

研究报告

Research Reports

拟康宁木霉 T-51 几丁质酶活性及内切几丁质酶基因克隆与分析

尤佳琪, 李国庆*

(华中农业大学作物病害监测和安全控制湖北省重点实验室, 武汉 430070)

摘要 木霉是一类重要的生防真菌, 木霉产生的几丁质酶在其生物防治的重寄生过程中起着重要作用。拟康宁木霉 *Trichoderma koningiopsis* T-51 是一株对番茄灰霉病有生防潜力的木霉菌株, 本文测定了 T-51 菌株产生几丁质酶的活性, 结果表明 T-51 在 PDB 中液体培养以及与灰霉病菌在 PDA 上对峙培养时产生的几丁质酶活性显著受到灰霉病菌的诱导。采用 RACE 技术首次克隆了拟康宁木霉 T-51 中一个几丁质酶基因 *Tkchit42*, 全长为 1 817 bp, 包含 4 个外显子和 3 个内含子。预测该基因有一个 1 275 bp 的开放阅读框, 编码 424 个氨基酸, 预测的蛋白总分子量为 46.378 kDa, 预测的等电点(pI)为 5.16, 与 *T. koningii* 中 42 kDa 内切几丁质酶的氨基酸序列相似性达到 99%。

关键词 几丁质酶; 拟康宁木霉; 基因克隆; 序列分析

中图分类号: S 476 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn.0529-1542.2017.04.004

Chitinase activity and endo-chitinase gene cloning and sequence analysis of *Trichoderma koningiopsis* T-51

You Jiaqi, Li Guoqing

(Key Laboratory of Crop Disease Monitoring & Safety Control of Hubei Province, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract *Trichoderma koningiopsis* T-51 is a potential biological control agent against *Botrytis cinerea*. In this study, chitinase activity of T-51 was significantly induced by *B. cinerea* in both liquid PDB medium and the interacting area with *B. cinerea* colony on PDA medium. An endo-chitinase gene *Tkchit42* was cloned from *T. koningiopsis* T-51. The full length of *Tkchit42* was 1 817 bp, encoding an endo-chitinase protein containing 424 amino acid residues. The predicted protein molecular weight was 46.378 kDa. The *Tkchit42* amino acid sequence BLAST showed 99% similarity with that of a 42 kDa endo-chitinase of *T. koningii*. For our knowledge, this is the first report of chitinase gene cloned from *T. koningiopsis*.

Key words chitinase; *Trichoderma koningiopsis*; gene cloning; sequence analysis

果蔬灰霉病是我国保护地果蔬生产中最主要的病害之一^[1], 在保护地果蔬生产中造成巨大的产量损失。灰霉病菌对化学农药极易产生抗性^[2], 而且化学农药所引起的农药残留和环境污染等问题也受到人们的重视, 因此, 生物防治作为一种可替代的灰霉病防治措施, 逐渐得到了植物保护研究者的关注。

木霉是一类具有广谱生防效果的生防真菌, 对包括灰霉病在内的许多植物真菌病害都有生防作

用。木霉对植物真菌病害的生防机制是多样的, 包括对病原菌营养竞争、重寄生、抗生作用以及通过诱导植物抗性防治病害^[3-4]。木霉的重寄生作用过程中, 分泌真菌细胞壁水解酶是极其重要的^[5]。几丁质是仅次于纤维素的自然界中第二大有机的可再生资源, 也是真菌细胞壁骨架的主要成分^[6], 分泌几丁质酶能够帮助木霉降解寄主真菌的细胞壁, 帮助木霉寄生寄主真菌。几丁质酶家族十分庞大, 可分为

收稿日期: 2016-08-17 修订日期: 2016-12-19

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(201303025)

* 通信作者 E-mail: guoqingli@mail.hzau.edu.cn

内切几丁质酶、外切几丁质酶、 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶和壳二糖酶等^[7],这些酶共同作用将几丁质逐步降解为单糖。许多研究表明,木霉产生的几丁质酶活性受到病原菌细胞壁的诱导^[8],在重寄生过程中几丁质酶基因的表达也有显著的上调^[9]。拟康宁木霉 T-51 是本实验室分离筛选得到的生防木霉菌株,前期的研究结果表明 T-51 对灰霉病菌有很强的重寄生能力,并且可以有效抑制灰霉病菌在植物残体上产孢,还有产生抗真菌物质、促进植物生长、诱导植物抗性等作用,对番茄灰霉病表现出很好的生防潜力^[10]。然而,目前世界上对于拟康宁木霉生物防治的研究极少,对拟康宁木霉生物防治的分子机制暂无报道。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

拟康宁木霉 *Trichoderma koningiopsis* 菌株 T-51 由本实验室分离自湖北省武汉市油菜田土壤中。

灰葡萄孢 *Botrytis cinerea* 菌株 RoseBC-3 由本实验室分离自月季灰霉病残体上。

1.2 主要试剂

TRIzol® Reagent (Invitrogen™, USA)、pMD18-T、rTaq DNA 聚合酶、dNTP 混合物、5'-Full RACE 试剂盒和 3'-Full RACE 试剂盒等均购于 TaKaRa 公司(中国大连);DNA 凝胶回收试剂盒购于 Axygen Scientific;粉状几丁质购于 Sigma 公司,并且根据任莉^[11]的方法制成胶态几丁质。1% DMAB(对二甲氨基苯甲醛):10 g DMAB 溶于 100 mL 含有 12%浓盐酸的冰醋酸溶液中,待完全溶解后置于 4℃下贮存备用,使用时用冰醋酸稀释 10 倍。

1.3 粗酶液的制备

1.3.1 液体培养

灰霉病菌菌株 RoseBC-3 菌丝块接种在铺有玻璃纸的 PDA 平板上生长,菌落长满后,将菌丝刮下,加液氮研磨成粉,按 1%(W/V)比例加入 PDB 培养基中,在 80℃水浴锅中水浴 4 h 后,用双层滤纸过滤,121℃蒸汽灭菌,即为 Bc-PDB。取 3 mL Bc-PDB 或 PDB 在 20 mL 的玻璃摇菌瓶中,每瓶加入一个直径 5 mm 的木霉 T-51 生长 2 d 的新鲜菌丝块,在 25℃摇床中 150 r/min 摇培 3 d。取摇培上清液为粗酶液。

1.3.2 对峙培养

将灰霉病菌菌株 RoseBC-3 和拟康宁木霉菌株 T-51 的菌丝块分别接种在 PDA 平板的两端,两个

菌丝块相距 7 cm,或者在 PDA 平板上单独接种灰霉或单独接种木霉。将接种后的 PDA 平板放在 20℃下培养 7 d,互作区域的粗酶液浸提方法参考任莉^[11],将对峙培养的平板中灰霉病菌和木霉菌落重叠区域(即为木霉与灰霉病菌的互作区,简称为 T+B)或单独灰霉病菌(B only)或单独木霉(T only)菌落下的 PDA 培养基切下,捣碎,按照 2:1(W/V)的比例在 ddH₂O 中浸提过夜,然后取上清液作为粗酶液。

1.4 几丁质酶活力测定

几丁质酶的测定方法参考任莉^[11],吸取 0.5 mL 粗酶液或 PDB(空白对照)于 5 mL 的离心管中,加入 0.5 mL 胶态几丁质。将离心管置于 37℃水浴中反应 4 h。然后以 8 000 r/min 的速度离心 5 min 终止酶促反应。吸取 0.5 mL 上清液于一支洁净离心管中,加入 0.1 mL 浓度为 0.8 mol/L 四硼酸钾溶液(pH 9.1)。摇匀后,沸水浴中反应 3 min,迅速用冰水冷却至室温。再加入 3 mL 制备好的 1%对二甲氨基苯甲醛(DMAB)试剂,并在 37℃下保温 20 min,自来水中冷却至室温。测定各反应体系在 585 nm 下的吸光值。以 N-乙酰氨基葡萄糖做标准曲线,在上述酶促反应体系中,定义 1 mL 酶液每小时释放出 1 μ mol 的 N-乙酰氨基葡萄糖定义为一个酶活力单位(U),计算各粗酶液中的几丁质酶活力。

1.5 核酸提取

将生长旺盛的拟康宁木霉 T-51 菌丝接种到铺有玻璃纸的固体 PDA 平板上,置于 20℃下培养 3 d 后收集菌丝。分别使用 CTAB 法和 TRIzol 法提取菌丝总 DNA 和总 RNA^[12]。

1.6 PCR 扩增

本研究所使用的引物序列见表 1,其中 P1-F/R 引物参考伊洪伟^[13]克隆长枝木霉中几丁质酶基因的 PCR 引物,其余引物是本研究中设计,由北京奥科鼎盛生物科技有限公司合成。

首先以拟康宁木霉 T-51 的基因组 DNA 为模板,用 P1F 和 P1R 引物(表 1)进行扩增,PCR 扩增体系(50 μ L):DNA (1 μ g/ μ L) 1 μ L,10 $\times$ PCR buffer 5 μ L, dNTP mix (2.5 mmol/L each) 1 μ L, P1-F (20 μ mol/L) 1 μ L, P1-R (20 μ mol/L) 1 μ L, rTaq DNA polymerase 0.5 μ L, ddH₂O 40.5 μ L。PCR 反应程序为:94℃预变性 30 s; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 2 min (35 个循环);72℃ 10 min,16℃ 5 min。基因末端序列的克隆使用 5' RACE 和 3' RACE 的方法,根据

已经测序获得的序列设计了引物 Tk-5'-GSP Outer、Tk-5'-GSP Inner、Tk-3'-GSP Inner 及 Tk-3'-GSP Outer(表 1),根据试剂盒说明书进行扩增。

表 1 本文使用的 PCR 扩增引物序列

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Sequence (5'-3')
P1 - F	ATGTTGGGTTTCTCGGAAAATCC
P1 - R	CTAGTTGAGACCGCTTCGGATGTT
Tk-5'-GSP Outer	CTGGGTGTCATCGGAAGGGTACT
Tk-5'-GSP Inner	AGCCACCGATAGAAAGCATAACC
Tk-3'-GSP Inner	ACGGTATCTGGGACTACAAGG
Tk-3'-GSP Outer	TGGGAGTACCCTTCCGATGA

1.7 扩增产物的纯化、连接、转化及测序

扩增后的产物用 1%琼脂糖凝胶电泳检测,切下目的片段,使用 DNA 凝胶回收试剂盒进行纯化,然后连接 pMD18 - T 载体,转化大肠杆菌 DH5 α ,筛选阳性转化子测序。测序由北京奥科鼎盛生物科技有限公司完成。

1.8 序列分析

核酸序列在 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)上进行同源性检索,使用 DNAMAN 软件对序列进行拼接,并将核苷酸序列翻译为氨基酸,使用 BioEdit 分析软件对基因的核苷酸序列进行碱基成分和氨基酸组成分析。使用 NCBI 的 ORF Finder 分析序列的保守结构域。使用 SignalP 工具(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>)中预测氨基酸序列的信号肽,通过 TargetP 工具(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>)进行蛋白亚细胞定位的预测,用 SWISS-MODEL 工具(<http://www.swissmodel.expasy.org/>)预测蛋白的三维模型。使用 MEGA 软件(NJ 法,重复运算 1 000 次)构建与同源基因序列的系统发育树。

2 结果与分析

2.1 几丁质酶活性

T-51 在 Bc-PDB 和 PDB 中的几丁质酶活性测定结果如图 1,T-51 在 Bc-PDB 中培养产生的几丁质酶活性(12.85 ± 4.85 U/mL)显著高于($P < 0.05$)在 PDB 中培养产生的几丁质酶活性(9.36 ± 0.61 U/mL)。T-51 和灰霉病菌对峙培养过程中的几丁质酶活性测定结果如图 2,在 T-51 与 RoseBC-3 的互作区域(T+B)中的几丁质酶活性(32.67 ± 10.27 U/mL)显著高于($P < 0.05$)单独培养木霉(T only)($11.71 \pm$

1.72 U/mL)或者单独培养灰霉病菌(B only)(9.99 ± 1.68 U/mL)所产生的几丁质酶活性。这表明灰霉病菌会诱导拟康宁木霉 T-51 产生几丁质酶,特别是在 T-51 重寄生灰霉病菌菌落的过程中,几丁质酶活性显著上升,这表明几丁质酶可能在木霉的重寄生过程中起着重要的作用。

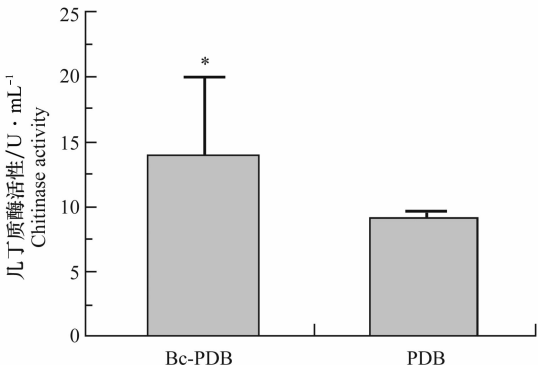
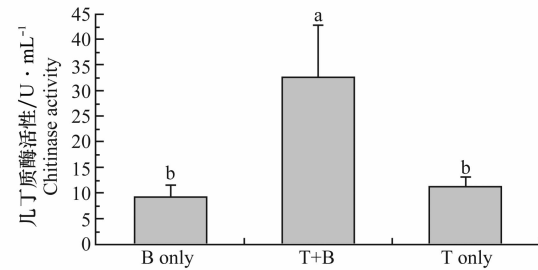


图 1 拟康宁木霉 T-51 在 Bc-PDB 与 PDB 中产生的几丁质酶活性

Fig. 1 Chitinase activity of *Trichoderma koningiopsis* T-51 in Bc-PDB and PDB



B only: 单独接种灰霉病菌; T+B: 木霉与灰霉病菌对峙培养时的互作区域; T only: 单独接种木霉
B only: *Botrytis* only; T+B: Interacting area of *Botrytis* and *Trichoderma*; T only: *Trichoderma* only

图 2 拟康宁木霉 T-51 与灰霉病菌对峙培养时产生的几丁质酶活性

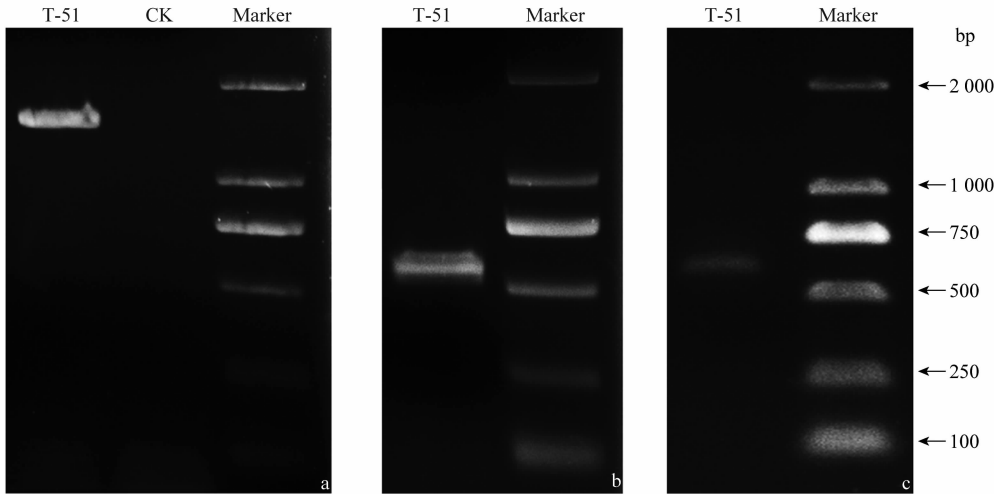
Fig. 2 Chitinase activity in dual culture of *Trichoderma koningiopsis* T-51 and *Botrytis* on PDA

2.2 拟康宁木霉 T-51 几丁质酶基因的克隆及序列分析

通过 P1 - F/R 引物的扩增两株拟康宁木霉 T-51 的基因组 DNA 得到 1 400 bp 左右的条带,如图 3a。该目的条带测序结果得到 1 470 bp 的序列。这段序列经过 NCBI 中比对,发现与许多木霉属其他种的内切几丁质酶基因有很高的同源性,其中与其近缘种康宁木霉 *T. koningii* 中编码 42 kDa 内切几丁质酶基因的核苷酸序列同源性达到 97%,因此将这个基因命名为 *Tkchit42*。然后根据这段序列设计了特异性引物进行末端序列的克隆。通过对 cDNA 的巢式 PCR 分

别扩增 5'端(图 3b)和 3'端(图 3c),均得到约 600 bp 的条带。测序后的序列使用 DNAMAN 软件进行拼

接得到了该基因的全长序列。*Tkchit42* 基因序列在 GenBank 中的登录号为 KU140672。



a: P1F/R引物扩增条带; b: 5'-RACE扩增条带; c: 3'-RACE扩增条带; Marker均为DL2000
a: Amplification using the primer pair P1F/R; b: 5'-RACE, c: 3'-RACE; Marker: DL2000

图 3 *Tkchit42* 基因的 PCR 及 RACE 扩增电泳图
Fig. 3 Amplification of *Tkchit42* by using PCR and RACE

序列分析的结果表明,该基因全长共 1 817 bp (不含 polyA),其中 5'端非编码区有 135 bp,3'端非编码区有 212 bp。包含 4 个外显子和 3 个内含子,内含子大小分别为 57、70、68 bp。外显子组成一个

长 1 275 bp 的开放阅读框,起始密码子为 ATG,终止密码子为 TAA(图 4),*Tkchit42* 基因全长碱基组成:G+C=49.26%,A+T=50.74%。

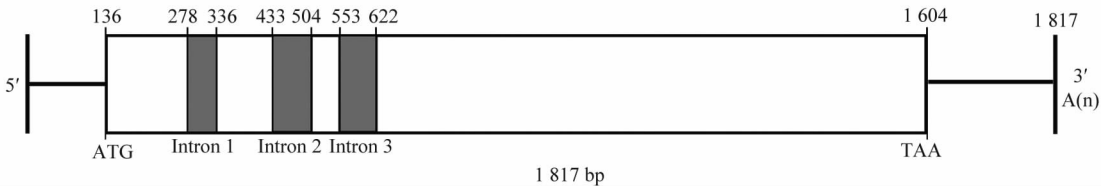


图 4 *Tkchit42* 基因全长结构示意图
Fig. 4 Structure of *Tkchit42* gene

2.3 *Tkchit42* 基因编码的氨基酸序列分析

Tkchit42 基因编码 424 个氨基酸(图 5),其中丝氨酸含量最高(10.82%),半胱氨酸含量最低(0.24%)。预测的蛋白总分子量为 46.378 kDa,预测的等电点(pI)为 5.16。氨基酸序列在 NCBI 上预测到内切几丁质酶的保守结构域,属于 GH18-几丁质酶超家族,有几丁质酶的活性位点。根据 SignalP 4.0 预测,在氨基酸序列前端存在信号肽,最可能的剪切位点是在 27~28 位;VAA-KD。使用 Target P 预测蛋白亚细胞器定位,预测结果表明该蛋白最有可能定位在胞外,是分泌蛋白。使用 SWISS-MODEL 在线预测了 *Tkchit42* 编码的蛋白三维结构的丝带模型,如图 6。

2.4 同源性及分子进化分析

将 *Tkchit42* 编码的氨基酸在 NCBI 数据库中比对

发现,其序列与多种木霉属真菌中 42 kDa 内切几丁质酶或几丁质酶基因的氨基酸序列相似性都达到 85%以上,其中与 *T. koningii* 相似性达到 99%(表 2)。利用 MEGA 软件建立 *Tkchit42* 编码的氨基酸序列及其他木霉中的同源氨基酸序列的系统进化树,如图 7。

3 结论与讨论

几丁质酶在木霉与寄主真菌互作的过程中十分重要,其中的 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶 NAG1 在木霉识别寄主真菌的过程中起到关键作用^[14]。木霉与寄主真菌还未接触的时候,木霉通过分泌少量的 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶来识别寄主真菌,当识别反应成功后,便在短时间内大量分泌几丁质酶来降解寄主真菌的细胞壁^[15-16],降解寄主细胞壁后产生的小

分子产物反馈给木霉后又能激活包括几丁质酶基因在内的重寄生相关基因的表达上调,进一步分泌更多的细胞壁水解酶类,最终导致寄主真菌细胞壁裂解,细胞死亡^[17]。已有研究表明木霉的几丁质酶等细胞壁水解酶类的活性受到寄主真菌细胞壁的诱导^[8],例如哈茨木霉产生的几丁质酶受到灰霉病菌细胞壁的诱导^[18]。本文的研究结果表明拟康宁木霉 T-51 在 PDB 摇培中产生几丁质酶的活性受到灰霉病菌的诱导,在拟康宁木霉 T-51 对灰霉病菌对峙培养时的互作区几丁质酶活性也显著升高,这意味着几丁质酶在 T-51 在对灰霉病菌的生物防治过程中可能起着重要作用。本实验室前期的研究表明,拟康宁木霉 T-51 对番茄灰霉病有着很好的生防潜力,并且对多种其他植物病原真菌菌落有重寄生能力。因此有必要对拟康宁木霉中生防相关的分子机

制进行深入的研究。

本研究首次克隆了拟康宁木霉中的一个几丁质酶基因 *Tkchit42*。在木霉中存在多种几丁质酶,在重寄生的过程中起着不同的作用,这些几丁质酶在木霉不同的种之间都存在差异。目前报道木霉中的内切几丁质酶的分子量主要为 33、37 kDa 以及 42 kDa 等^[19], 同源性分析表明 *Tkchit42* 的序列与编码 42 kDa 的内切几丁质酶基因的序列较为相近,根据本研究克隆的几丁质酶基因 *Tkchit42* 核酸序列预测其编码蛋白的分子量为 46 kDa。胡仕凤等^[15]通过比对分析 17 种木霉的 42 kDa 几丁质酶具有信号肽,序列为其 N 端的 22 个氨基酸残基,序列通常为“MLGFL-GKSVALLAALQATL TSA”,本研究中 *Tkchit42* 编码的前 22 个氨基酸序列与之相同,而且 *Tkchit42* 也预测到了信号肽。

```
1   ATGTTGGGTTTCTCGGAAAATCCGTGGCCTTGCTTGCTGCGCTGCAGGCCACTCTCACC
1   M L G F L G K S V A L L A A L Q A T L T
61  TCTGCATCTCCCGTAGCTGCGAAGGACGTCTCTATTGAGAAGAGAGCCAGTGGATACGCA
21  S A S P V A A K D V S I E K R A S G Y A
121 AACGCGCTCTACTTACCAACTGGGGTATCTACGGCCGCAACTTCCAGCTCAGAACCTG
41  N A V Y F T N W G I Y G R N F Q P Q N L
181 GTTGCCTCGGACATCACTCATGTCTACTCGTTTCATGAAGCTTCAAGCAGACGGCACT
61  V A S D I T H V I Y S F M N F Q A D G T
241 GTCGTCTCTGGAGATGCCATACGCCGATTATCACAAGCACTATTCCGACGATTCCTGGAAT
81  V V T S G D A Y A D Y H K H Y S D D S W N
301 GACGTCGGCAACAATGCGTACGGCTGTGTGAAGCAGCTGTTCAAAATGAAGAAGGCCAAC
101 D V G N N A Y G C V K Q L F K L K K A N
361 CGCAACTTGAAGGTTATGCTTTCTATCGGTGGCTGGACCTGGTCCACCAACTTCCCTTCT
121 R N L K V M L S I G G W T N F P S
421 GCAGCAAGCACCGATGCCAACCGCAAGAAGCTTTGCCAAGACTGCCATCACCTTCATGAAG
141 A A S T D A N R K N F A K T A I T F M K
481 GACTGGGGTTTCGATGGTATCGACATCGACTGGGAGTACCCTTCCGATGACACCCAGGCC
161 D W G F D G I D I D W E Y P S D D T Q A
541 ACCAATGATGTTCTTCTCAAGGAGATCCGATCTGAGCTGGATGCCATATGCTGCGCAA
181 T N M I L L L K E I R S E L D A Y A A Q
601 TACGCTCCAGGCTATCACTTCCTCCTCTCCATCGCTGCCCCGCGGCCCTGAGCACTAC
201 Y A P G A Y H F L L S I A P A G P E H Y
661 TCTTTCCTGATGTCCGACCTTGGCCAAGTCCCTCGACTATGTCAAGCTCATGCGCTAT
221 S F L H M S D L G Q V L D Y V N L M A Y
721 GACTATGTGTTCTTGGAGCAACTACTCTGGACACGATGCCAACCTGTTTGCTAACCCG
241 D Y A G S W S N Y S G H D A N L F A N P
781 TCCAACCCCAACTCCTCGCGGTACAACACCGATCAAGCTATCAAGGACTATATCAAGGGA
261 S N P N S S P Y N T D Q A I K D Y I K G
841 GGTGTTCCCGCAAGCAAGATCGTTTCTTGGCATGCCATCTATGGACGATCTTTCGAGAGC
281 G V P A S K I V L G M P I Y G R S F E S
901 ACCGGTGGCATTGGCCAGACCTACAGTGAATTGGATCTGGAAGCTGGGAGAACGGTATC
301 T G I G Q T Y S G I G S G I G S G I
961 TGGGACTACAAGGTTCTCCCTAAGGCTGGCGCTACAGTCCAGTATGACTCTGTGCGACAG
321 W D Y K V L P K A G A T V Q Y D S V A Q
1021 GCATACTACAGCTATGACCCAGCAGCAAGGAGCTCATCTCTTTCGATACCCCTGACATG
341 A Y Y A S Y D P S S K E L I S F D T P D M
1081 ATCAACACCAAGGTCTCGTACCTCAAGAACCTCGGCGCTGGGAGGTAGCATGTTCTGGGAG
361 I N T K V S Y L K N L G L G G S M F W E
1141 GCTTCTGCTGACAAGACTGGCTCTGACTCCTTGATCGGAACAGCCACAGAGCCCTGGGA
381 A S A D K T G S D S L I G T S H R A L G
1201 AGCCTGGACTCCACTCAGAACTTGCTGAGCTACCCCAACTCCCAGTATGACAACATCCGA
401 S L D S T Q N L L S Y P N S Q Y D N I R
1261 AACGGTCTCAACTAA
421 N G L N *
```

图 5 *Tkchit42* 基因预测的开放阅读框序列及氨基酸序列

Fig. 5 Predicted ORF and amino acid sequence of *Tkchit42*



图 6 Tkchit42 编码蛋白的三级结构丝带模型的预测

Fig. 6 The 3D structure prediction of the protein encoded by Tkchit42

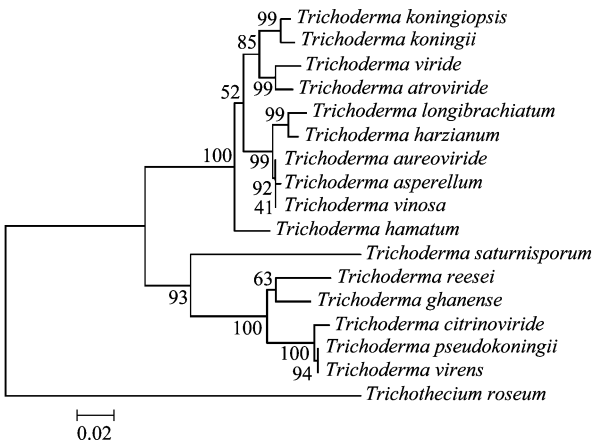


图 7 基于 Tkchit42 推导的氨基酸序列与其他木霉几丁质酶氨基酸序列的系统进化树

Fig. 7 Phylogenetic tree of the predicted amino acid sequences of Tkchit42

表 2 Tkchit42 的同源序列及编码氨基酸相似性

Table 2 Homology sequence used in this study and the amino acid similarity of Tkchit42

GenBank 登录号 GenBank accession number	基因编码产物 Encoded product	物种名 Species	氨基酸序列相似性/% Identity of amino acid sequence
gi 6630936 gb AAF19612.1	42 kDa 内切几丁质酶	康宁木霉 <i>Trichoderma koningii</i>	99
gi 226596953 gb ACO72604.1	几丁质酶	深绿木霉 <i>T. atroviride</i>	97
gi 6630948 gb AAF19618.1	42 kDa 内切几丁质酶	绿色木霉 <i>T. viride</i>	96
gi 56967602 gb AAW31950.1	42 kDa 内切几丁质酶	黄绿木霉 <i>T. aureoviride</i>	96
gi 297573457 gb ADI46579.1	CHI42 几丁质酶	棘胞木霉 <i>T. asperellum</i>	95
gi 6630962 gb AAF19625.1	42 kDa 内切几丁质酶	酒色木霉 <i>T. vinosum</i>	95
gi 88191681 gb ABD42921.1	内切几丁质酶	长枝木霉 <i>T. longibrachiatum</i>	94
gi 74049056 gb AAZ95174.1	内切几丁质酶	哈茨木霉 <i>T. harzianum</i>	94
gi 2738109 gb AAC60385.1	内切几丁质酶	钩状木霉 <i>T. hamatum</i>	94
gi 294992331 gb ADF57309.1	几丁质酶 chi18-5	加纳木霉 <i>T. ghanense</i>	85
gi 13516885 dbj BAB40594.1	内切几丁质酶	假康宁木霉 <i>T. pseudokoningii</i>	85
gi 13516873 dbj BAB40588.1	内切几丁质酶 e-G2	绿木霉 <i>T. virens</i>	85
gi 294992333 gb ADF57310.1	几丁质酶 chi18-5	橘绿木霉 <i>T. citrinoviride</i>	84
gi 589112229 ref XP_006968137.1	几丁质酶	里氏木霉 <i>T. reesei</i>	83
gi 284451278 gb ADB89220.1	42 kDa 内切几丁质酶	土星孢木霉 <i>T. saturnisporum</i>	81
gi 317134350 gb ADV02751.1	几丁质酶	粉红单端孢霉 <i>Trichothecium roseum</i>	71

几丁质酶有着广泛的应用前景。几丁质被几丁质酶降解后的产物(几丁寡糖、壳聚糖和 N-乙酰氨基葡萄糖)具有抗菌及抗肿瘤等活性^[20]。木霉中的几丁质酶基因转入水稻^[21]、烟草^[8]、苹果^[8]、棉花^[22]等植物,能够诱导植物对一些病原真菌产生抗性。哈茨木霉产生的几丁质酶粗提物能够抑制灰霉病菌菌丝生长和孢子萌发,并且抑制番茄灰霉病的发生^[23]。本研究结果表明拟康宁木霉 T-51 产生的几丁质酶可能在

生防过程中起着重要的作用,因此将来有必要对拟康宁木霉 T-51 的几丁质酶等生防相关的酶类进行更深入的研究,探究其在灰霉病防治中的作用。

参考文献

[1] Dean R, Kan J A L V, Pretorius Z A, et al. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology[J]. Molecular Plant Pathology, 2012, 13(4):414 - 430.
[2] Williamson B, Tudzynski B, Tudzynski P, et al. *Botrytis ci-*

- neria: the cause of grey mould disease [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2007, 8(5): 561–580.
- [3] Harman G E. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. [J]. *Phytopathology*, 2006, 96(2): 190–194.
- [4] Benitez T, Rincon A M, Limon M C, et al. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains [J]. *International Microbiology*, 2004, 7(4): 249–260.
- [5] 叶小波, 曾千春, 蒋细良. 木霉菌重寄生过程中的酶学研究进展[J]. *中国生物防治学报*, 2009, 25(3): 276–280.
- [6] Li Duoquan. Review of fungal chitinases[J]. *Mycopathologia*, 2006, 161(6): 345–360.
- [7] Gokul B, Lee J H, Song K B, et al. Characterization and applications of chitinases from *Trichoderma harzianum*-A review [J]. *Bioprocess & Biosystems Engineering*, 2000, 23(6): 691–694.
- [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] Steindorff A S, Ramada M H S, Coelho A S G, et al. Identification of mycoparasitism-related genes against the phytopathogen *Sclerotinia sclerotiorum*, through transcriptome and expression profile analysis in *Trichoderma harzianum* [J]. *BMC Genomics*, 2014, 15(1): 1–14.
- [10] You Jiaqi, Zhang Jing, Wu Mingde, et al. Multiple criteria-based screening of *Trichoderma* isolates for biological control of *Botrytis cinerea* on tomato [J]. *Biological Control*, 2016, 101: 31–38.
- [11] 任莉. 重寄生真菌盾壳霉降解草酸毒素及其引起的生防效应研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2008.
- [12] 曾丽梅. 盾壳霉草酸脱羧酶基因的克隆、功能验证及生防作用研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2013.
- [13] 伊洪伟. 长枝木霉菌几丁质酶基因克隆和抑菌活性物质结构鉴定[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2012.
- [14] Gruber S, Seidl-Seiboth V. Self versus non-self: fungal cell wall degradation in *Trichoderma* [J]. *Microbiology*, 2012, 158(1): 26–34.
- [15] Haran S, Schickler H, Oppenheim A, et al. Differential expression of *Trichoderma harzianum* chitinases during mycoparasitism [J]. *Phytopathology*, 1996, 86(9): 980–985.
- [16] Inbar J, Chet I. The role of recognition in the induction of specific chitinases during mycoparasitism by *Trichoderma harzianum* [J]. *Microbiology*, 1995, 141(11): 2823–2829.
- [17] Vinale F, Sivasithamparam K, Ghisalberti E L, et al. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2008, 40(1): 1–10.
- [18] 赵亚玲, 惠有为, 赵健, 等. 低温木霉对灰霉的拮抗作用[J]. *应用化工*, 2010, 39(9): 1303–1305.
- [19] 胡仕凤, 高必达, 陈捷. 木霉几丁质酶及其基因的研究进展[J]. *中国生物防治*, 2008, 24(4): 369–375.
- [20] 陈少波, 吴根福. 几丁质酶研究进展[J]. *科技通报*, 2004, 20(3): 258–262.
- [21] 柳良好, 徐同. 哈茨木霉几丁质酶诱导及其对水稻纹枯病菌的拮抗作用[J]. *植物病理学报*, 2003, 33(4): 359–363.
- [22] 李莉. 转木霉几丁质酶基因棉花的抗病性检测及鉴定[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2005.
- [23] 杨春林, 席亚东, 谢华蓉, 等. 哈茨木霉 Th-30 几丁质酶的生产条件及对灰霉病菌的拮抗作用[J]. *植物保护学报*, 2009, 36(4): 295–300.

(责任编辑: 田 喆)

(上接 20 页)

- [14] Sardanelli S, Krusberg L R, Golden A M. Corn cyst nematode, *Heterodera zae*, in the United States [J]. *Plant Disease*, 1981, 65: 622.
- [15] Ringer C E, Sardanelli S, Krusberg L R. Investigations of the host range of the corn cyst nematode, *Heterodera zae* from Maryland [J]. *Journal of Nematology*, 1987, 1: 97–106.
- [16] Morgan A, Mulvey R H. Redescription of *Heterodea zae*, the corn cyst nematode, with SEM observations [J]. *Journal of Nematology*, 1983, 15(1): 60–70.
- [17] Srivastava A N, Chawla G. Maize cyst nematode, *Heterodera zae*-A key nematode pest of maize and its management [R]. A Technical Bulletin (TB-ICN: 39/2005), IARI, New Delhi, India, 2005.
- [18] Hutzell P A. Description of male of *Heterodera zae* [J]. *Journal of Nematology*, 1984, 16 (1): 83–86.
- [19] Hutzell P A, Krusberg L R. Temperature and the life cycle of *Heterodera zae* [J]. *Journal of Nematology*, 1990, 22(3): 414–417.
- [20] Srivastava A N, Jaiswal R K. Host and non host status of plant species or the maize cyst nematode, *Heterodera zae*, in India [J]. *Nematologica Mediterranea*, 2011, 39: 203–206.
- [21] Srivastava A N, Swarup G. Preliminary studies on some graminaceous plants for their susceptibility to the maize cyst nematode *Heterodera zae* [J]. *Indian Journal of Nematology*, 1977, 5 (2): 257–259.
- [22] Bhargava S, Yadav B S. Host range study and evaluation of certain barley varieties to the maize cyst nematode *Heterodera zae* [J]. *Indian Journal of Mycology and Plant Pathology*, 1978, 8: 72.
- [23] Bajbaj H K, Gupta D C, Dahiya R S. Development of *Heterodera zae* Koshy et al. on wheat and maize [J]. *Nematologia*, 1986, 32: 209–215.
- [24] Lal A, Mathur V K. Occurrence of *H. zae* on *Vetiveria zizanioides* [J]. *Indian Journal of Nematology*, 1982, 12: 405–407.
- [25] Qasim M, Ghaffar A. *Heterodera zae* in rhizosphere of declining almond trees, *Prunus amygdalus*, in Baluchistan, Pakistan [J]. *Nematologica Mediterranea*, 1986, 14(1): 159.
- [26] Shahzad S, Ghaffar A. Tomato, a natural host of *Heterodera zae* in Pakistan [J]. *International Nematology Network Newsletter*, 1986, 3(4): 38.

(责任编辑: 杨明丽)