

通过导入几丁质酶基因提高巨大芽孢杆菌的生防效果*

张新建¹, 黄玉杰¹, 杨合同^{1,2**}, 任艳¹, 陈凯¹

(1 山东省科学院中日友好生物技术研究中心, 山东省应用微生物重点实验室, 山东 济南 250014;

2 山东理工大学生命科学学院, 山东 淄博 255049)

摘要: 以质粒 pMSDChi113 为模板, 经 PCR 扩增, 获得了几丁质酶基因 1.8 kb DNA 片段, 将该基因与大肠杆菌-芽孢杆菌穿梭质粒 pHY300PLK 连接, 获得重组质粒 pHYChi113。重组质粒经芽孢杆菌感受态方法转入巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) Ap25 中, 获得的工程菌株 *B. megaterium* Ap25-chi113 同时具有几丁质酶和内切葡聚糖酶酶活。平板对峙实验结果表明, 工程菌株对病原真菌 *Rhizoctonia solani*, *Coniothyrium fuckellii*, *Fusarium graminearum*, *Macrophoma kawatsukai*, *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia cerealis*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Bipolaris sorohulana* 的拮抗性能明显提高, 尤其是对 *Coniothyrium fuckellii* 的抑制率相对于野生菌 Ap25 提高了 13% 以上。盆栽防病实验结果表明, 工程菌株显著降低纹枯病菌 (*Rhizoctonia cerealis*) 对小麦 (*Triticum aestivum* L.) 及枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum*) 对棉花 (*Gossypium hirsutum* Linn.) 的致病能力, 对这两种病原菌的防效分别是 70.34% 和 58.51%, 同原始菌株相比, 防效分别提高了 27.54% 和 21.28%。

关键词: 几丁质酶; 芽孢杆菌; 穿梭质粒; 转化

中图分类号: Q 784

文献标识码: A

文章编号: 0253-2700 (2007) 06-666-05

Improving Biocontrol Effect of *Bacillus megaterium* (Bacillaceae) on Plant Disease through Genetic Modification with Chitinase Gene

ZHANG Xin-Jian¹, HUANG Yu-Jie¹, YANG He-Tong^{1,2}, REN Yan¹, CHEN Kai¹

(1 Biotechnology Research Center of Shandong Academy of Sciences, Key Laboratory for Applied Microbiology of Shandong Province

Jinan, 250014, China; 2 School of Life Sciences, Shandong University of Technology, Zibo 255049, China)

Abstract: *Bacillus megaterium* Ap25 which can produce endoglucanase was proved as a biocontrol agent of plant disease. The aim of this study is to enhance the biocontrol effect of this strain by introduction of a chitinase gene. A 1.8 kb DNA fragment containing chitinase gene and SD sequence was amplified with the template pMSDChi113 and was inserted into shuttle vector pHY300PLK to construct a new plasmid, pHYChi113. The recombinant plasmid was transformed into *B. megaterium*, resulting in a new strain named Ap25-chi113. Chitin plate culture and PCR amplification confirmed that Ap25-chi113 contained a functional chitinase gene. Comparing with the wild type Ap25 in dural culture experiment, Ap25-chi113 increased its effect against the pathogenic fungi. Especially, the inhibition percentage against *Coniothyrium fuckellii* increased about 13%. In pot experiment, Ap25-chi113 also increased the effect on suppression of wheat sheath blight and cotton Fusarium wilt caused by *Rhizotonia cerealis* and *Fusarium oxysporum* respectively, comparing with the wild strain.

Key words: Chitinase; *Bacillus megaterium*; Shuttle vector; Transfer

* 基金项目: 国家“863”计划现代农业技术领域重大项目资助 (2006AA10A211)

** 通讯作者: Author for correspondence. Tel: 86-531-82605386; Fax: 86-531-82965634; E-mail: yanght@keylab.net

收稿日期: 2007-06-01, 2007-08-17 接受发表

作者简介: 张新建 (1978-) 男, 山东苍山人, 博士, 助理研究员, 主要从事微生物遗传改造及生物防治方面的研究。

E-mail: zhxjmail@sohu.com

几丁质 (Chitin) 是广泛分布于自然界的生物多聚物, 其储量仅次于纤维素, 位居第二。几丁质酶 (chitinase) 可将由 β -1, 4-N-乙酰-D-葡聚糖 (NAG) 残基组成的几丁质降解为低分子量的 NAG, 是一类催化降解几丁质的糖基水解酶 (Gooday, 1990)。自然界中生防菌株大多数都能产生一种或几种几丁质酶, 通过水解除卵菌外的病原真菌的细胞壁而有效地抑制其生长 (Tomokazu 等, 2004; Zhu 等, 2001), 因此几丁质酶作为一种抗菌蛋白是生防菌抑制病原真菌的重要机制之一。

在生防菌中, 芽孢杆菌是目前研究较多的一类菌, 在植物病害生物防治中发挥了重要的作用。de la Vega 等 (2006) 报道了 *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* 中外切几丁质酶对病原真菌的作用, Kishore and Pande (2007) 报道了几丁质水解菌 *Bacillus cereus* 对鹰嘴豆叶部病害灰霉病的应用。目前已经在多种芽孢杆菌中克隆到了几丁质酶编码基因, 例如 Watanabe and Oyanaqi (1990) 在 *B. circulans* WL-12 中克隆了几丁质酶基因 *chiA*。黄玉杰等 (2006) 在 *B. subtilis* Ap113 中克隆了 *chi113*。前人的工作主要侧重于芽孢杆菌几丁质酶基因分子特性等方面, 利用芽孢杆菌几丁质酶基因构建生防菌株研究表达及抑菌活性还鲜有报道。本研究目的是利用穿梭载体 pHY300PLK 通过芽孢杆菌感受态转入方法将几丁质酶编码基因导入到本身几丁质酶活性较低的巨大芽孢杆菌 Ap25 中, 研究在巨大芽孢杆菌中的表达能力, 以提高生防菌的抑菌能力, 为进一步开发应用打下基础。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒及培养条件 本研究使用的菌株和质粒列于表 1。大肠杆菌 JM109 生长培养基 LB, 37 培养 12~16 h, 芽孢杆菌及其工程菌分别在 LB 平板或液体培

养基中 28 培养 24~48 h。抗生素使用浓度分别是: 氨苄青霉素 (Ap) 50 μ g/ml, 四环素 (Tet) 20 μ g/ml。

1.1.2 培养基 大肠杆菌培养基 LB、SOC 见参考文献 (颜子颖, 1998)

几丁质培养基见参考文献 (Wang and Tang, 1998)

SP 培养基: 100 ml 的蒸馏水中加入以下物质: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2%, K_2HPO_4 1.4%, KH_2PO_4 0.6%, 柠檬酸钠 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02%, 葡萄糖 0.5%, 酪蛋白水解物 0.02%, 酵母抽提物 0.1%, L-leucine 50 μ g/ml, L-Methionine 50 μ g/ml 其中葡萄糖、酪蛋白水解物、酵母抽提物、L-leucine 和 L-Methionine 配成母液分别灭菌, 接菌前加入到培养基中。

SP 培养基: 100 ml 的蒸馏水中加入以下物质: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2%, K_2HPO_4 1.4%, KH_2PO_4 0.6%, 柠檬酸钠 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02%, 葡萄糖 0.5%, MgCl_2 5 mmol/L, 酵母抽提物 0.1%, L-leucine 50 μ g/ml, L-Methionine 50 μ g/ml, 其中葡萄糖、 MgCl_2 、酵母抽提物、L-leucine 和 L-Methionine 配成母液分别灭菌, 接菌前加入到培养基中。

1.1.3 酶和试剂 各种限制性内切酶、 T_4 DNA ligase 等分别购自上海生工、TaKaRa Biotech 公司, DNA 凝胶回收试剂盒购自 TaKaRa Biotech 公司, DNA 片段回收试剂盒购自上海生工。X-gal、IPTG 购自 TaKaRa Biotech 公司。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒 pHYChi113 的构建 质粒 pMSDChi113 为 pMD18-T 连接枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) Ap113 的几丁质酶基因 *chi113*, 已在 GenBank 上登陆, 登陆号为 DQ661650, 具有几丁质酶活性。经测序发现该基因同 GeneBank 中已发表的 *B. subtilis* 的几丁质酶 *chi* 基因同源率为 99%, 并且该基因 *chi113* 的 5' 端引入 SD 序列 (黄玉杰等, 2006)。以质粒 pMSDChi113 为模板, 设计引物 *chiEcoRIup*: 5'-CGGAATTCAGGAGGTTGATATGAAAAAAG 和 *chiEcoRI*do: 5'-CGGAATTCTTATTTG CAATCACCAATT-3', 进行 PCR 扩增, 反应条件为: 94 预变性 5 min, 其次 94 变性 1 min, 39 退火 1.5 min, 72 延伸 2 min, 共 10 个循环, 然后 94 变性 1 min, 41 退火 1.5 min, 72 延伸 2 min, 共 25 个循环, 最后 72 延伸 20 min。利用 *EcoRI* 酶切 PCR 产物, 同 *EcoRI* 酶切并去磷酸化的大肠杆菌芽孢杆菌穿梭质粒 pHY300PLK 连接, 转化 *E. coli*

表 1 菌株和质粒

Table 1 Strain and Plasmid

菌株 质粒 Strains Plasmids	特性 Characteristics	来源 Sources
<i>B. subtilis</i> Ap113	生防菌株, 具有几丁质酶活性	实验室保存
<i>B. megaterium</i> Ap25	生防菌株, 具有内切葡聚糖酶活性	实验室保存
pHY300PLK	Amp ^r , Tet ^r , 穿梭质粒, 可在大肠杆菌和芽孢杆菌中复制	中国农业大学张力群老师惠赠
pMSDChi113	Amp ^r , 携带几丁质酶基因, 并在几丁质酶基因前具有 SD 序列	本室连接重组获得
pHYChi113	Amp ^r , Tet ^r , 携带有几丁质酶基因	本室连接重组获得

DH5，根据几丁质酶基因及穿梭载体 pHY300PLK 的酶切位点，利用 *Pst*I 和 *Eco*RI 酶切该质粒，以确定质粒的连接及其连接方向，经酶切检测确认后，获得重组载体 pHYChi113。

1.2.2 重组质粒 pHYChi113 向芽孢杆菌的转化 按照芽孢杆菌感受态细胞转化方法进行转化。

将纯化的巨大芽孢杆菌 Ap25 单菌落接种到 5 ml LB 的培养基上，37℃ 振荡培养过夜；含有芽孢杆菌的 LB 培养基接种到新鲜的 SP 培养基上（接种体积大约是 1%），37℃ 振荡培养，当细胞长到对数后期时，在培养液中加入甘油，最终浓度为 12.5%；将含有甘油的培养基每 400 μ l 一份装到微离心管中，在乙醇-干冰上迅速冷冻，-70℃ 保存，一直到使用时；使用保存的菌种时，37℃ 解冻，利用 SP 培养基稀释 7.5 \times 体积，振荡混匀，37℃ 振荡培养 90 min，利用此培养物作为感受态细胞。芽孢杆菌的感受态冰上融化，取 1.5 ml 的灭菌的离心管，依次加入 50 μ l 的感受态细胞和 50 μ l 的质粒溶液混匀，37℃ 振荡培养 30 min；加入 100 μ l LB 培养基，37℃ 振荡培养 60 min；用弯曲玻棒接菌在含 20 μ g/ml 的四环素的 LB 平板上，28℃ 培养 24~48 h。将得到的转化子同时接种到几丁质平板上和含四环素的 LB 平板上，28℃ 培养 3~5 d，观察转化子在几丁质平板上的水解情况。设计引物 JChi113-R 和 JChi113-F 对重组芽孢杆菌进行 PCR 扩增（黄玉杰等，2006），以具有几丁质酶活性的转化子为模板，检测几丁质酶基因的转化，并提取质粒，进行酶切检测。

1.2.3 几丁质酶活性测定 将芽孢杆菌 Ap25、工程菌 Ap25-chi113 按照 1% 接种量接种到几丁质液体培养基中，摇床培养 48 h 后，8 000 \times g 离心 10 min，上清液即为待测样品，采用冷冻干燥和聚乙二醇浓缩待测样品。几丁质酶活性测定用 DNS（3, 5-二硝基水杨酸）比色法（Tsukamoto 等，1984）。1 ml 磷酸缓冲液（0.2 mol/L, pH 4.5），0.5 ml 待测样品，0.5 ml 胶体几丁质，混匀，37℃ 恒温水浴 1 h。加入 DNS 试剂 1.0 ml，混匀后沸水浴 10 min，冷却至室温，离心后取上清液在波长 530 nm 下测吸光度，重复 3 次，取平均值。以 100℃ 高温灭活处理一个酶活力 15 min 的待测样品为对照。酶活单位定义：每小时水解几丁质产生 1 μ mol 还原糖所需的酶蛋白量。

1.2.4 重组芽孢杆菌平板拮抗和温室生物测定实验 表 2 中供试病原菌在 PDA 培养基上培养 3 天后，用灭菌打孔器取带菌丝的圆盘型培养基块，将该培养基块放在 PDA 平板的中央，将 Ap25、其工程菌株分别点接在距中央 2 cm 的周围，28℃ 下培养 5~8 d 后记录抑菌带的宽度，检测野生菌及其工程菌的平板拮抗能力。抑制率 = $1 - (\text{接细菌处病原菌扩展半径} / \text{对照病原菌扩展半径}) \times 100\%$ 。

以小麦纹枯病和棉花枯萎病为防治对象，对 Ap25 和 Ap25-Chi113 进行防病生物测定，操作方法、病害调查标准及防治效果计算参照文献（中华人民共和国农业部，2002；杨合同等，2003）。

表 2 病原真菌

Table 2 Pathogenic fungi

菌株 Strains	特性 Characteristics	来源 Sources
<i>Rhizoctonia solani</i>	植物病原菌，棉花等立枯病	实验室保存
<i>Coniothyrium fuckellii</i>	植物病原菌，引起枣的叶斑病	实验室保存
<i>Fusarium graminearum</i>	植物病原菌，引起小麦赤霉病	实验室保存
<i>Macrophoma kawatsukai</i>	植物病原菌，引起棉花红腐病	实验室保存
<i>Fusarium oxysporium</i>	植物病原菌，引起棉花枯萎病	实验室保存
<i>Botrytis cinerea</i>	植物病原菌，引起瓜类灰霉病	实验室保存
<i>Rhizoctonia cerealis</i>	植物病原菌，引起小麦纹枯病	实验室保存
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	植物病原菌，引起棉花炭疽病	实验室保存
<i>Bipolaris sorohululana</i>	植物病原菌，引起小麦等根腐病	实验室保存

2 结果

2.1 穿梭质粒 pHYChi113 向芽孢杆菌 Ap25 中的转化

按照 pHY300PLK 转芽孢杆菌的方法，将重组载体 pHYChi113 转化巨大芽孢杆菌 Ap25。将转化后长出的菌落转移至几丁质平板上培养，3~5 天后明显观察到部分菌落消解几丁质在自身周围产生的透明圈（图 1），说明导入的几丁质酶基因得到了表达，并且分泌到培养基中。挑取具有几丁质酶活性的菌株为模板，利用引物 JChi113-F 和 JChi113-R 进行 PCR 扩增，进一步确定几丁质酶编码基因导入到巨大芽孢杆菌中，筛选转化子。提取转化子质粒，利用 *Eco*RI 和 *Pst*I 酶切鉴定，鉴定结果同质粒 pHYChi113 的酶切结果一样。依据平板上对几丁质水解圈的大小，确定水解圈最大的转化子进入下一步实验，转化子编号为 Ap25-chi113。

2.2 几丁质酶活性检测

利用 DNS 比色法对芽孢杆菌 Ap25 及其工程菌 Ap25-chi113 进行几丁质酶活性测定，结果见表 3。由表 3 可以看出，通过摇床培养获得的粗酶

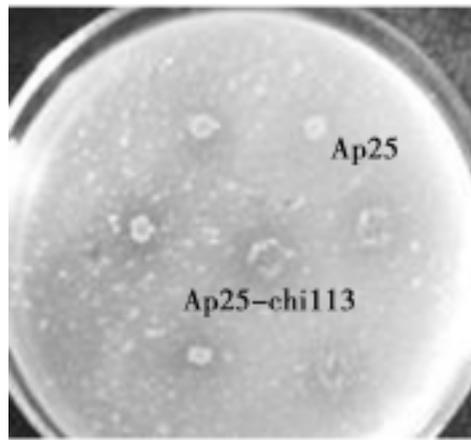


图 1 野生菌株 Ap25 和工程菌株 Ap25 ~ Chi113 对几丁质的消解作用
Fig . 1 Digestion of the chitin on plate by wild type Ap25 and engineered strain

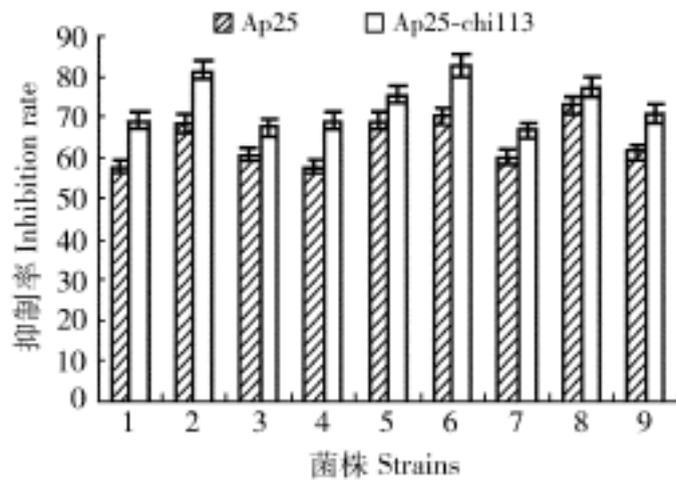


图 2 巨大芽孢杆菌 Ap25 与工程菌 Ap25 ~ chi113 对病原菌的抑制率
Fig . 2 Inhibition percentage of Ap25 and Ap25-chi113 to pathogenic fungi

1 . *R. solani*; 2 . *C. fuckellii*; 3 . *F. graminearum*;
4 . *M. kawatsukai*; 5 . *F. oxysporium*; 6 . *B. cinerea*;
7 . *R. cerealis*; 8 . *C. gloeosporioides*; 9 . *B. sorohlulana*

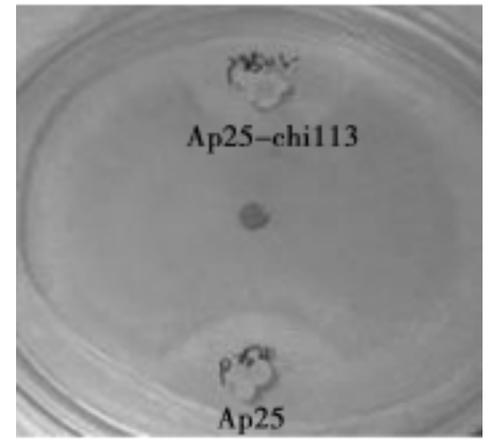


图 3 野生菌 Ap25 与工程菌对 *Rhizoctonia cerealis* 的室内平板拮抗性比较
Fig . 3 Inhibition effects of Ap25 and Ap25-Chi113 to *Rhizoctonia*

表 3 芽孢杆菌及工程菌几丁质酶活性测定
Table 3 Detection of chitinase activity from *Bacillus* and the recombinant

样品 Treatment	酶活力 Chitinase activity (U/ml)	
	Ap25	Ap25-chi113
粗酶液	0.14	4.02
5 倍浓缩液	1.23	13.10
10 倍浓缩液	2.08	26.91

液进行几丁质酶活性测定时，原始菌株 Ap25 及工程菌株 Ap25-chi113 几丁质酶活性分别是 0.14 和 4.02，利用冷冻干燥和聚乙二醇对粗酶液进行浓缩测定几丁质酶活性，工程菌株 Ap25-chi113 的 10 倍浓缩粗酶液中几丁质酶活性为 26.91，是原始菌株 Ap25 几丁质酶活性的 13 倍，由此可见将几丁质酶编码基因导入到巨大芽孢杆菌 Ap25 中，使 Ap25 获得了几丁质酶活性，进一步进行抑菌实验以确定几丁质酶基因的导入是否提高了芽孢杆菌 Ap25 的抑菌活性。

2.3 重组芽孢杆菌 Ap25-chi113 的平板拮抗试验

巨大芽孢杆菌 Ap25 与工程菌株 Ap25-chi113 对病原菌的抑制效果见图 2、3。结果表明，野

生菌株 Ap25 与工程菌株 Ap25-chi113 对所用供试病原菌均有一定的抑制效果，且经改造后的工程菌株抑菌能力明显增强，尤其是工程菌 Ap25-chi113 对 *C. fuckellii* 的抑菌率达到了 80% 以上，相对于野生菌 Ap25 的抑制率提高了 13% 以上。工程菌 Ap25-chi113 对 *F. graminearum* 的抑菌能力较差，其抑菌率为 66.5%，提高了 7%，以上说明几丁质酶编码基因的导入提高了巨大芽孢杆菌 Ap25 的抑菌能力。

2.4 野生菌株及其工程菌株温室生物测定实验

温室实验中，野生菌株与工程菌株对小麦纹枯病和棉花枯萎病防治效果见表 4。由表 4 可见野生菌株和工程菌株均可显著降低小麦纹枯病和棉花枯萎病病情指数，同对照相比在 0.01 水平上达到了显著差异。工程菌 Ap25-chi113 对小麦纹枯病和棉花枯萎病的防效分别达到了 70.34% 和 58.51%，同野生菌相比分别提高了 27.54% 和 21.28%，在 0.01 水平上达到了显著差异，进一步说明几丁质酶基因的导入确实提高了芽孢杆菌对小麦纹枯病菌和棉花枯萎病菌的防病效果。

表 4 巨大芽孢杆菌 Ap25 及其工程菌对小麦纹枯病和棉花枯萎病的防治效果

Table 4 Effects of Ap25 and Ap25-Chi113 on control of two plant diseases

处理 Treatment	小麦纹枯病 wheat sheath blight		棉花枯萎病 cotton Fusarium wilt	
	病情指数 Disease index (%)	防效 Efficacy (%)	病情指数 Disease index (%)	防效 Efficacy (%)
对照 CK	78.67 ^a ± 7.13	—	78.33 ^a ± 2.20	—
Ap25	45.00 ^b ± 3.21	42.80	49.17 ^b ± 0.83	37.23
Ap25-chi113	23.33 ^c ± 0.88	70.34	32.50 ^c ± 2.89	58.51

注：结果为均值 ± SE，不同小写字母表示在 0.01 水平上差异显著

Note: Results are mean ± standard error of mean small letters with different superscripts mean differences significantly ($P < 0.01$)

3 结论

本实验中所用的巨大芽孢杆菌出发菌株具有内切葡聚糖酶活性, 对病原菌具有一定的抑制作用(杨合同等, 2002)。几丁质酶基因在生防菌的抑菌机制及植物抗病能力中具有重要的作用, 利用该基因转化得到的工程菌较野生菌相比具有更强的抑菌活性, 例如徐小静等(2004)将 *Serratia marcescens* 的几丁质酶基因转入荧光假单胞杆菌中, 在平板拮抗实验中工程菌株的抑菌效果明显高于野生菌株, Jayaraman 等(2004)通过穿梭质粒 pDSK519 将水稻几丁质酶基因导入到 *Azospirillum brasilense* 中, 得到了具有抑菌能力的工程菌株。本研究利用已获得的枯草芽孢杆菌几丁质酶基因 *chi113*, 通过穿梭质粒 pHY300PLK 导入到巨大芽孢杆菌 Ap25 中, 得到的重组芽孢杆菌 Ap25-*chi113* 其 10 倍粗酶液中几丁质酶活性达到了 26.91, 增强了生防芽孢杆菌 Ap25 的抑菌能力, 提高了对植物病害的防治效果, 同原始菌株相比, 防效分别提高了 27.54% 和 21.28%。本实验结果与上述报道是一致的, 但是本研究所采用的出发菌株为能够产生内切葡聚糖酶的巨大芽孢杆菌, 所获得的转化子应该具有更为广谱的作用, 比如对低等真菌病害的作用; 因此在下一步的研究中, 将尝试把几丁质酶基因整合到巨大芽孢杆菌的染色体 DNA 上, 提高芽孢杆菌的防病效果, 扩抑菌范围, 以获得具有生态安全性的可用于田间的生防菌株。

〔参 考 文 献〕

- 中华人民共和国农业部, 2002. 中华人民共和国农业行业标准 (NY/T614-2002) ——小麦纹枯病测报调查规范 [R]. 2002-12-30 发布, 2003-03-01 实施
- 颜子颖, 王海林译, 1998. 精编分子生物学实验指南 [M]. 北京: 科学出版社
- de la Vega LM, Barboza-Corona JE, Aguilar-Uscanga MG *et al*. 2006. Purification and characterization of an exochitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. Aizawai and its action against phytopathogenic fungi [J]. *Can J Microbiol*, **52** (7): 651—657
- Gooday GW, 1990. The ecology of chitin decomposition [J]. *Adv Microb Ecol*, **11**: 378—430
- Hideyuki O, Nao Baba, Shigenri Nakayama *et al*. 2003. Molecular analysis of the gene encoding a novel cold-adapted chitinase (ChiB) from a marine bacterium, *Alteromonas* sp. Strain O-7 [J]. *J Bacteriol*, **185** (4): 1153—1160
- Hiroshi T, Takahiro K, Mitsugu Y *et al*. 2003. Characterization of chitinase genes from an alkaliphilic actinomycete, *Nocardiopsis prasina* OPC-131 [J]. *Appl Environ Microbiol*, **69** (2): 894—900
- Huang YJ (黄玉杰), Yang HT (杨合同), Zhou HZ (周红姿) *et al*. 2006. Chitinase gene from *Bacillus subtilis*: Cloning, sequencing and Expression in Burkholderia B418 [J]. *J Biol Control* (中国生物防治), **22** (增刊): 72—77
- Jayaraman Jayaraj, Subbaratnam Muthukrishnan, George H *et al*. 2004. Transfer of a plant chitinase gene into a nitrogen-fixing *Azospirillum* and study of its expression Canadian [J]. *J Microbiol*, **50** (7): 509—513
- Kishore Gk, Pande S, 2007. Chitin-supplemented foliar application of chitinolytic *Bacillus cereus* reduces severity of Botrytis gray mold disease in chickpea under controlled conditions [J]. *Lett Appl Microbiol*, **44** (1): 98—105
- Tomokazu K, Akihiro S, Toshiya S *et al*. 2004. Distribution and phylogenetic analysis of family 19 chitinases in actinobacteria [J]. *Appl Environ Microbiol*, **70** (2): 1135—1144
- Tsukamoto T, Koga D, Ide A *et al*. 1984. Purification and some properties of chitinases from Yam Dioscorea opposite [J]. *Thumb Agric Biol Chem*, **48** (4): 931—939
- Wang YM, Tang WH, 1998. Expression of chitinase and -1, 3-glucanase genes in *Bacillus subtilis* B-908. Liu Y. Res Control Plant Disease. Beijing: China Agri Sci and Tech Press, 423—426
- Watanabe T, Oyanaqi W, 1990. Gene cloning of chitinase A1 from *Bacillus circulans* WL-12 revealed its evolutionary relationship to *Serratia* chitinase and to the type III homology units fibronectin [J]. *J Biol Chem*, **15**: 15659—15665
- Xu XJ (徐小静), Zhang LQ (张力群), Zhu YY (朱有勇) *et al*. 2004. Improving biocontrol effect of *Pseudomonas fluorescence* P5 on plant diseases through genetic modification with chitinase gene [J]. *J Agric Biotechnol* (农业生物技术学报), **12** (4): 460—463
- Yang HT (杨合同), Tang WH (唐文华), Chi JG (迟建国) *et al*. 2002. Identification, modes of action and efficacy in controlling ginger bacterial wilt of biocontrol agent B1301 Chinese [J]. *J Biol Control* (中国生物防治), **18** (1): 21—23
- Yang HT (杨合同), Chen K (陈凯), Li JS (李纪顺) *et al*. 2003. Study on root colonization of wheat by recombinant *Bacillus megaterium* and biocontrol efficiency [J]. *Shandong Science* (山东科学), **16** (3): 12—17
- Zhu Q, Mahar EA, Masoud S *et al*. 2001. Enhanced protection against fungal attack by constitutive coexpression of chitinase and glucanase genes in transgenic tobacco [J]. *Bio/Technology*, **12**: 807—812