

真菌源几丁质酶在植物抗真菌病害中的应用

程笑笑, 冯自力, 冯鸿杰, 赵丽红, 师勇强, 李志芳*, 朱荷琴*

(棉花生物学国家重点实验室/中国农业科学院棉花研究所, 安阳 455000)

摘要 几丁质酶可以降解大多数真菌细胞壁, 阻止或中断真菌在植物体内的侵染、定殖和扩展, 在抗真菌病害的研究方面受到广泛关注。本文综述了真菌源几丁质酶的特性, 对真菌的抑制作用机制, 转几丁质酶基因植株的抗性评价, 产几丁质酶菌株和相关制剂在生物防治方面的应用, 并对其在生产上的发展前景进行了展望。

关键词 几丁质酶基因; 植物真菌病害; 抗病转基因

中图分类号: S 476.19 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn.0529-1542.2017.03.005

Applications of fungal chitinase in the fungal disease-resistant plants

Cheng Xiaoxiao, Feng Zili, Feng Hongjie, Zhao Lihong, Shi Yongqiang, Li Zhifang, Zhu Heqin

(State Key Laboratory of Cotton Biology/Institute of Cotton Research of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Anyang 455000, China)

Abstract Chitinase, which can degrade most fungal cell walls, prevent or interrupt the fungal infection, colonization and expansion in plants, has attracted a lot attention in fungi disease resistance. In this paper, we reviewed the characteristics of chitinase originated from fungi, the inhibition mechanism to fungi, the resistance evaluation of the transgenic plants, the application of chitinase-producing strains and related products in the biological control, and prospects for the development in the future.

Key words chitinase gene; plant fungal disease; resistant transgenic plant

几丁质在自然界中广泛存在, 又称甲壳素, 化学名称为(1,4)-2-乙酰氨基-2-脱氧- β -D-葡萄糖, 是由N-乙酰氨基葡萄糖通过 β -1,4-糖苷键连接而成的含氮多糖类生物性高分子^[1]。作为天然高分子, 几丁质在地球上的蕴藏量仅次于纤维素, 位居第二位。其主要来源于甲壳类动物的外壳、软体动物的器官、藻类和真菌细胞壁等等。真菌细胞壁的3%~60%是由几丁质构成的^[2], 几丁质以微纤丝的形式错落包埋于其基质中^[3], 可以被几丁质酶催化水解生成N-乙酰葡糖胺。

几丁质酶是几丁质生物降解过程中的关键酶, 广泛存在于各种生物中, 并参与其中的多种生理生化过程^[4-5]。几丁质酶水解几丁质后产生的生物活性物质几丁寡糖被广泛应用在农、医、化工、食品、环境保护等多个领域。真菌几丁质酶作为几丁质酶的重要成员, 主要应用于生物防治植物病害或转基因抗性育种。从广泛的真菌资源中克隆出新的几丁质酶基因, 并研究其体外表达产物的酶学性质以及对

真菌的抑制和抗病相关活性对于植物病害的生物防治和转基因植物抗病的研究具有重要意义。

1 几丁质酶及其特性

1905年, Benecke首次报道了微生物溶几丁质芽胞杆菌 *Bacillus chitinourous* 能够以几丁质作为营养物质^[6], Karrer和Hofinann在蜗牛胃液中发现能水解几丁质的几丁质酶^[7], 随后人们逐渐关注并研究微生物几丁质酶。

目前, 发现能产几丁质酶的微生物约有46个属近70种, 其中真菌有绿色木霉 *Trichoderma viride*、哈茨木霉 *T. harzianum*、淡紫拟青霉 *Paecilomyces lilacinus*、枯草毛霉 *Mucor subtilissimus*、米曲霉 *Aspergillus oryzae*、烟曲霉 *Aspergillus fumigatus*、球孢白僵菌 *Beauveria bassiana*、季也蒙假丝酵母 *Candida guilliermondii*、橄榄假丝酵母 *Candida oleophila*、疏绵状嗜热丝孢菌 *Thermomyces lanuginosus*

收稿日期: 2016-07-05 修订日期: 2016-08-29

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(201503109)

* 通信作者 E-mail: lizhifang2009@163.com; zhuheqin2012@163.com

等等,它们都是应用广泛的重要生防菌^[8-12]。

根据在底物上作用位置不同可以把几丁质酶分为内切几丁质酶和外切几丁质酶。其中内切几丁质酶作用于同聚物内部 β -1,4-糖苷键,随机剪切内部的糖苷键,产生几丁单糖和几丁二糖等;外切几丁质酶则作用于同聚物线性末端 β -1,4-糖苷键,剪切几丁质链的非还原末端,产生几丁单糖。分析位于催化区的氨基酸序列,根据其氨基酸序列的同源性可以把几丁质酶分为18、19和20家族。18家族的几丁质酶大部分来源于细菌、真菌、病毒及少数植物。其中位于18家族 β 3和 β 4链上的两段氨基酸序列是高度保守的,其催化区含有2个Asp和1个Glu,可能是活性位点的关键氨基酸。18家族几丁质酶的水解产物为 β 异构体^[13]。19家族的几丁质酶大部分来源于植物和部分链霉菌属真菌,水解产物是 α 异构体。18家族和19家族的几丁质酶的氨基酸序列没有同源性。20家族的几丁质酶则基本上来源于链霉菌属真菌与人类^[14]。然而在最近几年少数几丁质酶也被鉴定为属于23家族和48家族^[15]。

虽然不同来源几丁质酶之间的分子量差异比较大,但真菌源几丁质酶大都具有相似的结构域。一般具有信号肽序列,几丁质酶催化域,几丁质结合域以及一个短的C端区域。催化域负责几丁质的水解,是几丁质酶主要功能区,且高度保守,两个保守结构域分别为LISSGGW和DG-D-DWE^[16],另外,在催化域还有6个Cys残基参与了活性区的折叠。几丁质结合区域主要负责与几丁质结合,使催化域更好地发挥水解作用。真菌几丁质酶的几丁质结合区主要含有色氨酸残基(W),与此不同的是,植物的该区域主要含有半胱氨酸残基(C)^[17]。目前还不太清楚几丁质酶C端区域的作用。有报道20个氨基酸在*Altermonas* sp. strain O-7的C端序列形成一个疏水核,酶蛋白通过细胞膜时这个疏水核起着重要作用^[18]。真菌和酵母的几丁质酶都还含有一个富含丝氨酸或苏氨酸的区段,这个区段的作用可能也与酶的催化作用相关^[19]。

阻遏物和诱导物能够双向调控真菌几丁质酶基因的表达,一些易被利用的碳源如葡萄糖常起到阻遏的作用,而起诱导作用的一般为几丁质或其降解产物。用纯化的几丁质或植物病原真菌(如立枯丝核菌*Rhizoctonia solani*和灰葡萄孢*Botrytis cinerea*)细胞壁作唯一碳源,可在离体条件下诱导木霉

产生几丁质酶;相反,纤维素、脱乙酰壳多糖不仅不能诱导产生几丁质酶,还会阻遏几丁质酶合成。海洋酵母*Rhodospiridium paludigenum*在常规培养条件下几丁质酶表达量少,但是经由几丁质底物的诱导,该酶的表达量大幅增加,生防效果显著提高^[20]。有研究者推测几丁质酶基因的诱导表达可能与物理性接触细胞表面不溶性底物有关。几丁质酶的诱导也受到RNA合成抑制剂8-羟基喹啉和蛋白质合成抑制剂放线菌酮的抑制,所以认为几丁质酶的诱导是从头合成的,要经过转录翻译的过程^[21]。绿僵菌几丁二糖酶的表达不受代谢抑制物的影响,它伴随几丁质酶的表达而表达,几丁二糖酶降解N-乙酰葡萄糖胺后的产物N-乙酰氨基葡萄糖可作为几丁质酶的诱导物。这可以解释在几丁质酶活性低情况下为什么依然可以积累几丁质还原糖,这种调节模式的特殊之处在于它是通过一种酶的表达实现对另一基因的调控。几乎所有真菌产生几丁质酶时都受到葡萄糖的抑制,真菌几丁质酶基因的调控涉及分解代谢物阻遏机制,而阻遏物和诱导物系统能够防止几丁质酶的过量表达对微生物自身造成伤害^[22]。

2 几丁质酶抑菌作用机制

在病原真菌中,几丁质是构成细胞壁的主要成分,其中子囊菌、担子菌和半知菌的细胞壁以几丁质和葡聚糖为主,接合菌的细胞壁则富含几丁质和聚氨基葡萄糖。几丁质酶作用于真菌的细胞壁后降解几丁质释放出还原糖,充分证明了几丁质酶对真菌的抑制作用是发生在细胞壁上,通过破坏真菌细胞壁骨架,影响真菌形态建成、生长发育和致病力等^[23]。

细胞壁是植物病原真菌进入寄主植物并与之直接接触的先锋结构^[24],免疫化学技术直接证明了几丁质酶与真菌细胞壁间的作用^[25]。Mitchell发现所有能裂解真菌细胞壁的细菌菌株都含有几丁质酶,这些细菌能在仅以几丁质作为碳源的培养基上正常生长,而细胞壁中无几丁质成分的真菌则不能被裂解^[26]。几丁质酶除了对真菌细胞壁有明显降解作用外,还可以抑制孢子萌发、菌丝生长、芽管伸长等发育活动^[27]。Toyoda等纯化得到了来自灰霉素链霉菌*Streptomyces griseus*的外源几丁质酶,分别用其处理离体和活体的大麦胚芽鞘,发现正在发育的大麦白粉菌*Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*吸器

完全消解,已经发育成熟的病菌吸器的形状虽未改变但菌丝的伸长和次生菌体的形成受到抑制^[28]。Benhamou 等观察到木霉的几丁质酶可有效裂解完整小核菌 *Sclerotium rolfii* 菌丝体,不仅能够通过水解菌丝顶端生长区域新合成的几丁质破坏菌丝端部的生长,还可降解成熟的菌丝、分生孢子、厚垣孢子等含有几丁质的组织,从而抑制其生长^[29-30]。

细胞化学技术和电镜技术的应用进一步阐明了几丁质酶的抑菌机理。病原真菌细胞壁在几丁质酶的作用下发生扭曲、变形,之后出现菌丝细胞壁肿胀裂解,细胞质聚集、原生质体外溢或裸露等异常现象,这些强烈的破坏作用使其不能正常生长^[31]。因此,几丁质酶具有抑制植物病原菌生长繁殖的功能,可有效从源头减弱或阻止其对寄主的侵染。

3 几丁质酶的生防应用

与植物相比,微生物具有生长周期短、便于生产、易于研究的特点,因此将真菌几丁质酶应用于植物病原真菌的生物防治具备了良好的潜力。用对多种植物病原真菌有显著抑制作用的链霉菌 S01 菌株外源表达的几丁质酶处理病原菌,病原菌菌丝产生了扭曲变形,细胞质聚集、外溢的异常现象^[32]。经过基因工程改造的重组几丁质酶具有良好的生防潜能,可有效抑制灰霉、根霉、毛霉和拟茎点霉的孢子萌发,当酶液浓度达到 0.4% 时,抑制率可达 91% 以上^[33]。粉红聚端孢 *Trichothecium roseum* 经由 SMCS 诱导产生的胞外几丁质酶对烟草赤星病菌 *Alternaria alternata*、串珠镰刀菌 *Fusarium moniliforme*、稻瘟病菌 *Magnaporthe oryzae*、棉花黄萎菌 *Verticillium dahliae* 都有不同程度的抑制作用,其中对棉花黄萎菌的抑制作用最强^[34]。链孢黏帚霉 *Gliocladium catenulatum* 分泌的几丁质酶除对小麦雪腐病、葡萄白腐病、玉米黄斑病及斑点落叶病等的病原菌孢子萌发具有明显的抑制作用外,还能明显抑制核盘菌 *Sclerotinia sclerotiorum* 和立枯丝核菌 *Rhizoctonia solani* 的菌核萌发,抑菌谱宽^[35]。源自链孢黏帚霉 HL-1-1 菌株的几丁质酶 Gc CHI1 可以明显抑制立枯丝核菌、油菜菌核病菌 *Sclerotinia sclerotiorum*、番茄灰霉病菌 *Botrytis cinerea* 等多种植物病原真菌的菌丝生长、孢子萌发和菌核萌发^[36]。利用不同几丁质酶的协同作用,从理论上可获得抑菌谱更广泛、抑菌效果更加明显的生防菌株。富

集几丁质酶的链霉菌和芽胞杆菌菌株混合发酵液对黄瓜枯萎病菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*、产黄青霉 *Penicillium chrysogenum*、棉花枯萎病菌 *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*、小麦全蚀病菌 *Gaeumannomyces graminis*、绿色木霉 *T. viride*、黄瓜黑星病菌 *Cladosporium cucumerinum* 和啤酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 起到不同程度的抑制作用,也具有一定广谱性^[37]。

几丁质酶作为真菌细胞壁降解酶类的重要成员,是研究丝状真菌和寄主植物相互作用的模式蛋白之一,具有良好的生防潜能,已成为该领域的研究热点^[38]。大部分产几丁质酶的真菌可以直接或者间接抵御多种病原真菌对植物的侵染,体外表达的真菌源几丁质酶对真菌的生长也有抑制作用,且都具有较为广泛的抑菌谱,生防功效良好。

4 转几丁质酶基因植物与抗病性

几丁质酶作为激发子可以直接启动植物防御反应,也可以通过其降解真菌细胞壁产生的次生代谢产物(几丁单糖和几丁二糖等)诱导植物细胞做出系列防御反应,启动植物系统获得抗性反应,使植物体内病程相关蛋白(pathogenesis related protein)含量升高,提高抗病防御酶类活性,产生抗菌代谢产物(植保素和芳香族化合物等);坚固机械屏障,提高木质化程度,从而减少或阻止病原菌的成功侵染和扩散,提高植物抗病性^[39-40]。

几丁质酶作为直接由基因编码的抗菌蛋白,其基因是利用遗传工程技术进行抗病育种和提高生防菌对病原菌抑制作用的一个理想目标基因。转外源几丁质酶基因植物对某些病原的抗性增强。将植物源几丁质酶基因转化到水稻、甜菜、大豆、马铃薯等受体植物中,获得的转基因植物不仅对真菌病害具有一定的抗性,而且还对植物线虫、昆虫和其他一些病原物具有抗性^[41]。鉴于不同几丁质酶作用位点的不同和催化区氨基酸排列多样性,几丁质酶对底物呈现出不同的偏好性^[12-13],与植物源和细菌源的几丁质酶相比,真菌几丁质酶对真菌细胞壁中几丁质的靶向性强,其转基因植物对靶标真菌病害和非靶标病害均呈现出高效而广谱的抗性,同时通过诱导系统获得抗性而提高植物自身的抗病性,可以更好地应用于转基因抗病育种^[42]。将深绿木霉 *T. atroviride* 的 *ech 42* 基因导入到烟草和马铃薯

中,转基因植株高抗立枯丝核菌 *R. solani*、链格孢 *Alternaria* spp. 和灰葡萄孢 *B. cinerea*, 抗性优于细菌源或植物源几丁质酶的转基因株系^[43]。菌寄生真菌粉红聚端孢几丁质酶基因 *trchi1* 作为优质抗性诱导基因被应用于多种植物,转 *trchi1* 基因烟草对烟草赤星病和炭疽病抗性显著提升,转 *trchi1* 基因水稻植株对立枯丝核菌达到高抗级别^[42-44]。与其他几丁质酶相比,内切几丁质酶具有更高的裂解活性和抗真菌活性^[45],在主要通过合成内切几丁质酶来提高植物抗病性的木霉中应用较为频繁。转哈茨木霉内切几丁质酶基因的苹果增强了对苹果疮痂病的抗性^[46]。在转木霉几丁质酶 *Th En-42* 基因烟草中,内切几丁质酶基因的表达显著提高了受体植物对多种病原真菌的抗性,转 *Th En-42* 基因水稻对纹枯病的抗性级别也明显提高^[45-47]。转木霉几丁质酶基因 *chit42* 的马铃薯中,内切几丁质酶的表达显著提高了受体植物对番茄早疫病和纹枯病的抗性^[48]。转木霉几丁质酶基因的粳稻对水稻纹枯病和稻瘟病的抗性也得到了增强^[49]。

除了将高活性的外源几丁质酶基因转入植物体以构建能表达高活力几丁质酶的转基因植物,也有通过改造菌体如导入高效启动子以增加几丁质酶基因的表达量。汤浩茹等构建了 pBin19ESR 载体,其含烟草花叶病毒 35S 双启动子和苜蓿花叶病毒引导序列控制下抗新霉素磷酸转移酶基因 (*npt II*) 和哈茨木霉几丁质酶基因 (*Th En-42*),获得的整合有 *Th En-42* 基因的转基因核桃的几丁质酶活性比对照高几十至几千倍^[50]。转基因植株抗性的提高程度与其所表达的几丁质酶活性也大都呈现正相关。转内切几丁质酶基因 *ech42* 的苹果对苹果黑星病的抗性与内切几丁质酶活性呈显著正相关^[51]。转 *Th En-42* 的粳稻品种,其内切几丁质酶活性水平相比非转基因对照有大幅提高,也显著增强了对稻瘟病和纹枯病的抵御能力^[52]。编码哈茨木霉内切几丁质酶基因 *Chi18-12* 的转录丰度比 *Chi18-5* 的转录丰度高,但是整体几丁质酶活性远高于 *Chi18-12*,这两种内切几丁质酶基因在秀丽隐杆线虫卵寄生过程中以协同增效的方式发挥着重要作用^[53]。

共转化几丁质酶基因、其他真菌细胞壁水解酶基因或者植物自身防卫基因,获得具备更强、更稳定、更广谱抗性的双价或多价转基因植株将会是未来的发展方向。Sharad 等得到转内切几丁质酶基因 *ech42* 和内切葡聚糖酶基因 *bgn* 的番茄,与非转

基因对照相比,被番茄早疫病菌感染的叶面积显著降低,对齐整小核菌的防控效率高达 83.4%,表现出了良好的抗性^[54]。

理论上,似乎任何细胞壁含几丁质的真菌都可被几丁质酶部分降解,但是研究发现来源不同的几丁质酶的抑菌作用具有选择性:几丁质酶只对一部分真菌具有明显的抑制作用而对另一些真菌则没有抑制作用。真菌细胞壁结构的差异、几丁质所占比例的不同、几丁质暴露程度的差异、真菌体内 β -1,3-葡聚糖酶调节因子的作用、外源基因的类型、不同的植物种类、基因的表达水平或其他因子的作用都有可能影响几丁质酶抑菌效果及选择性,因此有必要对此再作深入研究,以扩大几丁质酶抑菌谱^[55]。

植物具有各种防御机制,以抵抗病原菌侵染。植物与病原菌互作的第一步为基于受体识别的微生物/病原相关分子模式 (microbe/pathogen associated molecular patterns, MAMPs/PAMPs) 激发的免疫反应,植物通过细胞表面受体 (pattern recognition receptors, PRRs) 识别病原菌的 PAMPs 而启动植物的防卫反应^[56-58]。几丁质或可溶性几丁质寡糖是潜在的 MAMPs^[59],几丁寡糖被高度保守的模式识别受体 (PRRs) 和受体蛋白 (RLPs) 介导与植物受体结合。在水稻中第一个被报道响应几丁质的免疫受体是几丁质激发子结合蛋白 (OsCEBiP)^[60],随后,OsCEBiP 的同源二聚体——几丁质激发子受体激酶 (chitin elicitor receptor kinase) (OsCERK1) 触发 Rac1 鸟嘌呤核苷酸交换因子 (OsRacGEF1) 的磷酸化^[61],通过小的 GTP 酶 Rac1 激发 MAPK 级联反应,启动活性氧迸发,促进防御酶类的积累,诱导抗性相关蛋白的表达,从而使得植物产生系统获得抗性^[62]。

虽然目前对防御机制相关研究取得了一定进展,但是对胞外因子诱导免疫机制的理解仍不全面。如:病原真菌是如何感知和应答植物被诱导产生的免疫反应? 如何行使真菌源激发子的功能,并与植物病程相关蛋白 (pathogenesis-related protein) 互动,营造互赢的共处模式? 植物病原真菌如何高效合理使用几丁质酶对抗异己、实现细胞壁再生,同时又保护细胞壁完整性^[24]? 这些还有待于进一步研究。

5 几丁质酶制品

几丁质酶作为对抗植物病原真菌的生物农药,也可作为农药增效剂与其他成分混配。如粘帚绿木

霉几丁质酶和葡聚糖苷酶组合使用,或与生物性抗真菌物和化学杀真菌剂混用有增效抗菌作用。

许多研究者致力于筛选表达高活性几丁质酶的生防菌种,或应用生物技术以改良菌种。例如,使可产生几丁质酶的木霉菌 *Trichoderma* sp. 与土壤优势植物病原菌的寄生菌 *T. hamatsuma* 融合,利用原生质体融合技术使后者具生产几丁质酶能力^[63]。陈振明等曾通过原生质体转化的方法把来自绿色木霉的内切几丁质酶基因的启动子和 mRNA 的编码区与来自构巢曲霉的色氨酸启动子相连,然后导入球壳毛壳菌 CG10 来改造生防菌^[64]。将纤维素基因 *cbhl* 1 启动子与深绿木霉几丁质酶基因 *Th En-42* 融合后转入本身无几丁质酶活性的里氏木霉 RutC-30 中,结果 *Th En-42* 过度表达,转化子产生的活性酶产量为基因供体菌产量的 20 倍(猜测可能是由于缺乏负调节机制),达 130 mg/L,可作为几丁质酶工业化生产用的菌种^[65]。

由于几丁质是真菌细胞壁的重要组成成分,而真菌生产条件相对简单、周期短,因而成为生产几丁质潜在的新来源和研究热点。目前已从多种真菌如:酿酒酵母、白色扁丝霉、构巢曲霉、白僵菌、少孢根霉、哈茨木霉、玫烟色棒束孢等中分离出几丁质酶^[66-69],并优化了几丁质酶提取工艺,获得可以直接应用于生产的高产、高活性几丁质酶制剂^[70]。

也有研究者提出利用毕赤酵母表达系统来分析或表达真核蛋白,一方面能使某些蛋白糖基化更加稳定,另一方面也可将外源基因产生的蛋白质分泌到培养基中,便于产品的分离纯化^[71]。此外,几丁质酶还可以有效用于制备真菌原生质体。真菌原生质体在研究酶的定位、超微结构以及细胞壁的再生等方面有着非常重要的作用^[72];并且还可以用于临床真菌早期感染检测,目前已经提出了利用放射性标记几丁质酶和几丁质结合蛋白来作为真菌感染的早期检测方法^[73]。

基因重组的微生物具有生产方便、靶标菌不易产生抗性等优点,因此今后应筛选出产酶量高且适合工业化生产的基因工程菌及表达系统,研究最佳发酵工艺,探索使酶活稳定的方法,加工成适用剂型,从而推动我国几丁质酶制剂的研究,使其更快、更好地为农业服务。

6 问题与展望

几丁质酶研究已成为几丁质科学中的一个重要

分支,尤其是其酶解产物对环境友好安全,预示着良好的应用前景。目前,尽管有关真菌几丁质酶及其在植物真菌病害防治中的作用报道较多,但由于几丁质酶抑菌作用的选择性,离生产上广泛性应用的要求还有一定距离。此外,常温真菌产生的几丁质酶量少、稳定性差,在田间的应用受到限制。工程菌和转基因植物的安全性一直是人们十分关注的问题,还需要对转几丁质酶基因工程菌和转基因植物进行环境安全性评价。相信随着发酵技术和基因工程技术的发展,真菌源几丁质酶将在植物真菌病害生物防治中发挥更大的作用。

参考文献

- [1] Flach J, Pilet P E, Jollès P. What's new in chitinase research? [J]. *Experientia*, 1992,48(8):701-716.
- [2] Bell A E, Charlwood B V. Encyclopedia of plant physiology new series. volume 8. Secondary plant products [M]. Oxford University Press, 1981.
- [3] 蒋选利,李振岐,康振生,等.几丁质酶与植物的抗病性[J]. *西北农业学报*, 2002,11(3):71-75.
- [4] 陈三凤,李季伦.几丁质酶研究历史和发展前景[J]. *微生物学通报*, 1993(3):156-160.
- [5] Koby S, Schickler H, Ilan C, et al. The chitinase encoding Tn7-based *chiA* gene endows *Pseudomonas fluorescens* with the capacity to control plant pathogens in soil [J]. *Gene*, 1994,147(1):81-83.
- [6] Benecke W. über *Bacillus chitinovor*, einen chitin zersetzenden Spaltpilz [M]. *A. Felix*, 1905,63:227.
- [7] Karrer P, Hofmann A. Polysaccharide XXXIX. über den enzymatischen Abbau von chitin und chitosan I [J]. *Helvetica Chimica Acta*, 1929,12(1):616-637.
- [8] 徐同,柳良好.木霉几丁质酶及其对植物病原真菌的拮抗作用[J]. *植物病理学报*, 2002,32(2):97-102.
- [9] Fang W, Leng B Y, Jin K, et al. Cloning of *Beauveria bassiana* chitinase gene *Bbchit1* and its application to improve fungal strain virulence [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005,71(1):363-370.
- [10] de la Gruz J, Hidalgo-Gallego A, Lora J M, et al. Isolation and characterization of three chitinases from *Trichoderma harzianum* [J]. *European Journal of Biochemistry*, 1992,206(3):859-867.
- [11] Felse P A, Panda T. Production of microbial chitinases-A revisit [J]. *Bioprocess Engineering*, 2000,23(2):127-134.
- [12] 冯金荣,惠丰立,文祯中.真菌几丁质酶及其在植物真菌病害防治中的作用[J]. *河南农业科学*, 2006(8):83-86.
- [13] 李丽,杨雪松,刘红全.微生物几丁质酶的特性及其应用的研究进展[J]. *广西民族大学学报(自然科学版)*, 2011,17(1):92-96.
- [14] 徐恩静.小麦几丁质酶基因的检测及酶活性测定[D].合肥:安

徽农业大学, 2011.

- [15] Arimori T, Kawamoto N, Shinya S, et al. Crystal structures of the catalytic domain of a novel glycohydrolase family 23 chitinase from *Ralstonia* sp. A-471 reveals a unique arrangement of the catalytic residues for inverting chitin hydrolysis [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(26):18696 - 18706.
- [16] van Aalten D M F, Komander D, Synstad B, et al. Structural insights into the catalytic mechanism of a family 18 exo-chitinase [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(16): 8979 - 8984.
- [17] Watanabe T, Suzuki K, Oyanagi W, et al. Gene cloning of chitinase A1 from *Bacillus circulans* WL-12 revealed its evolutionary relationship to *Serratia* chitinase and to the type III homology units of fibronectin [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1990, 265(26):15659 - 15665.
- [18] Tsujibo H, Orikoshi H, Tanno H, et al. Cloning, sequence, and expression of a chitinase gene from a marine bacterium, *Altermonas* sp. strain O-7 [J]. *Journal of Bacteriology*, 1993, 175(1):176 - 181.
- [19] 冯俊丽, 朱旭芬. 微生物几丁质酶的分子生物学研究[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2004, 30(1):102 - 108.
- [20] 卢黄娉. 几丁质对海洋酵母 *Rhodospiridium paludigenum* 果实采后病害防治效力的影响及相关机理研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2015.
- [21] Ulhoa C J, Peberdy J F. Purification and some properties of the extracellular chitinase produced by *Trichoderma harzianum* [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1992, 14(3):236 - 240.
- [22] 王治伟, 刘志敏. 微生物几丁质酶研究进展[J]. 生物技术通讯, 2006, 17(3):439 - 442.
- [23] 余长纓, 韩宝芹. 海洋弧菌几丁质酶的产酶条件及分离纯化研究[J]. 高技术通讯, 2002, 12(9):70 - 73.
- [24] Langner T, Göhre V. Fungal chitinases: function, regulation, and potential roles in plant/pathogen interactions [J]. *Current Genetics*, 2015, 62(2):243 - 254.
- [25] 韩宝芹, 余长纓, 刘万顺, 等. 几丁质酶研究现状及展望[J]. 中国海洋药物, 2001, 20(5):41 - 43.
- [26] Mitchell R, Alexander M. The mycolytic phenomenon and biological control of *Fusarium* in soil [J]. *Nature*, 1961, 190(4770):109 - 110.
- [27] Stressmann M, Kitao S, Griffith M, et al. Calcium interacts with antifreeze proteins and chitinase from cold-acclimated winter rye [J]. *Plant Physiology*, 2004, 135(1):364 - 376.
- [28] Toyoda H, Matsuda Y, Yamaga T, et al. Suppression of the powdery mildew pathogen by chitinase microinjected into barley coleoptile epidermal cells[J]. *Plant Cell Reports*, 1991, 10(5):217 - 220.
- [29] Benhamou N, Chet I. Parasitism of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*: ultrastructural and cytochemical aspects of the interaction [J]. *Phytopathology*, 1996, 86(4):405 - 416.
- [30] Rousseau A, Benhamou N, Chet I, et al. Mycoparasitism of the extramatrical phase of *Glomus intraradices* by *Trichoderma harzianum* [J]. *Phytopathology*, 1996, 86(5):434 - 443.
- [31] 陈红. 广谱抗病虫几丁质酶产生菌的筛选与几丁质酶分子生物学研究[D]. 成都: 四川农业大学, 2002.
- [32] 杨文博, 冯波, 佟树敏. 链霉菌 S01 菌株几丁质酶对植物病原真菌的拮抗作用[J]. 微生物学通报, 1997, 24(4):224 - 227.
- [33] 魏毅, 潘洪玉, 张传云, 等. 菌寄生真菌粉红聚端孢 s24 的 trichothecin(TCN) 纯化和抗菌活性[J]. 吉林农业大学学报, 2004, 26(2):130 - 133.
- [34] 张世宏, 李多川, 魏毅, 等. 粉红聚端孢菌胞外几丁质酶纯化、特性及抗菌活性[J]. 植物病理学报, 2002, 32(3):262 - 266.
- [35] 马桂珍, 高会兰, 张拥华, 等. 链孢粘帚霉几丁质酶的诱导及其抗真菌活性研究[J]. 微生物学通报, 2007, 34(5):905 - 908.
- [36] 王淑芳, 马桂珍, 孙漫红, 等. 粘帚霉几丁质酶 *GcCHI1* 的结构鉴定及其抑菌作用[J]. 微生物学通报, 2016, 43(1):107 - 115.
- [37] 司美茹, 赵云峰. 几丁质酶产生菌的筛选及其发酵液对病原真菌的拮抗作用[J]. 现代农业科学, 2008(10):30 - 32.
- [38] 糜艳霞, 任慧, 张常, 等. 几丁质酶的研究进展[J]. 生命科学, 2015(5):437 - 443.
- [39] 马汇泉, 甄惠丽, 孙伟萍. 几丁质酶及其在抗植物真菌病害中的作用[J]. 微生物学杂志, 2004, 24(3):50 - 53.
- [40] 许梦秋, 钟增明, 龚琰, 等. 几丁质酶在植物病害生物防治中的应用[J]. 现代农业科技, 2010(5):122 - 123.
- [41] 崔欣, 杨庆凯. 植物几丁质酶在抗真菌病害基因工程中的应用[J]. 植物保护, 2002, 28(1):39 - 42.
- [42] 咸洪泉. 菌寄生真菌几丁质酶基因的克隆及功能研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2011.
- [43] Kubicek C P, Mach R L, Peterbauer C K, et al. *Trichoderma*: From genes to biocontrol [J]. *Journal of Plant Pathology*, 2001.
- [44] 贺焜. 利用粉红聚端孢几丁质酶 *Trchi1* 基因和嗜热真菌 *Mnsod* 基因提高水稻抗性的研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2014.
- [45] Lorito M, Di P A, Hayes C K, et al. Antifungal, synergistic interaction between chitinolytic enzymes from *Trichoderma harzianum* and *Enterobacter cloacae* [J]. *Phytopathology*, 1993, 83(9):721 - 728.
- [46] Bolar J P, Norelli J L, Harman G E, et al. Synergistic activity of endochitinase and exochitinase from *Trichoderma atroviride* (*T. harzianum*) against the pathogenic fungus (*Venturia inaequalis*) in transgenic apple plants[J]. *Transgenic Research*, 2001, 10(6):533 - 543.
- [47] Shah J M, Raghupathy V, Veluthambi K. Enhanced sheath blight resistance in transgenic rice expressing an endochitinase gene from *Trichoderma virens* [J]. *Biotechnology Letters*, 2009, 31(2):239 - 244.
- [48] Matteo Lorito R L M P. Mycoparasitic interaction relieves binding of the CreI carbon catabolite repressor protein to promoter sequences of the *ech42* (endochitinase-encoding) gene in *Trichoderma harzianum* [J]. *Proceedings of the National*

- Academy of Sciences of the United States of America, 1996, 93 (25):14868 - 14872.
- [49] Liu Mei, Sun Zongxiu, Zhu Jie, et al. Enhancing rice resistance to fungal pathogens by transformation with cell wall degrading enzyme genes from *Trichoderma atroviride* [J]. Journal of Zhejiang University Science, 2004, 5(2):133 - 136.
- [50] 汤浩茹, Wallbraun M, 任正隆, 等. 通过农杆菌介导法将哈兹木霉几丁质酶 *ThEn-42* 基因导入核桃[J]. 园艺学报, 2001, 28 (1):12 - 18.
- [51] Bolar J P, Norelli J L, Wong K W, et al. Expression of endochitinase from *Trichoderma harzianum* in transgenic apple increases resistance to apple scab and reduces vigor [J]. Phytopathology, 2000, 90(1):72 - 77.
- [52] 刘梅, 覃宏涛, 孙宗修, 等. 转基因水稻中 *ThEn-42* 基因的稳定遗传及其抗病性的提高[J]. 农业生物技术学报, 2003, 11 (5):444 - 449.
- [53] Szabó M, Csepregi K, Gálber M, et al. Control plant-parasitic nematodes with *Trichoderma* species and nematode-trapping fungi: The role of *chi18-5* and *chi18-12* genes in nematode egg-parasitism [J]. Biological Control, 2012, 63(2):121 - 128.
- [54] Sharad U, Sharma G, Moger N, et al. Functional validation of plant transformation vector with stacked *ech42* and *bgn* from *Trichoderma* in tomato for fungal disease resistance [J]. Indian Journal of Genetics & Plant Breeding, 2015, 75(1):86 - 92.
- [55] 高必达. 转几丁质酶基因防植物病害研究:进展、问题与展望 [J]. 生物工程进展, 1999, 19(2):21 - 28.
- [56] Zipfel C. Plant pattern-recognition receptors [J]. Trends in Immunology, 2014, 35(7):345 - 351.
- [57] Sánchez-Vallet A, Mesters J R, Thomma B P. The battle for chitin recognition in plant-microbe interactions [J]. FEMS Microbiology Reviews, 2014, 39(2):171 - 183.
- [58] Ben K S, Postma J, Robatzek S. A moving view: subcellular trafficking processes in pattern recognition receptor-triggered plant immunity [J]. Annual Review of Phytopathology, 2015, 53(1):379 - 402.
- [59] Liu Xiaokun, Grabherr H M, Willmann R, et al. Host-induced bacterial cell wall decomposition mediates pattern-triggered immunity in *Arabidopsis* [J]. eLife, 2014, 3(331):e1990.
- [60] Kaku H, Nishizawa Y, Ishii-Minami N, et al. Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2006, 103(29): 11086 - 11091.
- [61] Hayafune M, Berisio R, Marchetti R, et al. Chitin-induced activation of immune signaling by the rice receptor CEBiP relies on a unique sandwich-type dimerization [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, 111(3):404 - 413.
- [62] Akamatsu A, Wong H L, Fujiwara M, et al. An OsCEBiP/OsCERK1 - OsRacGEF1 - OsRac1 Module is an essential early component of chitin-Induced rice immunity [J]. Cell Host and Microbe, 2013, 13(4):465 - 476.
- [63] 赵蕾, 汪天虹. 几丁质、壳聚糖在植物保护中的研究与应用进展 [J]. 植物保护, 1999, 25(1):43 - 44.
- [64] 陈振明, 王政逸, 郭泽建, 等. 绿色木霉内切几丁质酶基因的克隆及其毛壳菌转化[J]. 菌物学报, 2002, 21(3):375 - 382.
- [65] Seidl V, Huemer B, Seiboth B, et al. A complete survey of *Trichoderma chitinases* reveals three distinct subgroups of family 18 chitinases [J]. The FEBS Journal, 2005, 272(22):5923 - 5939.
- [66] 王治伟, 刘志敏. 微生物几丁质酶研究进展[J]. 生物技术通讯, 2006, 17(3):439 - 442.
- [67] 陈松, 黄骏麒. 几丁酶及其在植物抗真菌病中的作用[J]. 生物学杂志, 1992(2):1 - 2.
- [68] Sood S, Sandul S S, Kumar A K, et al. Computational characterization and structure prediction of chitinase gene of *Beauveria bassiana* using proteomic tools [J]. Journal of Biotech Research, 2016, 7:1 - 10.
- [69] Huang Zhen, Hao Yongfen, Gao Tianni, et al. The *Ifchit1* chitinase gene acts as a critical virulence factor in the insect pathogenic fungus *Isaria fumosorosea* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(12):1 - 13.
- [70] 金亚琳, 金晶, 刘青娥. 淡紫拟青霉几丁质酶提取工艺的优化研究[J]. 安徽农业科学, 2014, 42(30):10456 - 10458.
- [71] 章慧慧. 绿色木霉内切几丁质酶基因的克隆及其在大肠杆菌中表达的研究[D]. 杭州:浙江工商大学, 2008.
- [72] 姜竹峪, 陈羽, 魏锦兴, 等. 几丁质酶的研究进展[J]. 沈阳药科大学学报, 2016(5):414 - 418.
- [73] Lupetti A, de Boer M G J, Erba P, et al. Radiotracers for fungal infection imaging [J]. Medical Mycology, 2011, 49(S1): S62 - S69.

(责任编辑:杨明丽)