

DOI:10.12113/j.issn.1672-5565.201903006

罗汉果几丁质酶基因家族的生物信息学分析

李惠敏*, 李璐璐, 陈玉梅, 李佳慧

(广西师范大学 生命科学学院, 广西 桂林 541006)

摘要:几丁质酶是一类在植物抵抗病原真菌等过程中具有重要作用的蛋白质,为探讨几丁质酶在罗汉果抗根结线虫病中的调控作用,本研究基于南方根结线虫侵染下的罗汉果幼苗根系的转录组测序结果,采用生物信息学技术对筛选到的15个罗汉果几丁质酶基因进行分析。结果表明,15个罗汉果几丁质相关蛋白基因编码的氨基酸序列其N段均有一段信号肽,亚细胞定位在胞外;分子量从27 kDa到37 kDa不等;多数为酸性蛋白。基于氨基酸保守结构域和系统发育关系分析,15个罗汉果几丁质酶分属于GH18和GH19两大家族中的3个组别(I、III和IV)的成员,GH18家族成员三级结构预测具有典型的 $(\alpha/\beta)_8$ 桶状结构,而GH19家族成员三级结构预测只有 α 螺旋结构域。这些分析结果可为今后深入研究罗汉果几丁质酶的生物学功能和调控机制提供一定的理论依据,为罗汉果抗根结线虫病育种提供参考。

关键词:罗汉果;转录组测序;几丁质酶基因家族;理化特性

中图分类号:S435.79 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-5565(2019)03-167-08

Bioinformatics analysis of chitinase gene family in *Siraitia grosvenorii*

LI Huimin*, LI Lulu, CHEN Yumei, LI Jiahui

(College of Life Science, Guangxi Normal University, Guilin 541006, Guangxi China)

Abstract: Chitinases are proteins that play an important role in resistance to fungal diseases. To investigate the role of chitinases in the resistance of *Siraitia grosvenorii* to root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*), 15 chitinase genes were analyzed by bioinformatics based on transcriptome analysis of *Siraitia grosvenorii* seedlings infected by *Meloidogyne incognita*. Results showed that there was a signal peptide in the N-terminal of the amino acid sequences encoded by the 15 chitinase genes, and the subcellular localization was extracellular. The molecular weight ranged from 27 kDa to 37 kDa, and most of them were acidic proteins. The phylogenetic analysis based on amino acid conserved domain revealed that chitinases belong to three groups (I, III, and IV) of GH18 and GH19 families. The predicted tertiary structure of GH18 family members had a typical $(\alpha/\beta)_8$ -barrel structure. However, there were only α -helix domains in the prediction of the tertiary structure of GH19 family members. These results would provide a reference for further study on the regulatory role of chitinase in the resistance mechanism of *Siraitia grosvenorii* to the root-knot in the future.

Keywords: *Siraitia grosvenorii*; RNA-seq; Chitinase genes family; Physical and chemical property

罗汉果(*Siraitia grosvenorii*)属葫芦科藤本落叶植物,具有一年种多年生的块根状宿根性,其药食两用的果实被誉为“东方神果”,全球90%以上的罗汉果产于广西桂林地区^[1-2]。根结线虫病是一类危害大、分布广、防治难的植物病虫害,也是罗汉果生产中的主要病害之一。根结线虫不仅危害罗汉果植株

根部,破坏根组织的分化和生理活动,导致地上部分生长发育迟缓、推迟开花结果或不开花结果,同时还会加重枯萎病、根腐病等土传性真菌病害和部分细菌病害的发生,有的果园未到结果盛期就因严重感染根结线虫病而被迫淘汰,损失极为严重^[3-4]。因此,如何防治根结线虫病是目前罗汉果种植中迫于

收稿日期:2019-03-19;修回日期:2019-04-08.

基金项目:广西自然科学基金青年基金(No.2016GXNSFBA380061);广西高校中青年教师基础能力提升项目(No.2018KY0084);广西师范大学青年骨干教师成长支撑计划项目([2013]3).

*通信作者:李惠敏,女,副教授,研究方向:植物分子生物学.E-mail:huimin_@163.com.

要解决的主要问题之一,而利用生物技术进行抗性育种被认为是在植物生物防治中最有前景的策略^[5]。

几丁质酶(EC 3. 2. 1. 14)是一种能够将几丁质水解成 N-乙酰葡萄糖胺的糖苷酶^[6]。因真菌细胞壁均含有几丁质,线虫的卵壳和表皮中也含有几丁质物质,几丁质酶作为病原物和寄主植物相互作用中的一种重要蛋白质,已成为在植物抗病虫害研究中的热点^[7]。植物虽然不含几丁质,但也存在着几丁质酶基因,植物几丁质酶可分布于植物的茎、叶、种子及愈伤组织中,分子量为 25~55 kDa,多为单体,呈酸性或碱性,主要是内切几丁质酶,它随机水解几丁质内部 β -1, 4-糖苷键,释放出寡糖^[8-12],植物几丁质酶部分家族成员还具有溶菌酶同源性^[13-14],相关研究也表明植物几丁质酶的高水平表达能够增强植物对害虫、病原菌和环境胁迫的抵抗能力^[10-12, 15-16]。

随着高通量测序技术和生物信息学技术的发展,转录组测序技术(RNA sequencing, RNA-Seq)目前被广泛应用于植物抗病性等相关基因的鉴定与分析^[16-20],本研究基于 RNA-Seq 技术获得罗汉果根系转录组测序数据的基础上,对其中的几丁质酶基因家族成员进行生物信息学分析,期望为今后研究几丁质酶对罗汉果植株根结线虫病抗性分子机理提供参考,为罗汉果抗性育种提供基因来源。

1 材料与方法

1.1 材料

罗汉果为当地栽培品种青皮果,属于南方根结线虫易感品种,以罗汉果幼苗根系为植物材料进行

转录组测序,委托上海派森诺生物科技有限公司 Illumina HiSeq 2500 平台进行。

1.2 方法

1.2.1 罗汉果几丁质酶基因鉴定及理化特性分析

基于罗汉果幼苗根系的转录组测序数据及其注释结果,将搜索到的注释为几丁质酶的 Unigene 通过开放阅读框 ORF Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder>)和预测保守域 CD Search (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)在线软件检测确认,筛选出含 GH18 或 GH19 基因家族成员结构域特征且具有完整 ORF 的 Unigene 序列。将鉴定到的罗汉果几丁质酶基因编码的氨基酸序列使用 ExPASy (<http://www.expasy.org/>)进行在线预测其理化特性和跨膜结构域预测 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>)。

1.2.2 信号肽预测及亚细胞定位

利用 TargetP^[21] (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>)和在线软件 CELLO v2.5^[22]对 15 条罗汉果几丁质酶序列进行信号肽预测和亚细胞定位。

1.2.3 罗汉果几丁质酶系统进化树构建及氨基酸序列结构分析

基于几丁质酶的氨基酸序列,采用 MEGA6.0 邻接法(Neighbor-Joining, NJ)缺失序列删除的方式,构建罗汉果几丁质酶系统进化树(bootstrap = 1 000)。并以 NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)下载的 19 条拟南芥几丁质酶序列(本研究中将其编号 AtCht1 到 AtCht19,序列相关信息见表 1)为参考,对罗汉果几丁质酶进行分组。利用 DNAMAN 软件、MEME 和 Phyre2^[23]在线工具对罗汉果几丁质酶基因编码的氨基酸序列结构域进行分析。

表 1 拟南芥几丁质酶序列信息

Table 1 Chitinases in *Arabidopsis thaliana* downloaded from NCBI

名称	序列号	组别	名称	序列号	组别
AtCht1	AAA32768.1	III	AtCht11	BAA21861.1	III
AtCht2	AAA32769.1	I	AtCht12	NP_171738.1	I
AtCht3	AAB64044.1	IV	AtCht13	CAA19692.1	V
AtCht4	AAB64045.1	IV	AtCht14	AAK59442.1	I
AtCht5	AAB64046.1	IV	AtCht15	AAG09096.1	IV
AtCht6	AAB64047.1	IV	AtCht16	CAA19692.1	V
AtCht7	AAB64048.1	IV	AtCht17	CAA19690.1	II
AtCht8	BAA82810.1	I	AtCht18	CAB78976.1	II
AtCht9	CAA74930.1	IV	AtCht19	CAB81807.1	IV
AtCht10	BAA21860.1	III			

2 结果与分析

2.1 罗汉果几丁质酶基因家族成员的鉴定与理化性质分析

基于南方根结线虫侵染早期罗汉果根系转录组测序结果,搜索到注释为几丁质酶基因的 Unigene 共有 28 条,然后分别经 ORF finder 和 CD-Search 确认具有完整开放阅读框 ORF 和 GH18 或 GH19 基因家族成员结构域特征的 Unigene,最后共鉴定到 15 条罗汉果几丁质酶 Unigene,命名为 SgCht1 到

SgCht15(见表 2),ORF finder 在线预测其编码的几丁质酶前体氨基酸数目最少的为 SgCht6(260 个),最大的为 SgCht12 和 SgCht15(均是 343 个)。利用 ExPASy 在线软件对罗汉果几丁质酶基因编码的蛋白质进行理化性质预测结果见表 2,罗汉果几丁质酶的分子量在 27 kDa 到 37 kDa 之间,多数为酸性蛋白质,只有 SgCht1、SgCht4 和 SgCht9 的理论等电点大于 8.0;不稳定系数显示 SgCht1、2、4、6、7、10、11 和 14 为稳定蛋白,其余为不稳定蛋白;总平均亲水性显示 SgCht1、2、9、12、13 为疏水性蛋白,其余均属于亲水性蛋白。

表 2 罗汉果几丁质酶特征

Table 2 Characteristics of chitinases in *Siraitia grosvenorii*

类别	名称	跨膜螺旋/个	信号肽氨基酸数目	总氨基酸数目	理化特性			
					分子量/kDa	等电点	不稳定系数	总平均亲水性
几丁质酶	SgCht1	2	25	300	32.15	8.10	34.60	0.040
	SgCht2	0	25	295	30.99	4.68	29.60	0.114
	SgCht4	1	25	299	32.34	9.61	38.00	-0.054
	SgCht8	1	27	313	34.60	4.61	42.12	-0.053
	SgCht9	1	26	296	31.52	9.04	40.61	0.032
	SgCht12	1	30	343	36.69	5.33	42.35	0.131
	SgCht15	0	28	343	37.08	4.93	40.60	-0.104
	SgCht6	0	19	260	27.29	4.85	22.06	-0.046
	SgCht7	0	24	270	28.38	7.86	24.10	-0.054
	SgCht10	0	29	331	35.46	5.41	34.01	-0.123
	SgCht11	0	19	317	34.31	8.46	39.47	-0.375
类几丁质酶	SgCht3	0	21	297	32.55	6.08	41.86	-0.080
	SgCht5	0	26	300	32.93	5.70	47.38	-0.015
	SgCht13	0	21	339	35.84	7.46	41.76	0.060
	SgCht14	0	23	334	36.01	5.81	35.97	-0.024

2.2 信号肽预测及亚细胞定位结果

信号肽预测结果显示,本研究鉴定到的 15 个罗汉果几丁质酶前体其 N 端均有一段长度范围为 19-30 个氨基酸残基的信号肽(见表 2),亚细胞定位结果显示这些几丁质酶均定位在胞外。

2.3 罗汉果几丁质酶系统发育分析及分类

植物中的几丁质酶主要为糖苷水解酶 18 家族和 19 家族成员(GH18 和 GH19),根据氨基酸序列特征,植物的内切几丁质酶分为 5 类,GH18 包含 III 类和 V 类植物几丁质酶,GH19 包含 I、II、IV 类^[13-14]。本研究以拟南芥几丁质酶的分类为参考,基于几丁质酶氨基酸序列的 NJ 系统发育树结果如图 1 所示,15 条罗汉果几丁质酶序列(图中星号所示)归为 3 类即 SgCht11 属于 I 类;SgCht6、SgCht7 和 SgCht10 属于 IV 类,其余为 III 类。

DNAMAN9 多序列比对结果显示, I 类和 IV 类具有两个高度保守区,这两个保守区由一段富含脯氨酸、甘氨酸和精氨酸的可变交联区(见图 2,虚线下划线所示)相隔开,N 端高度保守区富含半胱氨酸(见图 2,虚线框所示),其作用是几丁质结合,简称 CBD(Chitin-binding domain);C 端是高度保守的催化区,有三个活性位点(见图 2 实线方框所示)。IV 类几丁质酶(SgCht6、SgCht7 和 SgCht10)与 I 类(SgCht11)相比有 4 处缺失(见图 2),氨基酸数目(见表 1)明显比 I 类少。

罗汉果 GH18 家族成员全部是 III 类几丁质酶,它们不含与几丁质结合的富半胱氨酸功能域,而且仅有一个催化结构域,根据活性中心是否是谷氨酸残基分为几丁质酶和类几丁质酶(见图 3,虚线框所示),SgCht1、2、4、8、9、12 和 SgCht15 均有一个谷氨

酸活性中心, SgCht5、SgCht13 缺失了谷氨酸活性中心, 而 SgCht3 和 SgCht14 的活性中性则分别是天冬

氨酸和丙氨酸残基。

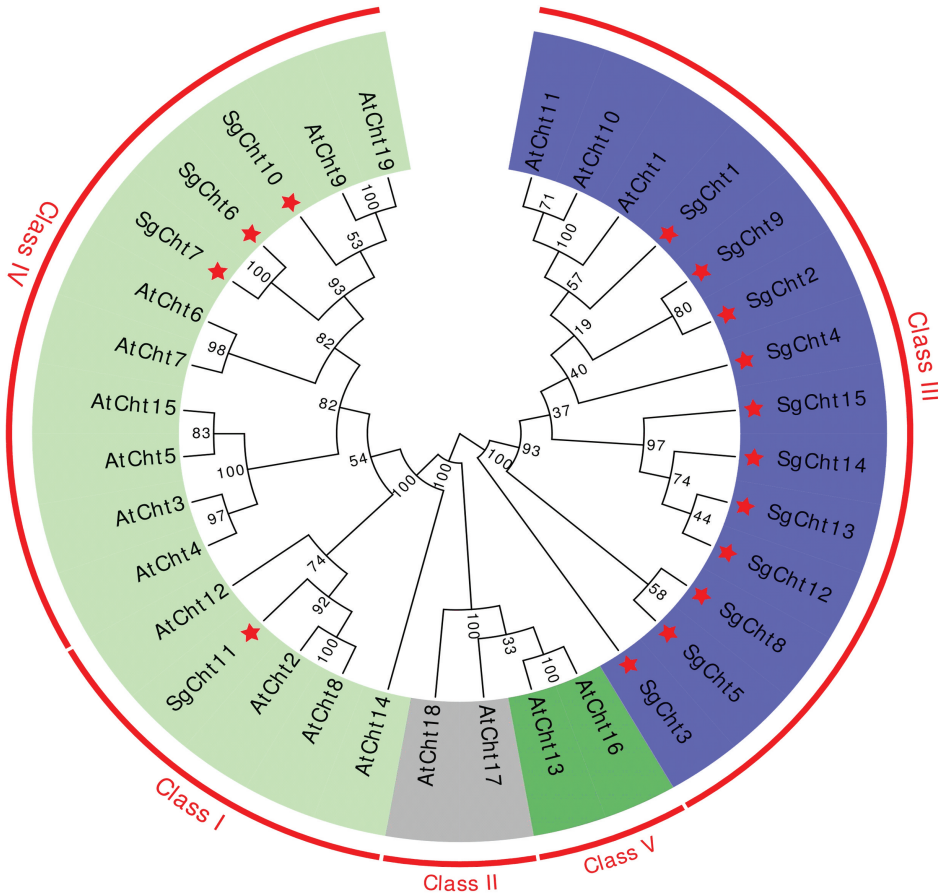


图1 罗汉果与拟南芥几丁质酶的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of chitinases from *Siraia grosvenorii* and *Arabidopsis thaliana*



图2 GH19 基因家族成员保守结构域氨基酸序列比对

Fig.2 Alignment of conserved regions of GH19 amino acid sequences

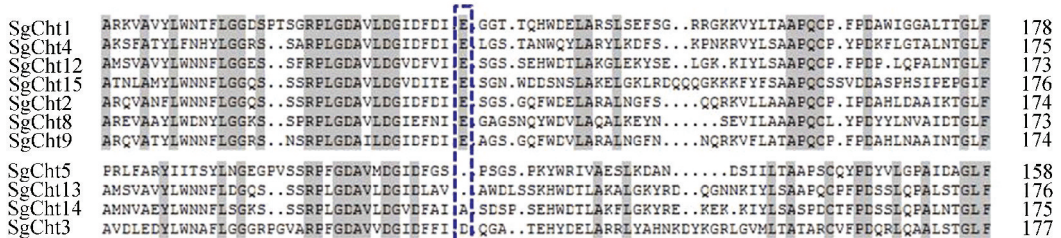


图3 GH18 基因家族成员保守结构域氨基酸序列比对

Fig.3 Alignment of conserved regions of GH18 amino acid sequences

2.4 罗汉果几丁质酶序列结构特点

利用 MEME 5.0.4 软件对 15 个罗汉果几丁质酶的氨基酸序列进行 motif 查找,设置查找 motif 数

目为 6 个,其余参数为默认值,结果如图 4 所示, GH18 家族成员均具有 motif1、motif2 和 motif4;而 GH19 家族成员仅有 motif6。

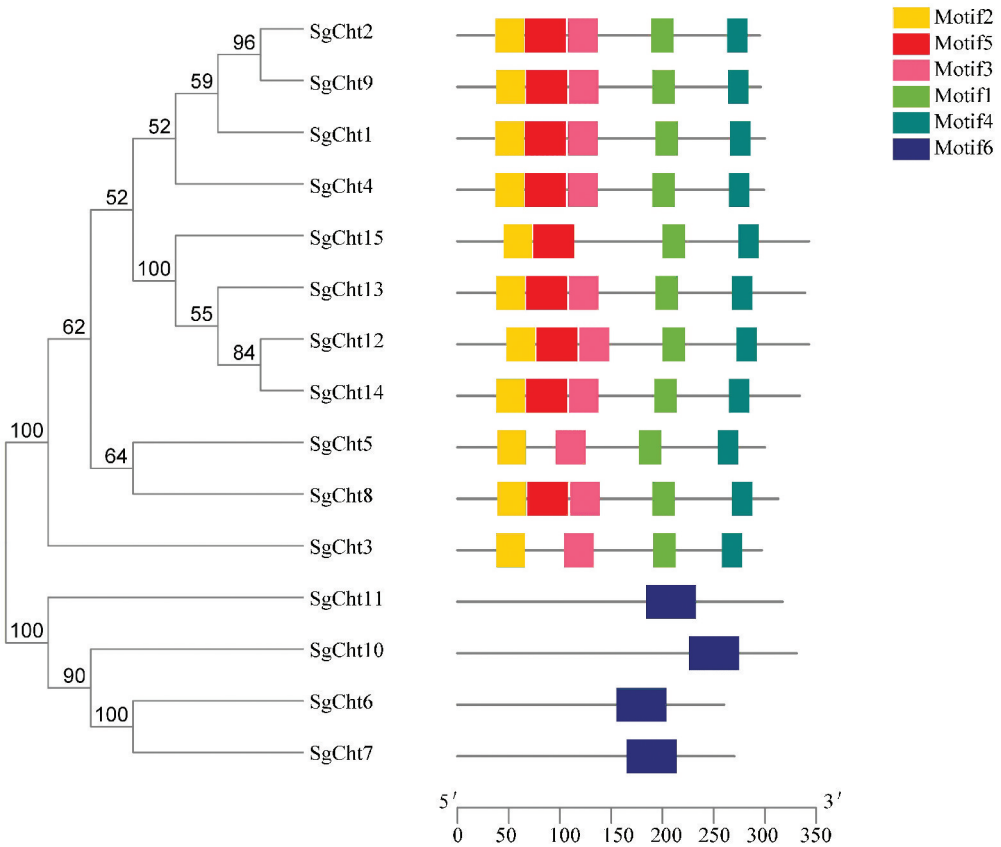
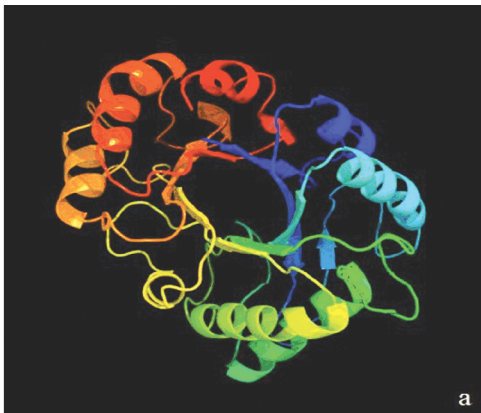


图 4 罗汉果几丁质酶蛋白基序

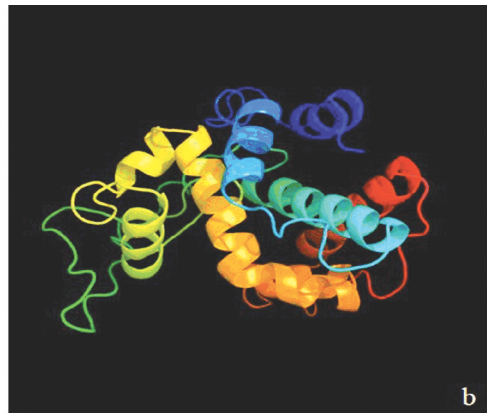
Fig.4 Motifs of chitinase in *Siraitia grosvenorii*

GH18 基因家族成员编码的蛋白质三级结构具有典型的 $(\alpha/\beta)_8$ 桶状结构,即外部为 8 个 α 螺旋域,内部为 8 个平行的 β 折叠域^[24],而 GH19 家族成员仅有 α 螺旋结构域。图 5 显示了罗汉果几丁质酶 GH18 基因家族成员 SgCht12 (见图 5a) 和

GH19 家族成员 SgCht6 (见图 5b) 由 Phyer2 软件预测的三级结构模型。其中,SgCht12 以 c6idnA 结构为模板,有 268 个氨基酸残基与模板达到 100% 的可信度;SgCht6 以 c4mckA 结构为模板,有 199 个氨基酸残基与模板达到 100%的可信度。



(a) SgCht12



(b) SgCht6

图 5 三级结构模型

Fig.5 Tertiary structure of SgCht12 (a) and SgCht6 (b)

3 结论与讨论

罗汉果为广西特有经济植物,但罗汉果植株易感根结线虫病^[3-4],被根结线虫感染后的罗汉果植株更容易被其他病菌的侵害,其中原因未见报道。几丁质是 N-乙酰葡聚胺以 β -1, 4-糖苷键连接起来的直链多聚物,是自然界中含量仅次于纤维素的一大类可再生聚合物,广泛存在于虾、蟹、昆虫、真菌等生物^[25-26]。线虫卵壳及表皮的主要组成成分是几丁质,与真菌病原物一样,植物被线虫侵染时,可诱导产生几丁质酶^[7]。几丁质酶作为病原物和寄主植物相互作用中的一种重要蛋白质,已成为在植物抗病虫害研究中的热点^[5-7]。在植物抗病基因工程中,通过过量表达几丁质酶基因来提高植物抗病性相关研究已有报道^[12,15,27-28]。郭悦等^[12]将克隆到的花生几丁质酶基因 AhChi 进行遗传转化实验验证其生物学功能,结果表明转植株在黑斑病菌接种 7d 时其叶片褐化及坏死程度明显较非转基因植株要轻。谷天燕等^[15]通过两端融合表达几丁质结合结构域的方法不但提高了几丁质酶对 α -几丁质和黑曲霉几丁质的结合能力和活性,同时也增强了其对病原真菌长枝木霉的抑制作用;南相日^[27]的研究结果表明,转菜豆几丁质酶基因的马铃薯抗病性比对照提高了 30%;王果萍等^[28]也发现几丁质酶对镰刀菌引起的西瓜枯萎病有一定的抑制作用。随着对几丁质酶作用机理研究的深入^[29-31],通过现代生物技术手段提高植物对真菌、昆虫、线虫等病害抗性将为有效生物防治提供新途径。本研究采用生物信息学方法从罗汉果根系转录组测序结果中鉴定到 15 个罗汉果几丁质酶基因,并对其编码的蛋白质进行了理化特性预测及系统发育分析,可为罗汉果几丁质酶基因生物学功能的鉴定提供理论基础,为罗汉果的抗病育种提供基因来源参考。本研究对转录组测序结果中的罗汉果几丁质酶基因的表达进行差异分析,结果发现接种根结线虫 7 d, SgCht12 基因和 SgCht14 出现显著性下调表达,分别是未接种根结线虫的 0.17 倍和 0.21 倍,这是否意味着已经被入侵的根结线虫建立了取食位点的罗汉果植株,很有可能由于几丁质酶的表达受到了抑制而导致对其他病菌的侵染更为敏感? 这有待今后对罗汉果几丁质酶的生物学功能进行更深入的研究来进一步确定。

参考文献(References)

[1] 范建华, 梁敏, 刘布鸣. 基于双聚类的近 10 年罗汉果研

究热点可视化分析[J]. 中国中医药信息杂志, 2017, 24(11): 91-95. DOI: 10.3969/j.issn.1005-5304.2017.11.022.

FAN Jianhua, LIANG Min, LIU Buming. Visualization study on hot spots of research on *Siraitiae fructus* in recent ten years based on double clustering analysis[J]. Chinese Journal of Information on TCM, 2017, 24(11): 91-95. DOI: 10.3969/j.issn.1005-5304.2017.11.022.

[2] 万艳娟, 吴军林, 吴清平. 功能性甜味剂罗汉果甜苷的生理功能及食品应用研究进展[J]. 食品与发酵科技, 2015, 51(5): 51-56. DOI: 10.3969/j.issn.1674-506X.2015.05-013.

WAN Yanjuan, WU Junlin, WU Qingping. Advances of physiological functions and application of mogroside[J]. Food and Fermentation Sciences & Technology, 2015, 51(5): 51-56. DOI: 10.3969/j.issn.1674-506X.2015.05-013.

[3] 刘纪霜, 黄金玲, 张正淳, 等. 罗汉果根结线虫病田间发病情况调查及病原鉴定[J]. 广东农业科学, 2011, 38(24): 66-68. DOI: 10.3969/j.issn.1004-874X.2011.24.023.

LIU Jishuang, HUANG Jinling, ZHANG Zhengchun, et al. Investigation in different sites and identified of *Siraitia grosvenorii* root-knot nematode[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2011, 38(24): 66-68. DOI: 10.3969/j.issn.1004-874X.2011.24.023.

[4] 尹庆璋, 梁秀荣, 游玉明, 等. 罗汉果根结线虫病的发生与防治[J]. 广西农学报, 2010, 25(5): 24-25. DOI: 10.3969/j.issn.1003-8779.2005.04.014.

YIN Qingzhang, LIANG Xiurong, YOU Yuming, et al. Occurrence and control of root-knot nematode disease on *Momordica grosvenori* swingle[J]. Journal of Guangxi Agriculture, 2010, 25(5): 24-25. DOI: 10.3969/j.issn.1003-8779.2005.04.014.

[5] 巩凯玲, 陈双慧, 纪晓晨, 等. 植物几丁质酶的研究进展[J/OL]. 分子植物育种, 2018, <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20181121.1005.004.html>.

GONG Kailing, CHEN Shuanghui, JI Xiaochen, et al. The research progress of plant chitinases[J/OL]. Molecular Plant Breeding, 2018, <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20181121.1005.004.html>.

[6] ASHISH M, PREET Y. Purification and properties of plant chitinases: A review[J]. Journal of Food Biochemistry, 2019, 43(3): e12762. DOI: 10.1111/jfbc.12762.

[7] 吴海燕, 段玉玺. 几丁质酶与大豆抗胞囊线虫关系初步研究[J]. 植物病理学报, 2004, 34(6): 555-557. DOI: 10.3321/j.issn:0412-0914.2004.06.013

WU Haiyan, DUAN Yuxi. Interaction of chitinase isozyme and soybean resistant to *Heterodera glyeines*[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2004, 34(6): 555-557. DOI: 10.3321/j.issn:0412-0914.2004.06.013.

[8] 贺哲, 王园秀, 张圣洁, 等. 猕猴桃几丁质酶基因克隆

- 及生物信息学分析[J]. 江西农业大学学报(自然科学版), 2018, 40(6): 1241-1247. DOI: 10.13836/j.jjau.2018156.
- HE Zhe, WANG Yuanxiu, ZHANG Shengjie, et al. An analysis of cloning and bioinformatics of chitinase gene from kiwi fruit[J]. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis (Natural Sciences Edition), 2018, 40(6): 1241-1247. DOI:10.13836/j.jjau.2018156.
- [9] LI Chen, LI Xiaoping, BAI Chengzhi, et al. A chitinase with antifungal activity from naked oat (*Avena chinensis*) seeds[J]. Journal of Food Biochemistry, 2019, 43(2): e12713. DOI:10.1111/jfbc.12713.
- [10] 李伟阳, 曾斌, 李疆, 等. 梨几丁质酶基因克隆及其生物信息学分析[J]. 中国农学通报, 2015, 31(9): 184-193. DOI:10.11924/j.issn.1000-6850.casb14120083.
- LI Weiyang, ZENG Bin, LI Jiang, et al. Cloning of pear chitinase gene and bioinformatics analysis [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2015, 31(9): 184-193. DOI:10.11924/j.issn.1000-6850.casb14120083.
- [11] 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[J]. 热带作物学报, 2017, 38(5): 894-905. DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2017.05.018.
- ZHU Chen, ZHANG Shuting, CHANG Xiaojun, et al. Cloning and its expression analysis of chitinase under drought stress in *Camellia sinensis*[J]. Journal of Tropical Crops, 2017, 38(5): 894-905. DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2017.05.018.
- [12] 郭悦, 姜平平, 潘雷雷, 等. 花生几丁质酶基因的克隆及抗病性验证[J]. 华北农学报, 2018, 33(6): 42-48. DOI:10.7668/hbxb.2018.06.006.
- GUO Yue, JIANG Pingping, PAN Leilei, et al. Cloning and disease resistance verification of chitinase gene in peanut[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2018, 33(6): 42-48. DOI: 10.7668/hbxb.2018.06.006.
- [13] NEUHAUS J M, FRITIG B, LINTHORST H J M, et al. A revised nomenclature for chitinase genes[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1996, 141(2): 102-104.
- [14] UBHAYASEKERA W, RAWAT R, HO S W T, et al. The first crystal structures of a family 19 class IV chitinase: The enzyme from Norway spruce[J]. Plant Molecular Biology, 2009, 71(3): 277-289. DOI:10.1007/s11103-009-9523-9.
- [15] 谷天燕, 刘晓楠, 李玲聪, 等. 融合表达几丁质结合结构域提高几丁质酶抗真菌活性[J]. 微生物学报, 2018, 58(12): 1-10. DOI:10.13343/j.cnki.wsb.20180418.
- GU Tianyan, LIU Xiaonan, LI Lingcong, et al. Enhance antifungal activity of chitinase by fusion of chitin binding domain at both terminus [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2018, 58(12): 1-10. DOI: 10.13343/j.cnki.wsb.20180418.
- [16] ZHAO Xiaobo, LI Chunjuan, YAN Caixia, et al. Transcriptome and proteome analyses of resistant preharvest peanut seedcoat in response to *Aspergillus flavus* infection [J]. Electronic Journal of Biotechnology, 2019, 39(5): 82-90. DOI:10.1016/j.ejbt.2019.03.003.
- [17] GOYER A, HAMLIN L, CROSSLIN J M, et al. RNA-Seq analysis of resistant and susceptible potato varieties during the early stages of potato virus Y infection[J]. BMC Genomics, 2015, 16(1): 472. DOI: 10.1186/s12864-015-1666-2.
- [18] AN Jing, SHEN Xuefeng, MA Qibin, et al. Transcriptome profiling to discover putative genes associated with paraquat resistance in goosegrass (*Eleusine indica* L.) [J]. PLoS One, 2014, 9(6): e99940. DOI: 10.1371/journal.pone.0099940.
- [19] JAIN S, CHITTEM K, BRUEGGENMAN R, et al. Comparative transcriptome analysis of resistant and susceptible common bean genotypes in response to soybean cyst nematode infection [J]. PLoS One, 2016, 11(7): e0159338. DOI:10.1371/journal.pone.0159338.
- [20] NEJAT N, CAHILL D, VADAMALAI G, et al. Transcriptomics-based analysis using RNA-Seq of the coconut (*Cocos nucifera*) leaf in response to yellow decline phytoplasma infection [J]. Molecular Genetics and Genomics, 2015, 290(5): 1899-1910. DOI: 10.1007/s00438-015-1046-2.
- [21] EMANUELSSON O, NIELSEN H, BRUNAK S, et al. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence [J]. Journal of Molecular Biology, 2000, 300(4): 1005-1016. DOI: 10.1006/jmbi.2000.3903.
- [22] YU Chinseng, CHEN Yuching, LU Chihhao, et al. Prediction of protein subcellular localization [J]. Proteins, 2006, 64(3): 643-651. DOI:10.1002/prot.21018.
- [23] KELLY L A, MEZULIS S, YATES C M, et al. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis [J]. Nature Protocol, 2015, 10(6): 845-858. DOI: 10.1038/nprot.2015.053.
- [24] HAI L, GREENE L H, HAIBING L. Sequence and structural analysis of the chitinase insertion domain reveals two conserved motifs involved in chitin-binding [J]. PLoS One, 2010, 5(1): e86542010. DOI: 10.1371/journal.pone.0008654.
- [25] 谢树章, 刘亚娟, 秦平伟, 等. 植物几丁质酶及应用研究进展 [J]. 安徽农学通报, 2009, 15(8): 58-61. DOI: 10.3969/j.issn.1007-7731.2009.08.031.
- XIE Shuzhang, LIU Yajuan, QIN Pingwei, et al. Progress on research of plant chitinase and its application [J]. Anhui Agricultural Science Bulletin, 2009, 15(8): 58-61. DOI:10.3969/j.issn.1007-7731.2009.08.031.
- [26] 赵和. 几丁质酶与植物抗病 [J]. 河北农业科学, 2004,

- 8(2):78-84. DOI:10.3969/j.issn.1088-1631.2004.02.019.
- ZHAO He. Chitinases and plant protection[J]. Journal of Hebei Agricultural Sciences,2004,8(2):78-84. DOI:10.3969/j.issn.1088-1631.2004.02.019.
- [27]南相日. 菜豆几丁质酶基因转化马铃薯及后代表达[J]. 中国农学通报,2006,22(2):75-77. DOI:10.3969/j.issn.1000-6850.2006.02.020.
- NAN Xiangri. Transformation and expression of chitinase in potato[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin,2006,22(2):75-77. DOI:10.3969/j.issn.1000-6850.2006.02.020.
- [28]王果萍,王景雪,孙毅,等. 几丁质酶基因导入西瓜植株及其抗病性鉴定研究[J]. 植物遗传资源学报,2003,4(2):104-109. DOI:10.3969/j.issn.1672-1810.2003.02.004.
- WANG Guoping, WANG Jingxue, SUN Yi, et al. Transformation of watermelon plants with chitinase gene and evaluation for fusarium wilt resistance[J]. Journal of Plant Genetic Resources,2003,4(2):104-109. DOI:10.3969/j.issn.1672-1810.2003.02.004.
- [29]王曦苗,汪来发,孟繁丽,等. 淡紫拟青霉 T-DNA 插入突变体几丁质酶和蛋白酶活性及致病力的变化[J]. 四川农业大学学报,2015,34(1):78-84. DOI:10.16036/j.issn.1000-2650.2016.01.014.
- WANG Xizhuo, WANG Laifa, MENG Fanli, et al. Changes in protease and chitinase of T-DNA insertional mutants of *Paecilomyces lilacinus* and their pathogenicity against *Meloidogyne incognita*[J]. Journal of Sichuan Agricultural University,2015,34(1):78-84. DOI:10.16036/j.issn.1000-2650.2016.01.014.
- [30]罗晶晶,张仁英,齐晓花,等. 黄瓜几丁质酶基因克隆及与白粉病抗性关系的初步研究[J]. 分子植物育种,2015,13(7):1584-1591. DOI:10.13271/j.mpb.013.001584.
- LUO Jingjing, ZHANG Renying, QI Xiaohua, et al. A preliminary study on cloning of chitinase gene and relationships to resistance of powdery mildew in cucumber (*Cucumis Sativus* L.) [J]. Molecular Plant Breeding,2015,13(7):1584-1591. DOI:10.13271/j.mpb.013.001584.
- [31]李雪艳,张涛,杨红梅,等. 棉花黄萎病拮抗细菌胞外酶检测及其酶活测定[J]. 新疆农业科学,2018,55(9):1663-1673. DOI:10.6048/j.issn.1001-4330.2018.09.012.
- LI Xueyan, ZHANG Tao, YANG Hongmei, et al. Detection of extracellular enzymes of antagonizing cotton verticillium wilt bacteria and determination of enzyme activity[J]. Xinjiang Agricultural Sciences,2018,55(9):1663-1673. DOI:10.6048/j.issn.1001-4330.2018.09.012.