

野生大豆与栽培大豆几丁质酶基因鉴定及其表达分析

张 华, 李 娜, 邢馨竹, 邵振启, 李喜焕, 张彩英

(河北农业大学农学院/华北作物改良与调控国家重点实验室/华北作物种质资源研究与利用教育部重点实验室/
河北省作物种质资源重点实验室, 保定 071001)

摘要: 几丁质酶是以几丁质等为底物的糖基水解酶(GH, glycosyl hydrolases), 在植物生长发育及抵御逆境中发挥重要作用。然而, 大豆几丁质酶基因的组织表达模式及对逆境的响应尚不清楚, 影响了其在遗传改良中的应用。本研究分别鉴定野生大豆与栽培大豆几丁质酶基因, 并分析其表达模式。结果发现, 野生大豆与栽培大豆分别含62个和55个几丁质酶基因, 位于17条和18条染色体上; 进化树分析发现, 117个基因分为5类, 其中类群III与类群V属于GH18亚家族, 类群I、类群II与类群IV属于GH19亚家族; 启动子分析发现, 几丁质酶家族成员包含响应激素及逆境胁迫顺式作用元件。栽培大豆几丁质酶基因表达分析发现, 其在不同组织及抗病耐逆等过程差异表达, 其中 *Gm.01G142400* 和 *Gm.13G346700* 等在接种花叶病毒的抗病品种叶片中诱导表达, *Gm.03G254300* 和 *Gm.20G164600* 等在低磷胁迫的磷高效品种根系中诱导表达, *Gm.08G259200* 和 *Gm.19G245400* 等在低磷胁迫根瘤中诱导表达; 野生大豆几丁质酶基因表达分析发现, 其在不同组织及耐盐过程差异表达, 其中 *Gs.02G002604* 和 *Gs.02G002940* 等在盐胁迫耐盐品种叶片中诱导表达。以上结果为挖掘利用几丁质酶基因奠定了基础。

关键词: 几丁质酶; 野生大豆; 栽培大豆; 基因家族; 表达模式

Identification and Expression Analysis of Chitinase Genes in Wild and Cultivated Soybeans

ZHANG Hua, LI Na, XING Xinzhu, SHAO Zhenqi, LI Xihuan, ZHANG Caiying

(College of Agronomy, Hebei Agricultural University/State Key Laboratory of North China Crop Improvement and Regulation /
North China Key Laboratory for Crop Germplasm Resources of Education Ministry / Hebei Key Laboratory of
Crop Germplasm Resources, Baoding 071001)

Abstract: Chitinase is a kind of glycosyl hydrolases (GH) which hydrolyzes the chitin and other polymers. Chitinase plays an important function in the plant growth and development, as well as in the resistant process to diverse stresses. However, the tissue expression patterns and responses to diverse stresses of chitinase genes in soybean are still unclear, which seriously limited its application in genetic improvement. In this study, the chitinase family genes were identified in the wild soybean (*Glycine soja* Sieb. and Zucc.) and cultivated soybean (*Glycine max* (L.) Merr.), and the expression patterns were also analyzed. The results showed that 62 and 55 chitinase genes were identified in the wild soybean and cultivated soybean, which located on 17 and 18 chromosomes, respectively. The phylogenetic tree analysis showed that the chitinase genes were divided into five categories, with Class III and Class V belonging to the GH18 subfamily, while Class I, Class II and Class IV belonging to the GH19 subfamily. Further analysis found many *cis*-acting elements in the promoter regions of chitinase genes responding to various plant hormones and stresses. Further gene expression analyses in cultivated soybean showed that the chitinase genes presented differential expressions in different tissues and under different

收稿日期: 2023-11-25 网络出版日期: 2024-01-10

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20231125001>

第一作者研究方向为大豆遗传育种与分子生物学, E-mail: zhanghua0316@163.com

通信作者: 李喜焕, 研究方向为大豆遗传育种与分子生物学, E-mail: lixihuan@hebau.edu.cn

张彩英, 研究方向为大豆遗传育种与分子生物学, E-mail: zhangcaiying@hebau.edu.cn

基金项目: 河北省现代农业产业技术体系建设专项资金(HBCT2024060204)

Foundation project: Hebei Agriculture Research System (HBCT2024060204)

stress conditions. Among these genes, *Gm.01G142400* and *Gm.13G346700* were strongly induced in the leaves of resistant variety after soybean mosaic virus inoculation, *Gm.03G254300* and *Gm.20G164600* were induced in soybean roots after low phosphorus treatment, and *Gm.08G259200* and *Gm.19G245400* were induced in soybean nodules under low phosphorus condition. Gene expression analysis in wild soybean showed that the chitinase genes presented differential expressions in different tissues and after salt stress, among which *Gs.02G002604* and *Gs.02G002940* were highly induced in the leaves of tolerant variety after salt treatment. These results provide important references for further utilizing the chitinase genes in soybean genetic improvement.

Key words: chitinases; wild soybean; cultivated soybean; gene family; expression analysis

几丁质酶(Chitinase)是一类以几丁质、壳聚糖、脂壳寡糖以及肽聚糖等天然高聚物为底物的糖基水解酶(GH, glycosyl hydrolases)^[1-2],其产物丁寡糖、壳聚糖和N-乙酰氨基葡萄糖不仅能增强植物自身的抗病菌能力,并且具有抑制人类肿瘤细胞生长的功能,在医药行业具有广阔的应用前景^[3-4]。通常情况下,根据几丁质酶水解反应产生的初级产物,可将其分为内切几丁质酶和外切几丁质酶,而植物体内多为内切几丁质酶,其主要作用于几丁质的 β -1,4-糖苷键,形成几丁单糖、几丁二糖和低聚糖等产物^[5]。同时,根据几丁质酶的氨基酸序列同源性又可将其分为糖苷水解酶18(GH18)与糖苷水解酶19(GH19)两个亚家族^[6-7]。对几丁质酶家族成员进行系统发育树分析可将其分为五类(I-V),其中III类与V类属于GH18亚家族,而I、II与IV类属于GH19亚家族^[8]。有研究发现,GH18亚家族的III类几丁质酶通常包含保守序列DXDXE与GH18催化结构域,且其GH18催化结构域由8个 α 螺旋与8个平行 β 折叠构成,GH18亚家族的V类几丁质酶尽管也含有与III类相同的保守序列与结构域,但它们之间的同源性很低^[9-10]。与GH18亚家族不同,GH19亚家族的I类几丁质酶含有一个N-端几丁质结合结构域和一个C端催化结构域,且II类几丁质酶包含的结构域与I类C端的催化结构域同源,而IV类几丁质酶尽管与I类的保守结构域同源性较高,但其结合结构域较I类缺少部分氨基酸,且C端的延伸区不完整^[11]。

很多植物含有几丁质酶,主要在根、茎、叶、花、荚等组织部位表达^[12-13],尤其是当植物受到含几丁质的昆虫和病菌等生物胁迫以及遇到高温、干旱等非生物胁迫时,其体内的几丁质酶含量迅速发生改变^[14-16]。有学者发现,超表达拟南芥几丁质酶基因*CACi2*可增强其对丁香假单胞菌的抗性^[17];外施水杨酸、乙烯以及甲基茉莉酸也可显著提高水稻几丁质酶基因*Oschi1*表达^[18]。尽管目前在模式植物拟南芥和水稻中已有几丁质酶基因家族鉴定及其生

物学功能分析的报道,但其在大豆生长发育以及响应外界逆境环境方面的功能尚不清楚,尤其是随着野生大豆和栽培大豆高质量基因组的公布,鉴定几丁质酶基因家族对发挥其在大豆重要性状遗传改良中的作用具有一定理论价值。

鉴于此,本研究分别利用野生大豆(*Glycine soja* Sieb. and Zucc.)W05高质量基因组(W05a1)和栽培大豆(*Glycine max*(L.)Merr.)Williams 82高质量基因组(Wm82a4v1)鉴定几丁质酶基因家族成员,并对其理化性质、染色体分布、系统进化关系、启动子顺式作用元件以及不同组织部位和抗病耐逆过程中的表达模式进行分析,为进一步发挥该类基因在大豆生长发育及抵御生物和非生物胁迫中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 大豆几丁质酶基因家族鉴定及其生物信息学分析

首先从SoyBase数据库(<https://www.soybase.org/>)下载野生大豆W05(W05a1)和栽培大豆Williams 82(Wm82a4v1)最新版本基因组序列,并在NCBI网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)查找拟南芥与水稻基因组的所有几丁质酶家族成员蛋白序列;随后以这些蛋白序列为种子序列,在大豆基因组数据中进行BLAST分析,寻找含GH18(PF00704)或GH19(PF00182)结构域的同源基因,同时结合Pfam数据库(<http://Pfam/search.shtml>)寻找GH18(PF00704)和GH19(PF00182),鉴定大豆几丁质酶家族基因;再利用NCBI数据库中的Conserved Domain Database(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>)工具,保留具有GH18和GH19保守结构域的基因^[19]。分别利用在线工具ExPASy-ProtParam tool(<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>)与Cell-PLoc 2.0(<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2/>)分析几丁质酶基因的蛋白理化性质及

其亚细胞定位^[20-21]。

1.2 几丁质酶家族成员系统进化分析

利用MEGA7.0软件对野生大豆、栽培大豆、拟南芥与水稻几丁质酶基因编码蛋白进行多序列比对,并采用相邻连接法(NJ,neighbor-joining)构建系统进化树,参数设置为Bootstrap 1000次重复^[22]。

1.3 几丁质酶基因染色体定位与共线性分析

在SoyBase数据库获取大豆几丁质酶基因家族成员物理位置,利用TBtools软件(<https://github.com/CJ-Chen/TBtools>)将基因的染色体定位结果进行可视化;通过TBtools软件的OneStepMCScanX-Super Fast工具对基因进行共线性分析。

1.4 几丁质酶家族成员保守基序分析

利用TBtools软件的Simple MEME Wrapper工具获得几丁质酶的蛋白保守基序,其中,最大基序数设为10,通过Visalze MEME/MAST Motif Pattern工具实现其结果的可视化。

1.5 几丁质酶基因顺式作用元件分析

利用TBtools截取大豆几丁质酶家族基因的上游2000 bp序列,通过PlantCare(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)分析其顺式作用元件。

1.6 几丁质酶基因表达模式分析

利用课题组栽培大豆抗病品种(齐黄30)接种

花叶病毒(SMV,soybean mosaic virus)不同时间(3 h、24 h、5 d、10 d和14 d)叶片转录组数据(以接种PBS缓冲液为对照)^[23]、磷高效品种(中黄15)低磷胁迫处理不同时间(7 d、28 d、49 d和70 d)根系转录组数据(以正常磷处理为对照)^[24]以及低磷处理的成熟根瘤转录组数据(以正常磷处理为对照)^[25],分别分析几丁质酶家族基因的表达模式。同时,利用前人已报道的栽培大豆和野生大豆不同组织部位转录组数据^[26-27],野生大豆盐胁迫处理不同时间(3 h、10 h,以0 h为对照)叶片转录组数据^[28],以及抗裂荚与易裂荚大豆品种豆荚发育不同时间的转录组数据^[29],分析几丁质酶基因的表达模式,并筛选存在表达差异的候选基因。

2 结果与分析

2.1 大豆几丁质酶基因家族鉴定及其理化性质

本研究分别在野生大豆W05与栽培大豆Williams 82基因组中鉴定到62个和55个几丁质酶基因(表1、表2),其中野生大豆几丁质酶基因编码的蛋白长度范围为114~820个氨基酸(表1),栽培大豆几丁质酶基因编码的蛋白长度范围为78~820个氨基酸(表2);亚细胞定位预测结果显示,上述几丁质酶基因编码蛋白主要位于细胞膜、细胞壁、液泡与细胞外基质。

表1 野生大豆几丁质酶基因家族鉴定

Table 1 Identification of chitinase gene family members in wild soybean

基因ID Gene ID	编码蛋白 Coding protein	亚细胞定位 Subcellular localization	基因ID Gene ID	编码蛋白 Coding protein	亚细胞定位 Subcellular localization
Gs.01G000553	296	液泡	Gs.03G008247	416	细胞壁
Gs.01G001524	283	细胞膜	Gs.05G011572	298	细胞外基质
Gs.02G002604	281	液泡	Gs.07G017058	289	液泡
Gs.02G002940	320	液泡	Gs.07G017060	341	细胞外基质
Gs.02G003628	296	液泡	Gs.08G021659	326	液泡
Gs.03G005867	289	细胞膜	Gs.08G022105	420	液泡
Gs.03G005868	289	细胞膜	Gs.08G022109	204	细胞壁
Gs.03G005869	289	细胞膜	Gs.09G023118	317	液泡
Gs.03G005871	289	细胞膜	Gs.09G023940	309	细胞壁
Gs.03G005873	289	细胞膜	Gs.09G023990	299	液泡
Gs.03G005877	289	细胞膜	Gs.10G027023	225	细胞外基质
Gs.03G005879	289	细胞膜	Gs.10G027869	304	液泡
Gs.03G005932	280	细胞膜	Gs.11G029753	294	细胞膜
Gs.03G008223	303	细胞外基质	Gs.11G029754	178	细胞壁

表 1 (续)

基因 ID Gene ID	编码蛋白 Coding protein	亚细胞定位 Subcellular localization	基因 ID Gene ID	编码蛋白 Coding protein	亚细胞定位 Subcellular localization
<i>Gs.11G029956</i>	304	细胞壁	<i>Gs.17G046619</i>	384	细胞壁
<i>Gs.11G030829</i>	379	细胞壁	<i>Gs.18G048250</i>	295	液泡
<i>Gs.11G032516</i>	308	细胞壁	<i>Gs.18G048257</i>	310	液泡
<i>Gs.11G032517</i>	263	细胞膜	<i>Gs.18G048258</i>	211	液泡
<i>Gs.11G032669</i>	274	液泡	<i>Gs.18G048259</i>	297	液泡
<i>Gs.12G033410</i>	114	细胞膜	<i>Gs.18G049856</i>	329	液泡
<i>Gs.12G033411</i>	280	液泡	<i>Gs.19G050817</i>	316	细胞外基质
<i>Gs.12G034517</i>	298	液泡	<i>Gs.19G052278</i>	277	细胞外基质
<i>Gs.14G038380</i>	156	细胞壁	<i>Gs.19G052570</i>	148	细胞外基质
<i>Gs.15G039684</i>	820	细胞膜	<i>Gs.19G052599</i>	196	细胞壁
<i>Gs.15G039953</i>	289	细胞壁	<i>Gs.20G053031</i>	800	细胞核
<i>Gs.15G040923</i>	318	液泡	<i>Gs.20G054344</i>	252	液泡
<i>Gs.16G043472</i>	317	液泡	<i>Gs.20G054345</i>	333	细胞外基质
<i>Gs.16G043474</i>	196	液泡	<i>Gs.20G054347</i>	299	液泡
<i>Gs.16G044028</i>	297	液泡	<i>Gs.U055170</i>	762	叶绿体
<i>Gs.17G045193</i>	374	细胞壁	<i>Gs.U055172</i>	365	细胞壁
<i>Gs.17G045457</i>	377	细胞壁	<i>Gs.U055208</i>	197	细胞外基质

野生大豆基因 ID Glysoja 缩写为 Gs.; 下同
Wild soybean gene ID Glysoja was abbreviated to Gs.; The same as below

表 2 栽培大豆几丁质酶基因家族鉴定
Table 2 Identification of chitinase gene family members in cultivated soybean

基因 ID Gene ID	编码蛋白 Coding protein	亚细胞定位 Subcellular localization	基因 ID Gene ID	编码蛋白 Coding protein	亚细胞定位 Subcellular localization
<i>Gm.01G055200</i>	296	液泡	<i>Gm.05G075000</i>	298	细胞外基质
<i>Gm.01G142400</i>	283	细胞膜	<i>Gm.07G005801</i>	78	细胞膜
<i>Gm.01G160100</i>	275	液泡	<i>Gm.08G259200</i>	326	液泡
<i>Gm.02G007400</i>	281	液泡	<i>Gm.08G299700</i>	300	液泡
<i>Gm.02G042500</i>	320	液泡	<i>Gm.08G300300</i>	245	细胞外基质
<i>Gm.02G113600</i>	296	液泡	<i>Gm.09G038500</i>	317	液泡
<i>Gm.03G024400</i>	289	细胞膜	<i>Gm.09G121000</i>	309	细胞壁
<i>Gm.03G024500</i>	289	细胞膜	<i>Gm.09G126200</i>	299	液泡
<i>Gm.03G024566</i>	289	细胞膜	<i>Gm.10G227700</i>	304	液泡
<i>Gm.03G024900</i>	289	细胞膜	<i>Gm.11G146899</i>	304	细胞壁
<i>Gm.03G025000</i>	289	细胞膜	<i>Gm.12G049100</i>	114	细胞膜
<i>Gm.03G025200</i>	289	细胞膜	<i>Gm.12G049200</i>	280	液泡
<i>Gm.03G030500</i>	280	细胞膜	<i>Gm.12G156600</i>	298	液泡
<i>Gm.03G254300</i>	303	细胞外基质	<i>Gm.13G155800</i>	379	细胞壁
<i>Gm.03G256800</i>	418	细胞壁	<i>Gm.13G330800</i>	308	细胞壁

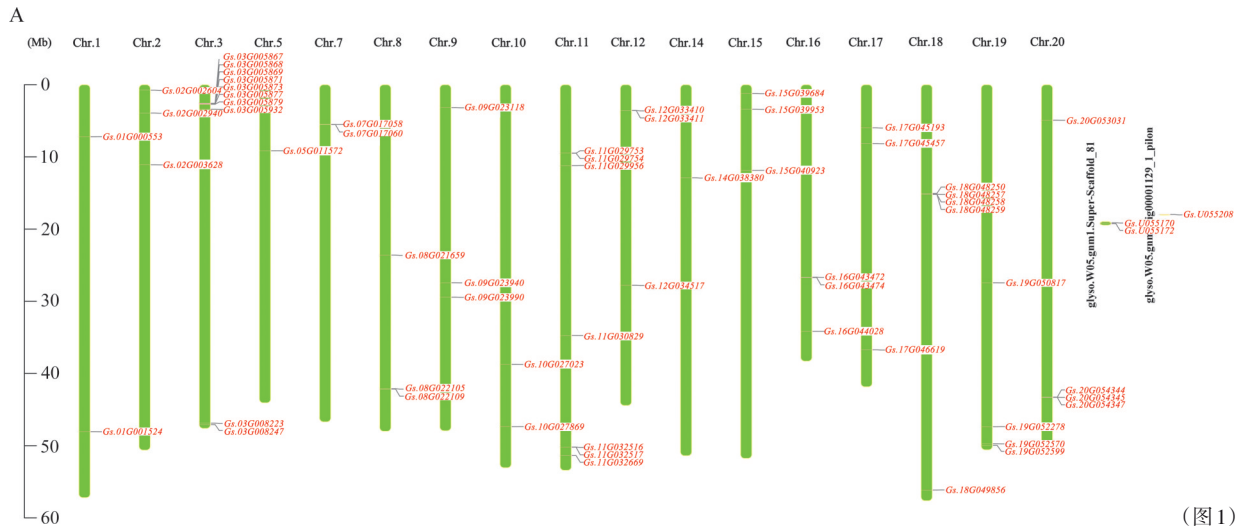
表 2 (续)

基因 ID Gene ID	编码蛋白 Coding protein	亚细胞定位 Subcellular localization	基因 ID Gene ID	编码蛋白 Coding protein	亚细胞定位 Subcellular localization
<i>Gm.13G330900</i>	264	细胞膜	<i>Gm.18G120200</i>	295	液泡
<i>Gm.13G346700</i>	274	液泡	<i>Gm.18G120700</i>	295	液泡
<i>Gm.14G110700</i>	174	细胞壁	<i>Gm.18G283400</i>	329	液泡
<i>Gm.15G015100</i>	820	细胞膜	<i>Gm.19G076200</i>	316	细胞外基质
<i>Gm.15G043300</i>	298	细胞壁	<i>Gm.19G221800</i>	272	细胞外基质
<i>Gm.15G143600</i>	318	液泡	<i>Gm.19G245400</i>	211	细胞膜
<i>Gm.15G206400</i>	762	叶绿体	<i>Gm.19G245500</i>	194	细胞膜
<i>Gm.15G206800</i>	365	细胞壁	<i>Gm.20G164600</i>	301	液泡
<i>Gm.16G119200</i>	317	液泡	<i>Gm.20G164700</i>	333	细胞外基质
<i>Gm.16G173000</i>	297	液泡	<i>Gm.20G164900</i>	299	液泡
<i>Gm.17G076100</i>	374	细胞壁	<i>Gm.U031104</i>	289	细胞膜
<i>Gm.17G103500</i>	377	细胞壁	<i>Gm.U031204</i>	289	细胞膜
<i>Gm.17G217000</i>	384	细胞壁			

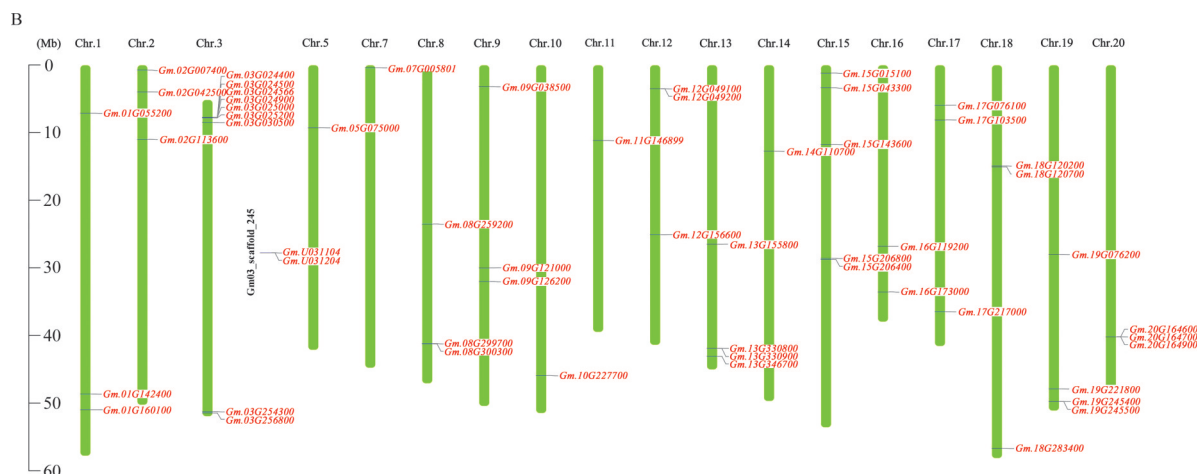
栽培大豆基因 ID Glyma 缩写为 Gm.; 下同
Cultivated soybean gene ID Glyma was abbreviated to Gm.; The same as below

分析野生大豆 62 个几丁质酶基因的染色体分布发现(图 1A), 59 个基因位于 17 条染色体(除 4 号、6 号和 13 号染色体), 另外 3 个基因(*Gs. U055170*、*Gs. U055172* 和 *Gs. U055208*)未定位到染色体, 且 59 个基因的染色体分布不均衡, 其中以 3 号染色体分布的基因数量最多(10 个), 其次为 11 号染色体(7 个)和 18 号染色体(5 个)。分析栽培大豆 55 个几丁质酶基因的染色体分布发现(图 1B), 其中 53 个基因定位于 18 条染色体(除 4 号和 6 号染色体), 另外 2 个基因(*Gm. U031104* 和 *Gm. U031204*)未

定位到染色体, 并以 3 号染色体分布的基因数量最多(9 个), 其次为 15 号染色体(5 个)、13 号染色体(4 个)和 19 号染色体(4 个)。与野生大豆相比, 栽培大豆的 3 号、7 号、10 号与 16 号染色体的几丁质酶基因数量分别减少 1 个, 18 号染色体减少 2 个, 11 号染色体减少 6 个, 而 1 号染色体增多 1 个, 15 号染色体增多 2 个, 13 号染色体增多 4 个, 推测野生大豆驯化为栽培大豆的过程中几丁质酶基因家族成员可能发生了基因丢失与易位现象。



(图 1)



A: 野生大豆几丁质酶基因; B: 栽培大豆几丁质酶基因

A: Wild soybean chitinase genes; B: Cultivated soybean chitinase genes

图1 野生大豆与栽培大豆几丁质酶基因的染色体分布

Fig. 1 Chromosome distributions of chitinase genes in wild and cultivated soybean

2.2 几丁质酶基因家族系统进化树与共线性分析

对上述鉴定的野生大豆和栽培大豆几丁质酶基因编码蛋白构建系统进化树(以拟南芥与水稻几丁质酶基因为参考),结果发现(图2),可将其划分为5类(分别命名为类群I~类群V),其中类群III与类群V属于糖基水解酶GH18亚家族,而类群I、类

群II与类群IV属于GH19亚家族, GH18亚家族的类群III包含的几丁质酶基因数量最多(含32个野生大豆基因和25个栽培大豆基因), GH19亚家族的类群II包含的几丁质酶基因数量最少(含5个野生大豆基因和3个栽培大豆基因)。

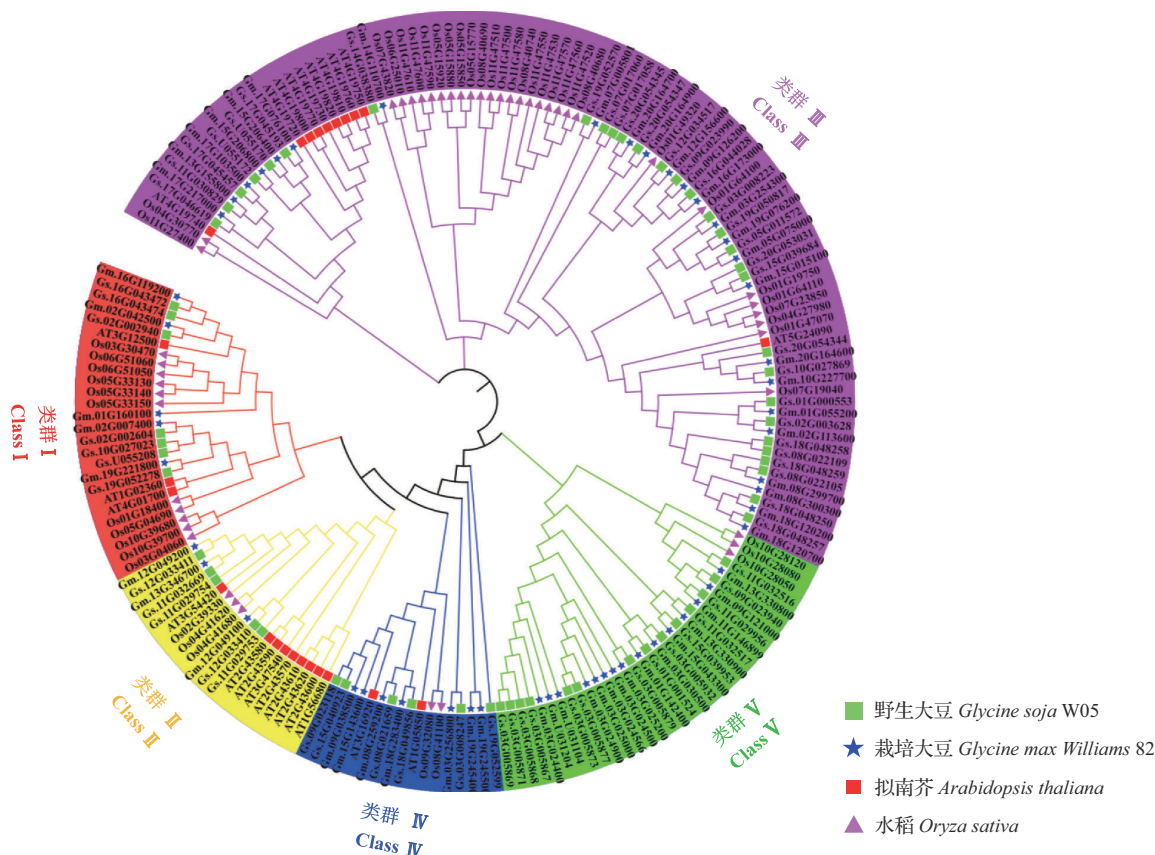


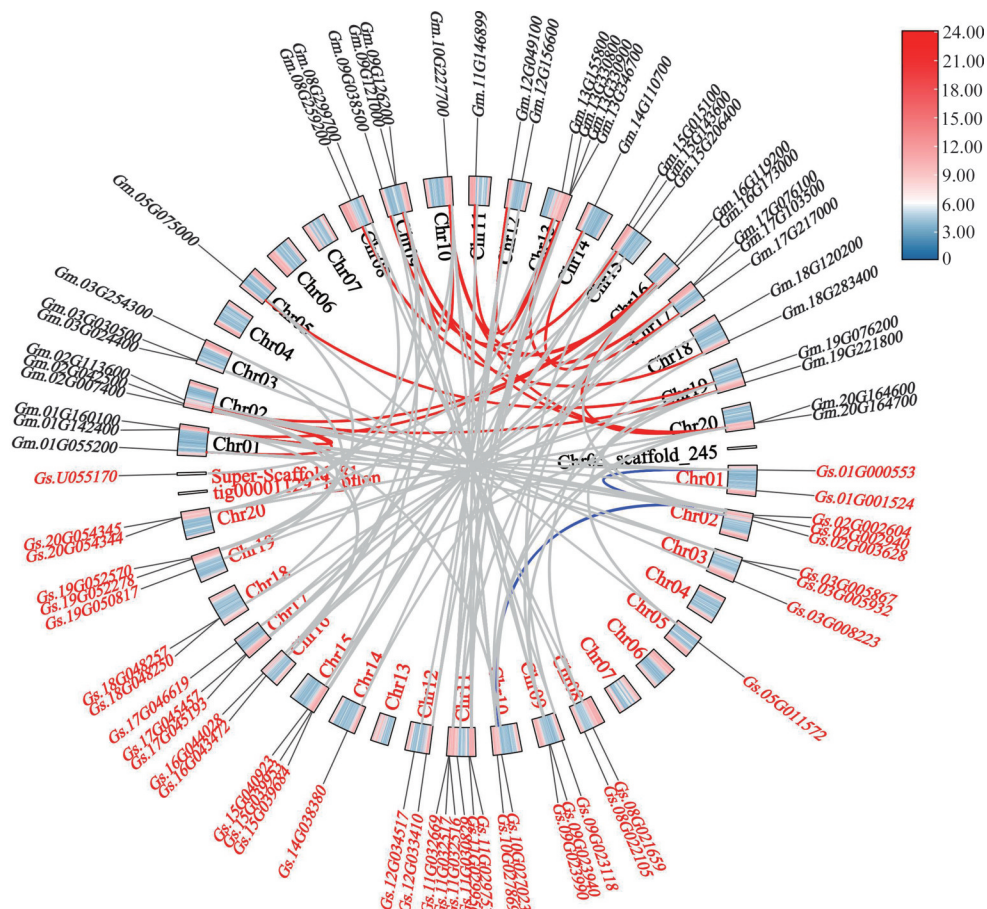
图2 大豆几丁质酶家族成员系统进化树分析

Fig. 2 The phylogenetic tree of chitinase family members in soybean

对野生大豆与栽培大豆几丁质酶基因进行共线性分析发现(图3),共有78对基因存在共线性关系,且染色体分布多样,如野生大豆10号染色体 *Gs. 10G027869* 与栽培大豆 *Gm. 09G126200*、*Gm. 10G227700*、*Gm. 16G173000* 和 *Gm. 20G164600* 具有共线性,而栽培大豆2号染色体 *Gm. 02G007400* 与野生大豆 *Gs. 02G002604*、*Gs. 10G027023* 和 *Gs. 19G052278* 具有共线性。进一步分析不同染色体的基因共线性发现,野生大豆11号染色体与栽培大豆的共线性基因数量最多(11个)。此外,野生大豆的2对几丁质酶基因(*Gs. 01G000553* 和 *Gs. 02G003628*、*Gs. 02G002604* 和 *Gs. 10G027023*)以及栽培大豆的19对几丁质酶基因(*Gm. 01G055200* 和 *Gm. 02G113600*、*Gm. 01G160100* 和 *Gm. 02G042500* 等)的非同义突变(Ka)与同义突变(Ks)比值小于1,表明这些基因在进化过程中经历了纯化选择,消除了有害突变,并使蛋白保持不变。

2.3 几丁质酶基因保守基序分析

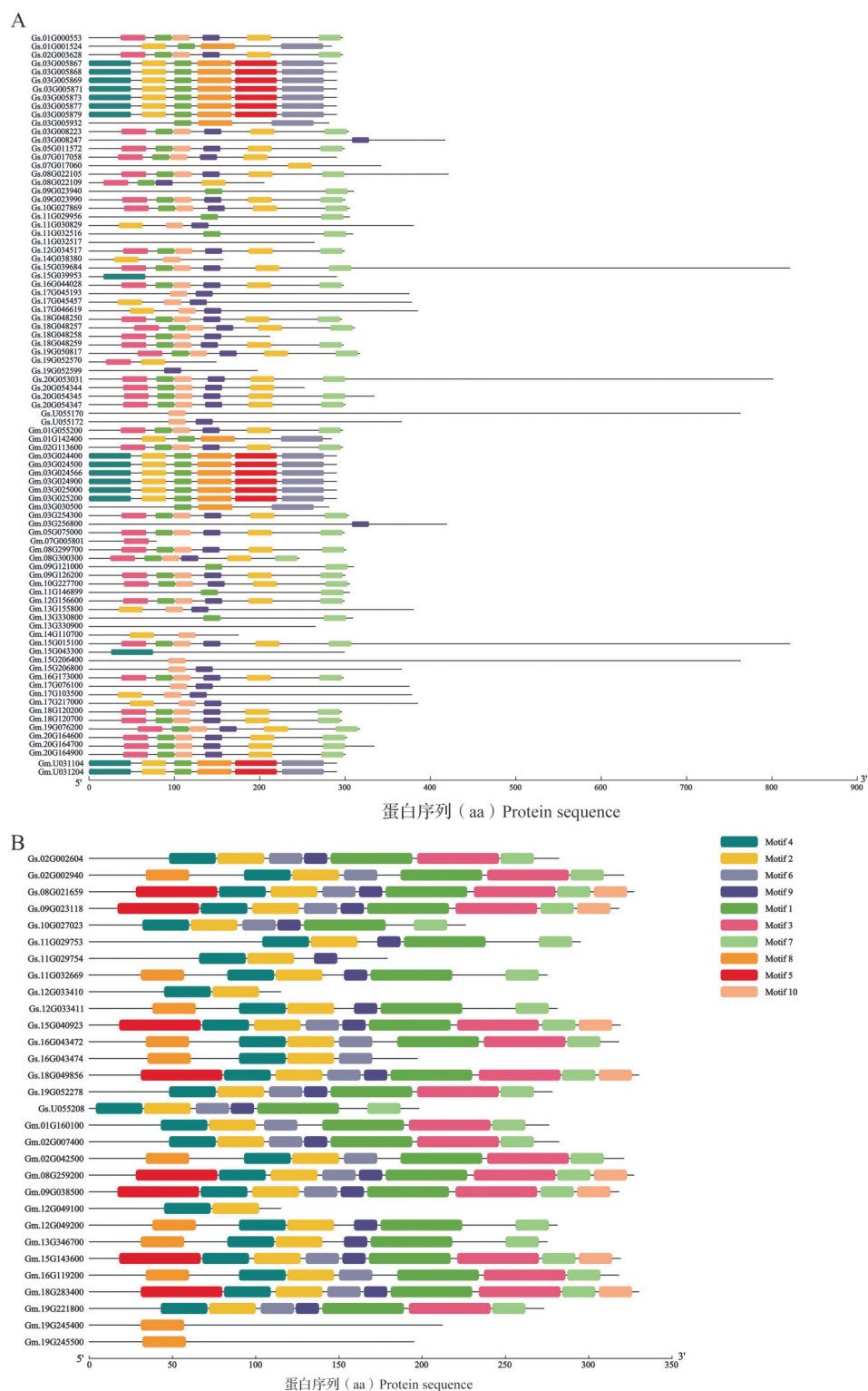
分析野生大豆和栽培大豆几丁质酶基因的保守基序发现(图4),在GH18与GH19亚家族分别鉴定到10个保守基序,将其命名为 motif 1~motif 10,其中39.08%的GH18亚家族基因同时含有 motif 1、motif 2、motif 3、motif 7和motif 9,而46.67%的GH19亚家族基因则同时含有 motif 1、motif 2、motif 4、motif 6、motif 7和motif 9。进一步分析发现,同一亚家族的野生大豆与栽培大豆基因存在相同的保守基序,如类群V的野生大豆 *Gs. 03G005867*、*Gs. 03G005868*、*Gs. 03G005869*、*Gs. 03G005871*、*Gs. 03G005873*、*Gs. 03G005877*、*Gs. 03G005879* 与栽培大豆的 *Gm. 03G024400*、*Gm. 03G024500*、*Gm. 03G024566*、*Gm. 03G024900*、*Gm. 03G025000*、*Gm. 03G025200*、*Gm. U031104*、*Gm. U031204* 均含有 motif 1、motif 2、motif 4、motif 5、motif 6和motif 8基序,说明几丁质酶基因在野生大豆向栽培大豆的进化过程中保留了较多相对保守的蛋白基序,这些基序可能对大豆生长发育具有重要作用。



灰色线连接共线性基因,蓝色线连接野生大豆纯化选择基因,红色线连接栽培大豆纯化选择基因;红色字体为野生大豆基因,黑色字体为栽培大豆基因
Gray lines indicate collinear genes, the blue lines indicate wild soybean purification selection genes, and the red lines indicate cultivated soybean purification selection genes; red font indicate wild soybean genes, black font indicate cultivated soybean genes

图3 大豆几丁质酶基因家族成员共线性分析

Fig.3 Collinear relationships of chitinase family genes in soybean



A: GH18 亚家族成员保守基序分析; B: GH19 亚家族成员保守基序分析

A: Motif structure analysis of GH18 subfamily; B: Motif structure analysis of GH19 subfamily

图4 大豆几丁质酶家庭成员保守基序分析

Fig. 4 Motif structure analysis of chitinase family members in soybean

2.4 几丁质酶基因启动子调控元件分析

分析几丁质酶基因上游启动子顺式作用元件发现(图5),几丁质酶家族成员包含赤霉素、脱落酸、水杨酸、光照、干旱、低温与细胞分化等响应元

件。进一步分析发现(图5A),95%的野生大豆几丁质酶基因启动子序列中含有响应植物激素的元件,73%的基因含有脱落酸响应元件,45%的基因含有水杨酸响应元件,68%的基因含有茉莉酸响应元

件,42%的基因含有响应干旱的MYB结合位点,35%的基因含有参与低温胁迫的调控元件,15%的基因含有参与籽粒生长发育的调控元件,并且所有的基因都含有光响应元件,另有少部分基因含有参与细胞分化与细胞周期的调控元件。

栽培大豆几丁质酶基因上游启动子序列中也含有响应多种植物激素以及生物与非生物胁迫的元件(图5B),如96%的基因含有激素响应元件,其

中82%的基因含有脱落酸响应元件,31%的成员具有水杨酸响应元件,71%的成员具有茉莉酸响应元件,而含有干旱、低温以及籽粒生长发育调控元件的基因数量则分别占42%、24%与13%。另外还发现,与野生大豆相比,栽培大豆几丁质酶基因启动子序列中含有一类能够响应植物类黄酮的MYB转录因子结合位点,表明其可能在野生大豆驯化为栽培大豆过程中发挥一定功能。

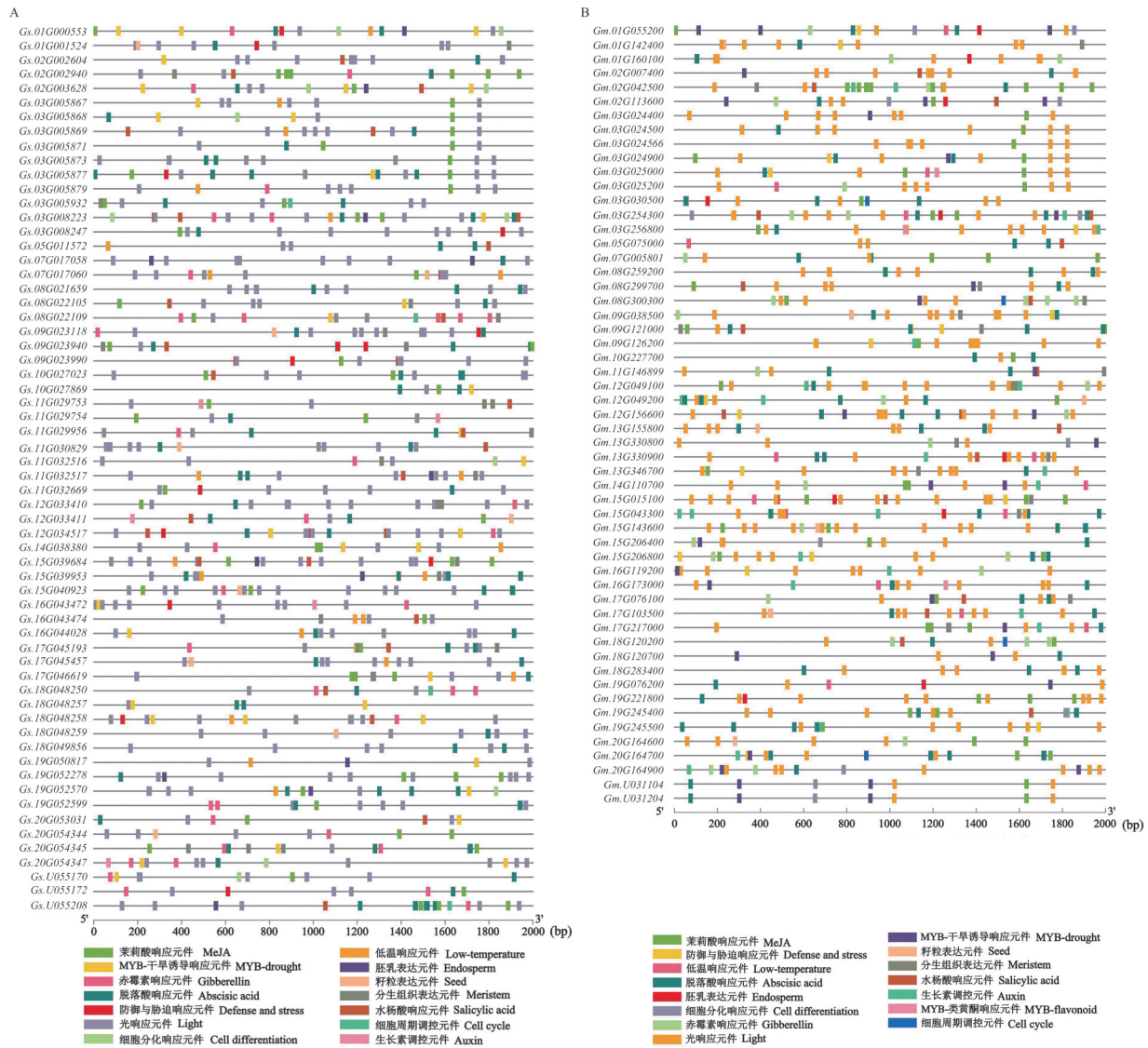


图5 大豆几丁质酶基因启动子区的顺式作用元件分析

Fig.5 Cis-acting elements analyses of chitinase family genes in soybean

2.5 几丁质酶家族基因表达模式分析

2.5.1 栽培大豆不同组织器官中的表达模式分析

分析栽培大豆55个几丁质酶基因在不同组织器官的表达模式发现(图6),几乎在各个组织部位均能检测到该类基因的表达,充分说明其对大豆正常生

长发育的重要性以及发挥功能的多样性,如GH18亚家族*Gm.03G256800*、GH19亚家族*Gm.08G259200*、*Gm.09G038500*与*Gm.18G283400*在根、茎、叶、花、荚、种子以及根瘤均有表达,而有些几丁质酶基因的表达具有明显的组织特异性,如GH19亚家族

Gm.16G119200 在叶片优势表达,而 GH18 亚家族 *Gm.13G155800* 和 *Gm.17G103500* 则在根系优势表达,表明这些基因可能与大豆叶片或根系的生长发育有关。另有一些基因如 *Gm.03G024400*、*Gm.03G030500* 和 *Gm.09G126200* 等在根瘤和根系优势表达,可能与大豆的根瘤形成有关;还有一些

基因在上述所有组织部位的表达量均较低,如 GH18 亚家族 *Gm.02G113600*、*Gm.08G299700*、*Gm.09G121000*、*Gm.14G110700*、*Gm.15G206400*、*Gm.18G120200* 和 GH19 亚家族 *Gm.12G049100* 等,推测其可能只在某些特定环境或某类胁迫与刺激诱导条件下发挥功能。

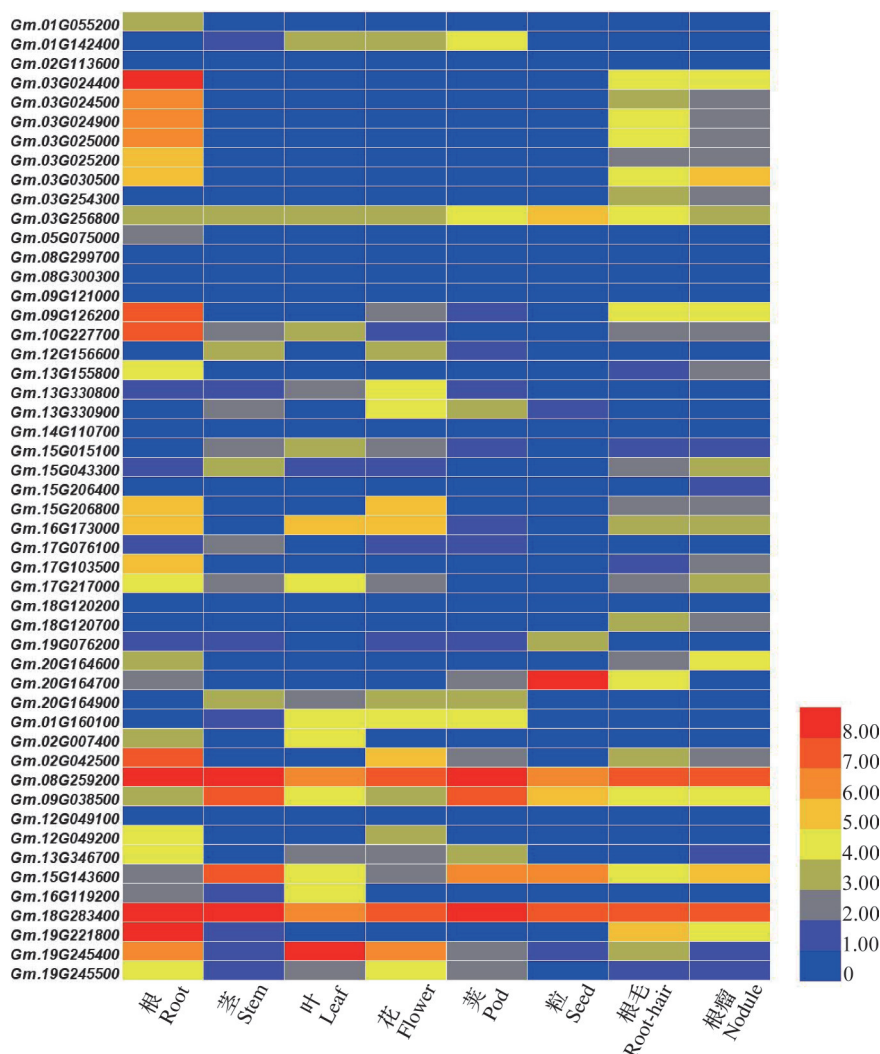
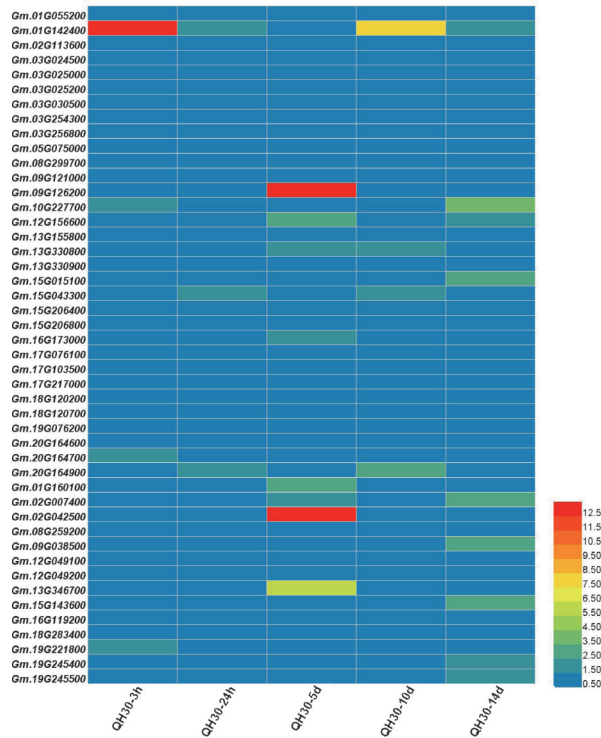


图6 几丁质酶基因在栽培大豆不同组织部位的表达模式分析

Fig. 6 Expression analysis of chitinase genes in different cultivated soybean tissues

2.5.2 栽培大豆抗病品种接种花叶病毒不同时间的表达模式分析 分析栽培大豆抗病品种叶片接种花叶病毒不同时间几丁质酶基因表达量发现(图7),有15个基因诱导表达,其接种处理的表达量是对照处理的2.0~22.9倍。进一步分析发现,其中4个基因(*Gm.01G142400*、*Gm.02G042500*、*Gm.09G126200*和*Gm.13G346700*)在花叶病毒接种后的表达

量达到对照处理的5倍以上,其中*Gm.01G142400*在接种花叶病毒的3个不同时间(3 h、24 h和10 d)表达量分别是对照处理的14.0倍、2.4倍和8.4倍,其余3个基因在接种处理后的表达量亦达到对照处理的5.7~22.9倍,推测这些基因在大豆抵抗花叶病毒感染或扩展过程中发挥一定功能。



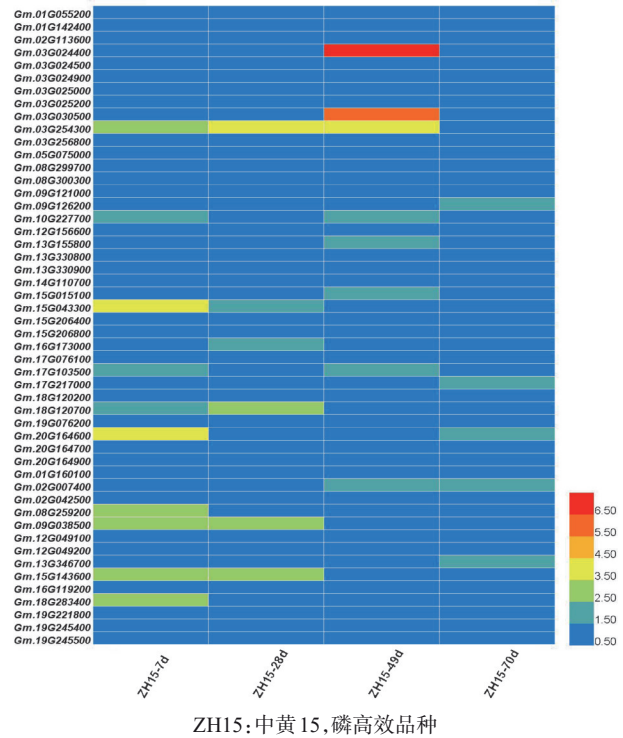
QH30: 齐黄30, 抗花叶病毒品种
QH30: Qihuang30, high-resistant cultivated soybean variety

图7 几丁质酶基因在栽培大豆抗病品种接种花叶病毒后的表达分析

Fig. 7 Expression analysis of chitinase genes after SMV inoculation in resistant cultivated soybean variety

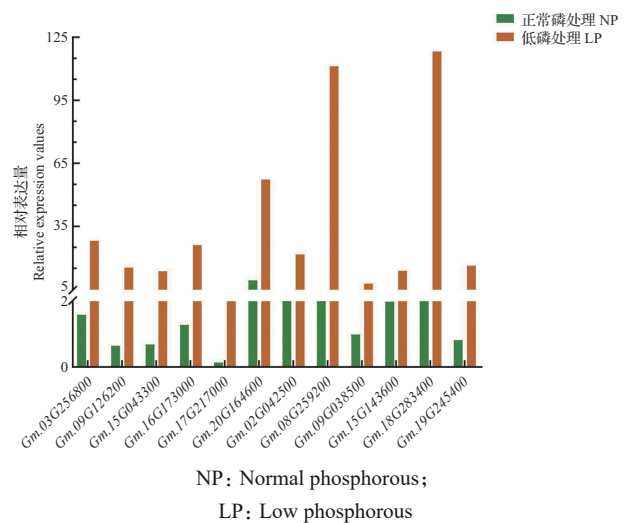
2.5.3 栽培大豆磷高效品种低磷胁迫不同时间的表达模式分析 分析几丁质酶基因在磷高效品种低磷处理4个不同时间的根系表达量发现(图8), 有16个基因(*Gm.03G024400*、*Gm.03G030500*、*Gm.03G254300*和*Gm.15G043300*等)受低磷胁迫诱导表达,其低磷处理下的表达量是正常磷处理的2.0~6.7倍。进一步分析发现,有5个基因(*Gm.03G254300*、*Gm.09G038500*、*Gm.15G043300*、*Gm.15G143600*和*Gm.20G164600*)在多个处理时间的表达量高于正常磷处理,其中*Gm.03G254300*在低磷处理3个时间(7 d、28 d和49 d)的表达量分别是正常磷处理的2.6倍、3.7倍和4.5倍,其余4个基因在低磷处理不同时间的表达量亦达到正常磷处理的2.0~4.5倍,推测这些基因对大豆根系抵御外界低磷逆境具有重要作用。

分析几丁质酶基因在低磷胁迫28 d的大豆成熟根瘤表达量发现(图9),有12个基因(*Gm.08G259200*、*Gm.09G126200*、*Gm.15G043300*、*Gm.16G173000*、*Gm.17G217000*、*Gm.18G283400*和*Gm.19G245400*等)被诱导表达,其低磷处理下的表达量是正常磷处理下的5.1~43.3倍,说明这些基因可能参与了低磷胁迫条件下的大豆根瘤形成和生物固氮过程。



ZH15: 中黄15, 磷高效品种
ZH15: Zhonghuang15, high-efficiency cultivated soybean variety
图8 几丁质酶基因在栽培大豆磷高效品种低磷处理不同时间后的表达分析

Fig. 8 Expression analysis of chitinase genes after low phosphorous treatment in high-efficiency cultivated soybean variety



NP: Normal phosphorous;
LP: Low phosphorous
图9 几丁质酶基因在栽培大豆低磷处理成熟根瘤后的表达分析

Fig. 9 Expression analysis of chitinase genes in cultivated soybean mature nodules after low phosphorous treatment

2.5.4 野生大豆不同组织器官中的表达模式分析 分析野生大豆几丁质酶基因的不同组织器官表达模式(图10),结果发现*Gs.03G008247*、*Gs.08G021659*、*Gs.09G023118*、*Gs.15G040923*和*Gs.18G049856*等

在野生大豆的根、茎、叶、花和种子均有表达,属于组成型表达基因;相反,*Gs.03G008223*、*Gs.18G048257*和*Gs.19G052570*等在野生大豆根系优势表达,*Gs.07G017058*在花中优势表达,*Gs.19G052599*在种子中优势表达,属于组织特异性表达基因。另有一些基因如*Gs.02G003628*、*Gs.10G027023*、*Gs.11G029754*、*Gs.16G043474*、*Gs.18G048250*、*Gs.18G048259*和*Gs.U055208*等则在上述组织部位的表达量均较低。

2.5.5 野生大豆与栽培大豆之间的组织表达差异分析 分析几丁质酶基因在野生大豆和栽培大豆之间的组织器官差异表达(图11),结果发现绝大多数基因在二者之间的表达模式基本相同,但也有部分基因在二者之间的表达模式存在较大差异。进一步分析上述存在表达差异的基因,结果发现*Gs.02G002604*在栽培大豆的盛荚期叶片中表达量最高,其次是初花期叶片,在野生大豆中的表达量以盛荚期叶片最高,而在初花期叶片中的表达量则非常低;*Gs.16G044028*在栽培大豆的初花期叶片和盛荚期叶片的表达量最高,而在野生大豆的初花期叶片表达量较低;*Gs.20G054345*在栽培大豆的种子中表达量最高,其次是豆荚,在野生大豆的表达量以种子最高,其次是花,而在豆荚中的表达量则很低。

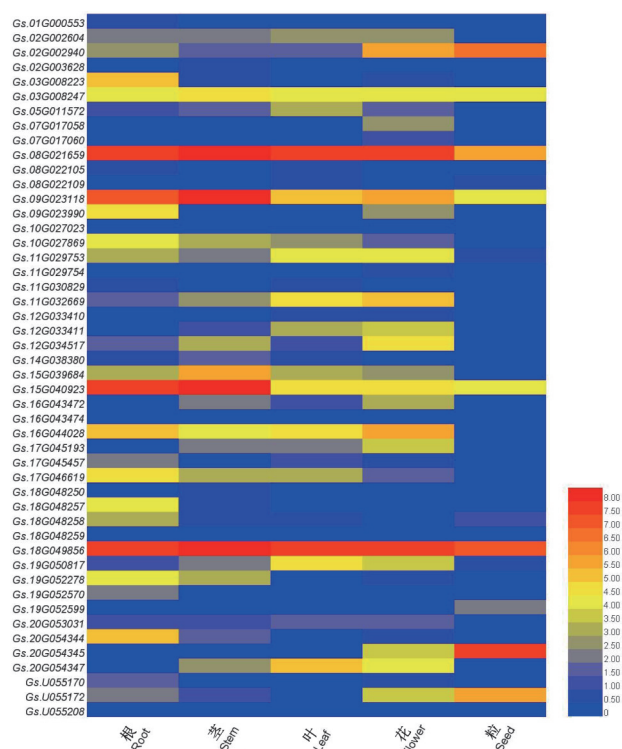
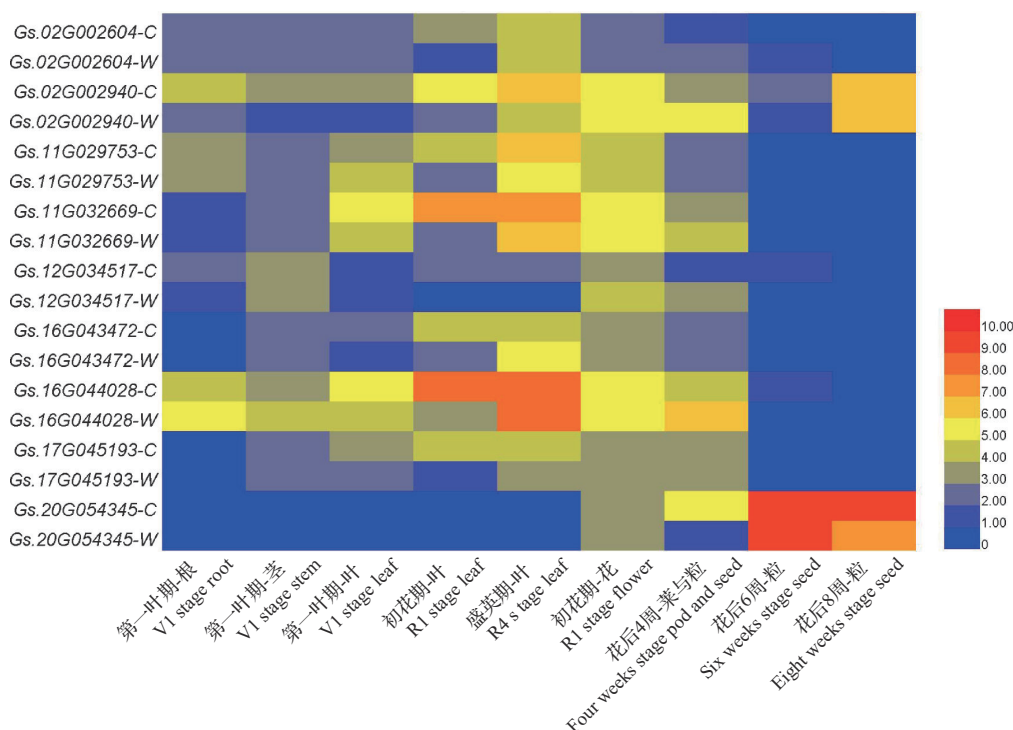


图10 几丁质酶基因在野生大豆不同组织部位的表达模式分析

Fig. 10 Expression analysis of chitinase genes in different wild soybean tissues



基因 ID-C:栽培大豆中的基因表达量;基因 ID-W:野生大豆中的基因表达量

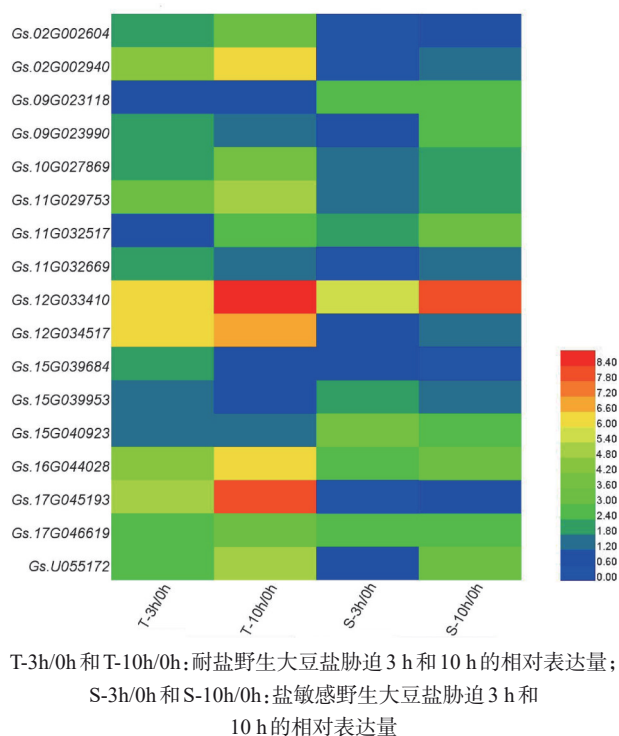
Gene ID-C: Gene expressions in cultivated soybean; Gene ID-W: Gene expressions in wild soybean; V1: First leaf;

R1: Initial flowering; R4: Full pod

图11 几丁质酶基因在栽培大豆与野生大豆之间的组织表达差异

Fig. 11 Different expressions of chitinase genes between wild and cultivated soybeans

2.5.6 盐胁迫下野生大豆叶片中的表达分析 利用前人已报道的2个野生大豆(耐盐品种和盐敏感品种)盐胁迫处理不同时间(3 h、10 h,以0 h为对照)的叶片转录组数据^[28],分析野生大豆几丁质酶基因表达模式(图12),结果发现 *Gs.02G002604*、*Gs.02G002940*、*Gs.12G034517* 和 *Gs.17G045193* 的表达量在耐盐品种盐胁迫处理3 h和10 h呈现上升趋势,而在盐敏感品种中的表达量与对照相比则基本未变, *Gs.09G023118* 表达量则在盐敏感品种盐胁迫处理3 h和10 h呈现上升,而在耐盐品种中的表达量与对照相比基本未变,推测这些基因可能与野生大豆耐盐性有关。



T-3h/0h and T-10h/0h: Relative expressions at 3 h and 10 h after salt stress in tolerant wild soybean; S-3h/0h and S-10h/0h: Relative expressions at 3 h and 10 h after salt stress in sensitive wild soybean

图12 盐胁迫下野生大豆叶片中的几丁质酶基因表达

Fig. 12 Expressions of chitinase genes under salt stress condition in wild soybean leaves

2.5.7 不同裂荚大豆品种豆荚中的表达分析 利用前人已报道的不同裂荚特性大豆品种(5个抗裂荚品种,5个易裂荚品种)豆荚开裂关键时期转录组数据^[29],分析上述55个栽培大豆几丁质酶基因表达情况,结果发现,个别基因如GH18亚家族 *Gm.01G142400* 在5个抗裂荚品种豆荚中的表达量均较高,而在4个易裂荚品种豆荚中的表达量较低,故推测其可能与大豆抗裂荚特性有关。

3 讨论

大豆是影响世界的中国起源作物。野生大豆作为栽培大豆的原始祖先种,不仅具有丰富的遗传多样性,而且具有荚多、粒多、耐荫、耐涝、耐高温、耐干旱、耐盐碱以及抗病虫等多种优良特性^[30-32]。另外,野生大豆与栽培大豆之间没有种间隔离,能够杂交结实。因此,研究野生大豆和栽培大豆遗传差异,对栽培大豆遗传改良具有重要意义。几丁质酶基因在植物生长发育以及抵御外界逆境胁迫中发挥重要作用,但其在大豆生长发育以及抗病耐逆等过程中的作用尚不明确。鉴于此,本研究分别利用最新公布的野生大豆 W05(W05a1)高质量基因组和栽培大豆 Williams 82(Wm82a4v1)高质量基因组鉴定几丁质酶基因,对其基因数量、染色体分布、共线性以及启动子调控元件进行分析,同时对其在大豆不同组织部位以及抵御花叶病毒和低磷逆境中的表达模式进行分析,为几丁质酶基因进一步育种应用奠定基础。

为验证结果可靠性,本研究查找了目前仅有的几篇有关大豆几丁质酶功能基因的报道,结果发现,与前人结果存在较好的一致性,例如 Zhao 等^[33]克隆 *GmChi1* 启动子,连接 *GUS* 基因转化烟草发现,转基因烟草四叶期根系 *GUS* 染色最深,推测 *GmChi1* 在根系表达量较高。本研究通过比对 *GmChi1* 序列发现,其对应 Williams 82 的 *Gm.02G042500*,且基因编码蛋白(320个氨基酸)、所属类群(类群I)等均与前人报道一致^[33];并且,本研究分析 *Gm.02G042500* 不同组织部位表达发现,其在大豆根系中的表达量最高,其次是花和荚,且启动子序列中含有水杨酸、脱落酸和茉莉酸等响应元件,这些与前人报道关于该基因的组织部位表达以及受上述激素影响的结果一致^[33-34]。另外,有学者发现,大豆几丁质酶基因 class III 启动子含有种子和花的组织特异表达元件,实时荧光定量 PCR 证实该基因在种子和花中的表达活性远高于其他组织部位^[35];本研究通过比对 class III 序列发现,其对应 Williams 82 的 *Gm.20G164700*,且编码蛋白(333个氨基酸)、所属类群(GH18)等与前人结果一致,分析其不同组织部位表达发现,在种子中的表达量最高,与前人报道一致,证实了本研究结果的可靠性^[35]。

通过比较野生大豆与栽培大豆的几丁质酶基因数量及其染色体分布发现,在野生大豆驯化过程中可能发生了几丁质酶家族成员的丢失和染色体

间的易位,从而导致栽培大豆的几丁质酶基因数量变少且染色体分布与野生大豆不同。有学者认为,在物种驯化过程中是否存在选择压力,可通过比较异义替换(Ka)与同义替换(Ks)的比值来判断,若比值大于1则认为存在正选择,若比值等于1则认为存在中性选择,而比值小于1则认为属于纯化选择^[36]。本研究参照这一理论,通过分析几丁质酶基因的Ka/Ks比值发现,野生大豆的2对几丁质酶基因与栽培大豆的19对几丁质酶基因经历了纯化选择,即这些基因在进化过程中由于自然选择而清除了有害突变,但蛋白序列保持不变。

启动子顺式作用元件对基因转录表达及功能发挥具有重要意义。本研究通过分析大豆几丁质酶基因家族成员启动子序列发现,含多种顺式作用元件,如光响应元件,脱落酸、赤霉素、水杨酸和生长素等应答元件以及籽粒生长发育和干旱胁迫响应等元件,意味着该类基因可能通过参与不同的信号通路进而发挥其功能。本研究鉴定到有些几丁质酶基因启动子含有赤霉素响应元件,而赤霉素可调节植物果荚长度^[37],推测这些基因可能通过赤霉素途径影响豆荚生长发育。并且,本研究在栽培大豆几丁质酶基因启动子中还鉴定到能够响应类黄酮的调控元件,而该元件在野生大豆几丁质酶基因启动子中并未被鉴定到,预示其可能与野生大豆驯化有关。类黄酮是植物体内一类非常重要的次生代谢产物,对调节植物生长发育,提高其在逆境环境下的生存能力具有重要意义,并且与豆科植物的花色、种皮色以及根瘤固氮密切相关^[38-41]。有学者发现,类黄酮化合物可诱导豆科植物根瘤菌结瘤因子的形成,进而介导根瘤菌入侵以及根瘤发育^[42-43]。因而本研究推测,含有类黄酮响应元件的栽培大豆几丁质酶基因可能与上述功能有关。

目前,有关几丁质酶参与植物抗病虫、耐逆等方面的研究已有报道。左豫虎等^[44]发现,当大豆感染疫霉根腐病时,抗病品种的几丁质酶活性显著高于感病品种。Su等^[45]发现,几丁质酶与甘蔗的抗黑穗病能力有关,其抗病品种的几丁质酶基因受黑穗病菌侵染诱导表达。有学者还发现,几丁质酶具有降解豆科植物部分结瘤因子从而抑制根瘤过量生长的作用^[46]。本研究通过分析接种花叶病毒的栽培大豆抗病品种叶片几丁质酶基因表达量,筛选出4个强烈诱导表达基因,且有的基因(如*Gm.01G142400*)在接种花叶病毒的多个时间诱导表达,说明其在抗花叶病毒侵染过程中发挥功能。同时,本研究

分析低磷处理的栽培大豆磷高效品种根系与根瘤几丁质酶基因表达量,筛选出5个在根系中和12个在根瘤中诱导表达的基因,且有的基因(如*Gm.03G254300*)在根系低磷处理的多个时间诱导表达,说明其在大豆抵御低磷逆境环境中发挥重要功能。

另外,有研究发现,大豆果荚腹缝线开裂区的细胞纤维素、木质素含量增多可使其抗裂荚能力明显提高^[47]。Sanchez-Rodriguez等^[48]发现,拟南芥几丁质酶基因*CTL1*发生突变,导致其纤维素合酶基因*CESAs*表达活性下降,纤维素含量降低,且纤维素和木葡聚糖结构发生改变。Wu等^[15]发现,水稻几丁质酶基因*OsCTL1*发生突变,可导致其纤维素含量和机械强度降低。本研究分析大豆抗裂荚转录组数据发现,几丁质酶基因*Gm.01G142400*在抗裂荚品种中的表达量较高,推测其可能与大豆抗裂荚特性有关。

参考文献

- [1] Bhattacharya D, Nagpure A, Gupta R K. Bacterial chitinases: Properties and potential. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2007, 27(1): 21-28
- [2] Gong S S, Meng Q L, Qiao J, Huang Y F, Zhong W Q, Zhang G W, Zhang K, Li N X, Shang Y X, Li Z Y, Cai X P. Biological characteristics of recombinant arthrobtrys oligospora chitinase AO-801. *Korean Journal of Parasitology*, 2022, 60(5): 345-352
- [3] 夏文水, 吴焱楠. 甲壳素/壳聚糖水解酶的研究进展. *中国海洋药物*, 1997, 16(2): 31-35
Xia W S, Wu Y N. Recent progress in the research of chitin/chitosan hydrolases. *Chinese Journal of Marine Drugs*, 1997, 16(2): 31-35
- [4] Li X R, Wajjiha B, Zhang P H, Dang Y J, Prasad R, Wei Y, Zhang S H. *Serendipita indica* chitinase protects rice from the blast and bakanae diseases. *Journal of Basic Microbiology*, 2023, 63(7): 734-745
- [5] Hamid R, Khan M A, Ahmad M, Ahmad M M, Abdin M Z, Musarrat J, Javed S. Chitinases: An update. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 2013, 5(1): 21-29
- [6] Rawat S, Ali S, Mittra B, Grover A. Expression analysis of chitinase upon challenge inoculation to *Alternaria* wounding and defense inducers in *Brassica juncea*. *Biotechnology Reports*, 2017, 13: 72-79
- [7] Jiao Z L, Su P P, Li Y, Zhao W J, Yang L B, Sun C Q, Xiu J F, Shang X L, Guo G. Identification and function analysis of chitinase 2 gene in housefly, *Musca domestica*. *Comparative Biochemistry & Physiology*, 2022, 259: 110717
- [8] Cantarel B L, Coutinho P M, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, Henrissat B. The Carbohydrate-Active EnZymes

- database (CAZy): An expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37: 233-238
- [9] Taira T, Hayashi H, Tajiri Y, Onaga S, Uechi G, Iwasaki H, Ohnuma T, Fukamizo T. A plant class V chitinase from a cycad (*Cycas revoluta*): Biochemical characterization, cDNA isolation, and posttranslational modification. *Glycobiology*, 2009, 19 (12): 1452-1461
- [10] Ohnuma T, Numata T, Osawa T, Mizuhara M, Lampela O, Juffer A H, Skriver K, Fukamizo T. A class V chitinase from *Arabidopsis thaliana*: gene responses, enzymatic properties, and crystallographic analysis. *Planta*, 2011, 234(1): 123-137
- [11] Price N P J, Momany F A, Schnupf U, Naumann T A. Structure and disulfide bonding pattern of the hevein-like peptide domains from plant class IV chitinases. *Physiological & Molecular Plant Pathology*, 2015, 89(1): 25-30
- [12] 蔡培原, 陈祥贵. 微生物几丁质酶研究概况及其在食品工程中的应用. *四川食品与发酵*, 2008, 44(3): 41-45
Cai P Y, Chen X G. Development and application of chitinase in food engineering. *Sichuan Food and Fermentation*, 2008, 44 (3): 41-45
- [13] Nakazaki T, Tsukiyama T, Okumoto Y, Kageyama D, Naito K, Inouye K, Tanisaka T. Distribution, structure, organ-specific expression, and phylogenetic analysis of the pathogenesis-related protein-3 chitinase gene family in rice (*Oryza sativa* L.). *Genome*, 2006, 49(6): 619-630
- [14] Vaghela B, Vashi R, Rajput K, Joshi R. Plant chitinases and their role in plant defense: A comprehensive review. *Enzyme and Microbial Technology*, 2022, 159: 110055
- [15] Wu B, Zhang B, Dai Y, Zhang L, Shang-Guan K K, Peng Y G, Zhou Y H, Zhu Z. *Brittle Culm15* encodes a membrane-associated chitinase-like protein required for cellulose biosynthesis in rice. *Plant Physiology*, 2012, 159(4): 1440-1452
- [16] Maglovski M, Gregorova Z, Rybansky L, Meszaros P, Moravcikova J, Hauptvogel P, Adamec L, Matusikova I. Nutrition supply affects the activity of pathogenesis-related beta-1, 3-glucanases and chitinases in wheat. *Plant Growth Regulation*, 2017, 81: 443-453
- [17] Hong, J K, Hwang B K. Promoter activation of pepper class II basic chitinase gene, *CAC12*, and enhanced bacterial disease resistance and osmotic stress tolerance in the *CAC12*-overexpressing *Arabidopsis*. *Planta*, 2006, 223(3): 433-448
- [18] Park C H, Kim S, Park J Y, Ahn I P, Jwa N S, Im K H, Lee Y H. Molecular characterization of a pathogenesis-related protein gene encoding a class III chitinase in rice. *Molecules and Cells*, 2004, 17(1): 144-150
- [19] 潘晓雪, 胡明瑜, 王忠伟, 苏梅, 雷开荣, 吴红, 蒋晓英. 水稻几丁质酶基因家族的全基因组鉴定及表达分析. *植物生理学报*, 2022, 58(4): 746-756
Pan X X, Hu M Y, Wang Z W, Su M, Lei K R, Wu H, Jiang X Y. Genome-wide analysis of the rice chitinases gene family and their expression profiles under different stress treatments. *Plant Physiology Journal*, 2022, 58(4): 746-756
- [20] Yu C S, Chen Y C, Lu C H, Huang J K. Prediction of protein subcellular localization. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 2006, 64(3): 643-651
- [21] Petersen T N, Brunak S, Heijne G, Nielsen H. SignalP 4.0: Discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods*, 2011, 8(10): 785-786
- [22] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 2016, 33(7): 1870-1874
- [23] Chu J H, Li W L, Piao D R, Kong Y B, Du H, Lin F, Li X H, Zhang C Y. Mining of a major QTL and novel genes conferring resistance to SC3 and SC7 strains in soybean. *Plant Breeding*, 2021, 140: 851-859
- [24] Kong Y B, Wang B, Du H, Li W L, Li X H, Zhang C Y. *GmEXLB1*, a soybean expansin-like B gene, alters root architecture to improve phosphorus acquisition in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*. 2019, 10: 808
- [25] Xing X Z, Du H, Yang Z W, Li X H, Kong Y B, Li W L, Zhang C Y. *GmSPX8*, a nodule-localized regulator confers nodule development and nitrogen fixation under phosphorus starvation in soybean. *BMC Plant Biology*, 2022, 22: 161
- [26] Libault M, Farmer A, Joshi T, Takahashi K, Langley R J, Franklin L D, He J, Xu D, May G, Stacey G. An integrated transcriptome atlas of the crop model *Glycine max*, and its use in comparative analyses in plants. *The Plant Journal*, 2010, 63 (1): 86-99
- [27] 魏志园, 王宇, 司增志, 魏莱, 温晓蕾, 乔亚科, 李桂兰, 张锴. 盐碱胁迫下野生大豆 CBL-CIPK 通路表达分析. *核农学报*, 2021, 35(8): 1783-1793
Wei Z Y, Wang Y, Si Z Z, Wei L, Wen X L, Qiao Y K, Li G L, Zhang K. Analysis of CBL-CIPK pathway proteins in wild soybean with saline-alkali stress. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2021, 35(8): 1783-1793
- [28] Yang Z Q, Luo C F, Pei X X, Wang S B, Huang Y M, Li J W, Liu B H, Kong F J, Yang Q Y, Fang C. SoyMD: A platform combining multi-omics data with various tools for soybean research and breeding. *Nucleic Acids Research*, 2024, 52: 1639-1650
- [29] Kang X, Cai J J, Chen Y X, Yan Y C, Yang S T, He R Q, Wang D, Zhu Y L. Pod-shattering characteristics differences between two groups of soybeans are associated with specific changes in gene expression. *Nature Reviews Cancer*, 2020, 20 (2): 201-210
- [30] 王克晶, 李福山. 我国野生大豆(*G. soja*)种质资源及其种质创新利用. *中国农业科技导报*, 2000, 2(6): 69-72
Wang K J, Li F S. General situation of wild soybean (*G. soja*) germplasm resources and its utilization of introgression into cultivated soybean in China. *Review of China Agricultural Science and Technology*, 2000, 2(6): 69-72
- [31] 胡小梅, 张必弦, 朱延明, 来永才, 李炜, 李琬, 毕影东, 肖佳磊, 齐宁, 林红, 刘广阳, 杨雪峰, 刘丽艳, 张俐俐. 野生

- 大豆资源的研究与利用. 安徽农业科学, 2011, 39(22): 13311-13313
- Hu X M, Zhang B X, Zhu Y M, Lai Y C, Li W, Li W, Bi Y D, Xiao J L, Qi N, Lin H, Liu G Y, Yang X F, Liu L Y, Zhang L L. The studies and utilization of wild soybean (*Glycine soja*). Journal of Anhui Agricultural Science, 2011, 39(22): 13311-13313
- [32] 齐宁, 林红, 魏淑红, 杨雪峰, 刘广阳. 利用野生大豆资源创新优质抗病大豆新种质. 植物遗传资源学报, 2005, 6(2): 200-203
- Qi N, Lin H, Wei S H, Yang X F, Liu G Y. Using wild soybean resources to develop the new soybean germplasm of high quality and diseases resistance. Journal of Plant Genetic Resources, 2005, 6(2): 200-203.
- [33] Zhao C M, Hou H, Xing M G, Xue R G. Identification of stigma specific expression fragment in the promoter of a soybean chitinase class I gene. Molecular Biology, 2023, 57(1): 83-94
- [34] Gijzen M, Kuflu K, Qutob D, Chernys J T. A class I chitinase from soybean seed coat. Journal of Experimental Botany, 2001, 52: 2283-2289
- [35] 赵艳, 沙伟, 金忠民, 张梅娟. 大豆 class III 酸性内切几丁质酶基因及其启动子表达方式. 中国油料作物学报, 2013, 35(2): 221-224
- Zhao Y, Sha W, Jin Z M, Zhang M J. Expression pattern of soybean class III acidic endochitinase gene and promoter. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2013, 35(2): 221-224
- [36] Nekrutenko A, Makova K D, Li W H. The KA/KS ratio test for assessing the protein-coding potential of genomic regions: An empirical and simulation study. Genome Research, 2002, 12(1): 198-202
- [37] Polowick P L, Sawhney V K. In vitro floral development of oilseed rape (*Brassica napus* L.): The effects of pH and plant growth regulators. Journal of Experimental Botany, 1991, 42(245): 1583-1588
- [38] 郭泽西, 刘露露, 孙大运, 潘凤英, 曲俊杰, 尹玲. 查尔酮合成酶在植物抗病中的研究进展. 分子植物育种, 2023, 21(22): 7545-7553
- Guo Z X, Liu L L, Sun D Y, Pan F Y, Qu J J, Yin L. Progress of chalcone synthase and plant disease resistance. Molecular Plant Breeding, 2023, 21(22): 7545-7553
- [39] 吴采玉, 文春雨, 黄丽萍, 徐瑞新, 宋健. 不同颜色大豆种皮成分及抗氧化性分析. 大豆科学, 2023, 42(5): 554-564
- Wu C Y, Wen C Y, Huang L P, Xu R X, Song J. Analysis of seed coat composition and antioxidant activity of soybean with different colors. Soybean Science, 2023, 42(5): 554-564
- [40] 杜婷婷, 宋治华, 董碧莹, 曹红燕, 刘腾跃, 杨琬琰, 祁萌, 陈婷, 王梦莹, 孟冬, 杨清, 付玉杰. 木豆类黄酮代谢通路关键基因家族的鉴定与表达分析. 农业生物技术学报, 2021, 29(12): 2289-2303
- Du T T, Song Z H, Dong B Y, Cao H Y, Liu T Y, Yang W L, Qi M, Chen T, Wang M Y, Meng D, Yang Q, Fu Y J. Identification and expression analysis of key gene families in flavonoid metabolism pathway in pigeon pea (*Cajanus cajan*). Journal of Agricultural Biotechnology, 2021, 29(12): 2289-2303
- [41] 厉广辉, 郭鑫, 孙艳斌, 张伟男, 赵慧玲, 赵红军, 王兴军, 付春, 赵传志. 盐胁迫下不同花生品种的类黄酮含量和抗氧化酶活性. 中国油料作物学报, 2023, 45(4): 803-809
- Li G H, Guo X, Sun Y B, Zhang W N, Zhao H L, Zhao H J, Wang X J, Fu C, Zhao C Z. Flavonoid contents and antioxidant enzyme activities of different peanut cultivars under salt stress. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2023, 45(4): 803-809.
- [42] 陈敏, 朱辉, 曹扬荣. 费氏中华根瘤菌 NodD2 蛋白与植物类黄酮互作的生化机制研究. 生命的化学, 2022, 42(7): 1396-1404
- Chen M, Zhu H, Cao Y R. Biochemical mechanism of the interaction between *Sinorhizobium fredii* NodD2 and plant flavonoids. Chemistry of Life, 2022, 42(7): 1396-1404
- [43] Salzer P, Bonanomi A, Beyer K, Vögeli-Lange R, Aeschbacher R A, Lange J, Wiemken A, Kim D, Cook D R, Boller T. Differential expression of eight chitinase genes in *Medicago truncatula* roots during mycorrhiza formation, nodulation, and pathogen infection. Molecular Plant-microbe Interactions, 2000, 13(7): 763-777
- [44] 左豫虎, 康振生, 杨传平, 芮海英, 娄树宝, 刘惕若. β -1,3-葡聚糖酶和几丁质酶活性与大豆对疫霉根腐病抗性的关系. 植物病理学报, 2009, 39(6): 600-607
- Zuo Y H, Kang Z S, Yang C P, Rui H Y, Lou S B, Liu T R. Relationship between activities of β -1,3-glucanase and chitinase and resistance to phytophthora root rot in soybean. Acta Phytopathologica Sinica, 2009, 39(6): 600-607
- [45] Su Y C, Xu L P, Fu Z W, Yang Y T, Guo J L, Wang S S, Que Y X. *ScChi*, encoding an acidic Class III chitinase of sugarcane, confers positive responses to biotic and abiotic stresses in sugarcane. International Journal of Molecular Sciences, 2014, 15, 2738-2760
- [46] Salzer P, Feddermann N, Wiemken A, Boller T, Staehelin C. *Sinorhizobium meliloti*-induced chitinase gene expression in *Medicago truncatula* ecotype R108-1: A comparison between symbiosis-specific class V and defence-related class IV chitinases. Planta, 2004, 219(4): 626-638
- [47] Dong Y, Yang X, Liu J, Wang B H, Liu B L, Wang Y Z. Pod shattering resistance associated with domestication is mediated by a *NAC* gene in soybean. Nature Communications, 2014, 5: 3352
- [48] Sanchez-Rodriguez C, Bauer S, Hématy K, Saxe F, Ibáñez A B, Vodermaier V, Konlechner C, Sampathkumar A, Rüggeberg M, Aichinger E, Neumetzler L, Burgert I, Somerville C, Hauser M T, Persson S. Chitinase-like1/pompom1 and its homolog CTL2 are glucan-interacting proteins important for cellulose biosynthesis in *Arabidopsis*. The Plant Cell, 2012, 24(2): 589-607