

微生物酶及其在植物病害生物防治中的作用

辛雅芬¹, 刘晓光^{2*}, 朱俊华³, 高克祥⁴ (1. 上海农林职业技术学院, 上海201600; 2. 江苏大学生命科学研究院, 江苏镇江212013; 3. 北京城市学院, 北京100083; 4. 山东农业大学植保系, 山东泰安271018)

摘要 介绍了生防菌产生的细胞壁降解酶, 如几丁质酶、葡聚糖酶和蛋白酶及其生防作用机制, 不同细胞壁降解酶之间以及与抗生素等次生代谢产物之间的协同抑菌作用, 以及细胞壁降解酶在植物病害生防中的潜在应用。

关键词 细胞壁降解酶; 生物防治; 协同作用

中图分类号 S476 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)07-03059-04

Microbial Enzymes and Their Roles in Biocontrol of Plant Diseases

XIN Ya-fen et al (Shanghai Vocation and Technique College of Agriculture and Forestry, Shanghai 201600)

Abstract The biocontrol mechanisms of cell-wall degrading enzymes (CWDEs) produced by biocontrol fungi and bacteria, such as chitinases, glucanases and proteinases, the synergistic antifungal activities among different CWDEs and secondary metabolites, such as antibiotics, and the potential application of CWDEs in biocontrol of plant diseases were discussed.

Key words Cell-wall degrading enzymes; Biocontrol; Synergistic antifungal activity

生物防治包括直接的和间接的两种策略。间接的策略, 如通过土壤改良改变植物根际环境, 增强固有拮抗微生物对专化性病菌的抑制作用。直接的生防机制包括抗生作用、对营养和空间的竞争作用, 以及产生具有溶菌作用的细胞壁降解酶(Cell-wall degrading enzymes, CWDEs)等。另外, 成功的定殖能力也是潜在拮抗菌的一个重要特性。最有效的生防因子可利用2种或多种不同的机制, 组合应用不同的拮抗菌, 通过多种作用机制来防治1种或多种病菌。了解生防机制是非常重要的, 因为它提供了大量的信息用于指导如何维持、增强和有效实施生物防治。为此, 笔者重点讨论了植物病害防治中微生物酶的作用机制。

1 细胞壁降解酶在植物病害生物防治中的作用

多数真菌的细胞壁主要由作为结构骨架的几丁质(卵菌为纤维素)及无定形的填充物昆布多糖(-1,3-葡聚糖)组成, 还含有少量的蛋白质、脂肪等。因此, 产生降解酶的能力是许多植物病害生物防治真菌和细菌的重要特性。在植物病害生防机制中, 重寄生或溶菌作用主要基于胞外细胞壁降解酶的活动, 负责降解靶标真菌的细胞壁并利用其营养; 同时, 这些细胞壁降解酶还能抑制植物病原真菌的菌丝生长和孢子萌发——抗生作用。另据报道, 重寄生真菌水解细胞壁产生的寡聚糖还可能作为激发子与寄主真菌的识别及活化植物的防御反应有关。研究表明, 自重寄生真菌中纯化的几丁质酶(Chitinase)、葡聚糖酶的抗菌活性比从植物和其他来源的酶要高得多; 而且组合使用不同的细胞壁降解酶, 或与植物病程相关(PR)蛋白、其他杀菌剂、影响细胞膜的毒素和生防细菌组合应用时, 抗菌活性因协同作用而明显增强^[1]。

1.1 几丁质酶 几丁质是N-乙酰葡糖胺(GlcNAc)以-1,4糖苷键连接起来的直链多聚物, 是昆虫甲壳和绝大多数真菌细胞壁的主要成分。在真菌中, 几丁质构成细胞壁的3%~60%^[2]。几丁质酶是一类能催化降解几丁质的糖苷酶, 产酶

微生物包括真菌、酵母、细菌、放线菌和某些病毒。从1969年Morreal等报道生防菌Trichoderma viride能够产生几丁质酶以来, 有关几丁质酶在生物防治及真菌细胞壁降解等方面的作用的研究逐渐增多^[3-5]。

根据酶切方式以及最终产物的不同, 几丁质酶可以分为3类, 分别为: -1,4-N-乙酰葡糖胺酶(-N-acetylhexosaminidase, (EC 3.2.1.52), 以外切形式降解几丁质, 水解产物仅为N-乙酰葡糖胺单体; 几丁二糖酶(Chitobiidase), 水解产物仅为几丁二糖; 内切几丁质酶(Endochitinase, EC 3.2.1.14), 以随机形式内切降解几丁质, 其酶解产物有几丁单糖、几丁二糖和几丁寡糖。按等电点大小可分为酸性几丁质酶和碱性几丁质酶。按氨基酸序列结构及同源性不同可分为18、19和20家族, 大多数微生物产生的几丁质酶属于18家族。

几丁质酶是一种诱导酶, 一些真菌、细菌、放线菌在含有几丁质的培养基中才能产生几丁质酶。除了几丁单糖, 几丁质、几丁二糖、脱乙酰几丁质和几丁寡糖均可作为诱导物^[6], 植物几丁质酶在病原真菌、病毒、细菌、外源几丁质、乙烯、重金属、机械损伤、紫外线辐射等因素下也可被大量诱导表达^[7-10]。用纯几丁质或植物病原菌细胞壁作唯一碳源, 可诱导木霉产生几丁质酶^[11], 但加入葡萄糖、蔗糖、蛋白质合成抑制剂等均会强烈抑制几丁质酶的产生。

1.2 -1,3-葡聚糖酶 -1,3-葡聚糖, 又称昆布多糖, 是由-1,3糖苷键连接的D型葡萄糖聚合物。真菌的细胞壁中含有超过60%的昆布多糖, 无定形地填充在规则排列的几丁质结构骨架中。-1,3-葡聚糖主要由-1,3-葡聚糖酶水解而来。-1,3-葡聚糖酶在细菌、真菌、高等植物中广泛分布。在真菌中, 已知-1,3-葡聚糖酶具有多种功能。首先, 它在真菌发育、分化和形态建成过程中有重要的生理功能; 其次, 当碳源和能源消耗殆尽时, 作为自溶酶, 与-1,3-葡聚糖的转移有关; 再次, 它参与植物-真菌病原互作, 在病原菌侵染过程中降解寄主维管束中的胼胝质(-D-1,3-葡聚糖); 最后, 它在腐生和重寄生现象中有营养功能。

1.2.1 -1,3-葡聚糖酶的分类和诱导。 -1,3-葡聚糖酶(-1,3-glucanase) 又称昆布多糖酶、胼胝质酶, 作用底物为以-1,

基金项目 国家自然科学基金项目(30370954, 30571498, 30670030, 30811130218); 江苏大学高级人才启动基金项目(07JDC030)。

作者简介 辛雅芬(1962-), 女, 吉林长春人, 副教授, 从事植物病害生物防治方面的研究。* 通讯作者, E-mail: xglu66@yahoo.com。

收稿日期 2008-12-15

3-糖苷键连接起来的多聚糖。微生物来源的-1,3-葡聚糖酶习惯上分为外切-1,3-葡聚糖酶[EC 3.2.1.58]和内切-1,3-葡聚糖酶[EC 3.2.1.6或EC 3.2.1.39]2种类型。外切型是从聚合物的非还原末端顺序切割葡萄糖,得到唯一的水解产物葡萄糖单体;内切型是沿着多糖链随机切割-1,3键,释放出分子量较小的寡聚糖^[11]。-1,3-葡聚糖的完全水解需要2种类型的酶共同作用。

真菌的-1,3-葡聚糖酶分组成型和诱导型,已发现多种多聚糖和真菌细胞壁均可以诱导生防真菌产生-1,3-葡聚糖酶,而高浓度的葡萄糖则抑制产酶。当 *Tichoderma harzianum* 在含有不同碳源的培养基上生长时,可以观察到真菌细胞壁不同诱导的-1,3-葡聚糖酶活性与类型也不同。木霉中的-1,3-葡聚糖酶在卵周质中,依附于细胞壁或分泌到培养基中,酶表达的调控是-葡聚糖生物降解和随后的菌寄生的关键步骤。木霉能够产生复杂的葡聚糖酶系统,表明它们可能在重寄生中对寄主细胞壁的水解起不同的作用。

1.2.2 -1,3-葡聚糖酶的纯化与基因克隆。已经从 *Tichoderma harzianum* 和 *Gliocladium virens* 等生防真菌中获得各种-1,3-葡聚糖酶,其在离体条件下可抑制各种植物病原真菌,包括 *Botrytis cinerea*、*Fusarium solani*、*Ustilago avenae* 和 *Uromyces necator* 等。用昆布多糖诱导 *T. harzianum* IM 206040 分泌胞外酶,从培养液中纯化出1个77 kDa的外切葡聚糖酶^[12]。从 *T. harzianum* CECT2413 中纯化出内切-1,3-葡聚糖酶 BGN13.1,设计合成寡聚核苷酸引物克隆 BGN13.1 的cDNA,推断的氨基酸序列预测了1个78 kDa的蛋白;氨基酸序列分析表明,该酶包含3个区域:N末端的前导序列、非确定性序列和富含Cys的C端序列;酶活力、蛋白和mRNA数据表明,基因 bgn13.1 受葡萄糖的抑制,同时被真菌细胞壁、灭菌的酵母细胞或真菌菌丝诱导^[13]。另一个来源于 *T. harzianum* 的外切-1,3-葡聚糖酶 LAM1.3,分子量为110 kDa,相关基因 lam1.3 已被克隆,LAM1.3 的推测氨基酸序列表现出与 EXG1 高度的同源性,而 EXG1 是植物病原真菌 *Cochliobdus carbonum* 的1个外切-1,3-葡聚糖酶,LAM1.3 与 BGN13.1 同源性低。侵染 *Sclerotinia sclerotiorum* 的重寄生菌 *Coniothyrium minutans* 分泌1个约100 kDa的外切-1,3-葡聚糖酶,从cDNA文库克隆编码基因命名为 cmg1,推断的核苷酸和氨基酸序列表明,其与其他真菌的外切-1,3-葡聚糖酶基因具有高度相似性^[14]。一种白粉菌的重寄生菌 *Ampelomyces quisqualis* 在培养液中具有高水平的胞外外切-1,3-葡聚糖酶的活性,编码该酶的基因 exgA 被分离和测序,从 exgA 推测的多肽与 EXG1 和 BGN13.1 分别有42%和30%的同源性,该基因在生长后期阶段表达,由真菌细胞壁成分诱导转录^[15]。

1.3 纤维素酶 纤维素是由-1,4-糖苷键连接8000~12000个葡萄糖残基形成的直链聚合物,纤维素酶是降解纤维素生成葡萄糖的一组酶的总称,一般分为3类:内切葡聚糖酶(Endo-1,4-D-glucanase, EC 3.2.1.4),作用于分子内部非结晶区,随机水解产生非还原末端的小分子纤维素;外切葡聚糖酶(Exo-1,4-D-glucanase, EC 3.2.1.91),作用于非还原端,一次水解产生纤维二糖分子;-葡萄糖苷酶(-glucosidase, EC 3.2.1.21),水解纤维二糖和短链的纤维寡糖生成

葡萄糖^[16-17]。

卵菌能引起植物猝倒病,瓜果腐烂病,马铃薯、番茄晚疫病,谷子白发病,葡萄、大豆、瓜类霜霉病及十字花科白锈病等严重病害。但卵菌的细胞壁主要由纤维素组成,因此必须用能够产生纤维素酶的生防因子来控制它。木霉属中的里氏木霉、康氏木霉(*Tichoderma koringii*)和绿色木霉(*Tichoderma viride*)是产纤维素酶活性较高的菌种。哈茨木霉T3菌株在泥炭藓和 *P. ultimum* 诱导下可产生内切-1,3-葡聚糖酶和内切-1,4-葡聚糖酶。

可以利用硫酸铵、醋酸铅沉淀,丙酮、乙醇、乙醚提取,纸层析、柱层析、凝胶过滤、等电聚焦等方法分离和提纯纤维素酶。有报道,从哈茨木霉T3菌株纯化出17 kDa的内切-1,3-葡聚糖酶和40、45 kDa的纤维素酶,它们在低浓度下即能抑制腐霉属真菌游动孢子萌发和芽管伸长。在哈茨木霉与 *Pythium ultimum* 的互作中,通过胶体金标记定位电镜观察发现,-1,3-葡聚糖酶首先削弱寄主真菌的细胞壁,然后有少量纤维素酶在细胞壁的局部穿透。由此证明了-1,3-葡聚糖酶在木霉与终极腐霉重寄生互作中的重要作用,而纤维素酶只是在重寄生的高级阶段起作用,更多的纤维素酶的水解产物是作为木霉腐生阶段的食物来源,为其自身的繁殖、产孢提供能量^[18]。

1.4 蛋白酶 蛋白酶是催化肽键水解的一类酶,广泛存在于微生物中,根据在蛋白质底物上的作用位点不同可分为外肽酶和内肽酶;根据催化机制分为丝氨酸蛋白酶、天冬氨酸蛋白酶、巯基蛋白酶和金属蛋白酶;根据氨基酸序列的相似性和进化关系又可分成不同的家族^[19]。生防真菌中木霉属产蛋白酶量较大,灭菌的菌丝、真菌细胞壁制备物和几丁质均可诱导哈茨木霉分泌蛋白酶,液体培养基中有葡萄糖则抑制产酶,有机氮源能够刺激产酶。Rodríguez-Kabana等发现,蛋白酶参与 *T. viride* 对 *S. rolfii* 的生物防治^[20]。已从哈茨木霉IM206040中克隆出基因 prb1,这是第一个报道的与重寄生有关的基因,它的产物是1个31 kDa的丝氨酸蛋白酶。该酶参与降解病原菌的细胞壁和细胞膜,从溶解的病原菌中释放蛋白质给重寄生菌提供营养,在与 *R. solani* 菌寄生互作中也能观察到该蛋白酶强有力地表达^[21]。

因为叶片表面环境多变,所以叶部病害难以用生防因子控制。近年来,叶部真菌病害的生物防治取得了较大的进展。哈茨木霉T39菌株是灰霉病(*B. cinerea*)的有效生防菌,它在液体培养基中分泌蛋白酶,可有效分解 *B. cinerea* 产生的致病因子多聚半乳糖醛酸酶。其直接用在菜豆叶片上可降低56%~100%的病害严重度。因为T39在体外很少产几丁质酶和-1,3-葡聚糖酶,经T39处理的叶片上也检测不到这2种酶,因此认为蛋白酶在哈茨木霉T39对 *B. cinerea* 的生物防治中是关键酶^[22]。

1.5 不同细胞壁降解酶之间的协同作用 大量试验证明,几丁质酶与-1,3-葡聚糖酶组合使用具有更强的抑菌作用。一方面由于-1,3-葡聚糖酶可水解真菌菌丝外围的葡聚糖成分,而将菌丝内部的几丁质暴露出来,使几丁质酶更容易作用于菌丝,从而增强了抑真菌作用;另一方面,酶解细胞壁的产物又可作为诱导因子,进一步增强酶的表达并诱导植物自

身的防卫反应,这种相互作用诱导的机制类似于过敏反应。此外,几丁质酶与核糖体失活蛋白、内毒素等其他抗体蛋白连用,也具有较好的抑菌效果。Much 等用几丁质酶单独处理仅能抑制 *T. viride* 的生长,用葡聚糖酶处理仅能抑制 *Fusarium solani f. sp. pisi* 的生长,而2种酶共同作用能有效抑制8种真菌的生长^[23]。Lorito 等发现,*T. harzianum* 的外切、内切几丁质酶和葡萄糖苷酶能协同抑制 *B. cinerea*^[24];离体试验表明,过氧化物酶、几丁质酶和-1,3-葡聚糖酶也能协同抑制多种植物病原真菌^[25]。

1.6 细胞壁降解酶与抗生素等次生代谢物的协同作用 抗生素一般是指由微生物产生的低分子量的有机化合物,能以较低的浓度抑制其他微生物的生长和代谢活动。具生防作用的 *Chaetomium*、*Gliocladium*、*Penicillium* 和 *Trichoderma* 几个属的真菌均能产生抗生素,其中,*Chaetomin*、*Vridin* 和 *Gliotoxin* 等表现出对微生物的广谱抗性,在生防中的重要作用已被证明。生防机制理论上分为抗生、寄生、竞争、诱导抗性等,自然条件下一种机制通常起主导作用,但不同作用方式之间并不相互排斥,可能同时发生协同作用,比各自单独使用拮抗水平更高^[26-27]。

当抗生素和几种水解酶组合用于防治 *B. cinerea*、*F. oxysporum* 的繁殖体时,发生了协同作用,但当酶在抗生素之后加时作用降低,说明细胞壁的降解需要水解酶和抗生素建立互作关系^[28]。在研究 *Peptaibol* 时发现,酶与抗生素的协同机制是酶和膜影响因子对细胞壁完整性的共同作用^[29]。*Peptaibol* 是含有12~22个氨基酸的线性寡肽,它富含-氨基异丁酸,在N末端N乙酰化,C末端含有氨基乙醇^[30]。它在黑色类脂膜上形成高压离子通道,达不到所需压强时可以改变脂质体对膜的通透性^[31]。当几丁质酶和葡聚糖酶降低了细胞壁的硬度(起屏障作用)时,肽类抗生素抑制膜上合成细胞壁组分的酶,因而削弱了菌丝修补降解酶对细胞壁分解作用的能力,这种观点可由木霉在重寄生互作中寄主真菌膜通透性的改变而得到支持^[32]。

2 细胞壁降解酶与线虫的生物防治

植物寄生线虫是重要的农业有害生物之一。几丁质酶和其他溶菌酶在植物病原线虫的生物防治中也具有重要作用。产几丁质酶的细菌 *Sentrophomonas maltophilia* 抑制马铃薯金线虫 *Gobodera rostochiensis* 卵的孵化,已成为马铃薯胞囊线虫病、金线虫病有效的生防策略^[33]。另一种防治植物寄生线虫的方法是在土壤中添加几丁质以刺激几丁质酶活性增强。这种处理方式使土壤中产几丁质酶的细菌和真菌的种群数量急剧上升,从而达到防治线虫的目的^[34]。

线虫表皮是由含胶原蛋白的多层角质层组成的。胶原蛋白酶对于真菌和细菌拮抗线虫病也起作用,通过添加胶原蛋白可使土壤接种根结线虫的番茄的虫瘿指数锐减。当胶原蛋白与溶胶原蛋白的真菌 *Cunninghamella elegans* 组合应用同时处理土壤时,减少虫瘿的效果更明显。另外,从根结线虫卵寄生真菌 *Paecilomyces lilacinus* 和食线虫真菌 *Verticillium chlamydosporium* 中分别纯化了约33 kDa 的蛋白酶,参与真菌对线虫卵壳的穿透,并通过水解卵壳外层的蛋白暴露几丁质层^[35-36]。

3 微生物酶与植物的诱导抗病性

植物具有诱导系统抗性的防卫机制以保护自身免受病害的侵袭。先于病害发生之前,它可以通过病原或非病原体以及某些化学物质诱导产生抗性。通常植物的防卫反应涉及病程相关蛋白的诱导和积累,以及胼胝质、木质素等结构多聚物的沉积。酸性PR蛋白,包括酸性的-1,3-葡聚糖酶和几丁质酶,在病菌侵染的早期阶段起作用,而碱性-1,3-葡聚糖酶和几丁质酶可能在侵染后期与病菌互作。过氧化物酶(POD)因为参与酚的合成并形成结构障碍,在植物抗病反应中也有重要作用。已有证据表明,哈茨木霉 T39 参与对灰霉病的诱导抗性。用哈茨木霉 T203 处理黄瓜根部,多种PR蛋白,如几丁质酶、-1,3-葡聚糖酶、纤维素酶和过氧化物酶的活性明显提高。1个33 kDa 的几丁质酶是植物产生的,所有水解酶的活性在接种后72 h 达到最高,表明植物的防御反应被活化。

除了细胞壁降解酶外,木聚糖酶和葡萄糖氧化酶等也参与木霉和其他拮抗真菌的生防活动。由 *T. viride* 产生的木聚糖酶通过合成乙稀和产生坏死来诱导植物的防卫反应。植物的防御反应需要活性氧,包括 H_2O_2 的参与。有大量的细菌和真菌产生葡萄糖氧化酶(Glucose oxidase, GO),但在动物和植物中没有发现。用真菌 *Aspergillus niger* 的葡萄糖氧化酶基因转化马铃薯,获得的转基因植株体内 H_2O_2 水平升高,诱导水杨酸SA的大量积累,2个防卫相关基因POD和酸性几丁质酶的mRNA水平升高,胞外POD同工酶活性增强,并伴随着根茎组织中木质素含量的明显增加。由此介导了对细菌软腐(*Erwinia caratovora subsp. caratovora*)和马铃薯晚疫病(*Phytophthora infestans*)的高度抗性,抗病性因外源的过氧化氢酶分解了 H_2O_2 而被抵消。通过类似的方法,表达真菌GO基因的转基因水稻也增强了对病原真菌和细菌的抗性。因此,在转基因植物中表达编码产生活性氧的酶基因,可能为培育广谱抗病性的工程植物开辟新途径^[37-38]。

4 直接操纵溶菌酶系统增强生防潜能的分子方法

几丁质酶可通过多种方式用于防治植物病原真菌。酶制剂可以引入灌溉水或进行种子包衣保护种苗,然而自由酶在土壤中寿命很短。人们通过2种策略提高生防真菌的几丁质酶活性:一是直接利用表达真菌几丁质酶基因的转基因植物,二是将能表达和分泌几丁质酶的遗传工程根际真菌或细菌引入土壤中。Haran 等将黏质沙雷氏菌 *Serratia marcescens* 的几丁质酶基因在组成型35S启动子的控制下引入哈茨木霉的基因组。Margolis-Clark 等构建了在 *T. reesei* 纤维素酶强启动子控制下,包含 *T. harzianum* 参与重寄生作用的42 kDa 内切几丁质酶编码区的转化载体,结果多数转化子的几丁质酶活性增长了10倍;而 *T. hamatum* 通过在基因组中增加了42 kDa 内切几丁质酶基因的另一个拷贝,使转化子的几丁质酶活性增长了5倍。

Lorito 等将木霉的内切几丁质酶基因 ech42 插入烟草和马铃薯基因组,结果真菌几丁质酶基因在转基因植株中高水平表达,提高了对叶部病原菌 *Aternaria alternata*、*A. solani* 和 *B. cinerea* 及土传的 *R. solani* 的抗病性。表达内切几丁质酶 Ech42 的苹果株系也增强了对 *Venturia inaequalis* 引起的苹果

黑星病的抗性。还有许多研究利用各种来源的几丁质酶和-1,3-葡聚糖酶基因构建转基因植物以增强抗病性。T. harzianum 的碱性蛋白酶基因 prb1 和 T. longibranchiatum 的-1,4-内切葡聚糖酶(纤维素酶)基因 egl1 通过增加其拷贝数都得到过量表达,转化子较野生型菌株分别明显减轻了 R. solani 或 Pythium ultimum 引发的病害,从而改良了木霉菌的生防潜能^[30]。

5 结语

综上所述,大量证据已表明许多真菌和细菌产生的胞外酶都参与微生物对植物有害生物的生防活动。为了获得有效的生物防治效果,通常需要酶和其他次生代谢物,尤其是抗生素的协同作用。重寄生作用是某些真菌拮抗菌生防活动的专化性机制,主要依赖于产生溶菌酶。对于具有强烈杀昆虫和杀线虫活性的生防真菌和细菌也是如此,分泌溶菌酶的昆虫病原真菌作为环境友好的昆虫生防因子受到更多的关注,而 Bacillus thuringiensis 的产酶能力增强了其生防潜能而居世界生物农药销售量榜首。最近,分子生物学,尤其是微生物分子遗传学和基因工程技术的兴起有助于鉴定生防因子的作用方式和遗传改良。总之,生物防治作为有害生物综合治理的一个组分,必将为发展安全而环境友好的高效植物保护策略发挥重要的作用。

参考文献

- [1] LORITO M, WOODS L, D'AMBROSIO M, et al. Synergistic interaction between cell wall degrading enzymes and membrane affecting compounds[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 1998, 9: 206-213.
- [2] WESSELS J G H, SEISMA J H. Fungal cell walls: A survey in encyclopedia of plant physiology [C]// TANNER W, LOEWUS F A. Plant Carbohydrates II. Berlin: Springer-Verlag, 1981: 352-394.
- [3] MONREAL J, REESE E T. The chitinase of Serratia marcescens [J]. Can J Microbiol, 1969, 15: 689-696.
- [4] SVAN A, CHETI. Degradation of fungal cell walls by lytic enzymes of Trichoderma harzianum [J]. Gen Microbiol, 1990, 135: 675-682.
- [5] TROSNOD A, HJELJORD L, KLEMSDAL S S, et al. Chitinolytic enzymes from the biocontrol agent Trichoderma harzianum [J]. Chitin Enzymol Proc Int Symp, 1996, 2: 235-244.
- [6] WATANABE T, SUZUKI K. Gene cloning of chitinase A1 from Bacillus circulans WL-12 revealed its evolutionary relationship to Serratia chitinase and to the type homology units of fibroretion [J]. Biochem, 1990, 265: 15659-15665.
- [7] BREDERODE F T, IINHORST H J M, BOLLER J F. Differential induction of acquired resistance and PR gene expression in tobacco by virus infection, ethylene treatment, UV light and wounding [J]. Plant Mol Biol, 1991, 17: 1117-1125.
- [8] BREJO F J G, GARRO R, CONEJERO U. C7 (p32) and C6 (p34) PR proteins induced in tobacco leaves by citrus exocortis viridiflexion are chitinase [J]. Physiol and Mol Plant Pathol, 1990, 36: 249-260.
- [9] CONRADS STRAUCH J, DOWM, MILLIGAN D E, et al. Induction of hydrolytic enzymes in Brassica campestris in response to pathogens of Xanthomonas campestris [J]. Plant Physiol, 1990, 92: 238-243.
- [10] BERGLUND L, BRUNSTET J, NELSEN K K, et al. A pectin-rich chitinase from Beta vulgaris [J]. Plant Mol Biol, 1995, 27: 211-216.
- [11] RACHEL C K, KAREN E, BROGIE, et al. Molecular characterization of a novel beta-1,3-exoglucanase related to mycoparasitism of Trichoderma harzianum [J]. Gene, 1999, 226: 147-154.
- [12] VAZQUEZ-GARCIDUENAS S, LEAL-MORALES C A, HERRERA-ESTRELLA A. Analysis of the -1,3-glucanolytic system of the biocontrol agent Trichoderma harzianum [J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 64: 1442-1446.
- [13] DE LA CRUZ J, HINFOR-TORO J A, BENTEZ T, et al. A novel endo-1,3-glucanase, BCN13.1, involved in the mycoparasitism of Trichoderma harzianum [J]. J Bacteriol, 1995, 177: 6937-6945.
- [14] GCZEY G, KERENYI Z, FULOP L, et al. Expression of cng1, an endo-1,3-glucanase gene from Coniophium nitans, increasing during sclerotial parasitism [J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67: 865-871.
- [15] RAYEN Y, SZTEJNBERG A. The mycoparasite anellomyces quisqualis expresses exgA encoding an endo-1,3-glucanase in culture and during mycoparasitism [J]. Phytopathology, 1999, 89: 631-638.
- [16] HENRISSAT B, CLAEYSSENS M, TOMME P, et al. Cellulase families revealed by hydrophobic cluster analysis [J]. Gene, 1989, 81: 83-95.
- [17] BEGUN P. Molecular biology of cellulose degradation [J]. Annu Rev Microbiol, 1990, 44: 219-248.
- [18] HICARD K, TRILLY Y, BENHAMOUN. Cytological effects of cellulases in the parasitism of Phytophthora parasitica by Pythium oligandrum [J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66(10): 4305-4314.
- [19] ARGOS P. A sensitive procedure to compare amino acid sequences [J]. Mol Biol, 1987, 193: 385-396.
- [20] RODRIGUEZ-KABANA R, KELLEY W D, CURL E A. Protolytic activity of Trichoderma viride in mixed culture with Sclerotium rolfsii in soil [J]. Can J Microbiol, 1978, 24: 478-490.
- [21] GERAMIA R A, GOLDMAN G H, JACOBS D, et al. Molecular characterization of the proteinase encoding gene, prb1, related to mycoparasitism by Trichoderma harzianum [J]. Mol Microbiol, 1993, 8: 603-613.
- [22] ELAD Y, KAPAT A. The role of Trichoderma harzianum protease in the biocontrol of Botrytis cinerea [J]. Eur J Plant Pathol, 1999, 105: 177-189.
- [23] MAUCH F, MAUCH MAN B, BOLLER T. Antifungal hydrolases in pea tissue. II. Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and -1,3-glucanase [J]. Plant Physiol, 1988, 88: 936-942.
- [24] LORITO M, HAYES C K, DI PIETRO A, et al. Purification, characterization and an N-acetyl-D-glucosaminidase from Trichoderma harzianum [J]. Phytopathol, 1994, 84: 398-405.
- [25] SCHLUMBAUMA, MAUCH F, VOGELI U, et al. Plant chitinase are potent inhibitors of fungal growth [J]. Nature, 1986, 324(6075): 365-367.
- [26] HOWELL C R. The role of antibiotics in biocontrol [C]// HARMAN G E, KUBICEK C P. Trichoderma & Gliocladium. Padstow: Taylor & Francis, 1998: 173-184.
- [27] MONIE E. Understanding Trichoderma: Between biotechnology and microbial ecology [J]. Int Microbiol, 2001, 4: 1-4.
- [28] HOWELL C R. Mechanisms employed by Trichoderma species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts [J]. Plant Dis, 2003, 87: 4-10.
- [29] LORITO M, FARKAS V, REBUFFAT S, et al. Cell-wall synthesis is a major target of mycoparasitic antagonism by Trichoderma harzianum [J]. Journal of Bacteriology, 1996, 178: 6382-6385.
- [30] REBUFFAT S, EL HENNING P, DAVOUST D, et al. Isolation, sequence and conformation of seven trichothiazines B from Trichoderma harzianum [J]. International Journal of Peptide and Protein Research, 1989, 34: 200-210.
- [31] EL HADJI M, REBUFFAT S, LE DOANT, et al. Interaction of trichothiazines A and B with nodal membranes and with the amoeba Dictyostelium [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1989, 978: 91-104.
- [32] LEWIS J A, PAPANIZAS G C. Permeability changes in hyphae of Rhizoctonia solani induced by germinating preparations of Trichoderma and Gliocladium [J]. Phytopathology, 1987, 77: 699-703.
- [33] CRONIN D, MOENNE-LOCCHOZ Y, DUNNE C, et al. Inhibition of egg hatch of the potato cyst nematode Globodera rostochiensis by chitinase producing bacteria [J]. Eur J Plant Pathol, 1997, 103: 433-440.
- [34] SARATHCHANDRA S U, WATSON R N, COX N R, et al. Effects of chitin amendment of soil on microorganisms, nematodes, and growth of white clover (Trifolium repens L.) and perennial ryegrass (Lolium perenne L.) [J]. Biol Fertil Soils, 1996, 22: 221-226.
- [35] GALPER S, COHN E, SHEGEL Y, et al. A collagenolytic fungus, Cunninghamella elegans, for biological control of plant parasitic nematodes [J]. J Nematol, 1991, 23: 269-274.
- [36] BONANIS P J M, HITTERS P F L, THUIS H, et al. A basic serine protease from Paecilomyces lilacinus with biological activity against Meloidogyne hapla eggs [J]. Microbiology, 1995, 141: 775-784.
- [37] BAILEY B A, AVNI A, ANDERSON J D. The influence of ethylene and tissue age on the sensitivity of Xanthi tobacco leaves to a Trichoderma viride xylanase [J]. Plant Cell Physiol, 1995, 36: 1669-1676.
- [38] WU G, SHORT B J, LAWRENCE E B, et al. Disease resistance conferred by expression of a gene encoding H₂O₂ generating glucose oxidase in transgenic potato plants [J]. Plant Cell, 1995, 7(9): 1357-1368.
- [39] CHERNIN L, CHETI. Microbial enzymes in the biocontrol of plant pathogens and pests [C]// DICK R P, BURNS R G. Enzymes in the environment. New York: Marcel Dekker, 2002: 171-225.