

DOI:10.11686/cyxb2024424

<http://cyxb.magtech.com.cn>

秦晓芳, 何芷睿, 贾彤, 等. 白三叶几丁质酶基因家族鉴定及 *TrChit3* 功能分析. 草业学报, 2025, 34(10): 187—201.

QIN Xiao-fang, HE Zhi-rui, JIA Tong, *et al.* Identification of the chitinase gene family and functional analysis of *TrChit3* from white clover. Acta Prataculturae Sinica, 2025, 34(10): 187—201.

白三叶几丁质酶基因家族鉴定及 *TrChit3* 功能分析

秦晓芳, 何芷睿, 贾彤, 杨玉娇, 付薇, 李航, 彭燕*

(四川农业大学草业科技学院, 四川 成都 611130)

摘要: 几丁质酶是一种糖苷水解酶, 在植物生长发育过程中发挥着重要作用。目前几丁质酶在白三叶应答各种生物和非生物胁迫的相关研究报道相对较少。本研究对白三叶的几丁质酶基因家族进行了全基因组鉴定, 得到了 44 个几丁质酶基因, 不均匀分布于白三叶 16 条染色体上, 通过系统进化分析将这些几丁质酶分为 GH18 和 GH19 分支, 5 个不同的小组: I~V。其中 29 个基因属于 GH18 亚家族, 15 个基因属于 GH19 亚家族, 且同一亚族基因具有相似的结构和功能。启动子分析发现, 这 44 个几丁质酶基因的启动子区域包含与生长发育、激素及逆境胁迫相关的多种顺式作用元件, 此外, qRT-PCR 分析显示, 盐胁迫和干旱胁迫处理显著诱导了几丁质酶基因的表达, 进一步验证了其在植物胁迫响应中的作用。选择 *TrChit3* 基因深入研究几丁质酶基因的抗旱能力。在拟南芥中过表达 *TrChit3* 基因并进行干旱胁迫处理, 测定相对电导率、丙二醛等生理指标, 结果显示在干旱条件下过表达 *TrChit3* 基因能够显著提高拟南芥的耐旱能力。研究结果为植物中几丁质酶基因的探索奠定了基础。

关键词: 白三叶; 几丁质酶; 基因家族; 表达分析

Identification of the chitinase gene family and functional analysis of *TrChit3* from white clover

QIN Xiao-fang, HE Zhi-rui, JIA Tong, YANG Yu-jiao, FU Wei, LI Hang, PENG Yan*

College of Grassland Science and Technology, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China

Abstract: Chitinases are glycoside hydrolases that play an important role in plant growth and development. Relatively few studies have focused on the responses of chitinases to various biotic and abiotic stresses in white clover (*Trifolium repens*). Therefore, in this study, we searched the whole genome of white clover to identify and characterize its chitinase gene family. A total of 44 chitinase genes were identified in the whole genome of white clover, and they were unevenly distributed on 16 chromosomes. Phylogenetic analysis of these chitinase genes classified them into two mega-groups (GH18 and GH19), with five separate clusters (I—V). Twenty-nine chitinase genes belonged to the GH18 subfamily and 15 belonged to the GH19 subfamily. The genes within the same subfamily genes encoded proteins with similar structures and functions. Promoter analysis showed that the promoter regions of these 44 chitinase genes contained a variety of *cis*-acting elements related to growth and development, hormones, and stress. Furthermore, quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction analyses showed that salt stress and drought stress resulted in significant increases in the transcript levels of chitinase genes, which further verified their roles in the plant stress response. *TrChit3* was selected for a detailed analysis of its role in

收稿日期: 2024-10-28; 改回日期: 2024-12-16

基金项目: 四川省饲草创新团队项目 (No. SCCXTD-2024-16) 资助。

作者简介: 秦晓芳 (1998—), 女, 山西临汾人, 在读硕士。E-mail: 2367176006@qq.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: pengyanlee@163.com

drought resistance. Overexpression of *TrChit3* in *Arabidopsis thaliana* enhanced its resistance to drought stress, as measured by changes in physiological indexes such as relative conductivity and malondialdehyde content. These results lay a foundation for further studies on the roles of chitinases in plants.

Key words: white clover; chitinase; gene family; expression analysis

植物在对病原体入侵和非生物胁迫的反应中表达了多种致病相关(pathogenesis-related, PR)蛋白。PR蛋白涉及直接攻击入侵病原体的裂解酶,如几丁质酶和 β -1,3葡聚糖酶,或者合成各种小分子(木质素、单宁、黑色素、植物抗毒素、酚类),从而延缓病原体的攻击^[1-2]。

几丁质酶是一种糖苷水解酶,分布广泛并且具有多种功能。在植物中,几丁质酶的分泌主要是作为真菌病原体或含有几丁质的生物裂解酶,它催化甲壳素中 β -1,4-糖苷键的水解裂解,并产生N-乙酰氨基葡萄糖^[3]。几丁质酶在自然界中无处不在,在不同的生命体中都有发现。根据特定催化结构域的存在,这些蛋白被分为几丁质酶家族18(GH18)和几丁质酶家族19(GH19)两个糖苷水解酶家族。此外,考虑到几丁质酶在结构、催化反应、系统发育关系和对抑制剂的特异性等方面的不同特征,这些几丁质酶代表了5个不同的类(I~V类),其中Ⅲ类和V类属于GH18,各有8个 α 螺旋和 β 链作为关键结构^[4-5],广泛分布于多种生物体中,而I、II和IV类属于GH19^[6],包含球状结构域^[6],主要存在于高等植物中^[6],负责促进大部分几丁质溶解活性^[7]。

植物几丁质酶分布在植物的根、茎、叶和花中,许多几丁质酶基因受发育调节,可能在特定的生理过程中发挥作用^[8]。有学者已经证明过表达几丁质酶基因可以抑制尖孢镰刀菌对萝卜(*Raphanus sativus*)植株的侵染^[9];几丁质酶Cht20.2的转录,赋予小麦(*Triticum aestivum*)条锈病抗性^[10];相关几丁质酶基因(RC7)的表达可以增强水稻(*Oryza sativa*)对纹枯病的抵抗力^[11]。此外,目前有研究表明几丁质酶也参与了植物对激素和非生物胁迫的应答反应^[12-14]。例如,茉莉酸甲酯可能是番茄(*Solanum lycopersicum*)种子萌发过程中几丁质酶基因*Chi9*表达的主要调节因子^[12];几丁质酶基因*Chi11*能够增强番茄对盐、干旱的耐受性^[13];HvChi22在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中过表达能够通过增加氧化保护酶的活性来增强拟南芥耐旱性,从而减少丙二醛(malondialdehyde, MDA)的积累^[14]。总之,几丁质酶基因参与植物多种抗逆过程。潘晓雪等^[15]对水稻几丁质酶基因家族成员进行全基因组鉴定,共鉴定到49个几丁质酶基因;此外,张华等^[16]对野生大豆(*Glycine max*)与栽培大豆几丁质酶基因进行鉴定,其中在野生大豆中鉴定到66个几丁质酶基因,在栽培大豆中鉴定到55个几丁质酶基因。然而,迄今为止,白三叶(*Trifolium repens*)几丁质酶基因家族尚未得到鉴定和系统分析,几丁质酶基因是否参与调控白三叶抗旱的生物学功能也未见报道。因此,本研究基于白三叶基因组数据,对白三叶几丁质酶基因家族进行了鉴定和分析,并使用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)技术观察几丁质酶基因在白三叶遭受逆境胁迫时的表达规律,分析筛选出可能参与调控白三叶抗旱的成员 gene-P8452_10182(*TrChit3*),并在拟南芥上过表达该基因从而对其参与调控白三叶抗旱的生物学功能进行验证。希望为未来深入了解白三叶几丁质酶基因在抵御逆境胁迫时发挥的功能提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 试验设计

试验于2023年在四川农业大学草业科技学院实验室进行,以‘拉丁诺’白三叶材料进行实时荧光定量PCR实验,使用Col-0型拟南芥进行花序侵染操作。

1.2 白三叶几丁质酶基因家族鉴定及其生物信息学分析

首先从NCBI数据库下载白三叶最新版本基因组序列,并在NCBI网站查找拟南芥基因组的所有几丁质酶家族成员蛋白序列。在NCBI上下载GH18和GH19的隐马尔可夫模型,利用TBtools软件筛选几丁质酶家族成员并命名。对候选几丁质酶家族成员的蛋白质分子量(molecular weight, MW)、等电点(isoelectric point, pI)和氨基酸长度等理化性质进行分析。利用TBtools软件对获取的几丁质酶基因进行染色体分布分析。

1.3 白三叶几丁质酶基因家族的系统进化树构建

以拟南芥几丁质酶基因作为参考,利用 MEGA 7 软件对白三叶几丁质酶基因家族成员构建系统进化树。

1.4 白三叶几丁质酶基因家族编码蛋白保守基序与基因结构分析

利用 MEME 网站识别白三叶几丁质酶蛋白序列中的保守基序。利用 TBtools 软件分析其进化关系并可视化。

1.5 白三叶几丁质酶基因家族的顺式作用元件预测

为了预测白三叶几丁质酶基因的顺势作用元件,本研究获得了启动子区的核苷酸序列(起始密码子上游 2.0 kb)。PlantCARE(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)进行预测分析。

1.6 非生物胁迫下白三叶几丁质酶基因 RT-qPCR 分析

挑选籽粒饱满的‘拉丁诺’白三叶种子,均匀的播种于蛭石中,在温度为 25 ℃,光照强度为 600 lx,相对湿度为 80%,光照持续时间为 8 h,夜间光周期为 16 h 条件下培养 7 d;然后进行水培,对培养 30 d 的白三叶幼苗分别进行干旱处理(15% 聚乙二醇, polyethylene glycol, PEG)及盐胁迫(150 mmol·L⁻¹ NaCl),进行 3 次重复,取处理时间分别为 0、1、3、6、12 和 24 h 时的叶片组织。提取不同处理下的白三叶叶片总 RNA,并进行反转录合成 cDNA,将 cDNA 分装保存在-30 ℃。使用 Primer 5 软件设计基因特异性引物(表 1),以实验室筛选的 At β-actin 作为内参基因(F: TGCTTGATTCCGGTGATGGTGTG;R: TGCTTGATTCCGGTGATGGTGTG);计算基因的相对表达量。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因 ID Gene ID	上游引物 Forward primer (5′-3′)	下游引物 Reverse primer (5′-3′)
gene-P8452_04698	CCGAACCCCTAAATTGAAC	CCACCGATAGAAAGCAACA
gene-P8452_70179	TCAAATTATGTCAATCCAAAGG	GAGTTTCCGCCTAAGAAGTTAT
gene-P8452_47669	AGCCCAAGAGTTAGGGTTTAC	ACAAGCAGGTTCTGATGATGT
gene-P8452_10179	CATTGATCCTTTTGTGGTCT	GTACCATCTCCTAAGTTTTGGC
gene-P8452_42935	TTCTTGACGGCATTGATTT	GCATTTCCATCCAAGCATC
gene-P8452_00576	CATCGGAGGAGGTAATAGCA	AAGTCAACACCATCAAACCC
gene-P8452_23770	CAGGGACAGATTGGTATGG	TTGAGAAAGAGCCCAGTTG
gene-P8452_72355	TATTCTCTTTCATCGCCTCA	TGTTTCATTTCTGTTGTGGTT
gene-P8452_10178	AGTCCACAATCACAAAAGAAAA	TCCAAACATAATCAAATAAACCA
gene-P8452_10182	TAGGTGATGCTGTTTTAGATGG	TTTGCTTTTGTGATTGTGAACT

1.7 拟南芥转化及阳性植株鉴定

使用 qRT-PCR 分析筛选出可能参与调控白三叶抗旱的成员 gene-P8452_10182(*TrChit3*),依据 pBI21 载体序列,设计 5′端分别引入 Xba I 和 Sac I 酶切位点和同源臂碱基的引物,即 pBI121-Trchit3-F: AGAACACGG GGGACTCTAGAATGGCATCCTTAAAACAAGTT 和 pBI121-Trchit3-R: GGGGAAATTCGAGCTCTTAAA CACTGCCCTTAATA。以白三叶 cDNA 为模板构建载体 pBI21-Trchit3,先将其转入大肠杆菌 DH5α 感受态细胞,验证后提取质粒再转入 EHA105 农杆菌感受态细胞中。

参照 Yao 等^[17]用花序侵染法将重组过表达载体转化至 Col-0 型拟南芥,待拟南芥结种后收取 T₀代转基因种子。将其置于含有 Kan 的 1/2 MS 固体培养基(蔗糖 30 g·L⁻¹,琼脂 8 g·L⁻¹,MS 培养基 10 g·L⁻¹)上筛选。两周后选取长势正常、生长良好的阳性植株移植至装有营养土的盆钵中,拟南芥成熟后收种。将拟南芥植株筛选至 T₃代,对 T₃代拟南芥植株进行测序验证,从中挑选出阳性植株。

1.8 转基因拟南芥干旱胁迫处理及生理指标测定

1.8.1 转基因拟南芥干旱胁迫处理 分别选取长势正常且相近的转基因植株和野生型植株移栽至装有相同重量混合营养土的黑色正方形塑料盆钵中,幼苗在土壤中生长 20 d 后进行干旱胁迫。采用 12% PEG 溶液(配制方法:100 g PEG 溶解于 1 L 1/4 霍格兰完全营养液中)进行模拟干旱胁迫。每 2 d 将托盘中剩余液体完全倒出,并倒入新的处理液。PEG 处理 7 d 后进行生理指标的测定。

1.8.2 叶片相对含水量 为了测定相对含水量(relative water content, RWC),将叶子从植物上分离下来,并立即称重以测定鲜重(fresh weight, FW)。将这些叶子在 4 °C 的蒸馏水中浸泡 24 h 后,轻轻吸干叶组织并加重膨胀重量(turgid weight, TW)。烘干后获得干重(dry weight, DW)。公式为: $RWC(\%) = [(FW - DW) / (TW - DW)] \times 100^{[18]}$ 。

1.8.3 相对电导率 称取相同部位、长势一致的叶片鲜样 0.1 g,用 ddH₂O 冲洗 4 次,干净的吸水纸轻轻吸去多余水分后放入试管中,加入 10 mL 蒸馏水,置于室温 16 h 后,用 DDS-11A 型电导仪(上海仪电科学仪器股份有限公司)测其初电导率。然后利用高压灭菌锅(121 °C、20 min)处理叶片,待叶片冷却至室温后,测定终电导率,相对电导率=(初电导率/终电导率)×100%。

1.8.4 叶绿素含量 参照 Xu 等^[19]的方法使用分光光度计(uv-6100, 上海)测量混合溶液在 645 和 663 nm 处的吸光度值来计算叶绿素含量。

1.8.5 叶绿素荧光参数 将叶子置于黑暗中 30 min 后,采用 Pocket PEA 连续激发式荧光仪(上海)测定叶片最大光化学效率(maximum photochemical efficiency, F_v/F_m)和叶片健康性能指数(performance index on absorption basis, PI_{ABS})。每个处理重复 10~12 次。

1.8.6 活性氧含量 称取大约 0.1 g 左右的拟南芥叶片,置于液氮中充分冷冻后,参照 Li 等^[20]和 Liu 等^[21]的方法测定活性氧含量。

1.8.7 丙二醛(MDA)含量及总抗氧化保护酶活性 称取拟南芥叶片组织约 0.1 g,放入含钢珠的 2 mL 离心管中,将含有样品的离心管于液氮中充分冷冻后,用 2 mL 50 mmol·L⁻¹ PBS(pH 7.8)在冰上研磨,然后离心 30 min(10360 r·min⁻¹, 4 °C)。收集粗酶溶液,将粗酶溶液(0.5 mL)加入含有硫代巴比妥酸(0.5%, thiobarbituric acid, TBA, w/v)和三氯乙酸(20%, w/v)的 1 mL 反应溶液中。混合均匀后在 95 °C 水浴锅中加热 25 min,然后在冰浴上快速冷却。最后,将混合物以 9457 r·min⁻¹ 离心 10 min。在 532 和 600 nm 处检测上清液的吸光度。MDA 含量($\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1}$) = $(OD_{532} - OD_{600}) \times V(\text{提取液总体积, L}) / (\text{样品长度} \times \text{消光系数} \times 1000 \times \text{样品鲜重})$ 。

称取 0.1 g 左右的拟南芥叶片,置于液氮中充分冷冻后再使用 Beyotime 公司的总抗氧化能力检测试剂盒 ml016826 测定总抗氧化酶活性,操作详见说明书。

1.9 数据处理

利用 SPSS 25 进行差异显著性分析,并采用 Origin 2016 作图。

2 结果与分析

2.1 白三叶几丁质酶基因家族成员的理化性质和染色体分布

在白三叶基因组中共鉴定出 44 个几丁质酶家族成员(表 2),编码氨基酸长度在 132~621 aa,平均长度 299 aa;分子量变化范围为 14603.66~68415.97 Da,平均 32700.88 Da;理论等电点为 4.37~9.26;不稳定指数为 21.51~47.07;脂肪族氨基酸指数为 56.40~96.54;平均疏水性为 -0.322~0.111。

为了了解白三叶几丁质酶基因家族成员的染色体分布情况,利用 TBtools 软件对白三叶几丁质酶家族成员构建了染色体分布图(图 1)。结果显示,白三叶几丁质酶基因家族不均匀分布在 16 条染色体上。

2.2 白三叶几丁质酶基因家族系统进化树

用 MEGA 7 对上述鉴定得到的 44 个白三叶几丁质酶基因进行系统进化树分析(图 2),参考拟南芥几丁质酶基因分类将白三叶几丁质酶基因家族划分为 5 类,分别命名为 Class I~Class V,每个类别中的成员数量也不相同。其中 Class III 包含的几丁质酶基因数量最多(23 个),而 Class II 包含的几丁质酶基因数量最少(2 个)。

表 2 白三叶几丁质酶基因家族蛋白理化性质

Table 2 Physicochemical properties of proteins in the chitinase gene family of white clover

基因 ID Gene ID	氨基酸长度 Amino- acids length (aa)	分子量 Molecular weight (Da)	等电点 Isoelectric point (PI)	不稳定指数 Instability index	脂肪族氨基酸指数 Aliphatic index	平均疏水性 Grand aver- age of hydrophobicity
gene-P8452_04693	298	32361.98	9.16	34.30	86.74	0.009
gene-P8452_04697	362	39842.48	9.26	34.73	86.22	-0.050
gene-P8452_04698	291	32409.61	5.60	40.36	87.22	-0.105
gene-P8452_04688	275	29055.34	4.37	31.32	82.04	-0.011
gene-P8452_00576	383	43275.95	8.33	31.26	78.69	-0.205
gene-P8452_04690	278	29609.18	5.15	34.46	86.44	0.059
gene-P8452_06296	383	43255.08	8.80	29.62	79.48	-0.199
gene-P8452_10187	297	32149.64	8.96	32.32	84.07	0.028
gene-P8452_10182	275	28960.20	4.41	33.27	82.76	-0.002
gene-P8452_10188	292	32297.52	5.74	37.78	86.61	-0.063
gene-P8452_10178	297	31928.65	5.02	35.58	82.83	-0.142
gene-P8452_10179	206	22738.68	5.11	31.38	87.14	-0.035
gene-P8452_13386	207	22795.73	5.11	30.86	86.71	-0.037
gene-P8452_18384	303	33888.14	6.93	42.01	82.38	-0.194
gene-P8452_17128	621	68415.97	5.22	28.83	92.17	0.005
gene-P8452_23770	365	39463.67	4.55	28.88	75.51	-0.168
gene-P8452_28219	132	14603.66	6.25	32.11	72.50	-0.164
gene-P8452_29322	362	39410.05	8.96	33.69	74.56	-0.281
gene-P8452_33777	331	35611.74	5.37	34.50	56.40	-0.303
gene-P8452_39032	256	27187.40	7.44	46.42	56.52	-0.245
gene-P8452_42935	294	31613.91	6.70	33.99	85.37	-0.010
gene-P8452_47669	294	31587.88	6.70	33.02	86.36	0.009
gene-P8452_53931	212	22708.93	4.37	28.04	61.75	-0.321
gene-P8452_53932	211	22945.46	5.46	31.39	57.82	-0.280
gene-P8452_53933	186	20238.60	4.99	28.93	60.91	-0.175
gene-P8452_53934	283	30502.81	4.71	32.67	59.36	-0.297
gene-P8452_53930	275	29591.09	6.83	36.52	62.22	-0.135
gene-P8452_53929	278	29839.26	5.27	31.46	59.78	-0.204
gene-P8452_54091	411	45795.84	5.50	47.07	87.83	-0.215
gene-P8452_58401	391	43516.31	5.45	45.42	90.77	-0.177
gene-P8452_58243	284	30703.01	4.66	33.45	58.10	-0.322
gene-P8452_58237	235	25189.95	4.57	35.09	67.36	-0.093
gene-P8452_58242	178	19133.09	4.55	21.51	65.84	-0.152
gene-P8452_58236	241	25954.70	4.81	31.04	64.85	-0.166
gene-P8452_63358	328	36123.93	9.07	42.80	80.49	-0.256
gene-P8452_59011	322	35664.54	6.23	24.44	73.63	-0.159
gene-P8452_68078	303	33447.00	8.72	35.38	82.61	-0.176
gene-P8452_63938	322	35664.54	6.23	24.44	73.63	-0.159
gene-P8452_70179	298	32589.35	6.71	23.03	96.54	0.063
gene-P8452_70182	297	31644.73	5.32	32.97	79.93	-0.004
gene-P8452_72355	378	41722.57	6.11	28.83	84.37	0.011
gene-P8452_75297	296	32327.00	6.13	24.14	95.57	0.034
gene-P8452_75301	270	28454.16	5.26	34.06	86.48	0.111
gene-P8452_77241	388	42619.43	6.11	33.05	82.71	-0.002

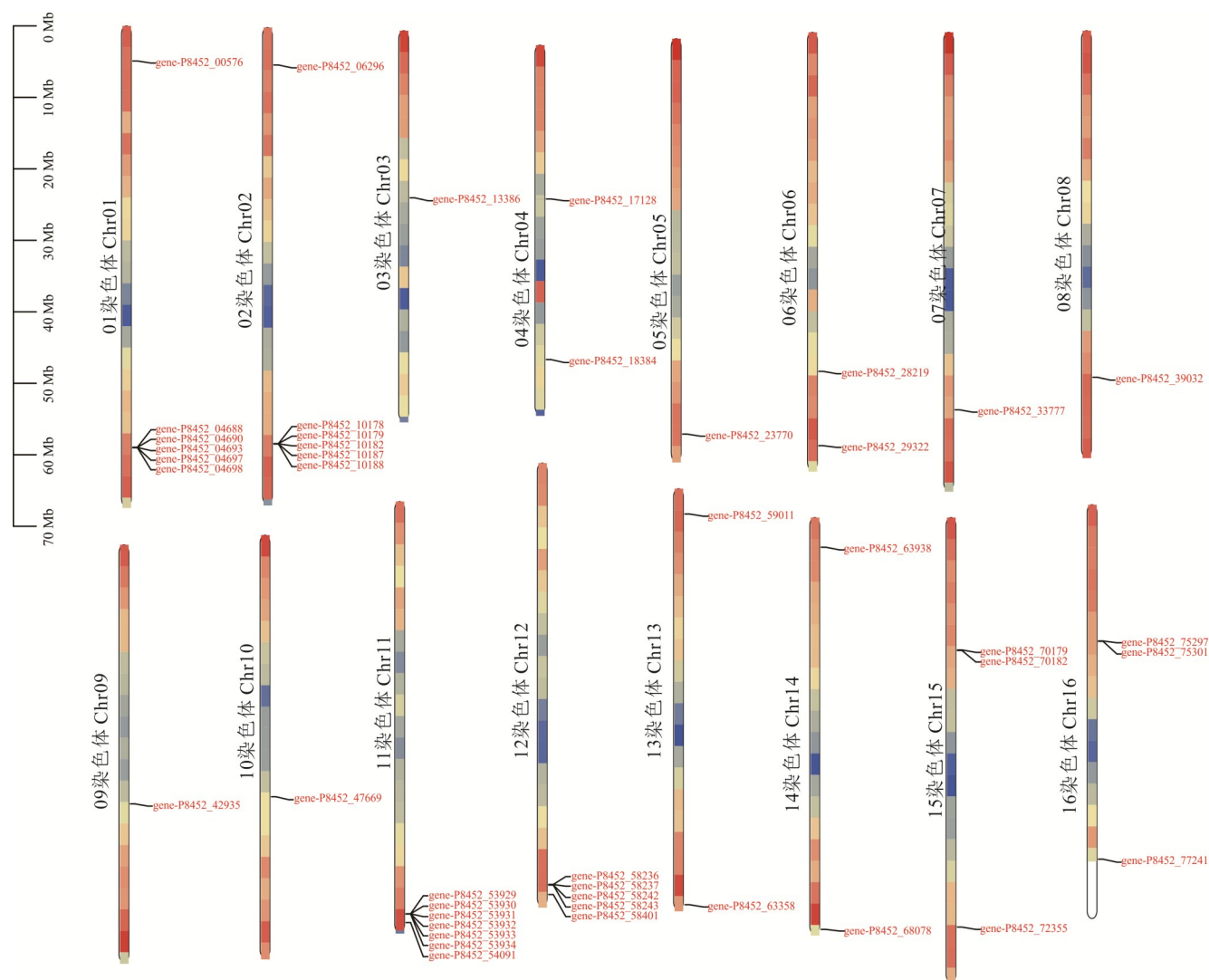


图1 白三叶几丁质酶基因家族成员在染色体上的分布

Fig. 1 Distribution of chitinase gene family members in white clover on chromosomes

2.3 白三叶几丁质酶基因家族保守结构域和基因结构分析

分析白三叶几丁质酶基因的保守基序(图3),将白三叶几丁质酶基因家族分为GH18和GH19两个亚族,其中GH18亚族有29个家族成员、GH19亚族有15个家族成员。在GH18与GH19亚族鉴定到10个保守基序,将其命名为 motif 1~motif 10,其中GH18亚族基因多数含有 motif 1、motif 2、motif 3、motif 7和 motif 8,而GH19亚族基因则多数含有 motif 2、motif 5、motif 6和 motif 10。表明同一亚族具有相似的蛋白保守基序排列。

基因结构分析结果显示,白三叶几丁质酶家族结构简单,绝大多数GH18亚族成员只有一个内含子,而GH19亚族成员大部分含有2个内含子。结合保守结构域结果分析,同一亚族的基因可能具有相似的功能。

2.4 白三叶几丁质酶基因家族成员启动子顺式作用元件分析

为了研究几丁质酶家族基因的功能,对白三叶几丁质酶基因起始密码子上游2 kb的序列进行分析,结果(图4)表明,白三叶几丁质酶基因的启动子区域存在多个生物和非生物胁迫响应的顺式元件,例如光响应、激素响应、胁迫应答等。其中,大部分成员均含有光响应元件,14个白三叶几丁质酶基因含有生长素响应元件;21个成员含有赤霉素响应元件;21个成员含有水杨酸响应元件;18个成员含有低温响应元件;18个成员含有干旱诱导的应答元件;19个成员含有防御和应激响应元件。另外,在9和12个成员中检测到分生组织表达响应元件,在12个成员中检测到胚乳表达响应元件,3个几丁质酶基因中检测到含有细胞周期调控响应元件。这些结果表明,白三叶几丁质酶基因可能参与白三叶生长发育并响应激素、胁迫等多种信号。

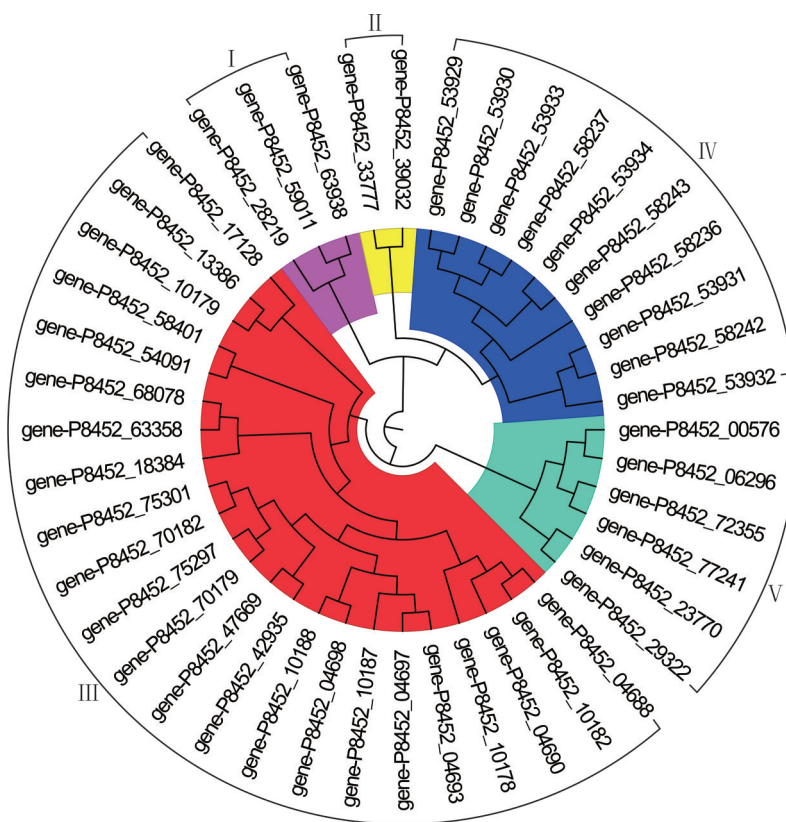


图 2 白三叶几丁质酶基因家族成员系统进化树分析

Fig. 2 Phylogenetic tree analysis of chitinase gene family members in white clover

2.5 干旱及盐胁迫下白三叶几丁质酶基因表达量分析

为了探究白三叶几丁质酶基因在各种环境胁迫下的潜在作用,本研究对启动子含有 ABA 响应、茉莉酸甲酯响应、MYB 干旱诱导等元件的基因按照数量排序,然后分别在含有这些元件最多和最少的基因中挑选了 5 个元件最多的几丁质酶基因(gene-P8452_06296、gene-P8452_10182、gene-P8452_23770、gene-P8452_10179、gene-P8452_63358)和 5 个元件最少的几丁质酶基因(gene-P8452_33777、gene-P8452_28219、gene-P8452_53931、gene-P8452_54091、gene-P8452_70179),利用实时荧光定量 PCR 技术分析在干旱及盐胁迫下白三叶几丁质酶基因的表达模式。以 PEG 模拟干旱处理和盐胁迫 0 h 的白三叶幼苗作为对照,利用实时荧光定量 PCR 对基因干旱胁迫和盐胁迫下的表达动态进行检测。结果显示,与对照相比,干旱处理和盐胁迫下这 10 个几丁质酶基因表达量均上调,只是上调幅度及时间出现差异(图 5 和图 6)。

2.6 过表达 *TrChit3* 拟南芥的获得

为了研究 gene-P8452_10182 基因的功能,将其重新命名为 *TrChit3* 并侵染拟南芥,对筛选得到的转基因 T_3 代拟南芥植株进行 PCR 检测,得到了 3 个转基因株系,分别命名为 OE1、OE2、OE3(图 7)。以 At β -actin 作为内参基因从而检测 *TrChit3* 的相对表达量。结果表明:转基因株系的 *TrChit3* 相对表达量明显提高,其中,OE1 株系的表达量相对较高,OE2 和 OE3 株系的表达量稍低,而野生型拟南芥(wild type, WT)中 *TrChit3* 不表达(图 7)。后续将用这 3 个株系来分析 *TrChit3* 抗旱功能。

2.7 过表达拟南芥中 *TrChit3* 抗旱功能验证

2.7.1 干旱胁迫对过表达 *TrChit3* 拟南芥表型的影响

如图 8 所示,在 12%PEG 胁迫后,野生型拟南芥比 3 个转基因株系(OE1、OE2、OE3)叶片萎蔫更严重,而对照组并没有明显差异,接下来进一步测定了对照及 PEG 胁迫后植株的相对含水量,对照处理下,3 个过表达株系与野生型拟南芥(WT)的相对含水量相差不大,PEG 胁迫后,过表达与野生型拟南芥相对含水量均显著降低,但经过干旱处理后 WT 的相对含水量要显著低于 OE1、OE2 和 OE3。结果表明, *TrChit3* 过表达可以增强拟南芥成苗在 PEG 模拟干旱胁迫下的抗性。

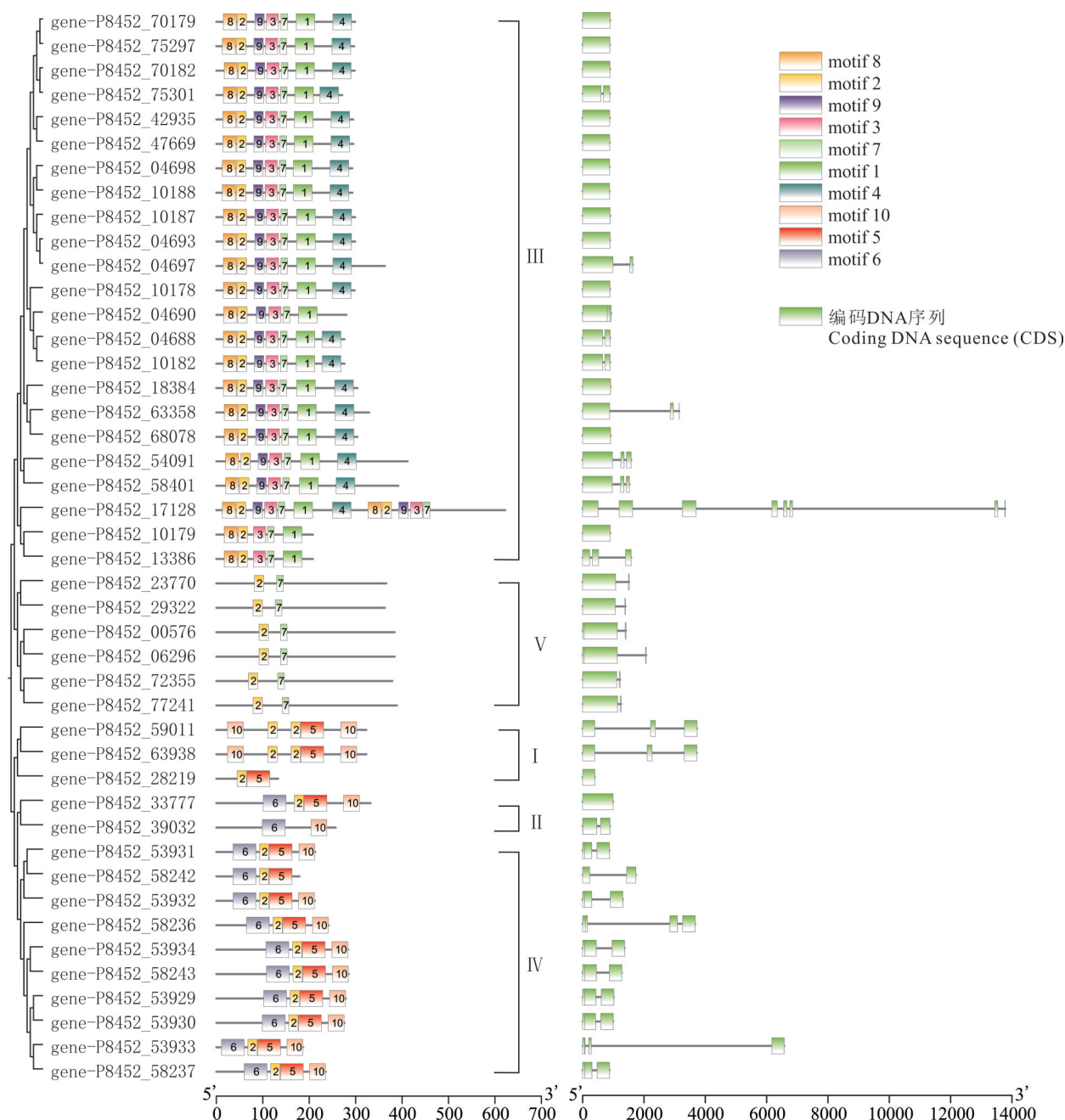


图3 白三叶几丁质酶基因编码蛋白的保守基序和基因结构分析

Fig. 3 Conserved motifs and gene structure analysis of chitinase gene encoding protein in white clover

2.7.2 干旱胁迫对叶绿素含量的影响 干旱胁迫会通过影响叶绿素含量来降低植物光合水平。本研究观察到,在对照条件下,WT与过表达拟南芥的叶绿素水平相差不大,当WT与过表达拟南芥处于干旱胁迫条件下,叶绿素a、叶绿素b及总叶绿素含量都显著降低,但是在干旱处理下,转基因株系的叶绿素a、叶绿素b及总叶绿素含量损失较小,且显著高于野生型(图9)。说明 *TrChit3* 基因可能在干旱胁迫下发挥作用。

2.7.3 干旱胁迫对叶绿素荧光参数的影响 正常生长条件下,野生型与转基因拟南芥(transgenic *A. thaliana*, OE1/OE2/OE3)的PS II最大光化学效率(F_v/F_m)和叶片健康性能指数(PI_{ABS})无显著性差异,但在干旱胁迫处理下,过表达拟南芥的叶绿素荧光参数均显著高于WT(图10),说明 *TrChit3* 基因可能降低了干旱胁迫对拟南芥光合能力的伤害程度。

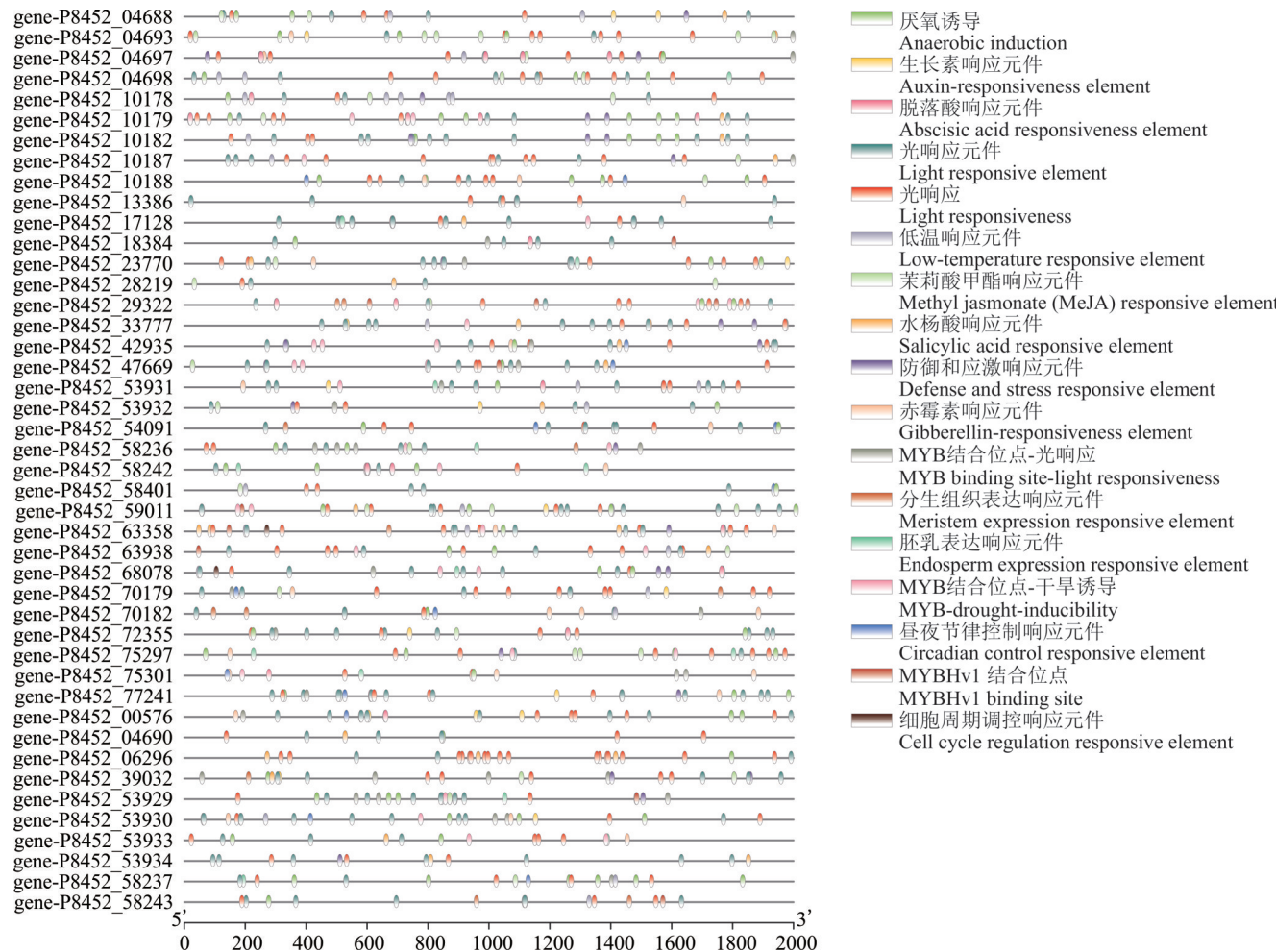


图 4 白三叶几丁质酶基因上游 2000 bp 启动子区域顺式作用元件预测结果

Fig. 4 Prediction results of cis-acting elements in the 2000 bp promoter region upstream of the chitinase gene of white clover

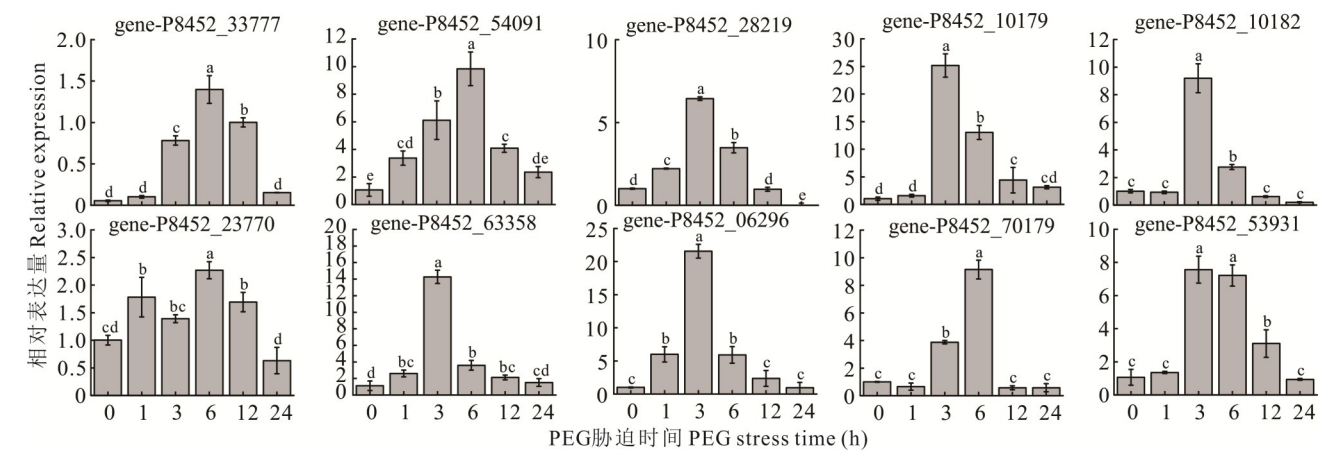


图 5 干旱胁迫下白三叶几丁质酶基因 qRT-PCR 分析

Fig. 5 qRT-PCR analysis of the chitinase gene of white clover under drought stress

不同小写字母表示在 $P < 0.05$ 水平差异显著。下同。The different lowercase letters indicate significant difference at $P < 0.05$ level. The same below.

2.7.4 干旱胁迫下野生型和转基因拟南芥相对电导率、MDA 和活性氧(超氧阴离子和过氧化氢)含量及总抗氧化能力 在正常处理中,野生型和转基因拟南芥的相对电导率、MDA、活性氧含量及总抗氧化能力无显著差异(图 11)。但干旱条件下,野生型拟南芥的相对电导率、MDA 和活性氧含量均显著高于转基因株系,其中干旱胁迫

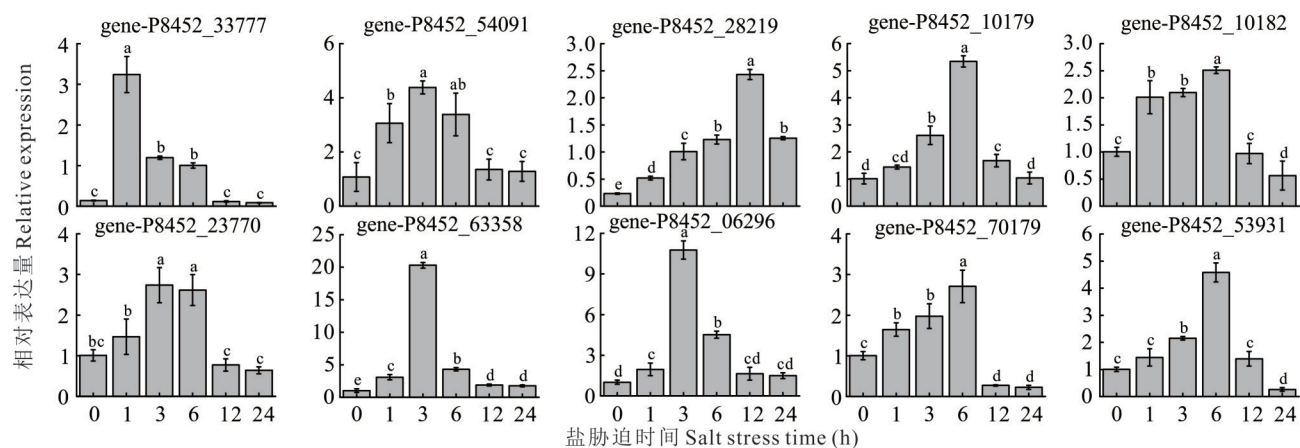


图6 盐胁迫下白三叶几丁质酶基因qRT-PCR分析

Fig. 6 qRT-PCR analysis of the chitinase gene of white clover under salt stress

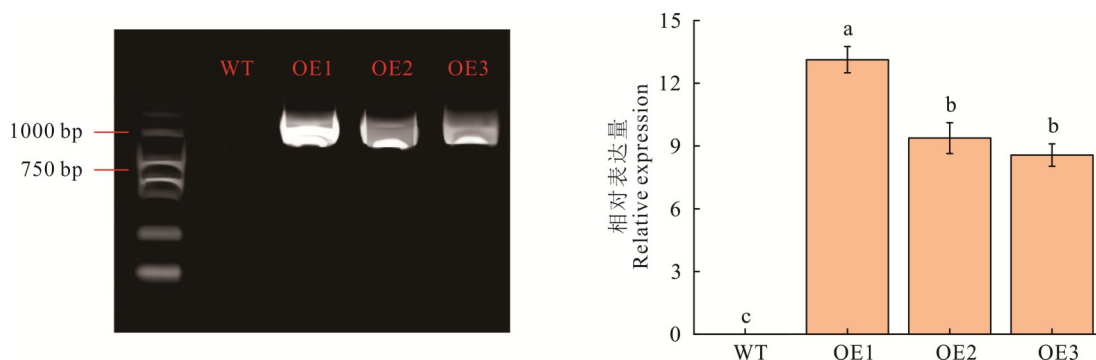


图7 过表达拟南芥植株鉴定及TrChit3基因表达量检测

Fig. 7 Identification of over-expressed *Arabidopsis* plants and detection of *TrChit3* gene expression

WT:野生型拟南芥。OE:过表达拟南芥。1,2,3是株系。WT: Wild type *arabidopsis*. OE: Overexpression *arabidopsis*. 1, 2, 3 is the strain.

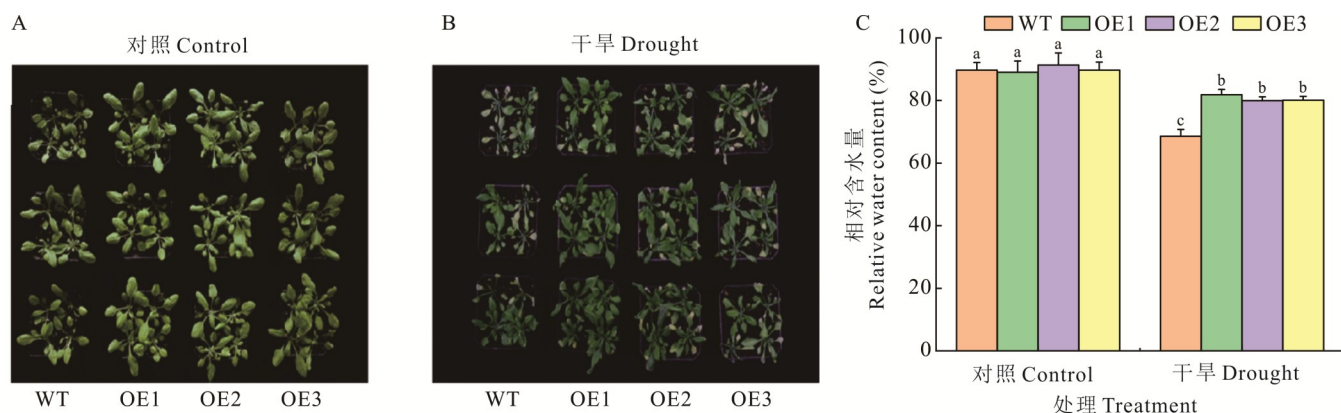


图8 过表达TrChit3拟南芥在12% PEG胁迫下的表型差异

Fig. 8 Phenotypic differences of *A. thaliana* over-expressing *TrChit3* under 12% PEG stress

A:野生型(WT)及过表达拟南芥在对照条件下的表型;B:WT及过表达拟南芥在12% PEG胁迫下的表型;C: WT及过表达拟南芥在对照及12% PEG胁迫下的相对含水量。A: The phenotype of wild type (WT) and over-expressed *A. thaliana* under control conditions; B: Phenotypes of WT and over-expressing *Arabidopsis* under 12% PEG stress; C: The relative water content of WT and overexpression *A. thaliana* under control and 12% PEG stress.

胁迫下野生型拟南芥的相对电导率是转基因株系的1.2倍(图11B),超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)含量是转基因株系的2倍(图11D);干旱条件下OE株系的总抗氧化能力显著高于WT(图11C)。结果表明, *TrChit3*可能通过调控活性氧(reactive oxygen species, ROS)系统提高拟南芥的抗旱性。

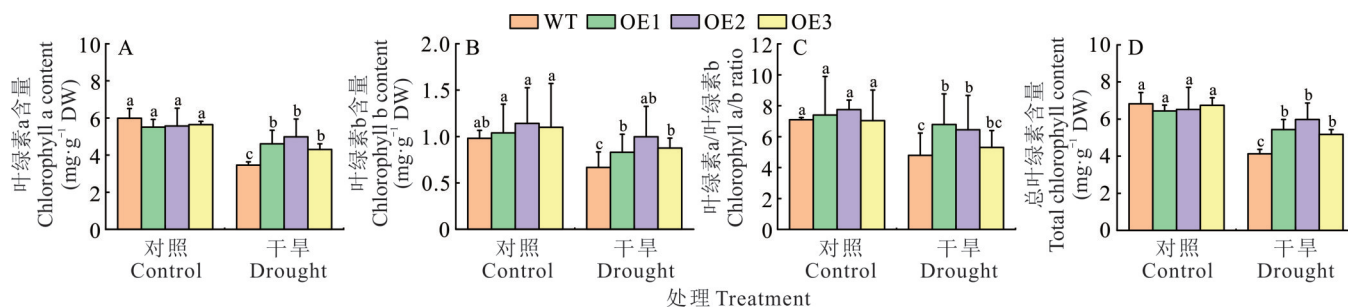


图 9 干旱胁迫对过表达 *TrChit3* 拟南芥叶绿素含量的影响

Fig. 9 Effect of drought stress on chlorophyll content of *A. thaliana* over-expressing *TrChit3*

DW: 干重 Dry weight. 下同 The same below.

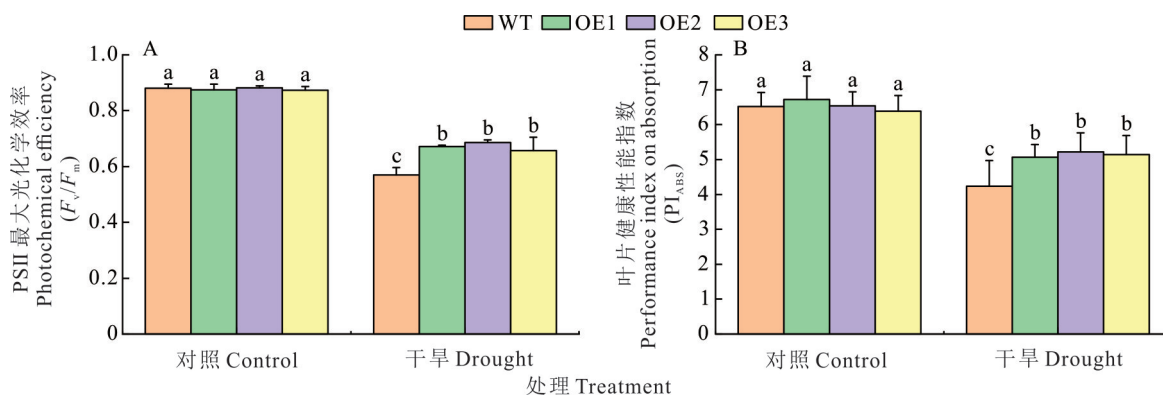


图 10 干旱胁迫下拟南芥的 PS II 最大光化学效率和叶片健康性能指数

Fig. 10 Photochemical efficiency and performance index in *A. thaliana* under drought stress

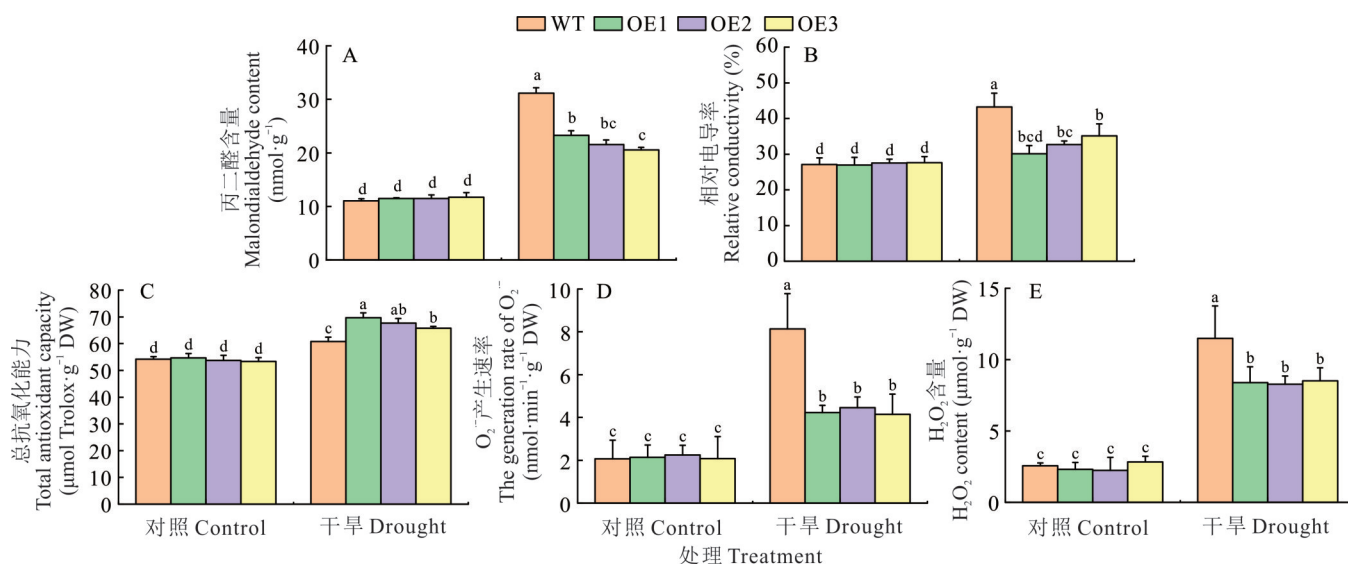


图 11 干旱胁迫对过表达 *TrChit3* 和野生型拟南芥的丙二醛含量和相对电导率、总抗氧化能力、超氧阴离子 $O_2^{\cdot-}$ 产生速率和 H_2O_2 含量的影响

Fig. 11 Effects of drought stress on malondialdehyde content, relative conductivity, total antioxidant capacity, superoxide anion $O_2^{\cdot-}$ production rate and H_2O_2 content in *TrChit3*-overexpressing and wild-type *Arabidopsis*

FW: 鲜重 Fresh weight.

3 讨论

白三叶是一种多年生豆科植物,由于其根系发育强壮、匍匐生长和快速更新,广泛分布在温带和冷温带地区^[22],它含有丰富的营养物质和矿物质元素,具有很高的营养、生态、遗传育种和药用价值^[23],然而,各种非生物胁迫

迫会严重影响白三叶的生长发育,从而影响其生产和推广^[24-25]。因此,研究白三叶抵御逆境胁迫的分子机制十分重要。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,但其在白三叶生长发育以及抗病耐逆等过程中的作用尚不明确^[24]。几丁质酶是一种糖苷水解酶,在自然界中分布广泛,几丁质酶因其在植物抗真菌防御反应中的重要作用而被广泛研究^[25],此外有研究表明植物几丁质酶在许多生理和形态过程中也起着重要作用,并且还参与对生物和非生物胁迫的反应^[26-30]。但现在还没有白三叶几丁质酶基因家族的系统分析。在本研究中,对白三叶几丁质酶基因家族成员进行了系统分析,并探究了白三叶几丁质酶基因在干旱及盐胁迫下的表达模式。

不同物种中几丁质酶基因数量差异较大,在番茄、水稻、柑橘(*Citrus reticulata*)、栽培大豆、葡萄(*Vitis vinifera*)、小麦、黄瓜(*Cucumis sativus*)、苹果(*Malus pumila*)中分别鉴定出43、49、32、55、53、189、28、36个几丁质酶基因^[31-37],本研究鉴定得到了44个白三叶几丁质酶基因,比较这44个几丁质酶基因的氨基酸序列后,可将其分为GH18和GH19两个亚族,5个不同的簇(I~V)。蛋白理化性质分析结果显示,这些白三叶几丁质酶基因家族成员编码蛋白的氨基酸数量变化范围为132~621 aa,与小麦、柑橘、苹果、栽培大豆等的氨基酸数量变化范围相似,均较大;理论等电点变化范围为4.37~9.26,且偏酸性蛋白质较多,结果与葡萄、苹果、黄瓜的基本一致。这些结果表明,不同物种的几丁质酶基因家族成员的理化性质具有相似性。染色体定位结果显示,44个成员不均匀分布在白三叶的16条染色体上,这与现有结果相似。

基因结构和保守基序分布可以为基因家族的进化关系提供进一步的证据^[38]。本研究结果发现GH18亚家族基因多数含有motif 1、motif 2、motif 3、motif 7和motif 8,而GH19亚家族基因则多数含有motif 2、motif 5、motif 6和motif 10;大多数GH18亚家族成员只有一个内含子,而GH19亚家族成员大部分含有2个内含子,这些结果与番茄、水稻、小麦等的几丁质酶相似^[32-35]。表明同一亚族基因可能具有相似的功能,而5个类别之间的不同基序组成也意味着不同类别之间的功能多样化。

植物几丁质酶受多种顺式作用元件的转录调控,包括激素顺式作用元件和多种胁迫顺式作用元件^[39-40]。本研究在大部分白三叶几丁质酶基因的启动子区域发现了光响应元件,表明大多数几丁质酶基因的表达可能与光照有关。有研究发现植物激素在几丁质酶基因表达中发挥重要作用^[14,41],本研究所得结果与其一致。同时在18个白三叶几丁质酶基因家族成员中发现含有干旱诱导的应答元件;19个成员含有防御和应激响应元件。为了验证这种可能性,本研究随机选择了10个白三叶几丁质酶基因家族成员,分析在干旱及盐胁迫下白三叶几丁质酶基因的表达模式。结果发现,在干旱及盐胁迫处理下这10个几丁质酶基因的表达量发生或多或少地变化,其中干旱胁迫下变化尤其明显,这与目前研究结果相似^[13-14,29,42-43]。推测白三叶几丁质酶基因家族可能在激素、干旱、低温等生物和非生物逆境胁迫应答中起重要作用,这需要进行进一步的研究。因此,本试验选取gene-P8452_10182基因并将其命名为*TrChit3*,通过花序侵染法获得了转基因拟南芥^[15],对野生型及转基因拟南芥进行干旱胁迫试验从而初步验证*TrChit3*基因功能。

叶绿素是光合作用的主要成分之一,对干旱胁迫敏感^[44]。本研究中,在干旱胁迫处理下,WT的叶绿素含量显著低于过表达株系。叶绿素含量越高,植物光合作用越强,从而增加植物鲜重^[45]。有研究发现,在干旱处理下,过表达株系的相对含水量显著高于WT,本研究结果与其相似。植物遭受干旱胁迫时,由于气孔和代谢的限制,导致其光合作用下降^[46]。叶绿素荧光是衡量光合作用的探针^[47],已有研究表明在干旱胁迫下几丁质酶基因可以有效保护PS II活性,具有更高的叶绿素荧光^[13]。本试验也有相似结果,在干旱胁迫下,*TrChit3*转基因拟南芥的PS II最大光化学效率(F_v/F_m)和光化学性能指数(PI_{ABS})均显著高于野生型拟南芥。这些结果表明*TrChit3*基因可能参与拟南芥光合作用从而提高耐旱性。

在植物中,脂质过氧化主要是由于ROS过度积累引起的氧化应激导致的^[48],特别是 H_2O_2 ^[18]。MDA是一种用来评估植物在非生物胁迫下的膜脂质氧化损伤程度的物质^[49]。在干旱环境中,植株为了保护膜免受脂质过氧化损伤,进化出一系列抗氧化防御系统,通过提高总抗氧化能力从而应对干旱^[50]。在本研究中,干旱胁迫下,与野生型拟南芥相比,转基因植株丙二醛(MDA)含量、超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)产生速率和 H_2O_2 含量较低,说明转基因植株

遭受的膜损伤程度较低,3个转基因株系的总抗氧化能力均高于野生型,表明转基因植株具有更有效的酶促抗氧化系统来清除过量的ROS。这些数据表明,ROS清除系统能力的提高是过表达的转 *TrChit3* 基因拟南芥抗旱性增强的原因之一。

4 结论

本研究在白三叶基因组中鉴定出44个几丁质酶基因,这些基因随机且不均匀地分布在白三叶染色体上。系统发育分析将这些几丁质酶基因分为GH18和GH19两个亚族,5个不同的簇,分别代表5类几丁质酶(I、II、III、IV和V)。基因结构和保守结构域结果显示,同一亚族基因可能具有相似的功能,启动子分析显示,几丁质酶基因启动子区域存在多个与生物和非生物胁迫相关的顺式作用元件,表明其在植物对多种胁迫的防御反应中起作用。此外,基因表达分析显示,干旱和盐胁迫处理显著诱导了几丁质酶基因的表达,进一步证实了它们在白三叶胁迫响应中的作用。克隆得到 *TrChit3* 基因,并成功在拟南芥中过表达,拟南芥干旱胁迫试验表明, *TrChit3* 基因可能参与光合作用及膜脂过氧化从而提高转基因拟南芥的耐旱能力,本研究结果为白三叶几丁质酶在植物防御中的潜在作用提供了新的见解。然而,需要进行大量的研究工作来阐明几丁质酶介导的不同植物胁迫调节的详细机制,以便将其用于白三叶改良中。

参考文献 References:

- [1] Karasuda S, Tanaka S, Kajihara H, *et al.* Plant chitinase as a possible biocontrol agent for use instead of chemical fungicides. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2003, 67(1): 221–224.
- [2] Malik A. Purification and properties of plant chitinases: a review. *Journal of Food Biochemistry*, 2019, 43(3): e12762.
- [3] Dahiya N, Tewari R, Hoondal G S. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 71(6): 773–782.
- [4] Hamid R, Khan M A, Ahmad M, *et al.* Chitinases: an update. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 2013, 5(1): 21–29.
- [5] Richa K, Tiwari I M, Devanna B, *et al.* Novel chitinase gene *LOC_Os11g47510* from indica rice Tetep provides enhanced resistance against sheath blight pathogen *Rhizoctonia solani* in rice. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 596.
- [6] Passarinho P A, DE Vries S C. *Arabidopsis* chitinases: a genomic survey. *Arabidopsis Book*, 2002(1): e0023.
- [7] Tyler L, Bragg J N, Wu J, *et al.* Annotation and comparative analysis of the glycoside hydrolase genes in *Brachypodium distachyon*. *BMC Genomics*, 2010, 11(1): 600.
- [8] Su Y, Xu L, Wang S, *et al.* Identification, phylogeny and transcript of chitinase family genes in sugarcane. *Scientific Reports*, 2015, 5(1): 10708.
- [9] Sundheim L, Poplawsky A R, Ellingboe A H. Molecular cloning of two chitinase genes from *Serratia marcescens* and their expression in *Pseudomonas* species. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 1988, 33(3): 483–491.
- [10] Bai X, Zhan G, Tian S, *et al.* Transcription factor BZR2 activates chitinase *Chit20.2* transcription to confer resistance to wheat stripe rust. *Plant Physiology*, 2021, 187(4): 2749–2762.
- [11] Datta K, Tu J, Oliva N, *et al.* Enhanced resistance to sheath blight by constitutive expression of infection-related rice chitinase in transgenic elite indica rice cultivars. *Plant Science*, 2001, 160(3): 405–414.
- [12] Wu C T, Bradford K J. Class I chitinase and β -1,3-glucanase are differentially regulated by wounding, methyl jasmonate, ethylene, and gibberellin in tomato seeds and leaves. *Plant Physiology*, 2003, 133(1): 263–273.
- [13] Kumar S A, Kumari P H, Jawahar G, *et al.* Beyond just being foot soldiers-osmotin like protein (OLP) and chitinase (*Chi11*) genes act as sentinels to confront salt, drought, and fungal stress tolerance in tomato. *Environmental and Experimental Botany*, 2016, 132(1): 53–65.
- [14] Wan K, Buitrago S, Cheng B, *et al.* Analysis of chitinase gene family in barley and function study of *HvChi22* involved in drought tolerance. *Molecular Biology Reports*, 2024, 51(1): 731.
- [15] Pan X X, Hu M Y, Wang Z W, *et al.* Genome-wide analysis of the rice chitinases gene family and their expression profiles under different stress treatments. *Chinese Journal of Plant Physiology*, 2022, 58(4): 746–756.
潘晓雪, 胡明瑜, 王忠伟, 等. 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.

- [16] Zhang H, Li N, Xing X Z, *et al.* Chitinase gene identification and expression analysis of wild soybean and cultivated soybean. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2024, 25(9): 1573–1588.
张华, 李娜, 邢馨竹, 等. 野生大豆与栽培大豆几丁质酶基因鉴定及其表达分析. *植物遗传资源学报*, 2024, 25(9): 1573–1588.
- [17] Yao C, Li X, Li Y, *et al.* Overexpression of a *Malus baccata* MYB transcription factor gene *MbMYB4* increases cold and drought tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(3): 1794.
- [18] Ma R, Liu W, Li S, *et al.* Genome-wide identification, characterization and expression analysis of the *CIPK* gene family in potato (*Solanum tuberosum* L.) and the role of *StCIPK10* in response to drought and osmotic stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(24): 13535.
- [19] Xu F, Liu S, Liu Y, *et al.* Effectiveness of lysozyme coatings and 1-MCP treatments on storage and preservation of kiwifruit. *Food Chemistry*, 2019, 288: 201–207.
- [20] Li T, Huang Y, Khadr A, *et al.* DcDREB1A, a DREB-binding transcription factor from *Daucus carota*, enhances drought tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana* and modulates lignin levels by regulating lignin-biosynthesis-related genes. *Environmental and Experimental Botany*, 2020, 169: 103896.
- [21] Liu D, He S, Zhai H, *et al.* Overexpression of *IbP5CR* enhances salt tolerance in transgenic *sweetpotato*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2014, 117: 1–16.
- [22] Li M, Zhang X, Zhang T, *et al.* Genome-wide analysis of the *WRKY* genes and their important roles during cold stress in white clover. *PeerJ*, 2023, 11: e15610.
- [23] Li M, Chen X, Huang W, *et al.* Comprehensive identification of the β -amylase (*BAM*) gene family in response to cold stress in white clover. *Plants*, 2024, 13(2): 154.
- [24] Zhang Y, Li Z, Peng Y, *et al.* Clones of *FeSOD*, *MDHAR*, *DHAR* genes from white clover and gene expression analysis of ROS-scavenging enzymes during abiotic stress and hormone treatments. *Molecules*, 2015, 20(11): 20939–20954.
- [25] Ma X F, Wright E, Ge Y, *et al.* Improving phosphorus acquisition of white clover (*Trifolium repens* L.) by transgenic expression of plant-derived phytase and acid phosphatase genes. *Plant Science*, 2009, 176(4): 479–488.
- [26] Mészáros P, Rybanský L, Spieš N, *et al.* Plant chitinase responses to different metal-type stresses reveal specificity. *Plant Cell Reports*, 2014, 33: 1789–1799.
- [27] Shibuya N, Minami E. Oligosaccharide signalling for defence responses in plant. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2001, 59(5): 223–233.
- [28] Wang J, Xu Z Q. Cloning and inducible expression of a class I chitinase gene *FaChit1* from *Festuca arundinacea*. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2010, 30(5): 869–875.
王健, 徐子勤. 高羊茅 *FaChit1* 基因 cDNA 克隆及诱导表达. *西北植物学报*, 2010, 30(5): 869–875.
- [29] Zhu C, Zhang S T, Chang X J, *et al.* Cloning and its expression analysis of chitinase under drought stress in *Camellia sinensis*. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2017, 38(5): 894–902.
朱晨, 张舒婷, 常笑君, 等. 茶树几丁质酶基因的克隆及其在干旱胁迫下的表达分析. *热带作物学报*, 2017, 38(5): 894–902.
- [30] Kochieva E Z, Filyushin M A, Beletsky A V, *et al.* Identification and expression analysis of chitinase genes in parasitic plant *Monotropa hypopitys*. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 2017, 473(1): 111–113.
- [31] Yu L X, Djebrouni M, Chamberland H, *et al.* Chitinase: differential induction of gene expression and enzyme activity by drought stress in the wild (*Lycopersicon chilense* Dun.) and cultivated (*L. esculentum* Mill.) tomatoes. *Journal of Plant Physiology*, 1998, 153(5): 745–753.
- [32] Cao J, Tan X. Comprehensive analysis of the chitinase family genes in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Plants*, 2019, 8(3): 52.
- [33] Hu Y P, Guo Y J, Ji Q H, *et al.* Structure, classification and evolutionary analysis of chitinase gene family in citrus. *South China Fruit Tree*, 2022, 51(6): 16–21.
胡亚平, 郭雁君, 吉前华, 等. 柑桔几丁质酶基因家族的结构、分类与进化分析. *中国南方果树*, 2022, 51(6): 16–21.
- [34] Yao H. Analysis of grape chitinase and glucanase gene families. *Qinghuangdao: Hebei Normal University of Science and Technology*, 2024.
姚姮. 葡萄几丁质酶和葡聚糖酶基因家族的分析. 秦皇岛: 河北科技师范学院, 2024.
- [35] Xu W, Liu J F, Zhang G, *et al.* Genome-wide identification and expression analysis under *Fusarium graminearum* stress of chitinase gene family in *Triticum aestivum* L. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2019, 48(11): 7–17.

- 徐武, 刘建丰, 张戈, 等. 小麦几丁质酶基因家族的全基因组鉴定及禾谷镰刀菌胁迫下的表达分析. 河南农业科学, 2019, 48(11): 7—17.
- [36] Bartholomew E S, Black K, Feng Z, *et al.* Comprehensive analysis of the chitinase gene family in cucumber (*Cucumis sativus* L.): from gene identification and evolution to expression in response to *Fusarium oxysporum*. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(21): 5309.
- [37] Haxim Y, Kahar G, Zhang X, *et al.* Genome-wide characterization of the chitinase gene family in wild apple (*Malus sieversii*) and domesticated apple (*Malus domestica*) reveals its role in resistance to *Valsa mali*. Frontiers in Plant Science, 2022, 13: 1007936.
- [38] Jeffares D C, Penkett C J, Bähler J. Rapidly regulated genes are intron poor. Trends in Genetics, 2008, 24(8): 375—378.
- [39] Grover A. Plant chitinases: genetic diversity and physiological roles. Critical Reviews in Plant Sciences, 2012, 31(1): 57—73.
- [40] Gao Y, Zan X L, Wu X F, *et al.* Identification of fungus-responsive cis-acting element in the promoter of *Brassica juncea* chitinase gene, *BjCH11*. Plant Science, 2014, 215: 190—198.
- [41] Taira T, Toma N, Ichi M, *et al.* Tissue distribution, synthesis stage, and ethylene induction of pineapple (*Ananas comosus*) chitinases. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2005, 69(4): 852—854.
- [42] Lyu P, Zhang C, Xie P, *et al.* Genome-wide identification and expression analyses of the chitinase gene family in response to white mold and drought stress in soybean (*Glycine max*). Life, 2022, 12(9): 1340.
- [43] Ali M, Gai W X, Khattak A M, *et al.* Knockdown of the chitin-binding protein family gene *CaChiIV1* increased sensitivity to *Phytophthora capsici* and drought stress in pepper plants. Molecular Genetics and Genomics, 2019, 294: 1311—1326.
- [44] Amira M, Qados A. Effect of salt stress on plant growth and metabolism of bean plant *Vicia faba* (L.). Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences, 2011, 10(1): 7—15.
- [45] Manuka R, Saddhe A A, Kunar K. Expression of *OsWNK9* in *Arabidopsis* conferred tolerance to salt and drought stress. Plant Science, 2018, 270: 58—71.
- [46] Flexas J, Medrano H. Drought-inhibition of photosynthesis in C₃ plants: stomatal and non-stomatal limitations revisited. Annals of Botany, 2002, 89(2): 183—189.
- [47] Zlatev Z. Drought-induced changes in chlorophyll fluorescence of young wheat plants. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 2009, 23(1): 438—441.
- [48] Farmer E E, Mueller M J. ROS-mediated lipid peroxidation and RES-activated signaling. Annual Review of Plant Biology, 2013, 64(1): 429—450.
- [49] Davey M, Stals E, Panis B, *et al.* High-throughput determination of malondialdehyde in plant tissues. Analytical Biochemistry, 2005, 347(2): 201—207.
- [50] Miller G, Suzuki N, Ciftci-Yilmaz S, *et al.* Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. Plant, Cell & Environment, 2010, 33(4): 453—467.