氮能力使之在农业生产中具有重要的生态效益和经济效益。氮素是植物生长发育的基本元素, 在调节植物生长、产量增减和品质组成等方面具有重要作用, 被认为是限制产量和品质决定的关键因素。尽管土壤中的氮素有限, 但豆科植物与其他作物不同, 可以与土壤中的根瘤菌形成一种互惠互利的共生体系, 通过形成固氮根瘤来实现生物固氮, 不仅能满足宿主植物的氮需求, 同时也会释放到土壤中供其他植物吸收使用<sup>[2]</sup>。根瘤菌会识别豆科植物根际所分泌的类黄酮化合物, 这一过程会诱导结瘤相关基因的表达并促使结瘤因子 (NFs, nod factors)<sup>[3]</sup>的合成。随后根瘤菌侵染豆科植物的根毛, 在中柱鞘细胞形成侵染线并进入植物根皮层, 皮层细胞被激活形成根瘤原基和根瘤<sup>[4]</sup>。大豆的 NF 受体可以感知并激活结瘤基因的表达, 如结瘤起始因子 (NIN, nodule inception)<sup>[5]</sup>、共生信号途径关键转录因子 NSP1/NSP2 (nodulation signaling pathway)<sup>[6]</sup>和早期结瘤素基因 (ENOD40, Early Nodulin 40)<sup>[7]</sup>等, NIN 和其他因子相互作用, 以调节根原基和根瘤的形成<sup>[8]</sup>。

油菜素内酯 (BL, brassinolide) 是一种甾醇类化合物, 最早在油菜花粉中发现<sup>[9]</sup>, 故将与 BL 有相似活性和结构的化合物统称为油菜素甾醇类化合物 (BRs, brassinosteroids)<sup>[10]</sup>。BR 是植物体内一种关键的类固醇激素, 参与生长发育的多个过程, 包括细胞的分裂和伸长、维管分化、生殖发育、花粉发育、腋芽生长、根分生组织发育、开花时间的调控、气孔发育及其开放和关闭、籽粒形态等, 还在生物和非生物胁迫中起关键作用<sup>[11-12]</sup>。已有研究发现在大豆品种 Enrei 及其超结瘤突变体 *En6500* 的叶面喷施 BR 或将 BR 直接注入根基, 会减少根瘤形成并抑制侧根发育, 相反, 外源施加 BR 生物合成抑制剂芸苔素啞则促进结瘤形成<sup>[13]</sup>。近期, 有研究者发现 BR 信号转导成分 *GmBES1-1* 通过抑制 NF 信号和结节形成来抑制结瘤<sup>[14]</sup>。BR 信号转导的核心受体, 油菜素内酯不敏感型受体 BRI1 (brassinosteroid insensitive 1), 属于一种位于细胞膜的富含亮氨酸重复受体激酶 (LRR-RLK, leucine rich repeats receptor-like kinase)<sup>[15]</sup>。它有 25 个 LRR 结构域, LRR XXI 和 LRR XXII 之间有一个长度为

70个氨基酸的岛结构域，该结构域为 BRI1 所特有，对感知 BR 至关重要<sup>[16]</sup>。早期研究者通过化学诱变，筛选出对 BR 不敏感的拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) 突变体 *bri1*，该突变体表现出雄性不育和植株矮小的特征，随后将控制该突变体的基因命名为 *BRI1*<sup>[17]</sup>。BR 与 BRI1 的细胞外结构域结合，以激活信号转导的级联反应。在细胞表面没有 BR 的情况下，BRI1 与 BRI1 激酶抑制剂 1 (BKI1, BRI1-associated kinase 1) 结合，处于非活性状态<sup>[18]</sup>。当感知 BR 来临时，BRI1 被部分激活并与 BKI1 解离，与另一种 LRR-RLK, BRI1 受体相关激酶 1 (BAK1, BRI1-associated kinase 1) 相互作用。BRI1 和 BAK1 激酶结构域之间能够相互进行磷酸化<sup>[18]</sup>，这个过程最终导致两种转录因子 BES1 (BRI1-EMS-suppressor 1) 和 BZR1 (brassinazole-resistant 1) 被激活，以调节 BR 下游基因的表达，进而实现对植物生长与发育过程的调控<sup>[19,20]</sup>。

在拟南芥中 *BRI1* 基因还有三类同源基因，*BRL1* (*brassinosteroid insensitive 1-like 1*)、*BRL2* (*brassinosteroid insensitive 1-like 2*) 和 *BRL3* (*brassinosteroid insensitive 1-like 3*)。其中只有 *BRL1* 和 *BRL3* 与 BR 结合，且能够回补拟南芥 *bri1* 突变体的矮化表型，是具有功能性的 BR 受体<sup>[21]</sup>。*BRI1* 除了转导 BR 信号，在植物逆境胁迫响应过程中也起着至关重要的作用。例如水稻 (*Oryza sativa* L.) *BRI1* 缺失突变体 *d61* 对根结线虫表现出较强的抗性<sup>[22]</sup>。在拟南芥中过表达 *AtBRL3* 基因可以提高拟南芥的耐旱性<sup>[23]</sup>，而在高粱 (*Sorghum bicolor* L.) 中 *SbBRI1* 突变可以增强植物的耐旱性<sup>[24]</sup>。此外，在蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula* Gaertn.) 中，有研究者发现 *mtbri1* 突变体结瘤数量减少且表现出固氮缺陷<sup>[25]</sup>。在豌豆 (*Pisum sativum* L.) 的 BR 生物合成突变体 *lk*、BR 受体突变体 *lkb* 以及 *bri1* 中，均发现侧根和根瘤数量减少<sup>[26]</sup>。这些研究表明 *BRI1* 在植物发育和适应环境变化 (如生物和非生物胁迫) 中均起关键作用，且对豆科植物根瘤形成具有重要的调节作用。

针对大豆 *GmBRI1* 基因的研究，Wang 等<sup>[27]</sup>和 Peng 等<sup>[28]</sup>分别克隆了 *GmBRI1a* 和 *GmBRI1b* 基因，发现 *GmBRI1a* 在大豆快速生长器官和根部中表达较高，且均可以回补拟南芥 *bri1-5* 突变体的生长缺陷，验证了 *GmBRI1a* 和 *GmBRI1b* 在 BR 信号转导中的受体作用，二者在进化上具有保守性。Chen 等<sup>[14]</sup>通过 RNA 干扰 (RNAi, RNA interference) 降低 *GmBRI1a* 和 *GmBRI1b* 在大豆毛状根中的表达，发现结瘤密度增加，同时 *GmBRI1b* 过表达的大豆植株结瘤数量减少。*BRI1* 作为 BR 的重要受体，目前已报导的大豆 *GmBRI1* 基因的研究大部分依赖于回补拟南芥突变体且只集中在家族成员 *GmBRI1a* 和 *GmBRI1b* 上，对 *GmBRI1* 基因家族的功能研究在大豆体内的验证还缺少证据，尤其在共生结瘤中的研究还不全面。因此，本研究对大豆 *GmBRI1* 基因家族进行鉴定和综合分析，包括蛋白质的理化性质、基因结构、染色体定位、系统发育分析、顺式作用元件分析、磷酸化位点预测、蛋白互作网络预测以及表达模式分析等，探索 *GmBRI1* 家族基因与根瘤菌感染反应的关系，为深入解析 *GmBRI1* 家族基因在大豆共生结瘤中的功能提供研究基础。

# 1 材料与方法

## 1.1 试验材料

本研究所用的植物材料是大豆参考基因组品种 Williams 82 (Wm82)，所用根瘤菌菌株为 USDA110。选择发育良好的大豆成熟种子在灭菌蛭石中萌发，在人工气候室中培养，培养条件为 25°C 恒温、16 h 光照/8 h 黑暗的长日照光周期条件，相对湿度 70%。生长 7 d 后接种根瘤菌，浓度用蒸馏水调至 OD<sub>600</sub> = 0.08，每株大豆苗接种 30 mL 根瘤菌。

## 1.2 试验方法

**1.2.1 *GmBRII* 基因家族成员的鉴定** 以 4 个拟南芥 BRII 家族蛋白序列 AtBRII (AT4G39400)、AtBRL1 (AT1G55610)、AtBRL2 (AT2G01950) 和 AtBRL3 (AT3G13380) 作为参考序列，在 Phytozome 13 (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>) 数据库下载大豆全基因组序列进行 BLASTP 分析，并利用 Pfam 数据库 (<http://pfam.xfam.org/search>) 获得 BRII 蛋白的典型结构域，岛状结构域 PF 号 (PF20141)，利用 TBtools 的 Hmm Search 工具进行筛选。然后使用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 和 CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 确认 *GmBRII* 家族基因的候选成员。

**1.3.2 *GmBRII* 蛋白理化性质预测** 通过 ExPASy 在线网站中的 Prot Param (<https://web.expasy.org/protparam/>) 对大豆 *GmBRII* 蛋白的氨基酸数量、分子量、分子式、原子数等进行理化性质分析<sup>[29]</sup>，并利用同个网站的 Prot Scale (<https://web.expasy.org/protscale/>) 预测蛋白疏水性。通过 NetPhos 网站 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetPhos-3.1/>) 对 BRII 家族成员进行磷酸化位点预测<sup>[30]</sup>。

**1.3.3 *GmBRII* 基因家族的系统发育分析** 在 Phytozome 数据库中获取拟南芥、百脉根 (*Lotus corniculatus* L.)、蒺藜苜蓿、番茄 (*Solanum lycopersicum* L.)、水稻、玉米 (*Zea mays* L.)、高粱的氨基酸序列，使用 Hmm search 搜索 7 个物种中含有 BRII 蛋白典型的结构域的基因，利用 MEGA 11 进行氨基酸序列多重比对，并通过相邻连接法 (Neighbor-Join, NJ) 构建系统发育树<sup>[31]</sup>，bootstrap 值设置为 1000。利用 ChiPlot 对生成的系统发育树进行美化 (<https://www.chiplot.online/>)。

**1.3.4 *GmBRII* 基因结构和保守基序分析** 保守基序通过在线工具 MEME (<https://meme-suite.org/meme/>) 检索<sup>[32]</sup>，使用 TBtools 工具完成可视化。利用 TBtools 中的 Visualize Gene Structure 插件进行基因结构分析。

**1.3.5 染色体定位与共线性分析** 利用大豆基因组的 GFF3 文件和 TBtools 确定每个 *GmBRII* 家族基因的染色体位置<sup>[33]</sup>。使用 TBtools 中的 One Step MCScanX 插件对大豆物种内 *GmBRII* 基因进行共线性分析<sup>[33]</sup>，使用 Advanced Circos 插件进行可视化。使用 TBtools 中 Dual Systemy Plot 插件对大豆及其他物种的种间共线性进行分析。

**1.3.6 顺式作用元件分析** 获取 *GmBR11* 家族基因的转录起始位点上游 2 000 bp 的基因组序列, 利用在线工具 PlantCARE (<http://bioinformatics.psbugent.be/webtools/plantcare/html/>) 对每个成员的启动子序列进行顺式作用元件分析<sup>[34]</sup>, 利用 Excel 工具可视化。

**1.3.7 GmBR11 互作蛋白预测** 利用网站 Uniprot (<https://www.uniprot.org/>) 得到 GmBR11 家族所对应的蛋白 ID, 导入在线网站 STRING (<https://cn.string-db.org/>), 选择“Multiple sequences”, 设置物种为“Glycine max”, 线条粗细表示两个相连蛋白质之间互作的强度, 最低互作置信度为中等可信度 0.400, 最大互作数中第一层、第二层设置为 10 个, 其余参数设置为默认。

**1.3.8 GmBR11 基因家族的表达分析** 在接种根瘤菌 0 h、12 h、24 h 采集根毛样品, 以及接种 28 d 后采集根毛和根瘤样品。使用 Ultrapure RNA Kit 试剂盒 (康为世纪生物科技股份有限公司, 江苏), 提取样品总 RNA。采用 HiScript III RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper) 试剂盒 (诺唯赞生物科技股份有限公司, 南京) 将每个样品的总 RNA 逆转录合成第一链 cDNA。使用 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix (诺唯赞生物科技股份有限公司, 南京), 在实时荧光定量 PCR 仪 (罗氏, 瑞士) 进行 qRT-PCR。反应体系为 10  $\mu$ L, 反应程序为三步法: 95°C 预变性 1 min, 1 个循环; 95°C 变性 5 s, 60°C 延伸 30 s, 共 40 个循环。内参基因为大豆 *GmTubulin* (表 1), 采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  方式计算 *GmBR11* 家族基因的相对表达水平。3 次生物学重复。利用 GraphPad Prism 9.0 软件的 Student's *t*-test 方法进行显著性分析并作图。

**表 1 qRT-PCR 引物列表**

**Table 1 Primer sequences for qRT-PCR**

引物名称 Primer Name	引物序列 Primer Sequence (5'-3')
GmTubulin-qF	TCTTGGACAACGAAGCCATCT
GmTubulin-qR	GGTGAGGGACGAAATGATCT
GmBR11a-qF	TCCTCCTCATTAACCTCCCT
GmBR11a-qR	TTGAGAAGCCAAGAAACGAC
GmBR11b-qF	AACCTCCAATCCCTCAACCTC
GmBR11b-qR	TTTGTTGCCTTTGAGAGAGA
GmBRL1a-qF	GTATGATCTACCTTGACCTTCC
GmBRL1a-qR	AAGAAAGACCCTCCAATGCC
GmBRL1b-qF	AACAAACTAACGGGTCAACTCAG
GmBRL1b-qR	GAACTAGATTCTTGACGAACC
GmBRL2a-qF	AATGACAACAGCCAAACCAC
GmBR12a-qR	AAACCACCACACCAATGAG
GmBRL2b-qF	CAAGAATGATAACAGCCAACCC
GmBR12b-qR	AGCAACAGAGATGAGAATTCCC
GmNIN1a-qF	CATCTTGAGCCTCTACCACC

GmNIN1a-qR	GCTTTGACTCTAAAAGTGCCGG
GmENOD40.1-qF	TGGACAACACCCTCTAAACCA
GmENOD40.1-qR	GTGAGGGAGTGTGAGGAGTGA

## 2 结果与分析

### 2.1 *GmBRII* 家族成员的鉴定及理化性质分析

利用拟南芥的 4 个 *BRII* 蛋白序列作为参考，筛选出大豆基因组中有 6 个 *GmBRII* 家族成员，与已报导的结果一致<sup>[28]</sup>，分别命名为 *GmBRIIa* (*Glyma.06G147600*)，*GmBRIIb* (*Glyma.04G218300*)，*GmBRL1a* (*Glyma.04G115700*)，*GmBRL1b* (*Glyma.06G320600*)，*GmBRL2a* (*Glyma.05G136900*)，*GmBRL2b* (*Glyma.08G092200*)。为了解 *GmBRII* 家族成员的生物学特征和潜在功能，对 *GmBRII* 基因家族成员进行分析，包括其在染色体上的位置、开放阅读框长度、氨基酸数量、分子量、理论等电点 (pI) 等。结果如表 2 所示，这 6 个 *GmBRII* 家族成员的开放阅读框在 3 411-3 636 bp 之间；氨基酸数量在 1 136-1 211 aa 之间；分子量范围为 124.44-132.5 kD；原子数为 17 575-18 711 之间；等电点在 5.85-6.44 之间，均小于 7.0，为酸性蛋白；不稳定系数在 30.9-36.66 之间，均为稳定蛋白；亲脂系数在 96.96-101.24，均被预测为疏水性。蛋白所含的主要氨基酸比例中均是亮氨酸 Leu 含量最高 (14.7%-15.4%)，其次是丝氨酸 Ser 含量 (10.1%-12%)，这可能与富含亮氨酸重复的受体激酶性质有关。综上，尽管 6 个 *GmBRII* 成员的氨基酸数目、分子量、分子数、原子数目存在差异，但差距不大且不同成员之间具有一定的相似性，这些结果表明 *GmBRII* 家族成员之间可能存在功能的冗余性。

**表 2 *GmBRII* 基因家族理化性质**

**Table 2 Physicochemical properties of *GmBRII* gene family in soybean**

基因名称 Gene Name	基因位置 Gene location	开发阅读框 ORF (bp)	蛋白长度 Protein length (AA)	分子量 Molecular weight (kD)	分子式 Formula	原子数目 Total number of atoms
<i>GmBRIIa</i>	Chr06:12052121 - 12056526	3555	1184	129.33	C <sub>5763</sub> H <sub>9119</sub> N <sub>1539</sub> O <sub>1741</sub> S <sub>47</sub>	18209
<i>GmBRIIb</i>	Chr04:48926007 - 48930251	3564	1187	129.01	C <sub>5752</sub> H <sub>9111</sub> N <sub>1531</sub> O <sub>1735</sub> S <sub>48</sub>	18177
<i>GmBRL1a</i>	Chr04:13274335 - 13277947	3612	1203	130.91	C <sub>5851</sub> H <sub>9266</sub> N <sub>1568</sub> O <sub>1747</sub> S <sub>43</sub>	18475
<i>GmBRL1b</i>	Chr06:50922018 - 50925654	3636	1211	132.5	C <sub>5920</sub> H <sub>9390</sub> N <sub>1596</sub> O <sub>1762</sub> S <sub>43</sub>	18711
<i>GmBRL2a</i>	Chr05:32948083 - 32953596	3522	1173	128.94	C <sub>5712</sub> H <sub>9184</sub> N <sub>1542</sub> O <sub>1732</sub> S <sub>55</sub>	18225
<i>GmBRL2b</i>	Chr08:6973835 - 6977613	3411	1136	124.44	C <sub>5504</sub> H <sub>8849</sub> N <sub>1493</sub> O <sub>1677</sub> S <sub>52</sub>	17575

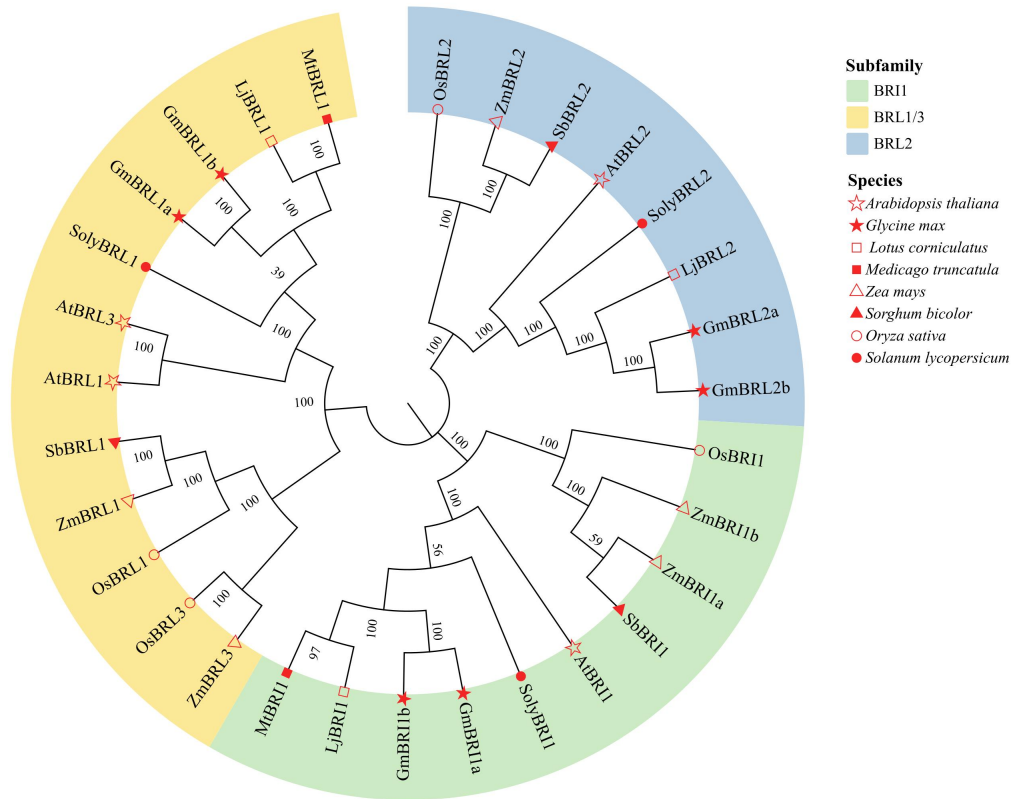
  

基因名称 Gene Name	等电点 pI	不稳定系数 Instability index	脂肪系数 Aliphatic index	疏水性 Hydrophobicity	主要氨基酸 Major amino acids (%)	磷酸化潜在位点 Phosphorylation potential
-------------------	-----------	----------------------------	-------------------------	-----------------------	--------------------------------	--------------------------------------

<i>GmBRI1a</i>	6.27	36.66	96.96	Hydropathicity	Leu 15.4,Ser 11.7, Asn 7.4,Gly 7.3	132
<i>GmBRI1b</i>	6.23	35.87	98.69	Hydropathicity	Leu 15.4,Ser 12.0, Gly 7.6,Asn 7.3	123
<i>GmBRL1a</i>	5.97	33.49	101.24	Hydropathicity	Leu 14.7,Ser 11.1, Gly 8.1,Asn 6.9	123
<i>GmBRL1b</i>	6.44	34.19	100.64	Hydropathicity	Leu 14.8,Ser 11.3, Gly 7.8,Asn 6.9	123
<i>GmBRL2a</i>	5.91	30.9	101.3	Hydropathicity	Leu 15.1,Ser 10.1, Gly 7.3,Asn 6.9	117
<i>GmBRL2b</i>	5.85	31.04	100.76	Hydropathicity	Leu 15.2,Ser 10.2, Gly 7.7,Asn 6.9	111

## 2.2 不同物种的 BRI1 系统发育分析

为了研究大豆和其他物种 BRI1 的系统发育关系,分析了来自 8 个物种的 30 个 BRI1 蛋白序列。双子叶植物,大豆中有 6 个成员、拟南芥有 4 个成员、百脉根有 3 个成员、蒺藜苜蓿有 2 个成员、番茄有 3 个成员。单子叶植物,水稻有 4 个成员、玉米有 5 个成员、高粱有 3 个成员。系统发育树显示这些 BRI1 成员可以划为 3 个亚家族(图 1),分别是 BRI1 (10 个成员)、BRL1/3 (12 个成员)和 BRL2 (8 个成员)。除了蒺藜苜蓿以外,其余 7 个物种在三个亚家族中均有成员,属于同一亚家族的基因可能在进化过程中扮演相似的角色,具有保守性。同时每个亚家族又进一步分为双子叶植物和单子叶植物两个小分支,表明双子叶植物和单子叶植物之间 BRI1 基因的结构和功能可能存在明显差异。



不同的亚家族由不同颜色代表；不同符号代表不同物种：拟南芥（空心星号）；大豆（红色星号）；百脉根（空心正方形）；蒺藜苜蓿（红色正方形）；番茄（红色圆形）；水稻（空心圆形）；玉米（空心三角形）；高粱（红色三角形）

Different colors represent different subfamilies; Different symbols represent different species; *Arabidopsis thaliana* ( hollow star ); *Glycine max* ( red star ); *Lotus corniculatus* ( hollow square ); *Medicago truncatula* ( red square ); *Solanum lycopersicum* ( red circles ); *Oryza sativa* ( hollow circles ); *Zea mays* ( hollow triangle ); *Sorghum bicolor* ( red triangle )

图 1 BRI1 基因家族的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of BRI1 gene family

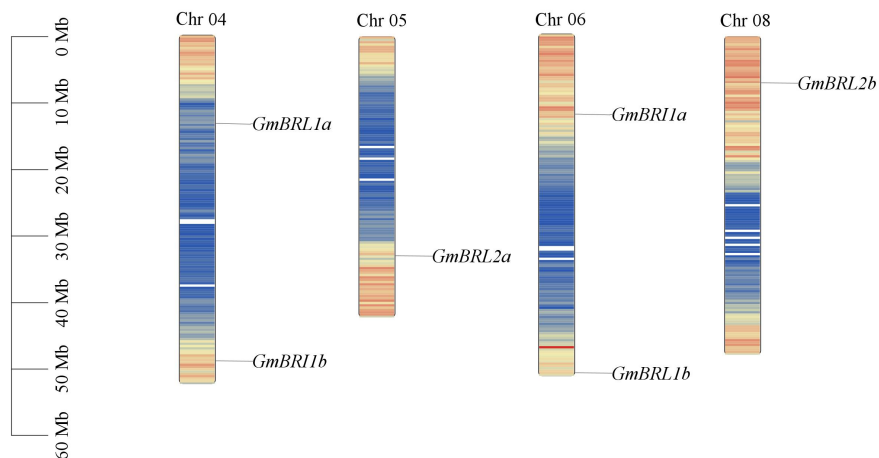
### 2.3 GmBRI1 基因分布及共线性分析

为了准确了解 *GmBRI1* 基因在染色体上的位置，利用大豆基因组 GFF3 文件和 TBtools 绘制染色体定位分布图。6 个 *GmBRI1* 基因不均匀的分布在 4 条染色体上（图 2），两对同源基因 *GmBRI1a* 与 *GmBRI1b*、*GmBRL1a* 与 *GmBRL1b* 分别分布在染色体 Chr 04 和 Chr 06 上，*GmBRL2a* 与 *GmBRL2b* 分布在 Chr 05 和 Chr 08 染色体上。大豆是典型的古多倍体，先后经历了两次全基因组多倍化并伴随着缓慢的二倍化过程，导致近 75% 的基因以多拷贝形式存在<sup>[35]</sup>。除了多倍体事件以外，片段复制也是基因家族产生并扩张的主要原因<sup>[36]</sup>。种内共线性分析显示，大豆基因组中 6 个 *GmBRI1* 家族基因存在 3 个片段复制事件（*GmBRI1a/GmBRI1b*、*GmBRL1a/GmBRL1b*、*GmBRL2a/GmBRL2b*）（图 3），这些基因对之间具有高度同源性，意味着它们可能在功能上相对保守，共同调控



大豆相同的生物学过程。

有研究指出物种间同源性高的基因对之间可能具有共线性，从而使它们具有相似的生物学特征和表达模式<sup>[37]</sup>。为了解析 *BR11* 基因家族的进化关系，我们构建了 8 个物种的 *BR11* 基因家族种间共线性图谱（图 4），包括典型的双子叶模式植物、豆科植物以及单子叶植物，即大豆与拟南芥、百脉根、蒺藜苜蓿、番茄、水稻、玉米和高粱的比较综合图谱，与大豆 *GmBR11* 基因关联强度由高到低为：百脉根（6 对）、拟南芥（6 对）、番茄（6 对）、蒺藜苜蓿（4 对）、水稻（2 对）、玉米（0 对）、高粱（0 对），即大豆与双子叶植物 *BR11* 基因存在 22 对共线性关系，而在被测单子叶植物中只与水稻存在 2 对共线性关系，在玉米和高粱中均未发现共线性关系。其中 *GmBR11a*、*GmBR11b*、*GmBRL1a* 和 *GmBRL1b* 与 4 个物种（拟南芥、百脉根、蒺藜苜蓿、番茄）的同源基因有关，*GmBRL2a* 和 *GmBRL2b* 与 3 个物种（拟南芥、百脉根、水稻）的同源基因有关。表明 *BR11* 和 *BRL1* 同源基因对可能在单、双子叶植物分化之后才在双子叶植物中出现。值得注意的是，虽然大豆、百脉根与蒺藜苜蓿同为豆科植物，但大豆 *GmBRL2a* 和 *GmBRL2b* 基因只与百脉根存在共线性关系，而蒺藜苜蓿中并不存在，表明大豆与百脉根的亲缘关系可能更近，而且 *BRL2* 同源基因对可能出现在大豆、百脉根与蒺藜苜蓿分化之后。根据种间共线性分析的结果，说明 *BR11* 基因在双子叶植物和单子叶植物的进化过程中可能发生了显著的变异和重复，而且极有可能在双子叶植物的分化过程中发挥更重要的作用。

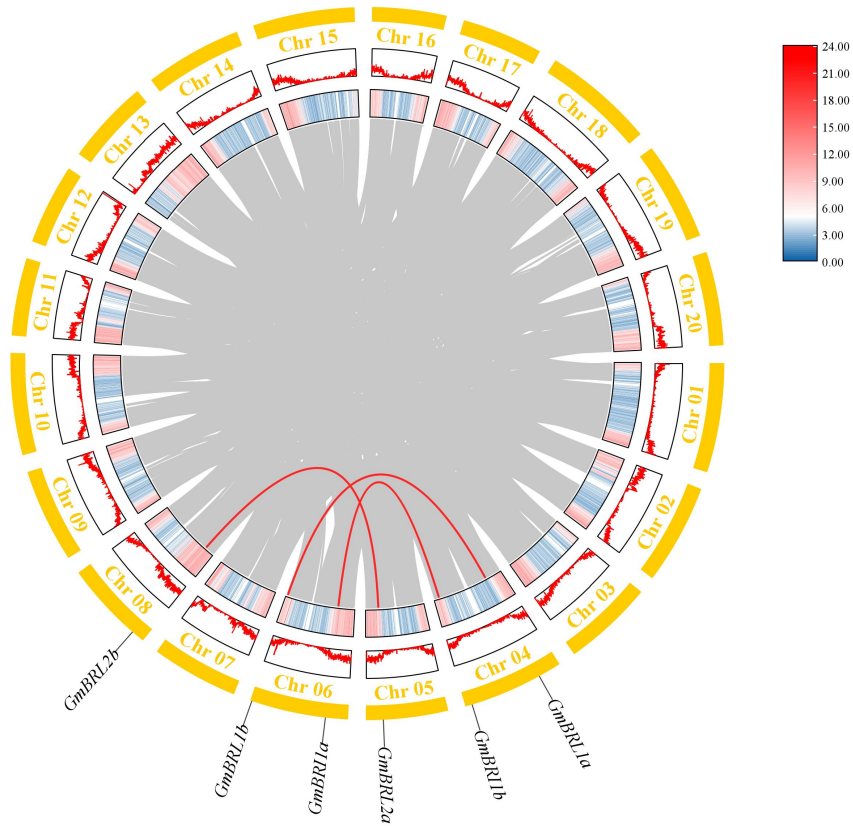


比例尺以兆碱基 (Mb) 为单位。染色体上的颜色表示基因的密度，红色表示最高密度，蓝色表示最低密度

The scale is measured in Megabase ( Mb ). The colors on the chromosome represent the density of the gene, red represents the highest density, and blue represents the lowest density

图 2 *GmBR11* 基因家族在染色体上的分布

Fig. 2 Chromosomal distribution of *GmBR11* gene family

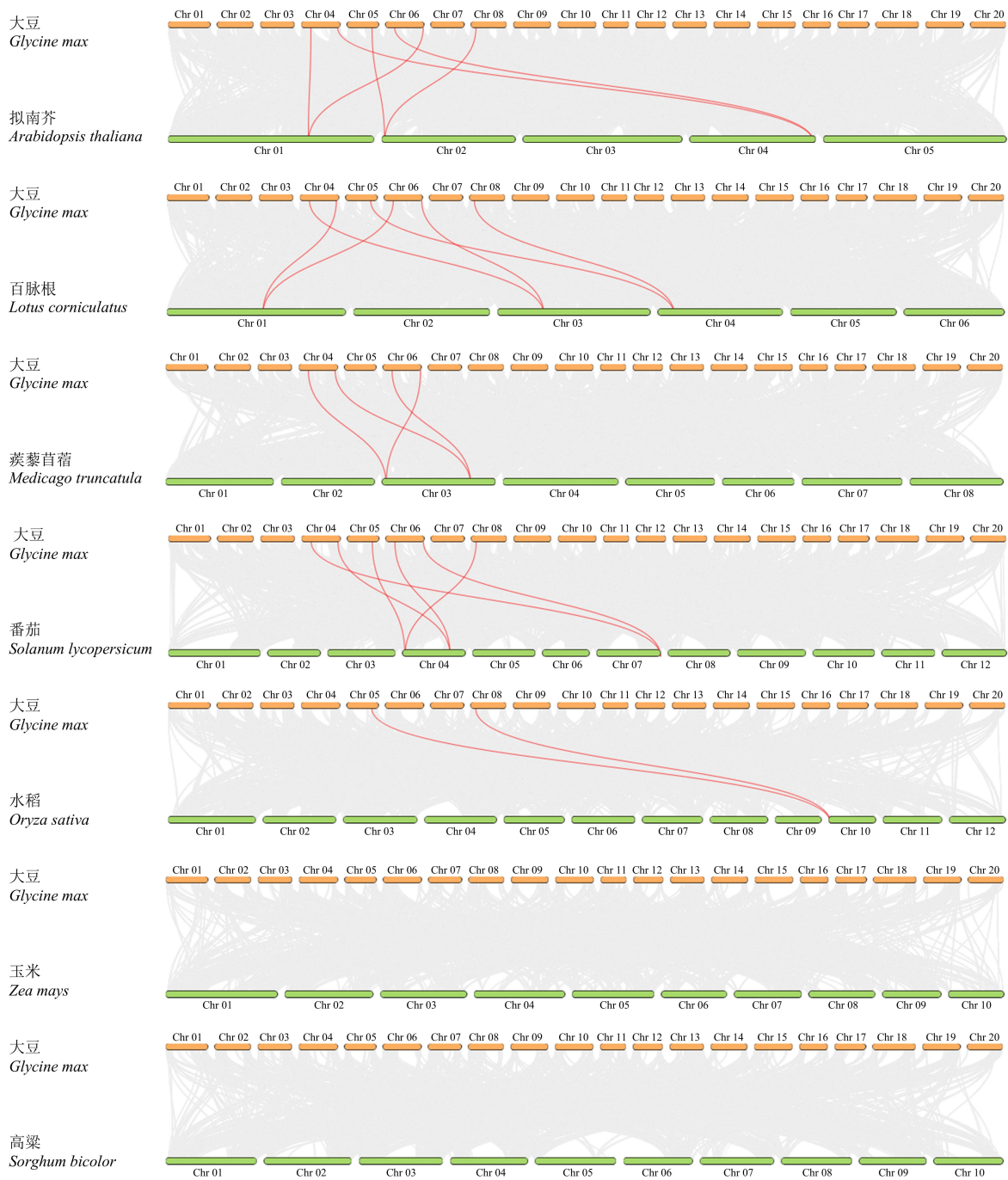


红色曲线连接片段复制的基因对。外侧部分指示基因在染色体上的对应位置，黄色框对应不同的染色体（Chr 01-Chr 20）。红色锯齿线突出显示了每条染色体上的基因密度高低。图的内侧框进一步强调了染色体内的基因密度

Red curved line connects duplicated gene pairs. The outer part indicates the location of these genes on the chromosome, and the yellow boxes correspond to different chromosomes ( Chr01-Chr20 ). Red serrated lines highlight the gene density on each chromosome. The inner frames of the chart further emphasize the gene density in the chromosome

**图 3 *GmBR11* 基因家族的种内共线性分析**

**Fig. 3 Synteny analysis of *GmBR11* genes family in soybean**



红色高亮线为 *GmBR11* 基因的物种间共线性对，灰色线条为大豆与其他物种基因组的所有共线性区块

The red lines highlight collinear pairs of *GmBR11* genes, while the gray lines in the background represent collinear blocks between the genome of soybean and the other species

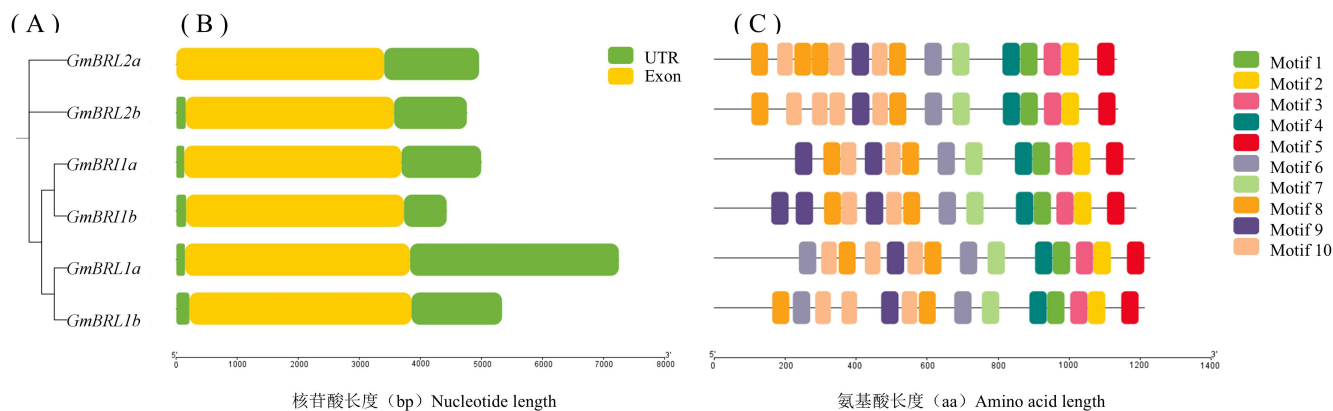
图 4 大豆与不同物种间 *BR11* 基因的共线性分析

Fig. 4 Synteny analysis of *BR11* gene between soybean and other species

## 2.4 *GmBR11* 基因结构和保守基序分析

为了探究大豆 *GmBR11* 家族基因结构的保守性和功能的多样性, 根据其编码序列和基因组信息, 利用 TBtools 以及 MEME Suitez 在线网站分析了 *GmBR11* 家族成员的基因结构和保守基序。基因结构分析表明, *GmBR11* 家族基因均没有内含子 (图 5A、B)。无内含子基因是一种在转录过程中无需内含子剪切步骤从而快速应答相应外界因素的基因, 可以更快速的完成转录过程<sup>[38]</sup>。大豆 6 个 *GmBR11* 成员的 UTR 序列长度不尽相同, UTR 在分子遗传学中具有重要作用, 通过富含的顺式作用元件精细调控基因的时空表达模式。因此, 推测 *GmBR11* 成员之间可能会参与不同的生物学过程。所有 *GmBR11* 家族成员都包含 10 个 Motif, 且同源基因之间的 Motif 分布具有相似性 (图 5C), 表明同源基因间保守性较高, 可能具有相似的生物学功能。

综上所述表明, *GmBR11* 家族成员既具有蛋白功能的相对保守性, 同时又存在不同成员间的分工协作以快速应对或缓冲各种不同的外界环境变化。这为深入了解 *GmBR11* 家族基因的功能提供了重要线索。



A: 系统发育树; B: 基因结构; C: 保守基序

A: Phylogenetic tree; B: Gene structure; C: Conserved motif

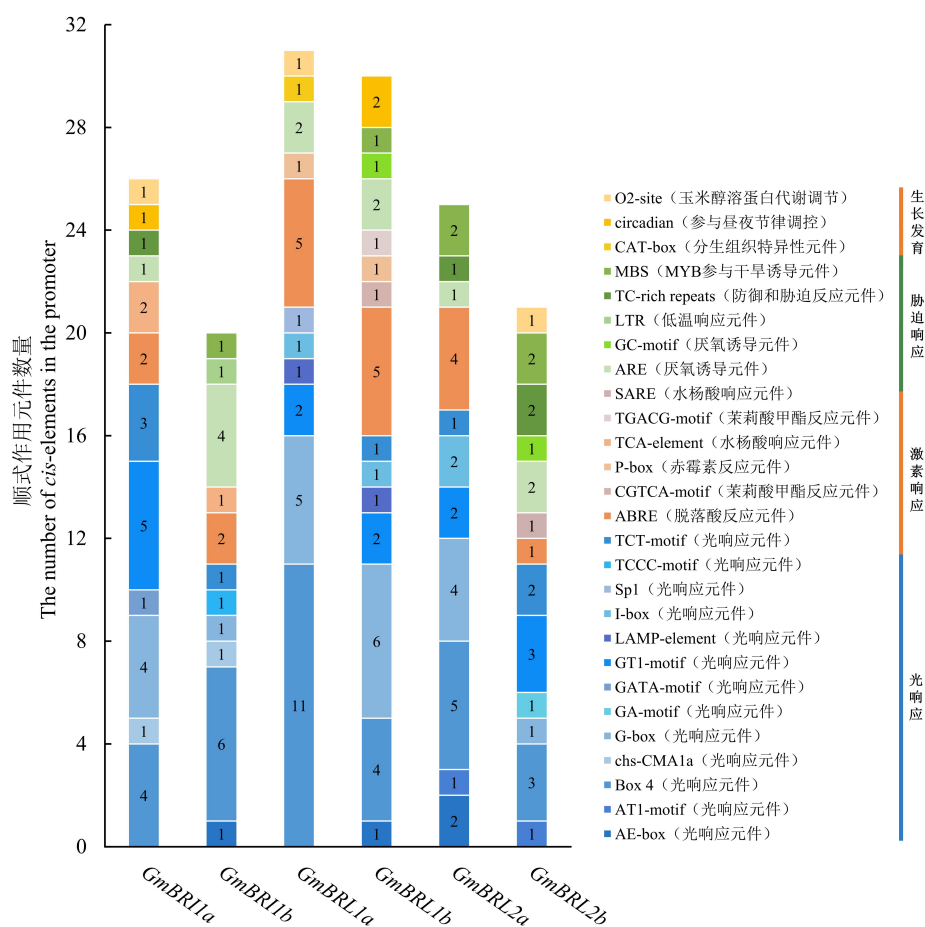
图 5 *GmBR11* 基因家族的基因结构和保守基序分析

Fig. 5 Analysis of gene structure and conserved motifs of *GmBR11* gene family

## 2.5 *GmBR11* 基因启动子的顺式元件分析

基因的表达调控取决于启动子区顺式作用元件的种类和数量。为了探索 *GmBR11* 基因潜在的转录调控机制, 本研究选取 *GmBR11* 基因转录起始位点上游 2 000 bp 序列分析其中的顺式作用元件。结果显示, 共鉴定出 27 种顺式作用元件, Box 4 和 G-box 元件在 *GmBR11* 家族基因启动子中大量富集, 表明 *GmBR11* 家族基因可能会受到特定光信号的诱导。除了含有丰富的光响应元件外, 还存在与调节生长发育、逆境胁迫和激素相关的元件 (图 6)。 *GmBRL1a* 和 *GmBRL1b* 启动子的激素响应元件占比较大, 分别为 6 个和 8 个, 表明这两个基因可能在激素通路中发挥主要作用; 而 *GmBRL2b* 和 *GmBR11b* 的胁迫响应元件居多, 分别为 7 个和 6 个, 这两个基因可能在应对逆境中发挥关键作用, 预示着 *GmBR11* 家族基因在功能上具有不同程度的差异性。

以上分析表明, *GmBRII* 家族基因在调控光响应、激素响应、逆境胁迫和生长发育过程中发挥重要的作用, 而且家族成员之间既存在功能的保守性又有差异, 可能在长期演化过程中通过调整家族成员的基因表达, 产生了新的基因功能, 以确保植物在生长发育及应对各种环境变化时由不同的 *GmBRII* 家族成员协同或独立的发挥作用。



不同的顺式元件以不同的颜色表示

The different *cis*-elements are indicated by different colors

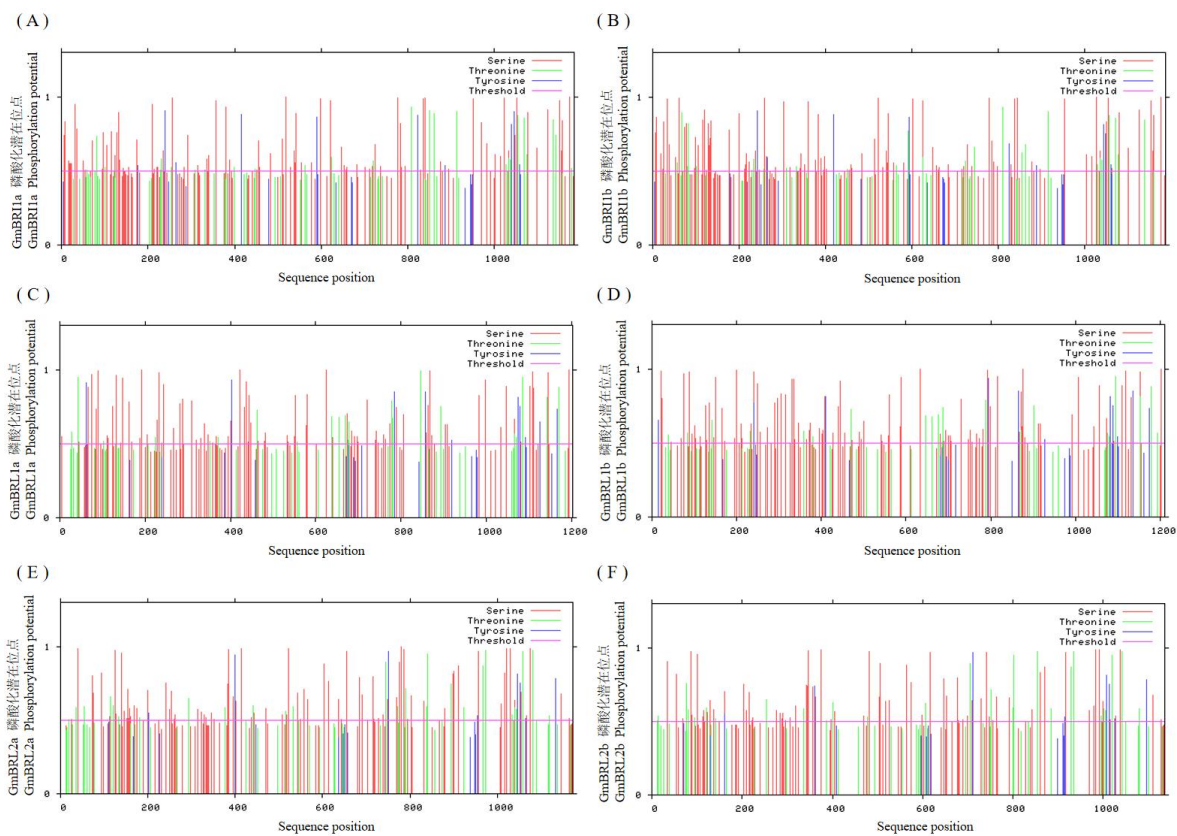
图 6 *GmBRII* 基因家族启动子的顺式作用元件分析

Fig. 6 Analysis of *cis*-acting elements in the promoter of *GmBRII* gene family

## 2.6 *GmBRII* 家族蛋白的磷酸化位点预测

蛋白质的磷酸化修饰在植物发育过程和适应环境变化中的信号传导至关重要<sup>[39]</sup>。BR 信号转导需要通过其受体 BRI1 的一些列磷酸化事件启动信号级联反应, 并激活下游 BR 响应基因的表达。磷酸化主要集中在丝氨酸 (Ser, Serine)、苏氨酸 (Thr, Threonine) 和酪氨酸 (Tyr, Tyrosine) 残基上。已知拟南芥 BRI1 的酪氨酸位点 Tyr-831

磷酸化会导致生长抑制和开花延迟，而 Tyr-956 磷酸化会抑制 BRI1 激酶的活性<sup>[40]</sup>。利用 NetPhos 2.0 Server 在线工具，对 GmBRI1 家族成员进行磷酸化位点的预测分析，结果显示 6 个 GmBRI1 蛋白的潜在磷酸化位点数量在 111-132 之间，其中 GmBRI1a 磷酸化位点最多（表 1）。6 个成员均包含丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸位点，3 类位点数量各不相同，但主要都是以丝氨酸和苏氨酸为主（图 7）。因此推测 GmBRI1 家族成员之间在 BR 信号转导的功能与活性方面可能既存在一定的保守性又具有一定的差异性。



红色线条代表丝氨酸；绿色线条代表苏氨酸；蓝色线条代表酪氨酸；紫色线条代表阈值

Red lines represent Serine; green lines represent Threonine; blue lines represent Tyrosine; purple lines represent threshold; A: GmBRI1a; B: GmBRI1b; C: GmBRL1a; D: GmBRL1b; E: GmBRL2a; F: GmBRL2b

图 7 GmBRI1 家族蛋白的潜在磷酸化位点预测

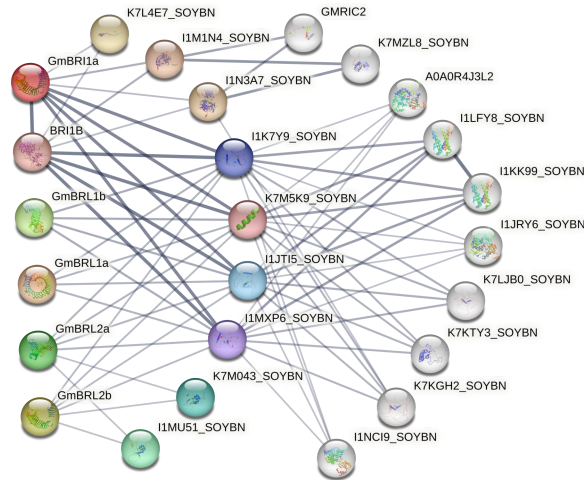
Fig.7 Prediction of potential phosphorylation sites of GmBRI1 family protein in soybean.

## 2.7 GmBRI1 的互作蛋白预测

为了深入了解 GmBRI1 家族蛋白的潜在功能，探索与其他因子的相互作用关系，使用在线程序 STRING (<https://string-db.org/>) 来预测其互作网络。结果显示，GmBRI1 家族蛋白存在复杂的相互作用，共获得 19 个互作蛋白（图 8，表 3），其中 I1K7Y9\_SOYBN、K7M5K9\_SOYBN、I1JT15\_SOYBN、I1MXP6\_SOYBN 这 4 个蛋白都属于 BKI1 成员，即 BRI1 激酶抑制剂，均与 6 个 GmBRI1 蛋白直接互动，尤其与 GmBRI1a 和 GmBRI1b 存在高强度的互作关系。除此以外，获得的其他直接互作蛋白分别属于 ATP 酶、蛋白激酶及含有 BSD 结构域

的转录因子。在获得的间接互作蛋白中，GMRIC2 的编码基因 *CLE35* (*CLAVATA3-like 35*)，属于 CLE (*CLAVATA3/Embryo Surrounding Region*) 多肽激素家族，所编码的蛋白质在细胞间的信号传递中起着重要作用，受根瘤菌和硝酸盐诱导，并通过 CLE/SUNN 介导的结瘤自调节系统 AON (Autoregulation of nodulation) 抑制根瘤形成<sup>[41]</sup>；K7MZL8\_SOYBN 是 MYB 转录因子的一种；A0A0R4J3L2、I1JRY6\_SOYBN 和 I1NCI9\_SOYBN 属于 JAR1 (Jasmonate resistant 1) 或 JAR4 (Jasmonate resistant 4)，可以激活 JA 信号途径，已有研究表明 JA 途径介导着植物的生长发育、胁迫响应以及调控根瘤菌的侵染<sup>[42,43]</sup>；I1KK99\_SOYBN、I1LFY8\_SOYBN 属于类固醇 5- $\alpha$ -还原酶 DET2 (DEETIOLATED2)，DET2 是催化 BR 生物合成过程中的主要限速酶，负责将油菜甾醇转化为油菜甾烷醇<sup>[44]</sup>；K7LJB0\_SOYBN、K7KGH2\_SOYBN 属于 PIF3 转录因子。

综上所述，预测出 GmBRI1 家族蛋白与 BRI1 激酶抑制剂 BKI1 可以直接互作，或者通过 BKI1 招募其他成员形成更大的蛋白复合体，参与到 BR 信号转导途径所调控的不同生物学过程中，其中可能既有 GmBRI1 蛋白功能保守性的一面，又有调控豆科植物所特有的结瘤过程。



不同的球代表不同的蛋白质；彩色球代表直接互作蛋白，白色球代表间接互作蛋白；连接线段的粗细表示两个相连蛋白的互作强度，  
线段越粗表示互作强度越高

Each ball represents a different protein; The color ball represents the direct interaction protein, and the white ball represents the indirect interaction protein; the thickness of the connecting line thickness indicates the strength of the two connected proteins. The thicker the line, the higher the interaction intensity

**图 8 GmBRI1 家族成员互作蛋白预测**

**Fig. 8 Protein interaction prediction of GmBRI1 family members**

**表 3 GmBRI1 互作蛋白列表**

**Table 3 List of BRI1 interaction protein in soybean**

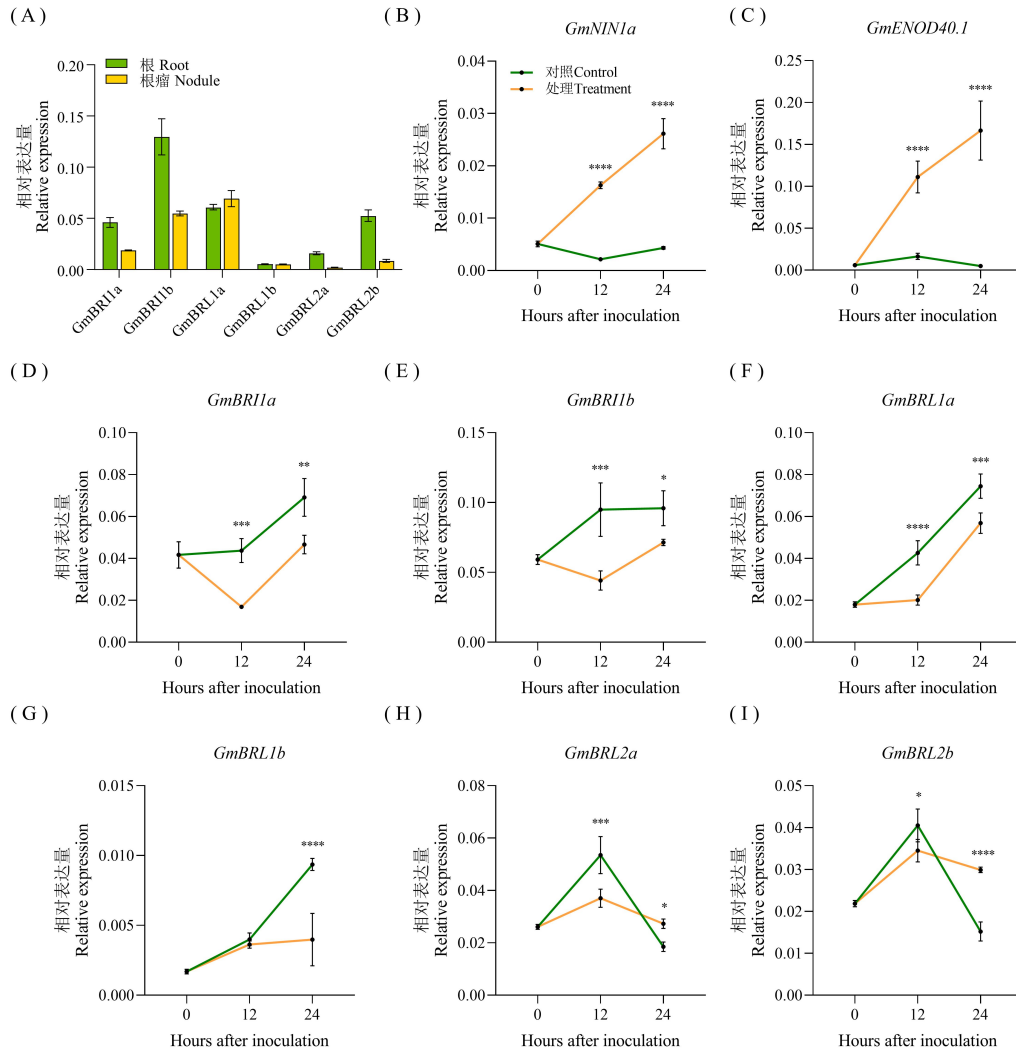
蛋白 ID	基因 ID	蛋白信息
Protein ID	Gene ID	Protein information
K7L4E7_SOYBN	Glyma.08G014800	一种 ATP 酶；属于 TRAFAC 类驱动蛋白
I1M1N4_SOYBN	Glyma.13G224500	受体样蛋白激酶
I1N3A7_SOYBN	Glyma.06G085400	受体样蛋白激酶
I1K7Y9_SOYBN	Glyma.06G039100	BRI1 激酶抑制剂 1, BKI1；参与 BR 信号转导

K7M5K9_SOYBN	Glyma.14G082300	BR11 激酶抑制剂 1, BK11; 参与 BR 信号转导
I1JT15_SOYBN	Glyma.04G038100	BR11 激酶抑制剂 1, BK11; 参与 BR 信号转导
I1MXP6_SOYBN	Glyma.17G243000	BR11 激酶抑制剂 1, BK11; 参与 BR 信号转导
K7M043_SOYBN	Glyma.13G160600	未知功能的转录因子, 具有 BSD 结构域
I1MU51_SOYBN	Glyma.17G110900	未知功能的转录因子, 具有 BSD 结构域
GMRIC2	Glyma.06G284100	CLE35; 参与豆科植物结瘤自调节系统 AON
K7MZL8_SOYBN	Glyma.19G219000	MYB 转录因子
A0A0R4J3L2	Glyma.07G057900	JAR1; 茉莉酸-酰胺合成酶
I1LFY8_SOYBN	Glyma.11G010000	类固醇 5- $\alpha$ -还原酶 DET2; 参与 BR 的生物合成
I1KK99_SOYBN	Glyma.07G144400	类固醇 5- $\alpha$ -还原酶 DET2; 参与 BR 的生物合成
I1JRY6_SOYBN	Glyma.03G256200	JAR4; 茉莉单酰-L-氨基酸合成酶
K7LJB0_SOYBN	Glyma.10G138800	转录因子 PIF3; 具有 bHLH 结构域
K7KTY3_SOYBN	Glyma.06G085400	一种糖基转移酶; 具有 GT47 结构域
K7KGH2_SOYBN	Glyma.03G225000	转录因子 PIF3; 具有 bHLH 结构域
I1NCI9_SOYBN	Glyma.19G254000	JAR1; 茉莉酸-酰胺合成酶

## 2.8 *GmBR11* 基因家族对根瘤菌侵染的响应

为了探究 *GmBR11* 基因家族在大豆生长发育特别是在结瘤过程中的作用, 首先分析了根和根瘤中 *GmBR11* 的表达模式, 结果显示该家族的所有成员在根和根瘤中均有表达, 整体而言 *GmBR11a*、*GmBR11b* 和 *GmBRL1a* 的表达量相对较高 (图 9A)。为了进一步探究 *GmBR11* 基因家族在结瘤早期是否响应根瘤菌侵染, 在 Wm82 植株真叶完全展开时接种根瘤菌 USDA110, 分析 0、12 和 24 HAI (Hours after inoculation) *GmBR11* 家族基因的相对表达量。*GmNIN1a* 是大豆结瘤中的关键调控因子, *GmENOD40.1* 是根瘤早期发育相关基因, 都属于大豆识别根瘤菌共生信号的 marker 基因。结果显示, 在接种根瘤菌后, *GmNIN1a* 和 *GmENOD40.1* 均在 12、24 HAI 持续显著上调 (图 9B-C)。在 12 HAI 时, 除了 *GmBRL1b* 没有变化, 其余 5 个 *GmBR11* 基因在接种根瘤菌后相比于对照组均下调表达。在 24 HAI 时, *GmBR11a*、*GmBR11b*、*GmBRL1a* 和 *GmBRL1b* 的表达量相对于未接种根瘤菌的对照组依然呈现下调表达, 但相比于接种处理的 12 HAI 却表现出增加的趋势; 而 *GmBRL2a* 和 *GmBRL2b* 的表达量在 24 HAI 表达量比对照组高 (图 9D-I)。结果表明, *GmBRL2a* 和 *GmBRL2b* 的表达模式与其他家族成员略有不同, 但所有的 *GmBR11* 家族成员都能快速响应根瘤菌侵染, 且整体而言表达量均受到根瘤菌的抑制, 因此推测可能通过抑制早期根瘤菌的侵染过程而抑制大豆结瘤, 是一个结瘤负调控因子, *GmBR11* 家族基因可能在大豆的共生固氮中发挥重要作用。





A: *GmBRII* 家族基因在根和根瘤中的相对表达量; B-C: *GmNIN1a* 和 *GmENOD40.1* 基因在接种根瘤菌后 0、12、24 h 的相对表达量; D-I: *GmBRII* 家族基因在接种根瘤菌后 0、12、24 h 的相对表达量; 显著性差异水平 \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*  $P < 0.0001$

A: Expression of *GmBRII* family genes in soybean roots and nodules; B-C: Expression of *GmNIN1a* and *GmENOD40.1* at 0, 12, 24 hours after inoculation with rhizobia; D-I: Expression of *GmBRII* family genes at 0, 12, 24 hours after inoculation with rhizobia; The level of statistical significance \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*  $P < 0.0001$

图9 *GmBRII* 基因家族的表达模式

Fig. 9 The expression pattern of *GmBRII* gene family

### 3 讨论

本研究在大豆基因组中共鉴定了 6 个 *GmBRII* 家族基因，在不同物种中的系统发育分析显示，*GmBRII* 家族可分为 3 个分支，同一亚家族的基因高度同源。同时，发现大豆中含有的 *GmBRII* 基因数量均比其他物种都要多（图 1），这可能与大豆进化史上发生的全基因组复制（WGD, the whole genome duplication）事件有关。

在大豆进化史上至少经历过两 WGD 事件，分别在约 59 Myr (Million years) 和 13 Myr 前，导致其基因组高度复制，许多基因的数量与其他二倍体物种相比都有所增加<sup>[35]</sup>。种内共线性分析发现在 6 个 *GmBR11* 基因中有 3 对同源基因且均为片段复制 (图 3)，这表明片段复制在 *GmBR11* 基因家族的长期进化过程中也起着重要的作用。此外，基因结构分析和保守基序分析发现，*GmBR11* 基因结构非常保守且都没有内含子 (图 5B)，在同源基因对中的保守基序分布和数量基本相似 (图 5C)，说明 *GmBR11* 基因家族在进化过程中可能功能相对保守。

顺式作用元件分析对研究基因表达调控机制、构建基因表达调控网络和发展基因工程技术具有重要作用。如在蒺藜苜蓿中，JA 途径的核心转录因子 MtMYC2 能够与结瘤调控因子 NIN 表达所必需的共生相关基因 *MtIPD3* (Interacting protein DMI3) 的启动子 G-box 元件结合，促进 *MtIPD3* 的转录，从而进一步激活共生信号的传导，并积极调控根瘤菌的侵染过程。与此同时，研究者还通过 CRISPR/Cas9 特异的敲除 G-box 元件，导致 *MtIPD3* 的表达大大降低并造成根瘤菌侵染线减少<sup>[43]</sup>。本研究分析发现所有的 *GmBR11* 基因启动子都包含丰富的顺式作用元件，其中，G-box、Box-4 和 ABA 相关的元件最为常见，涉及光响应、生长发育、植物激素 (ABA、JA、SA、GA) 反应和胁迫反应 (干旱、低温、厌氧) 等 (图 6)。*GmBR11* 基因启动子频繁出现的这些顺式作用元件，表明 *GmBR11* 基因家族在植物适应复杂的外界环境中起着关键作用，同时，我们也可以通过遗传调控网络解析或者基因工程的手段利用这些元件调控 *GmBR11* 的基因表达，从而实现调控相关的生物学过程。

生物固氮是植物重要的进化事件之一，而豆科植物根瘤共生固氮进化过程中具有复杂的调节网络，最新研究发现豆科植物对根瘤菌共生固氮适应性的进化是植物保守基因、豆科获得基因、豆科丢失基因共同作用的结果<sup>[45]</sup>。我们对 *GmBR11* 基因家族的综合分析表明该家族成员在大豆共生固氮中发挥作用。植物激素 ABA 以及 BR 均抑制根瘤菌的表皮侵染<sup>[46-47]</sup>，而顺式作用元件分析中富含上述激素响应元件。此外，蛋白互作网络预测出的互作蛋白中包含与调节豆科植物结瘤自调节系统 AON 的互作蛋白 GMRIC2 和 MYB 转录因子 K7MZL8\_SOYBN。已有研究指出，MYB 转录因子在非生物胁迫以及调节类黄酮合成中发挥多种功能<sup>[48]</sup>，同时还有一些 JA 相关的蛋白。这些结果显示 *GmBR11* 除了作为 BR 信号转导过程中的重要受体，还与多种激素相关，而这些激素均已被报道可以调节豆科植物的共生结瘤过程<sup>[43,46,47]</sup>。更重要的是，我们通过实验验证了 *GmBR11* 家族成员能够快速响应根瘤菌的侵染 (图 9)，且同一亚家族的成员具有相似的表达模式，推测 *GmBR11* 基因家族可能为大豆结瘤的负调控因子。

综上所述，本研究利用生物信息学以及 qRT-PCR 定量分析法对 *GmBR11* 基因家族进行系统发育、染色体位置、基因结构、顺式作用元件、磷酸化位点和蛋白互作网络预测，以及根瘤菌侵染早期的表达模式进行了综合分析，发现 *GmBR11* 基因家族在植物的生长发育过程与适应复杂的外界环境中起着关键作用。尤其，大豆作为

一种重要的经济作物，由于其独特的植物-根瘤菌共生关系而区别于其他非豆科植物，而 *GmBR11* 基因家族在大豆共生结瘤过程中也发挥重要作用。研究结果不仅为 *GmBR11* 基因在大豆生长发育过程中的功能的深入探究奠定重要基础，而且为共生固氮的分子调控网络提供新的候选基因。

#### 参考文献

- [1] Hartman G L, West E D, Herman T K. Crops that feed the world 2. Soybean—worldwide production, use, and constraints caused by pathogens and pests. *Food Security*, 2011, 3(1): 5-17
- [2] Shi X Y, Zhao Y G, Xu M W, Ma L Y, Adams J M, Shi Y. Insights into plant - microbe interactions in the rhizosphere to promote sustainable agriculture in the new crops era. *New Crops*, 2024, 1: 100004
- [3] Popp C, Ott T. Regulation of signal transduction and bacterial infection during root nodule symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology*, 2011, 14(4): 458-467
- [4] Ferguson B J, Indrasumunar A, Hayashi S, Lin M H, Lin Y H, Reid D E, Gresshoff P M. Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2010, 52(1): 61-76.
- [5] Marsh J F, Rakocevic A, Mitra R M, Brocard L, Sun J H, Eschstruth A, Long S R, Schultze M, Ratet P, Oldroyd G E D. *Medicago truncatula* *NIN* is essential for rhizobial-independent nodule organogenesis induced by autoactive calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *Plant Physiology*, 2007, 144(1): 324-335
- [6] Cerri M R, Frances L, Laloum T, Auriac M-C, Niebel A, Oldroyd G E D, Barker D G, Fournier J, de Carvalho-Niebel F. *Medicago truncatula* ERN transcription factors: regulatory interplay with NSP1/NSP2 GRAS factors and expression dynamics throughout rhizobial infection. *Plant Physiology*, 2012, 160(4): 2155-2172
- [7] Yang W C, Katinakis P, Hendriks P, Smolders A, de Vries F, Spee J, van Kammen A, Bisseling T, Franssen H. Characterization of *GmENOD40*, a gene showing novel patterns of cell-specific expression during soybean nodule development. *The Plant Journal*, 1993, 3(4): 573-585
- [8] Sasaki T, Suzuki T, Soyano T, Kojima M, Sakakibara H, Kawaguchi M. Shoot-derived cytokinins systemically regulate root nodulation. *Nature Communications*, 2014, 5(1): 4983
- [9] Grove M D, Spencer G F, Rohwedder W K, Mandava N, Worley J F, Warthen J D, Steffens G L, Flippen-Anderson J L, Cook J C. Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from *brassica napus* pollen. *Nature*, 1979, 281(5728): 216-217
- [10] Clouse S D, Sasse J M. BRASSINOSTEROIDS: essential regulators of plant growth and development. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1998, 49: 427-451
- [11] 卫卓赞, 黎家. 受体激酶介导的油菜素内酯信号转导途径. *生命科学*, 2011, 23(11): 1106-1113  
Wei Z Y, Li J. Receptor kinases mediated brassinosteroid signal transduction in plants. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2011, 23(11): 1106-1113
- [12] 陆燕, 赵天祥, 刘国祥, 贾继增, 孔秀英. 小麦矮秆圆粒突变体的鉴定与分析. *植物遗传资源学报*, 2014, 15(1): 161-165  
Lu Y, Zhao T X, Liu G X, Jia J Z, Kong X Y. Identification and analysis of the dwarf sphaerococcoid grain mutant W98. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2014, 15(1): 161-165
- [13] Terakado J, Fujihara S, Goto S, Kuratani R, Suzuki Y, Yoshida S, Yoneyama T. Systemic effect of a brassinosteroid on root nodule formation in soybean as revealed by the application of brassinolide and brassinazole. *Soil Science & Plant Nutrition*, 2005, 51(3): 389-395
- [14] Chen X, Hu X T, Wang H J, Liu J, Peng Y Q, He C M, He M, Wang X L. GmBES1-1 dampens the activity of GmNSP1/2 to mediate brassinosteroid inhibition of nodulation in soybean. *Plant Communications*, 2023, 4(6): 100627
- [15] Li J M, Chory J. A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell*, 1997, 90(5): 929-938
- [16] He Z H, Wang Z Y, Li J M, Zhu Q, Lamb C, Ronald P, Chory J. Perception of brassinosteroids by the extracellular domain of the receptor kinase BR11. *Science*, 2000, 288(5475): 2360-2363
- [17] Clouse S D, Langford M, McMorris T C. A brassinosteroid-insensitive mutant in *Arabidopsis thaliana* exhibits multiple defects in growth and development. *Plant Physiology*, 1996, 111(3): 671-678
- [18] Wang X L, Chory J. Brassinosteroids regulate dissociation of BK11, a negative regulator of BR11 signaling, from the plasma membrane. *Science*, 2006, 313(5790): 1118-1122
- [19] Yu X F, Li L, Zola J, Aluru M, Ye H X, Foudree A, Guo H Q, Anderson S, Aluru S, Liu P, Rodermel S, Yin Y H. A brassinosteroid transcriptional network

- revealed by genome-wide identification of BES1 target genes in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 2011, 65(4): 634-646
- [20] Wang Z Y, Nakano T, Gendron J, He J X, Chen M, Vafeados D, Yang Y L, Fujioka S, Yoshida S, Asami T, Chory J. Nuclear-localized BZR1 mediates brassinosteroid-induced growth and feedback suppression of brassinosteroid biosynthesis. *Developmental Cell*, 2002, 2(4): 505-513
- [21] Zhou A F, Wang H C, Walker J C, Li J. BRL1, a leucine-rich repeat receptor-like protein kinase, is functionally redundant with BRI1 in regulating *Arabidopsis* brassinosteroid signaling. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 2004, 40(3): 399-409
- [22] Nahar K, Kyndt T, Hause B, Höfte M, Gheysen G. Brassinosteroids suppress rice defense against root-knot nematodes through antagonism with the jasmonate pathway. *Molecular Plant-microbe Interactions*, 2013, 26(1): 106-11520
- [23] Fábregas N, Lozano-Elena F, Blasco-Escámez D, Tohge T, Martínez-Andújar C, Albacete A, Osorio S, Bustamante M, Riechmann J L, Nomura T, Yokota T, Conesa A, Alfocea F P, Fernie A R, Caño-Delgado A I. Overexpression of the vascular brassinosteroid receptor BRL3 confers drought resistance without penalizing plant growth. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 4680
- [24] Fontanet-Manzanque J B, Laibach N, Herrero-García I, Coletto-Alcudia V, Blasco-Escámez D, Zhang C, Orduña L, Alseekh S, Miller S, Bjarnholt N, Fernie A R, Matus J T, Caño-Delgado A I. Untargeted mutagenesis of brassinosteroid receptor SbBRI1 confers drought tolerance by altering phenylpropanoid metabolism in *Sorghum bicolor*. *Plant Biotechnology Journal*, 2024, 9(22): 1-18
- [25] Cheng X F, Gou X P, Yin H J, Mysore K S, Li J, Wen J Q. Functional characterisation of brassinosteroid receptor *MtBRI1* in *Medicago truncatula*. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 9327
- [26] Ferguson B J, Ross J J, Reid J B. Nodulation phenotypes of gibberellin and brassinosteroid mutants of pea. *Plant Physiology*, 2005, 138(4): 2396-2405
- [27] Wang M, Sun S, Wu C X, Han T F, Wang Q Y. Isolation and characterization of the brassinosteroid receptor gene (*GmBRI1*) from *Glycine max*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014, 15(3): 3871-3888
- [28] Peng S N, Tao P, Xu F, Wu A P, Huo W G, Wang J X. Functional characterization of soybean *Glyma04g39610* as a brassinosteroid receptor gene and evolutionary analysis of soybean brassinosteroid receptors. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(6): 897
- [29] Garg V K, Avashthi H, Tiwari A, Jain P A, Ramkete P W, Kayastha A M, Singh V K. MFPPPI - Multi FASTA ProtParam interface. *Bioinformatics*, 2016, 12(2): 74-77
- [30] Blom N, Gammeltoft S, Brunak S. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *Journal of Molecular Biology*, 1999, 294(5): 1351-1362
- [31] Wu M, Li Y, Chen D M, Liu H L, Zhu D Y, Xiang Y. Genome-wide identification and expression analysis of the *IQD* gene family in moso bamboo (*Phyllostachys edulis*). *Scientific Reports*, 2016, 6: 24520
- [32] Bailey T L, Johnson J, Grant C E, Noble W S. The MEME Suite. *Nucleic Acids Research*, 2015, 43(W1): W39-49
- [33] Chen C J, Wu Y, Li J W, Wang X, Zeng Z H, Xu J, Liu Y L, Feng J T, Chen H, He Y H, Xia R. TBtools-II: a “one for all, all for one” bioinformatics platform for biological big-data mining. *Molecular Plant*, 2023, 16(11): 1733-1742
- [34] Lescot M, Déhais P, Thijs G, Marchal K, Moreau Y, Van de Peer Y, Rouzé P, Rombauts S. PlantCARE, a database of plant *cis*-acting regulatory elements and a portal to tools for *in silico* analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Research*, 2002, 30(1): 325-327
- [35] Schmutz J, Cannon S B, Schlueter J, Ma J, Mitros T, Nelson W, Hyten D L, Song Q, Thelen J J, Cheng J, Xu D, Hellsten U, May G D, Yu Y, Sakurai T, Umezawa T, Bhattacharyya M K, Sandhu D, Valliyodan B, Lindquist E, Peto M, Grant D, Shu S, Goodstein D, Barry K, Futrell-Griggs M, Abernathy B, Du J, Tian Z, Zhu L, Gill N, Joshi T, Libault M, Sethuraman A, Zhang X C, Shinozaki K, Nguyen H T, Wing R A, Cregan P, Specht J, Grimwood J, Rokhsar D, Stacey G, Shoemaker R C, Jackson S A. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature*, 2010, 463(7278): 178-183
- [36] Cannon S B, Mitra A, Baumgarten A, Young N D, May G. The roles of segmental and tandem gene duplication in the evolution of large gene families in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology*, 2004, 4: 10
- [37] Lallemand T, Leduc M, Landès C, Rizzon C, Lerat E. An overview of duplicated gene detection methods: why the duplication mechanism has to be accounted for in their choice. *Genes*, 2020, 11(9): 1046
- [38] Jain M, Khurana P, Tyagi A K, Khurana J P. Genome-wide analysis of intronless genes in rice and *Arabidopsis*. *Functional & Integrative Genomics*. 2008 , 8(1): 69-78

- [39] Zhang W J, Zhou Y W, Zhang Y, Su Y H, Xu T D. Elsevier, 2023. Protein phosphorylation: A molecular switch in plant signaling. *Cell Reports*, 2023, 42(7): 112729
- [40] Oh M-H, Wang X, Kota U, Goshe M B, Clouse S D, Huber S C. Tyrosine phosphorylation of the BRI1 receptor kinase emerges as a component of brassinosteroid signaling in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(2): 658-663
- [41] Li Y H, Pei Y, Shen Y T, Zhang R, Kang M M, Ma Y L, Li D Y, Chen Y H. Progress in the self-regulation system in legume nodule development-AON (Autoregulation of Nodulation). *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(12): 6676
- [42] 李丹丹, 林蓉, 李新国, 郑月萍. *AtJAR1* 基因在拟南芥耐盐性中的功能分析. *浙江农林大学学报*, 2022, 39(5): 998-1009
- Li D D, Lin R, Li X G, Zheng Y P. Functional analysis of *AtJAR1* gene in salt tolerance of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Zhejiang A&F University*, 2022, 39(5): 998-1009
- [43] Guo D, Li J G, Liu P, Wang Y Z, Cao N, Fang X L, Wang T, Dong J L. The jasmonate pathway promotes nodule symbiosis and suppresses host plant defense in *Medicago truncatula*. *Molecular Plant*, 2024, 17(8): 1183-1203
- [44] Luo M, Xiao Y H, Li X B, Lu X F, Deng W, Li D M, Hou L, Hu M Y, Li Y, Pei Y. GhDET2, a steroid 5 $\alpha$ -reductase, plays an important role in cotton fiber cell initiation and elongation. *The Plant Journal*, 2007, 51(3): 419-430
- [45] Liu T F, Liu Z, Fan J W, Yuan Y Q, Liu H Y, Xian W F, Xiang S Y, Yang X, Liu Y C, Liu S L, Zhang M, Jiao Y N, Cheng S F, Doyle J J, Xie F, Li J Y, Tian Z X. Loss of *Lateral suppressor* gene is associated with evolution of root nodule symbiosis in Leguminosae. *Genome Biology*, 2024, 25(1): 250
- [46] Xu S M, Song S S, Dong X X, Wang X Y, Wu J, Ren Z Y, Wu X S, Lu J J, Yuan H F, Wu X Y, Li X, Wang Z J. *GmbZIP1* negatively regulates ABA-induced inhibition of nodulation by targeting *GmENOD40-1* in soybean. *BMC Plant Biology*, 2021, 21(1): 35
- [47] McGuinness P N, Reid J B, Foo E. Brassinosteroids play multiple roles in nodulation of pea via interactions with ethylene and auxin. *Planta*, 2020, 252(4): 70
- [48] Wang X P, Niu Y L, Zheng Y. Multiple functions of MYB transcription factors in abiotic stress responses. *International journal of molecular sciences*, 2021, 22(11): 6125