

李耀华,张蕊,刘颀,等. 蒺藜苜蓿LysM类受体激酶的研究进展[J]. 华中农业大学学报, 2024, 43(4): 3-11.  
DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2024.04.002

## 蒺藜苜蓿LysM类受体激酶的研究进展

李耀华,张蕊,刘颀,朱辉,曹扬荣

农业微生物资源发掘与利用国家重点实验室/湖北洪山实验室/华中农业大学生命科学技术学院,武汉 430070

**摘要** LysM类受体激酶属于多基因家族,其胞外域直接参与几丁质、肽聚糖和脂壳寡糖等糖化化合物的感知,从而激活植物免疫或共生信号转导。豆科模式植物蒺藜苜蓿中第1个LysM受体基因LYK3的功能于2003年被表征。此后,越来越多的LysM类受体激酶的功能相继被鉴定。本文总结了蒺藜苜蓿LysM类受体激酶家族基因功能特征,综述了蒺藜苜蓿LysM类受体激酶家族分别在根瘤共生、菌根共生和免疫感知等方面的研究进展。研究发现,蒺藜苜蓿LysM类受体激酶家族基因数量的扩张导致了功能分化,但也存在部分基因间功能冗余现象。此外,研究还揭示了免疫与共生信号在LysM类受体激酶介导的受体感知层面存在着密切的交联,为后续研究蒺藜苜蓿中LysM类受体激酶家族基因提供有效参考。

**关键词** 蒺藜苜蓿; LysM类受体激酶; 根瘤共生; 菌根共生; 免疫感知

**中图分类号** S551<sup>+</sup>.7 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2024)04-0003-09

氮元素是构成蛋白质、核酸等生物大分子的重要元素,也是限制植物生长和形成产量的主要元素。属于FaFaCuRo(豆目Fabales、壳斗目Fagales、葫芦目Cucurbitales、蔷薇目Rosales)的部分植物获得了与根瘤菌形成根瘤共生(root nodule symbiosis, RNS)的能力,能够在氮素缺乏的土地上生长。蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*)由于基因组较小(约450 Mb)、染色体组型简单( $2n=2x=16$ )、世代周期短(约3个月),并且能够与根瘤菌和丛枝菌根真菌建立共生,成为豆科模式植物。

植物通过一系列类受体激酶感知和响应各种微生物信号,这些信号被称为微生物相关分子模式(microbial-associated molecular patterns, MAMPs)。植物的类受体激酶根据不同的胞外域结构大致分为:亮氨酸重复序列类(leucine-rich repeats, LRRs)、凝集素类(lectins)和溶菌素基序类(LysMs)等<sup>[1]</sup>。溶菌素基序类受体激酶(LysM-receptor like kinase, LysM-RLK)是植物特异性受体蛋白家族,可感知土壤微生物的成分,调节先天免疫和共生。LysM受体家族成员的数量在不同的植物中具有较大的差异,在不能进行根瘤菌共生和丛枝菌根真菌共生的拟南芥中有

5种、大叶藻中有4种,在仅有丛枝菌根真菌共生的水稻中有10种、番茄中有14种,在既有根瘤菌共生又有丛枝菌根真菌共生的蒺藜苜蓿中有24种、百脉根中有20种<sup>[2]</sup>,暗示随着共生能力获得,LysM受体家族成员的数量急剧扩张。LysM类受体激酶家族在共生及免疫中出现功能分化,意味着该家族基因引入了新的功能。蒺藜苜蓿中已经鉴定得到的24种LysM受体可分为3类:LYM(LysM protein)类2种、LYK(LysM domain-containing receptor-like kinase)类11种、LYR(LYK-related)类11种<sup>[3]</sup>(表1)。目前虽然已经鉴定到其中一些LysM受体的生化功能,但还有大部分的受体具体功能未被解析。本文对过去20多年蒺藜苜蓿LysM受体激酶参与共生和免疫反应的研究进行了系统总结,旨在为深入研究该家族基因的功能奠定基础。

### 1 蒺藜苜蓿LysM类受体激酶

蒺藜苜蓿中LysM类受体激酶家族可根据其激酶结构域划分为3种类型(图1)。第1种类型为LYK,是标准形式的RD激酶,含有催化性的D残基,其前一个残基为R,这种类型的激酶在体外表现出自

收稿日期:2024-05-07

基金项目:国家重点研发计划项目(2019YFA0904700);国家自然科学基金项目(32090063);农业微生物资源发掘与利用全国重点实验室自主创新项目(AML2023B01)

李耀华, E-mail: yhlee@webmail.hzau.edu.cn

通信作者:曹扬荣, E-mail: yrcao@mail.hzau.edu.cn

表1 蒺藜苜蓿中LysM类受体激酶分类

Table 1 LysM-RLKs in *M. truncatula*

分类 Classification	基因 ID Gene ID	基因名 Gene name	根瘤共生 RNS	丛枝菌根真菌共生 AMS	免疫 Immunity	参考文献 References
LYK I	Medtr5g086540	LYK1	—	—	—	—
	Medtr5g086120	LYK4	■	—	—	[4]
	Medtr5g086090	LYK5	—	—	—	—
	Medtr5g086040	LYK6	—	—	—	—
	Medtr5g086030	LYK7	—	—	—	—
	Medtr5g086310/330	LYK2	■	—	—	[5]
	Mt5g0040300 (R108)	LYK2bis	■	—	—	[6]
	Medtr5g086130	LYK3	■	●	—	[4]
	Medtr3g080050	LYK9	—	●	◆	[7]
	Medtr2g024290	LYK8	—	●	—	[8]
LYK II	Medtr5g033490	LYK10	■	—	—	[9]
LYK III	Medtr8g014500	LYK11	—	—	—	—
LYR I	Medtr5g019040	NFP	■	●	◆	[10]
	Medtr8g078300	LYR1	■	●	—	[11]
LYR II	Medtr5g042440	LYR8	—	—	—	—
	Medtr7g029650	LYR10	—	—	—	—
	Medtr4g058570	LYR9	—	—	—	—
	Medtr5g019050	LYR3	■	●	—	[12]
LYR III	Medtr1g021845	LYR2	—	—	—	—
	Medtr5g085790	LYR4	—	—	◆	[13]
LYR IV	Medtr3g080170	LYR7	—	—	—	—
	Medtr7g079350	LYR5	—	—	—	—
LYM I	Medtr7g079320	LYR6	—	—	—	—
	Medtr3g072410	LYM1	—	—	◆	Unpublished data
LYM II	Medtr4g094730	LYM2	—	—	—	—

注 Note: ■: 与结瘤相关的蛋白质 Proteins associated with nodulation; ●: 与菌根形成相关的蛋白质 Proteins associated with mycorrhizal formation; ◆: 与防御信号相关的蛋白质 Proteins associated with defense signaling; —: 表示未鉴定或不具有此功能 Unidentified function or unavailable function.

磷酸化活性<sup>[14]</sup>。第2种类型为LYR,携带1种非典型激酶结构,缺少一些关键的激酶活性特征,如富含甘氨酸的loop。在体外实验中,这种激酶无法显示自磷酸化或反式磷酸化活性<sup>[15]</sup>。近年来有关LYK类蛋白和LYR类蛋白功能表征的研究已在许多代表高等植物遗传多样性的物种中进行,包括双子叶植物(拟南芥、蒺藜苜蓿、百脉根和番茄)和单子叶植物(水稻、大麦)等。第3种类型为LYM,不具备胞内激酶域,通过糖基磷脂酰肌醇(glycosylphosphatidylinositol, GPI)方式锚定于细胞膜上<sup>[16]</sup>。

LysM类受体激酶家族通常具有单次跨膜结构域、胞外和胞内区域。胞外域通常包含3个LysM结构域(每个结构域由约40个氨基酸组成),主要负责对脂壳寡糖(lipochitooligosaccharide, LCO)、壳寡糖(chitooligosaccharide, CO)和肽聚糖(peptidoglycan, PGN)等3种含GlcNAc的配体信号的感知。LysM

类受体激酶的胞外域三级结构呈紧密的三叶草状,其中3个典型的 $\beta\alpha\beta$ 状LysM结构域通过3个保守的二硫键紧密互连并稳定,配体可以结合到第1个LysM结构域中。这些LysM类受体激酶具有相似的三级结构,暗示了它们可能拥有共同的起源<sup>[17]</sup>。当胞外域感知到配体后,可以激活不同的植物反应,从而导致共生建立或对病原体的防御反应。位于N末端第1个和第2个LysM结构域之后的半胱氨酸基序(cys-xaa-cys)对于二硫键的形成和确保蛋白质在细胞环境中正确的折叠和功能发挥至关重要<sup>[18]</sup>。LYK类受体激酶胞内区域包含1个激酶结构域,该结构域能通过自磷酸化控制催化活性,这一过程受到系统下游信号传导的调节<sup>[14,19]</sup>。在激酶结构域中鉴定的重要保守基序或残基包含:富含甘氨酸的GxGxxG基序,与ATP分子中的磷酸根形成氢键从而稳定ATP; AxK(磷酸转移)基序,能够与ATP的 $\alpha$ -和 $\beta$ -

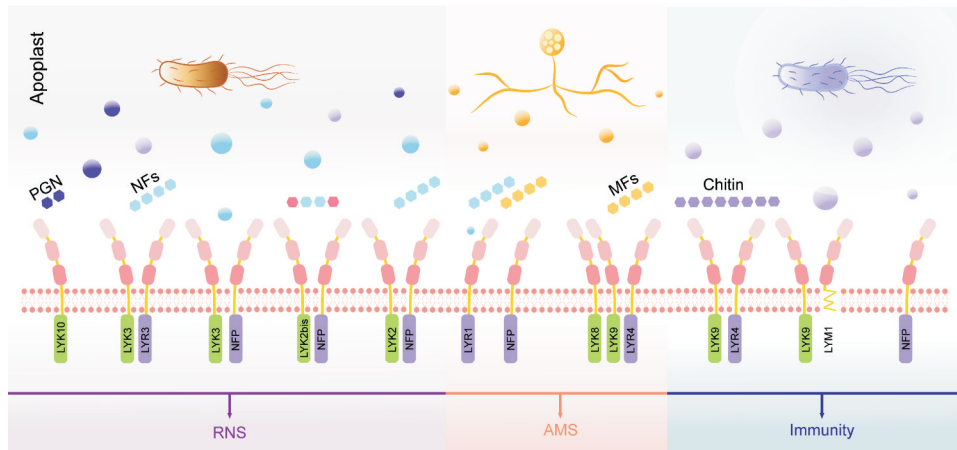


图1 蒺藜苜蓿的LYK、LYR和LYM类受体激酶感知共生因子和免疫因子

Fig. 1 The perception of symbiotic factors and related MAMPs by LYK, LYR and LYM in *M. truncatula*

磷酸基团形成氢键;HRD基序,主要起到催化 and 稳定镁离子的作用等。LYK类受体激酶的这些基序对ATP的水解至关重要,是激酶活性发挥的基础<sup>[3]</sup>。

## 2 蒺藜苜蓿 LysM 类受体激酶在 RNS 中的研究

2001年,在蒺藜苜蓿中通过筛选不能结瘤的突变体库中鉴定到1个名为根毛卷曲(hair curling, HCL)的基因,该基因对于根瘤菌诱导的根毛卷曲和侵染至关重要<sup>[20]</sup>。hcl突变体表现出根毛卷曲受阻、侵染线的形成早期阶段受阻、表皮结瘤因子(nod factors, NFs)响应正常、皮层细胞分裂减弱等表型<sup>[4]</sup>。在蒺藜苜蓿中LYK3(LysM receptor like kinase 3)被证明编码HCL,除了负责侵染线形成之外,该基因还控制根毛卷曲。在豆科模式植物百脉根中,LYK3的直系同源基因是LjNFR1,该基因突变后将丧失全部对根瘤菌或者结瘤因子NFs的响应,但是蒺藜苜蓿中lyk3仍存在约50%共生响应<sup>[21]</sup>。研究人员提出了蒺藜苜蓿中NFs识别的双受体模型:即LYK3作为进入受体(entry receptor)介导了对结瘤因子侧链结构的精确识别;而其他的同源蛋白可能行使作为信号受体(signaling receptor)的功能,对NFs侧链基团识别较为宽泛,主要功能是传递共生信号<sup>[22]</sup>。根瘤菌突变体接种试验表明,LYK3以依赖NFs侧链结构的方式控制侵染线(infection threads, ITs)的形成,这支持了双受体模型中LYK3作为进入受体发挥作用<sup>[23]</sup>。近期研究表明,在蒺藜苜蓿中识别NFs的双受体模型可能存在争议,因为在蒺藜苜蓿中LYK3存在2个同源基因LYK2、LYK2bis。蒺藜苜蓿lyk2/lyk3/lyk2bis三突变体完全丧失了共生信号,并且过

表达其中任意一个就能恢复三突变体的结瘤能力<sup>[5]</sup>,这说明单个LysM受体就能行使完整共生功能。LYK2bis是蒺藜苜蓿R108生态型特有的一个新进化基因,负责参与识别突变体苜蓿中华根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti* 2011, nodF/nodL),这在一定程度上扩展了蒺藜苜蓿的宿主范围特异性。在蒺藜苜蓿中过表达百脉根的结瘤因子受体NFR1(nod factor receptor 1)/NFR5(nod factor receptor 5)可以使蒺藜苜蓿与百脉根根瘤菌兼容并产生部分正常的根瘤,表明结瘤因子受体介导了部分宿主范围特异性<sup>[24]</sup>。

进一步的研究发现,结瘤因子受体LYK3和NFR1的胞外域第1个LysM基序的部分保守序列负责结瘤因子的识别特异性。LYK3对Sm2011产生的结瘤因子(SmLCO)的亲合实验表明,LYK3高亲和力结合其匹配的NFs [ $K_d = (27.4 \pm 0.4) \mu\text{mol/L}$ ],与不匹配的百脉根中慢生根瘤菌(*Mesorhizobium loti*)产生的NFs结合能力 [ $K_d = (173.2 \pm 0.9) \mu\text{mol/L}$ ]相比降低6倍<sup>[25]</sup>。LYK2和LYK2bis胞外域序列对比结果显示,二者具有高度的相似性,尤其是在I、III、IV区具有完全相似的结构。此前的研究表明该区域具有NFs识别的特异性,暗示LYK2与LYK2bis可能具有相似的识别NFs的能力,需要进一步的试验来证明。蒺藜苜蓿中包括LYK3在内的多个LysM受体紧密排列在5号染色体上,一些LYK簇基因之间的蛋白质相似性表明它们可能是相互冗余的,这些LysM受体基因可能经历了多次的基因复制事件,同时也有一些LysM受体存在基因重组事件导致截短基因的产生(如R108生态型中的LYK5bis)以及新基因LYK2bis的产生<sup>[6,26]</sup>。这也说明在蒺藜苜蓿中参与NFs感知的LysM受体的基因组所在染色体区



域高度活跃。

NFP(nod factor perception)是属于LYR类的参与NFs识别的受体,突变后将完全丧失对根瘤菌NFs的响应<sup>[10]</sup>。对其等位基因*nfp-2*突变体研究表明,NFP蛋白质对内质网质量控制具有敏感性,突变后影响其向质膜的运输。NFP既参与侵染线的发育过程,也参与根瘤的整个形成过程<sup>[6]</sup>。NFP胞外域的3个LysM结构域在参与识别NFs中具有重要作用。结构域交换实验表明,第2个LysM2结构域对于根瘤菌成功侵染也很重要,进一步研究发现其中L154对于侵染和结瘤都是必不可少的<sup>[27-28]</sup>。NFP胞外结构域可以直接结合NFs,生化分析表明,纯化的NFP L147D/L154D突变体胞外域与Sm2011产生的NFs的解离常数为 $[K_d=(166.7\pm 4.2) \text{ mmol/L}]$ ,比野生型 $[K_d=(12.7\pm 0.1) \text{ mmol/L}]$ 低13倍。并且与野生型NFP相比,L147D/L154D突变体结合NFs的速率快4.5倍,解离速率增加59倍,说明NFP中的L147D/L154D所在疏水区域是一种保守的结构特征,对于参与NFs识别和共生信号传导至关重要<sup>[16]</sup>。

在本氏烟草(*Nicotiana benthamiana*)中共同过表达LYK3和NFP会诱导超敏反应(hypersensitive response, HR),导致细胞死亡,但是具体机制尚不清楚<sup>[29]</sup>。LYK3和NFP都被证明定位在细胞膜上<sup>[15]</sup>。在蒺藜苜蓿中用绿色荧光蛋白(GFP)标记LYK3,发现它在细胞外围具有点状分布,与质膜或膜相关囊泡定位一致。在缓冲液处理的对照根中,LYK3-GFP呈现动态斑点分布,但接种Sm2011后,LYK3-GFP斑点相对稳定。肌动蛋白(actin)和脂筏蛋白(flotillin 4, FLOT4)构成了一个特定纳米域的主要核心。接受到根瘤菌诱导后,共生remorin蛋白(symbiotic remorin 1, SYMREM1)作为一个次级骨架,需要FLOT4的生理互作,才能招募LYK3并将其稳定地锚定在纳米域中<sup>[30-31]</sup>。LYK3-GFP的稳定性增强依赖于根瘤菌及其特定类型结构的NFs,使LYK3从动态分布变为静态稳定状态。尽管Sm2011 *nodF/nodL*产生的非还原端修饰异常的NFs仍可增加LYK3-GFP的稳定性,但NFs结构的N-乙酰葡萄糖胺骨架以及硫酸化修饰对于LYK3-GFP的稳定性则是必需的。Sm2011 *nodF/nodL*突变体接种A17后仅能引起根毛卷曲以及侵染点形成,几乎不能形成根瘤<sup>[22]</sup>。这表明共生根瘤菌能够触发蒺藜苜蓿中LYK3的定位和运动性的改变,但对结瘤因子侧链基团的修饰需求较形成根瘤所需的要求

低<sup>[32]</sup>。在蒺藜苜蓿根瘤内部,NFP和LYK3定位于根瘤顶端约2个细胞层的狭窄区域的细胞外围。这种限制性的积累比启动子活性或者mRNA积累的区域更窄,并且可能有助于防止防御样反应的诱导和/或限制根瘤菌释放到精确的细胞层<sup>[33]</sup>。

通过将光亲和标记实验与蛋白质组学和转录组学相结合,鉴定到LYR3也可以作为NFs结合蛋白定位在细胞质膜上,且对NFs表现出高亲和力( $K_d=25 \text{ nmol/L}$ )<sup>[12]</sup>。通常,LYK3作为具有激酶活性的NFs受体会将无激酶活性的NFP磷酸化并且形成二聚体传递共生信号。LYR3作为无激酶活性的受体在酵母膜系统双杂交实验中可以检测到与LYK3的互作,放射性同位素实验显示LYK3具有底物磷酸化能力,可以磷酸化LYR3。LYR3与LYK3和NFP的共同过表达也能减弱后两者过表达所诱导的烟草HR反应。鉴于LYR3对NFs和菌根因子(Myc factors, MFs)具有相当广泛的结合特异性,MtLYR3可能参与结瘤和菌根化过程中MtLYK3的NFs依赖性调节,需要进一步对蒺藜苜蓿突变体植物进行研究来验证这种假设<sup>[34]</sup>。

蒺藜苜蓿中LYK10是百脉根胞外多糖受体(exopolysaccharide receptor 3, EPR3)的直系同源基因,但是LYK10并不直接参与感知Sm1021产生的胞外多糖琥珀聚糖<sup>[12]</sup>。蒺藜苜蓿中LYK10是否参与其他胞外多糖或者感知病原菌的胞外多糖从而介导免疫响应还有待研究。LYK10突变后会产生与LjEPR3突变植株类似的早期表型,如在接种14 d后成功入侵的根瘤原基及根瘤数目减少,接种后结瘤事件推迟<sup>[9,35]</sup>。lyk10突变体产生的成熟根瘤大小显著大于野生型,也说明LYK10负调控蒺藜苜蓿根瘤的大小<sup>[35]</sup>。

### 3 蒺藜苜蓿 LysM 类受体激酶在 AMS 中的研究

陆地植物和丛枝菌根真菌(arbuscular mycorrhizal fungi, AMF)自4亿年前就已经共同进化,丛枝菌根真菌能与大约70%~90%的陆生植物建立良好的丛枝菌根真菌共生(arbuscular mycorrhizal fungi symbiosis, AMS),在养分有限的情况下促进矿物质元素的吸收<sup>[8]</sup>。植物根部释放的独脚金内酯可以诱导根际AMF产生MFs从而促进孢子萌发和菌丝分支。MFs的主要成分也包括LCO,其化学结构似于根瘤菌产生的NFs,以及一些可能的LCO前体寡糖四

聚体(CO4)<sup>[36-38]</sup>,表明 LysM 类受体激酶既能参与 RNS,又能参与 AMS。

蒺藜苜蓿对 MFs 的识别部分依赖于 NFP<sup>[36]</sup>,然而 NFP 在蒺藜苜蓿的菌根定植过程中没有明显的作用。蒺藜苜蓿中结瘤的进化出现与全基因组复制事件相关,该事件也伴随了 LysM 受体基因的复制,产生了一些密切相关的旁系同源基因,如 NFP 和 LYR1。NFP 在根瘤菌定植期间表达量增加,而 LYR1 在菌根感染时诱导表达<sup>[39]</sup>。这表明 LYR1 可能在菌根信号传导中发挥功能,并且这种功能早于 RNS 的出现。使用与 MFs 化学结构最接近的 LCO-V(C18:1,NMe,<sup>35</sup>S)进行体外结合实验,结果显示 LYR1 具有与 MFs 结合的能力,但是这种结合能力对于 AMS 不是必须的。NFP 和 LYR1 胞外域的 3 个 LysM 结构域交换实验以及 LYR1 胞外域的点突变实验表明,LYR1 与 MFs 结合位点位于第 2 个 LysM,而 NFP 在该位点的分化有利于结瘤能力的精细调控,但也减弱了与 MFs 的结合能力<sup>[11]</sup>。LYR1 对 LCO-V(C18:1,NMe,<sup>35</sup>S)的亲合力为  $K_d=6.5$  nmol/L,这与 LYR3 对于 NFs 的亲合力在同一单位量级,比 NFP 对 NFs 的亲合力高了 3 个数量级<sup>[11]</sup>,并且 LYR1 对 MFs 的亲合力比对 NFs 的亲合力至少高 80 倍。

在自然环境中共生期间,蒺藜苜蓿进化出多个具有高亲和力的 LCO 结合蛋白(例如 LYR1 和 LYR3)。这些 LysM 类受体激酶对不同的共生信号具有不同的亲和偏好性,可能是为了更好地区分不匹配的根瘤菌、AMF 或者其他产生 LCO 的微生物。*nfp* 突变体没有呈现明显的 AMS 表型<sup>[10]</sup>,可能是由于 LYR1 和 NFP 二者存在功能冗余。但是 *lyr1-1/nfp-2* 双突变体、单突变体以及野生型的蒺藜苜蓿接种 AMF 后同样没有观察到差异,这表明尽管在 AMS 期间 LYR1 受到诱导表达,但 LYR1 对于 AMS 不是必需的。鉴于蒺藜苜蓿中还有更多 LYR 的功能未被表征,这可能更需要更复杂的多重突变体来探究参与 AMF 共生识别的分子机制<sup>[11]</sup>。

蒺藜苜蓿中 LYK9 是拟南芥 *AtCERK1* 和水稻 *OsCERK1* 的直系同源基因,在共生和免疫方面具有双重功能<sup>[40-41]</sup>。通过不同时间点 *lyk9* 突变株系的菌根表型评估结果显示,突变株系的早期感染事件显著低于野生型。这表明 LYK9 在 AM 真菌根部感染和定殖过程中发挥着显著的作用<sup>[7]</sup>。*lyk9* 突变体中仍能检测到 AM 真菌共生,而 LYK6、LYK7、LYK8

和 LYK10 的突变对 AMF 总定植数和真菌侵染没有影响,这可能由于这些 LysM 受体激酶与 LYK9 对于 AMS 具有冗余功能。

当接种低浓度孢子时,*lyk8-1/lyk9-1* 突变体的根表现出丛枝、细胞间菌丝和囊泡的完全丧失,而 *lyk6/lyk9*、*lyk7/lyk9* 和 *lyk10/lyk9* 突变体中出现的感染事件与单独 *lyk9* 突变体中的结果没有显著差异。*lyk8/lyk9* 突变体中 CO 和 AMF 诱导的共生基因表达以及钙离子震荡等信号完全中断。几丁质磁柱结合实验显示 LYK8 具有非常弱的结合几丁质磁柱的能力,虽然 LYK8 可以参与 CO 介导的共生信号传导,但是 LYK8 并不直接参与 CO 所诱导的免疫反应。并且 LYK8 可以与 LYK9、LYR4 和共生受体激酶(symbiosis receptor-like kinase, SYMRK)以依赖 CO4 和 CO8 的方式形成复合物,进而激活 AM 真菌共生信号<sup>[35]</sup>。这也证明 LYK9-LYK8-SYMRK-LYR4 受体复合物可能在介导 CO 触发的共生信号传导中发挥关键作用。LysM 受体激酶家族的研究扩展了我们对 AMS 分子机制的理解,特别是最近新发现的 LYK8 与 LYK9 的协同作用,为植物如何识别 AMF 参与共生这一重要问题提供了重要理论基础,也对解析和利用 AMS 以促进农业可持续发展至关重要。

## 4 蒺藜苜蓿 LysM 类受体激酶在免疫感知中的作用研究

植物作为固着生长的生物,在土壤中定植时需要面临自然界中复杂的微生物生境。这些微生物群落关系错综复杂,其中有些是有益的,也有一部分微生物是有害的<sup>[42]</sup>。LysM 受体激酶被鉴定为病原体相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMP)的受体,可触发植物防御反应以阻止或限制有害微生物入侵,这一过程称为“PAMP 触发免疫”(PAMP-triggered immunity, PTI)<sup>[43-44]</sup>。在水稻和拟南芥中,OsCEBiP 和 LysM 受体激酶 OsCERK1、AtCERK1 和 AtLYK5 参与真菌细胞壁主要组成成分几丁质的感知<sup>[45-47]</sup>。同时,拟南芥 LYM1 和 LYM3 被证明可以结合并参与对病原菌产生 PGN 的抗性,与 AtCERK1 一起在感知细菌肽聚糖的受体复合物中发挥作用<sup>[47]</sup>。蒺藜苜蓿中 LYM1 和 LYM2 的功能还有待研究,但也有未发表数据显示 LYM1 在参与蒺藜苜蓿免疫响应中起到重要作用。

对蒺藜苜蓿等47种代表性植物的LysM类受体激酶家族的系统发育分析表明,LYK9与AtCERK1、OsCERK1、LjLYS6属于直系同源<sup>[48]</sup>。在烟草中过表达LYK9和拟南芥CERK1都会诱导其产生HR反应<sup>[29]</sup>。lyk9突变体中几丁质诱导的免疫反应显著下调,但是被flg22诱导的免疫反应与野生型的反应相当,这说明LYK9能够特异性参与几丁质诱导的免疫反应<sup>[47]</sup>。蒺藜苜蓿LYR4基因是已知在拟南芥中感知几丁质的AtLYK5的同源基因<sup>[47]</sup>,几丁质处理可以增加根中LYR4的表达。并且,用CO8处理后可以在lyr4突变体中观察到相对于野生型的MAPK3/6的磷酸化减少<sup>[48]</sup>。lyr4和lyk9突变体接种灰霉菌后产生的病斑大小显著大于野生型产生的病斑大小,这说明LYR4和LYK9都参与了蒺藜苜蓿中的防御反应。

研究表明,nfp突变体在与多种病原体的相互作用中呈现抗性降低的特征。当侵染病原真菌*Verticillium albo-atrum*后,nfp突变体相比野生型表现出严重的感病表型,表明其免疫系统遭到损坏<sup>[49-50]</sup>。此外,NFP还参与了对苜蓿炭疽菌(*Colletotrichum trifolii*)和卵菌豌豆根腐霉(*Aphanomyces euteiches*)等病原体的免疫响应。转录组分析显示,nfp突变体与野生型蒺藜苜蓿在应对*Aphanomyces euteiches*侵染时存在约70%的基因共同上调表达,特有的转录组差异主要涉及细胞动力学过程的调节。NFP除了在RNS中发挥重要作用外,还在AMS和病原体免疫反应中发挥作用,因此推测NFP可能参与不同蛋白质复合物的形成,从而导致不同的免疫反应<sup>[51]</sup>。总之,NFP不仅通过直接感知病原体触发免疫反应,还可以通过调节蒺藜苜蓿对病原体的转录响应,影响蒺藜苜蓿对病原体的抵抗能力。

## 5 结语与展望

近二十多年对LysM类受体激酶家族的研究表明,免疫与共生在进化上有着密切联系。植物通过识别“朋友”和“敌人”产生的化学信号分子,如LCO/CO信号等,来区分共生微生物和病原体。LysM类受体激酶在这一过程中发挥着重要作用,其特异性结合不同结构糖化合物的能力不仅影响植物对共生微生物的感知,还参与了对免疫系统的调控。豆科植物中LysM-RLK家族数量的扩张凸显了这些受体在适应性进化中的重要性,使得植物能在复杂的根际微生物环境中更精确地区分免疫与共生信号

通路。

免疫与共生之间的互动呈现出相辅相成的关系。共生微生物对宿主免疫系统产生抑制作用。例如,用SmLCO预处理后,蒺藜苜蓿以依赖LYK9和LYR4的方式减弱被几丁质诱导产生的免疫反应,并且同时施加SmLCO和几丁质能够比单独施用SmLCO显著提高共生相关基因*MtHA*、*MtVa-pyrin*的表达<sup>[52]</sup>。这种对免疫激发子的抑制不仅仅局限于几丁质,也会减弱对flg22诱导的免疫反应<sup>[53]</sup>。宿主免疫系统的激活有助于共生特异性,进一步强调了免疫与共生之间的复杂互动关系。

未来的研究可以重点关注蒺藜苜蓿中LysM类受体激酶及其下游成分在调节植物免疫和共生中的功能多样性及可能的功能分化现象。特别是,LysM受体在识别或结合其他小分子配体以及受体在多重信号感知中的作用仍有待进一步探索。深入研究LysM类受体激酶家族的复杂工作机制,对于揭示植物受体复合物的组成和机制至关重要。通过在根瘤菌和菌根共生中的深入研究,我们可以更全面地了解LysM类受体激酶的功能和机制,为未来植物免疫和共生研究奠定坚实基础。

## 参考文献 References

- [1] NGOU B P M, WYLER M, SCHMID M W, et al. Evolutionary trajectory of pattern recognition receptors in plants[J/OL]. *Nature communications*, 2024, 15 (1) : 308 [2024-05-07]. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-44408-3>.
- [2] RUMAN H, KAWAHARADA Y. A new classification of lysin motif receptor-like kinases in *Lotus japonicus*[J]. *Plant & cell physiology*, 2023, 64(2):176-190.
- [3] BUENDIA L, GIRARDIN A, WANG T M, et al. LysM receptor-like kinase and LysM receptor-like protein families: an update on phylogeny and functional characterization [J/OL]. *Frontiers in plant science*, 2018, 9: 1531 [2024-05-07]. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01531>.
- [4] LIMPENS E, FRANKEN C, SMIT P, et al. LysM domain receptor kinases regulating rhizobial nod factor-induced infection [J]. *Science*, 2003, 302(5645):630-633.
- [5] LI Y H, ZHAO Y W, YAN Z, et al. Nodulation trio in *Medicago truncatula*: unveiling the overlapping roles of *MtLYK2*, *MtLYK3*, and *MtLYK2bis*[J/OL]. *Journal of integrative plant biology*, 2024[2024-05-07]. <https://doi.org/10.1111/jipb.13718>.
- [6] LUU T B, OURTH A, POUZET C, et al. A newly evolved chimeric lysin motif receptor-like kinase in *Medicago truncatula* spp. *tricycla* R108 extends its Rhizobia symbiotic partnership [J]. *New phytologist*, 2022, 235(5):1995-2007.



- [7] GIBELIN-VIALA C, AMBLARD E, PUECH-PAGES V, et al. The *Medicago truncatula* LysM receptor-like kinase LYK9 plays a dual role in immunity and the arbuscular mycorrhizal symbiosis [J]. *New phytologist*, 2019, 223 (3) : 1516-1529.
- [8] ZHANG C X, LI R J, BAUDE L, et al. CRISPR/Cas9-mediated generation of mutant lines in *Medicago truncatula* indicates a symbiotic role of MtLYK10 during nodule formation [J/OL]. *Biology*, 2024, 13(1) : 53 [2024-05-07]. <https://doi.org/10.3390/biology13010053>.
- [9] MAILLET F, FOURNIER J, MENDIS H C, et al. *Sinorhizobium meliloti* succinylated high-molecular-weight succinoglycan and the *Medicago truncatula* LysM receptor-like kinase MtLYK10 participate independently in symbiotic infection [J]. *The plant journal*, 2020, 102(2) : 311-326.
- [10] BEN AMOR B, SHAW S L, OLDROYD G E D, et al. The NFP locus of *Medicago truncatula* controls an early step of Nod factor signal transduction upstream of a rapid calcium flux and root hair deformation [J]. *The plant journal*, 2003, 34(4) : 495-506.
- [11] CULLIMORE J, FLIEGMANN J, GASCIOLLI V, et al. Evolution of lipochitooligosaccharide binding to a LysM-RLK for nodulation in *Medicago truncatula* [J]. *Plant & cell physiology*, 2023, 64(7) : 746-757.
- [12] FLIEGMANN J, CANOVA S, LACHAUD C, et al. Lipochitooligosaccharidic symbiotic signals are recognized by LysM receptor-like kinase LYR3 in the legume *Medicago truncatula* [J]. *ACS chemical biology*, 2013, 8(9) : 1900-1906.
- [13] BOZSOKI Z, CHENG J, FENG F, et al. Receptor-mediated chitin perception in legume roots is functionally separable from Nod factor perception [J]. *PNAS*, 2017, 114 (38) : E8118-E8127.
- [14] MADSEN E B, ANTOLÍN-LLOVERA M, GROSSMANN C, et al. Autophosphorylation is essential for the in vivo function of the *Lotus japonicus* Nod factor receptor 1 and receptor-mediated signalling in cooperation with Nod factor receptor 5 [J]. *The plant journal*, 2011, 65(3) : 404-417.
- [15] ARRIGHI J F, BARRE A, BEN AMOR B, et al. The *Medicago truncatula* lysin [corrected] motif-receptor-like kinase gene family includes NFP and new nodule-expressed genes [J]. *Plant physiology*, 2006, 142(1) : 265-279.
- [16] WILLMANN R, LAJUNEN H M, ERBS G, et al. *Arabidopsis* lysin-motif proteins LYM1 LYM3 CERK1 mediate bacterial peptidoglycan sensing and immunity to bacterial infection [J]. *PNAS*, 2011, 108(49) : 19824-19829.
- [17] GYSEL K, LAURSEN M, THYGESEN M B, et al. Kinetic proofreading of lipochitooligosaccharides determines signal activation of symbiotic plant receptors [J/OL]. *PNAS*, 2021, 118 (44) : e2111031118 [2024-05-07]. <https://doi.org/10.1073/pnas.2111031118>.
- [18] LEFEBVRE B, KLAUS-HEISEN D, PIETRASZEWSKA-BOGIEL A, et al. Role of N-glycosylation sites and CXC motifs in trafficking of *Medicago truncatula* Nod factor perception protein to plasma membrane [J]. *Journal of biological chemistry*, 2012, 287(14) : 10812-10823.
- [19] ZENG L R, VELÁSQUEZ A C, MUNKVOLD K R, et al. A tomato LysM receptor-like kinase promotes immunity and its kinase activity is inhibited by AvrPtoB [J]. *The plant journal*, 2012, 69(1) : 92-103.
- [20] CATOIRA R, TIMMERS A C, MAILLET F, et al. The HCL gene of *Medicago truncatula* controls *Rhizobium*-induced root hair curling [J]. *Development*, 2001, 128(9) : 1507-1518.
- [21] MITRA R M, SHAW S L, LONG S R. Six nonnodulating plant mutants defective for Nod factor-induced transcriptional changes associated with the legume-rhizobia symbiosis [J]. *PNAS*, 2004, 101(27) : 10217-10222.
- [22] ARDOUREL M, DEMONT N, DEBELLÉ F, et al. *Rhizobium meliloti* lipooligosaccharide nodulation factors: different structural requirements for bacterial entry into target root hair cells and induction of plant symbiotic developmental responses [J]. *The plant cell*, 1994, 6(10) : 1357-1374.
- [23] SMIT P, LIMPENS E, GEURTS R, et al. *Medicago* LYK3, an entry receptor in rhizobial nodulation factor signaling [J]. *Plant physiology*, 2007, 145(1) : 183-191.
- [24] RADUTOIU S, MADSEN L H, MADSEN E B, et al. LysM domains mediate lipochitin-oligosaccharide recognition and *Nfr* genes extend the symbiotic host range [J]. *The EMBO journal*, 2007, 26(17) : 3923-3935.
- [25] BOZSOKI Z, GYSEL K, HANSEN S B, et al. Ligand-recognizing motifs in plant LysM receptors are major determinants of specificity [J]. *Science*, 2020, 369(6504) : 663-670.
- [26] LUU T B, CARLES N, BOUZOU L, et al. Analysis of the structure and function of the LYK cluster of *Medicago truncatula* A17 and R108 [J/OL]. *Plant science*, 2023, 332: 111696 [2024-05-07]. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2023.111696>.
- [27] BENSMIHEN S, DE BILLY F, GOUGH C. Contribution of NFP LysM domains to the recognition of nod factors during the *Medicago truncatula*/*Sinorhizobium meliloti* symbiosis [J/OL]. *PLoS One*, 2011, 6(11) : e26114 [2024-05-07]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026114>.
- [28] RIVAL P, DE BILLY F, BONO J J, et al. Epidermal and cortical roles of NFP and DMI3 in coordinating early steps of nodulation in *Medicago truncatula* [J]. *Development*, 2012, 139 (18) : 3383-3391.
- [29] PIETRASZEWSKA-BOGIEL A, LEFEBVRE B, KOINI M A, et al. Interaction of *Medicago truncatula* lysin motif receptor-like kinases, NFP and LYK3, produced in *Nicotiana benthamiana* induces defence-like responses [J/OL]. *PLoS One*, 2013, 8 (6) : e65055 [2024-05-07]. <https://doi.org/>

- 10.1371/journal.pone.0065055.
- [30] LEFEBVRE B, TIMMERS T, MBENGUE M, et al. A remorin protein interacts with symbiotic receptors and regulates bacterial infection[J]. *PNAS*, 2010, 107(5):2343-2348.
- [31] LIANG P B, STRATIL T F, POPP C, et al. Symbiotic root infections in *Medicago truncatula* require remorin-mediated receptor stabilization in membrane nanodomains [J]. *PNAS*, 2018, 115(20):5289-5294.
- [32] HANEY C H, RIELY B K, TRICOLI D M, et al. Symbiotic rhizobia bacteria trigger a change in localization and dynamics of the *Medicago truncatula* receptor kinase LYK3 [J]. *The plant cell*, 2011, 23(7):2774-2787.
- [33] MOLING S, PIETRASZEWSKA-BOGIEL A, POSTMA M, et al. Nod factor receptors form heteromeric complexes and are essential for intracellular infection in medicago nodules [J]. *The plant cell*, 2014, 26(10):4188-4199.
- [34] FLIEGMANN J, JAUNEAU A, PICHEREAUX C, et al. LYR3, a high-affinity LCO-binding protein of *Medicago truncatula*, interacts with LYK3, a key symbiotic receptor [J]. *FEBS letters*, 2016, 590(10):1477-1487.
- [35] ZHANG J Y, SUN J, CHIU C H, et al. A receptor required for chitin perception facilitates arbuscular mycorrhizal associations and distinguishes root symbiosis from immunity [J]. *Current biology*, 2024, 34(8):1705-1717.
- [36] MAILLET F, POINSOT V, ANDRÉ O, et al. Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza [J]. *Nature*, 2011, 469(7328):58-63.
- [37] OLDROYD G E D. Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants [J]. *Nature reviews*, 2013, 11(4):252-263.
- [38] GENRE A, CHABAUD M, BALZERGUE C, et al. Short-chain chitin oligomers from arbuscular mycorrhizal fungi trigger nuclear Ca<sup>2+</sup> spiking in *Medicago truncatula* roots and their production is enhanced by strigolactone [J]. *New phytologist*, 2013, 198(1):190-202.
- [39] YOUNG N D, DEBELLÉ F, OLDROYD G E D, et al. The *Medicago* genome provides insight into the evolution of rhizobial symbioses [J]. *Nature*, 2011, 480(7378):520-524.
- [40] ZHANG X W, DONG W T, SUN J, et al. The receptor kinase CERK1 has dual functions in symbiosis and immunity signaling [J]. *The plant journal*, 2015, 81(2):258-267.
- [41] CAROTENUTO G, CHABAUD M, MIYATA K, et al. The rice LysM receptor-like kinase OsCERK1 is required for the perception of short-chain chitin oligomers in arbuscular mycorrhizal signaling [J]. *New phytologist*, 2017, 214(4):1440-1446.
- [42] HARMAN G, KHADKA R, DONI F, et al. Benefits to plant health and productivity from enhancing plant microbial symbionts [J/OL]. *Frontiers in plant science*, 2021, 11: 610065 [2024-05-07]. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.610065>.
- [43] JONES J D G, DANGL J L. The plant immune system [J]. *Nature*, 2006, 444(7117):323-329.
- [44] JONES J D G, STASKAWICZ B J, DANGL J L. The plant immune system: from discovery to deployment [J]. *Cell*, 2024, 187(9):2095-2116.
- [45] SHIMIZU T, NAKANO T, TAKAMIZAWA D, et al. Two LysM receptor molecules, CEBiP and OsCERK1, cooperatively regulate chitin elicitor signaling in rice [J]. *The plant journal*, 2010, 64(2):204-214.
- [46] WAN J R, ZHANG X C, NEECE D, et al. A LysM receptor-like kinase plays a critical role in chitin signaling and fungal resistance in *Arabidopsis* [J]. *The plant cell*, 2008, 20(2):471-481.
- [47] CAO Y R, LIANG Y, TANAKA K, et al. The kinase LYK5 is a major chitin receptor in *Arabidopsis* and forms a chitin-induced complex with related kinase CERK1 [J/OL]. *eLife*, 2014, 3: e03766 [2024-05-07]. <https://doi.org/10.7554/eLife.03766>.
- [48] RUTTEN L, MIYATA K, ROSWANJAYA Y P, et al. Duplication of symbiotic lysin motif receptors predates the evolution of nitrogen-fixing nodule symbiosis [J]. *Plant physiology*, 2020, 184(2):1004-1023.
- [49] REY T, NARS A, BONHOMME M, et al. NFP, a LysM protein controlling Nod factor perception, also intervenes in *Medicago truncatula* resistance to pathogens [J]. *New phytologist*, 2013, 198(3):875-886.
- [50] BEN C, TOUENI M, MONTANARI S, et al. Natural diversity in the model legume *Medicago truncatula* allows identifying distinct genetic mechanisms conferring partial resistance to *Verticillium* wilt [J]. *Journal of experimental botany*, 2013, 64(1):317-332.
- [51] GOUGH C, JACQUET C. Nod factor perception protein carries weight in biotic interactions [J]. *Trends in plant science*, 2013, 18(10):566-574.
- [52] FENG F, SUN J, RADHAKRISHNAN G V, et al. A combination of chitooligosaccharide and lipochitooligosaccharide recognition promotes arbuscular mycorrhizal associations in *Medicago truncatula* [J/OL]. *Nature communications*, 2019, 10(1):5047 [2024-05-07]. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12999-5>.
- [53] LIANG Y, CAO Y R, TANAKA K, et al. Nonlegumes respond to rhizobial Nod factors by suppressing the innate immune response [J]. *Science*, 2013, 341(6152):1384-1387.



## Progress on studying LysM receptor-like kinases in *Medicago truncatula*

LI Yaohua, ZHANG Rui, LIU Li, ZHU Hui, CAO Yangrong

*National Key Laboratory of Agricultural Microbiology/  
Hubei Hongshan Laboratory/College of Life Science and Technology,  
Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China*

**Abstract** LysM receptor-like kinases (LysM-RLKs) belong to the multi-gene family whose extracellular domains are directly involved in the perception of glycosyl compounds including chitin, peptidoglycans, and lipochitooligosaccharides, thereby activating pathways of plant immunity or symbiotic signal transduction. The function of the first LysM receptor gene, *LYK3*, in the model legume *Medicago truncatula* was characterized in 2003. Subsequently, the function of more and more LysM receptor kinases was identified. This article provided a detailed enumeration and functional characterization of the LysM-RLK family in *M. truncatula*. The progress on studying LysM receptor kinase family in nodulation symbiosis, mycorrhizal symbiosis, and immune perception of *Medicago truncatula* was summarized. It is indicated that the expansion of the number of LysM-RLKs genes within the *M. truncatula* has led to functional differentiation, but there is a phenomenon of functional redundancy among some genes as well. In addition, a close cross-linking between immune and symbiotic signals at the level of receptor perception mediated by LysM-RLKs was revealed. It will provide effective references for further studying LysM-RLKs genes in *M. truncatula*.

**Keywords** *Medicago truncatula*; LysM receptor-like kinases; root nodule symbiosis; arbuscular mycorrhizal symbiosis; immune perception

(责任编辑:葛晓霞)