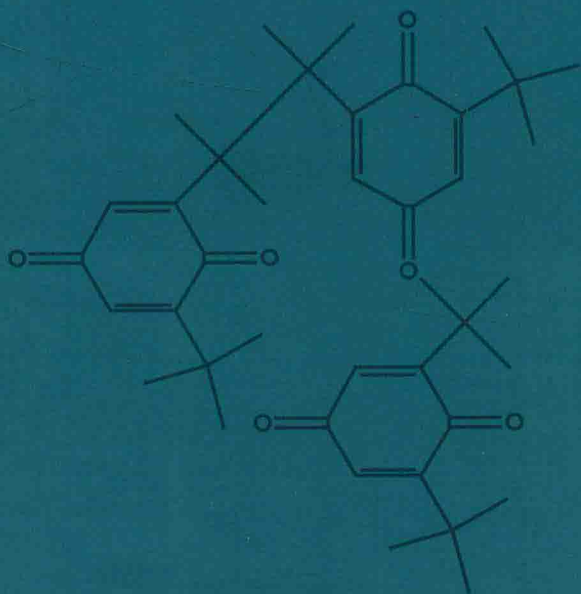


菌株T-33抑菌活性物质 及其对杨树烂皮病菌的抑制机理

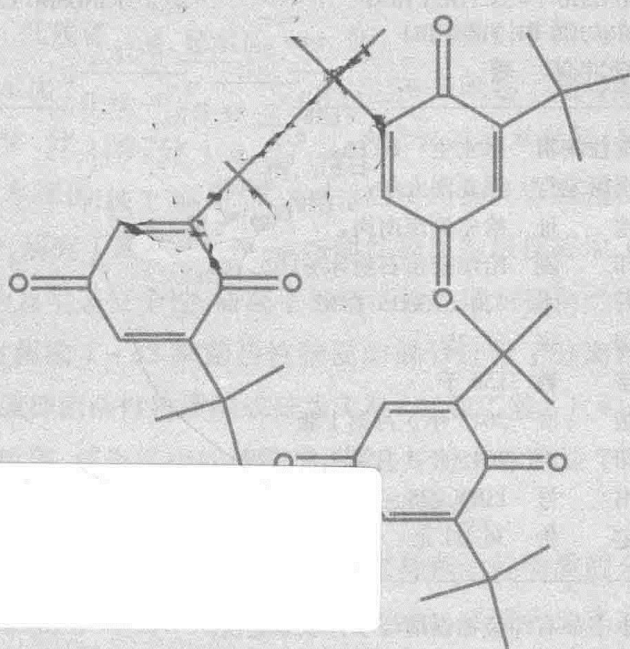
李冲伟 ◇ 著



黑龙江大学出版社
HEILONGJIANG UNIVERSITY PRESS

菌株T-33抑菌活性物质 及其对杨树烂皮病菌的抑制机理

李冲伟 ◇ 著



图书在版编目(CIP)数据

菌株 T-33 抑菌活性物质及其对杨树烂皮病菌的抑制机理 / 李冲伟著. -- 哈尔滨: 黑龙江大学出版社, 2015.5

ISBN 978-7-81129-861-1

I. ①菌… II. ①李… III. ①杨树-植物细菌病-防治-研究 IV. ①S763.721.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2015)第 013776 号

菌株 T-33 抑菌活性物质及其对杨树烂皮病菌的抑制机理

JUNZHU T-33 YIJUN HUOXING WUZHI JI QI DUI YANGSHU LANPI

BINGJUN DE YIZHI JILI

李冲伟 著

责任编辑 张永生 高媛

出版发行 黑龙江大学出版社

地 址 哈尔滨市南岗区学府路74号

印 刷 哈尔滨市石桥印务有限公司

开 本 720×1000 1/16

印 张 11.75

字 数 158 千

版 次 2015 年 5 月第 1 版

印 次 2015 年 5 月第 1 次印刷

书 号 ISBN 978-7-81129-861-1

定 价 36.00 元

本书如有印装错误请与本社联系更换。

版权所有 侵权必究

前 言

近年来,由金黄壳囊孢菌(*Cytospora chrysosperma*)引起的杨树烂皮病的发生面积呈现上升的趋势,轻者引起局部林木病害,重者造成林木大面积死亡,严重破坏了当地的生态环境,给国家造成巨大的经济损失。由金黄壳囊孢菌引起的杨树烂皮病属于寄主主导性病害,对该病害的控制应以提高寄主抗性及抑制病原菌种群数量为主要方向,而控制病原菌种群数量的增长需要安全、低毒、适宜的生防制剂。长期使用化学农药制剂增加了农林副产品中的农药残留量,严重危害人畜健康,污染大气、土壤和水源。在防治病、虫、草害等过程中,微生物农药以其高效、低毒、低残留、低成本的显著特性,一直吸引着国内外专家的研究兴趣,显示出了巨大的应用开发潜力。本书阐述了笔者利用微生物学、生物化学、分子生物学和发酵工程等学科的技术手段,从国内外收集的 29 个木霉菌株中,筛选出对杨树烂皮病菌具有高效抑制作用的菌株 T-33,研究了菌株 T-33 抑菌活性物质的最佳提取工艺、稳定性、室内防治及生态安全性,研究了抑菌活性物质对杨树烂皮病菌的抑制机理并对菌株 T-33 抑菌活性物质的成分进行了分离纯化和结构鉴定,得出该抑菌活性物质的成分为 2,6-二叔丁基-1,4-苯醌,属于一种具有抗菌、消炎作用的植物代谢物,并对木霉菌株 T-33 的分类地位进行了分子生物学验证及生理学特性研究。

该书总结了从微生物菌株中分离、提取和鉴定抑菌活性物质的全过程,是笔者在生物防治方面工作的一些体会和经验,希望为未来本科生、研究生从事该领域的研究提供借鉴。

在本书的编写和出版过程中,得到了黑龙江大学出版社高媛老

师、刘剑刚老师的帮助,本书出版承蒙“黑龙江省博士后特别资助”项目的资助。在此,谨向他们致以诚挚的谢意。

限于本人的学识和水平,书中不当或疏漏之处在所难免,望广大同行和学生随时赐教,以待日后改进和提高。

李冲伟

2015年3月

目 录

第 1 章 绪论	1
1.1 木霉菌的研究现状	2
1.2 杨树烂皮病的研究现状	16
1.3 生物农药的应用	21
1.4 有效成分的提取分离及化学结构研究	32
第 2 章 木霉菌株及其抑菌活性物质的筛选	39
2.1 仪器与材料	40
2.2 试验方法	41
2.3 结果与分析	46
本章小结	52
第 3 章 菌株 T-33 的分类地位及生理学特性	53
3.1 仪器与材料	56
3.2 试验方法	58
3.3 结果与分析	64
本章小结	70
第 4 章 高效提取物稳定性的研究	72
4.1 仪器与材料	72
4.2 试验方法	73

4.3 结果与分析	75
本章小结	84
第5章 室内生物测定及生态安全性检验	85
5.1 仪器与材料	86
5.2 试验方法	86
5.3 结果与分析	90
本章小结	94
第6章 培养液提取物对杨树烂皮病病原菌的抑制机制 ...	96
6.1 仪器与材料	96
6.2 试验方法	97
6.3 结果与分析	103
本章小结	116
第7章 抑菌活性成分的分离、纯化及结构鉴定	117
7.1 仪器与材料	120
7.2 试验方法	121
7.3 结果与分析	135
本章小结	162
参考文献	163

第1章 绪论

杨树以其适应性广、生长快等特点成为“三北”防护林及用材林的先锋树种,也是北方城市绿化及行道树的主要树种。随着杨树栽植面积的扩大、栽培品种的增加和管护工作的疏忽,病虫害问题逐渐凸显出来。由金黄壳囊孢菌引起的杨树烂皮病一直是危害杨树的主要病害之一,近年来呈现上升的势头。据调查,黑龙江省杨树人工林发病率常在30%~40%,病死率达15%~25%。该病造成林木生长衰弱、干形变劣,严重时甚至全林毁坏。对杨树烂皮病防治的工作,除了加强栽培管理、适地适树外,及时清除病原菌、控制病原菌种群数量上升也是防治工作的重点方向。

本研究从生物防治角度出发,筛选对杨树烂皮病菌具有显著抑制效果的木霉菌株;通过对高效木霉菌株抑菌活性物质的提取、分离纯化、功能检测和结构鉴定,筛选对杨树烂皮病菌具有显著抑制效果的抑菌活性物质;同时研究抑菌活性物质对杨树烂皮病菌的抑菌机理。上述研究成果将为杨树烂皮病的有效控制及微生物农药的开发奠定坚实的理论基础。

我国农林生物防治中化学药品使用较多,开发既能控制病害又对环境友好的微生物农药是目前国内外研究的热点。木霉菌株抑菌活性物质的提取分离、纯化、结构鉴定以及对病原菌抑制机理的研究在国内鲜见报道。

1.1 木霉菌的研究现状

在基于 Whittaker(1969)的生物五界系统的 Ainsworth 等人(1973)的菌物分类系统中,木霉属(*Trichoderma*)真菌属真菌门(*Eumycota*)、半知菌亚门(*Deuteromycotina*)、丝孢纲(*Hyphomycetes*)、丝孢目(*Hyphomycetales*);在基于八界系统的菌物分类系统中,被列入无性型真菌(*Anamorphic fungi*)。木霉菌广泛存在于土壤、植物残体、植物根围、植物叶片及种子、球茎表面及动物粪便上,对其他真菌具有拮抗作用。木霉菌通常生长迅速,但是不同的种类生长速度不同。菌落背面颜色不同,有无色、浅黄色、黄色、琥珀色、浅红色、黄绿色。菌丝多数为基内生菌丝,有些菌株最终可以形成毡状、柔毛状、羊绒状或者蛛网状的气生菌丝。分生孢子在产孢区或产孢簇中产生,产孢簇是紧密结构,开始为白色,但较多的情况是转变为绿色、灰色或者棕色,常产生厚壁孢子,厚壁孢子在基内菌丝上间生或在营养菌丝侧枝的尖端端生,椭圆形或圆形,表面光滑或有加厚现象,无色至浅黄色或绿色。分生孢子梗的分枝可分为4种类型,即粘帚霉型(*Gliocladium* - like)、厚基孢型(*Pachybasium* - like)、轮枝菌型(*Verticillium* - like)和木霉型(*Trichoderma* - like),分生孢子梗的分枝特点是木霉属真菌鉴定的重要形态指标。

1.1.1 木霉菌的分类

1794年 Persoon 首次引入木霉属的概念,该属当时只包括四个种。后续的研究证明,只有 *Trichoderma viride*(绿色木霉)属于木霉属真菌。该时期的木霉种类鉴定没有一个统一的标准。1939年, Bisby 研究了木霉菌的变异性,结果发现它没有任何稳定的形态特征,因此主张将木霉属定为一个单种属。在此后很长的时间内,凡是产生绿色孢子的木霉菌都被认为是绿色木霉。1969年, Rifai 首次提出了木霉属的分

类系统,根据分生孢子梗和分生孢子的特征将该属真菌分为9个种。20世纪90年代 Bissett 在 Rifai 分类系统的基础上进行了木霉菌无性型形态学研究,该研究被认为是目前比较详细的无性型形态学研究。Bissett 将木霉属真菌分为5个组,即 *Longibrachiatum* 组、*Saturnisporum* 组、*Trichoderma* 组、*Pachybasium* 组和 *Hypocreanum* 组,种间分类则是以分生孢子梗的分枝方式为特征的,每组设若干种,包括一些有性型——肉座菌属(*Hypocrea*)真菌的单孢分离物所表现出来的形态学变动。而有关肉座菌属真菌的无性型是否属于木霉属,一直都无法确定。1987年 Doi 等建立 *Saturnisporum* 组,得到了 Bissett 的认可。该组包括两个成员, *T. saturnisporum* 和 *T. ghanense*。而后, Kuhls 对 rDNA 的 ITS 序列的研究表明, *T. saturnisporum* 和 *T. ghanense* 与 *Longibrachiatum* 组最初的4个种构成一个单系群,且 *T. ghanense* 与 *T. parceramosum* 的 ITS 序列相同,因而取消了 *Saturnisporum* 组,将这两个种并入 *Longibrachiatum* 组。在 *Trichoderma* 组中,两个常见种 *T. viride* 和 *T. harzianum* 也存在较大的特征差异,经 RAPD 和 RFLP 分析发现, *T. harzianum* 同一种内三个亚群之间的差异已超出一定的范围,说明 *T. harzianum* 是个复合种;对 *T. viride* 的 rDNA 序列进行研究发现, *T. viride* 是与 *T. harzianum* 相对应的两个不同的群,所以 *T. viride* 和 *T. harzianum* 的分类地位都需要重新定义。结合现有的分子生物学资料,在20世纪90年代初 Bissett 的分类系统的基础上, Gams 和 Bissett 重新订正了木霉属的分类系统,在专著 *Trichoderma and Gliocaldium* 形态学部分有详细论述,这是目前最新的木霉分类系统。在该分类系统中,木霉属真菌被分为4个组,即 *Longibrachiatum* 组, *Trichoderma* 组, *Pachybasium* 组和 *Hypocreanum* 组。前3个组比较容易从土壤中获得, *Hypocreanum* 组所容纳的范围比较广。Bissett 将子座平展的、分生孢子梗分枝少或无的以及 *Hypocrea* 的无性型都归于 *Hypocreanum* 组。*Hypocrea* 属真菌的无性型很少能独立地观察到,多数是由 *Hypocrea* 属真菌的子囊孢子培养而来的,而且很多菌株最后都丧失了产生孢子的能力。

国内对木霉菌的研究也有较长的历史。1986 年三明市真菌研究所从自然界中收集了 20 多个木霉菌株,并系统地研究了各菌株的形态及培养特性。根据 Rifai 的分类系统,确定了 6 个木霉种,这 6 种木霉均能引起香菇等食用菌的病害。文成敬等人对中国西南地区棉田中的木霉种群进行了分类研究,鉴定出 9 个木霉集合种。云南农业大学唐嘉义等人从云南省大围山自然保护区土壤样品中分离到 69 株木霉,按 Rifai - Bissett 分类系统,获得 6 个集合种。目前,木霉属真菌中比较常见的种类有哈茨木霉(*T. harzianum*)、绿色木霉(*T. viride*)、木素木霉(*T. lignorum*)、康氏木霉(*T. köningii*)、多孢木霉(*T. polysporum*)、钩状木霉(*T. hamatum*)和长柄木霉(*T. longibrachiatum*)。

1.1.2 木霉菌的生防机制

自 1932 年 Weindlin 发现在土壤中增加木霉菌的数量能够防治某些致病真菌的病害起,人们才注意到木霉菌的价值。在农业持续发展的今天,木霉菌作为一类资源丰富的拮抗微生物,在植物病害的生物防治方面起着重要的作用。木霉菌与病原菌之间的作用机制主要包括寄生、竞争、抗生、诱导抗性、溶菌和促进植物生长。

1.1.2.1 寄生作用

木霉菌对病原菌的主要拮抗机制之一是木霉菌的寄生作用,表现为重寄生。在木霉菌与病原菌互作过程中,木霉菌会被寄主菌丝分泌的一些物质所诱导,木霉菌一旦清楚寄主的存在,就会与寄主建立寄生关系。木霉菌丝产生附着孢状的分枝,吸附于寄主菌丝,平行或螺旋状沿着寄主菌丝生长,并通过分泌一些胞外酶,将寄主的细胞壁溶解,木霉菌丝继而进入寄主菌丝内生长,使寄主菌丝的生长逐渐停止。有研究表明,木霉菌以立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)和灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)的细胞壁和几丁质作为唯一碳源时,可以产生大量的且能分解寄主细胞壁的 β -1,3-葡聚糖酶和几丁质酶等酶类物质。

Horace 的研究表明,哈茨木霉防治立枯丝核菌的主要机制之一是产生六戊烷基吡喃及戊烯基吡喃。六戊烷基吡喃及戊烯基吡喃是挥发性的抗生素。立枯丝核菌引起的病害曾使我国黄瓜、萝卜、烟草、葡萄、番茄、棉花等经济作物和粮食作物大量减产。目前,无论在试验小区、大田,还是在温室,利用木霉菌防治立枯丝核菌的研究已广泛而深入地开展,一些国家和地区已经有登记注册的木霉生防制剂,并已经开始推广使用。

1.1.2.2 竞争作用

竞争作用是利用木霉菌进行生物防治的重要机制。木霉菌在自然界的土壤中广泛分布,是一种营养资源和生存空间的强力竞争者,这种竞争在一定程度上可以减少植物病害的发生。例如,利用木霉菌的拮抗竞争机制可以防治由木材腐朽菌引起的木材腐朽。木霉菌的竞争作用主要表现为对生存空间的竞争和对营养的竞争。竞争作用通常都是发生在两个或更多的微生物间,它们对同一资源有更多的要求;另一方面,外界微生物的长期定殖必须与土著微生物区系和引入的生物因子同时展开竞争。木霉菌生长迅速,具有较高的产孢的能力,而且充分具备竞争能力,因而是高效的生防因子。

1.1.2.3 抗生作用

随着一种抗生素——胶霉毒素(*Gliotoxin*),即木素木霉分泌的对立枯丝核菌和核盘菌(*Sclerotinia sclerotium*)有抑制作用的物质的发现,多种产生抗生素的木霉菌相继被分离和鉴定出来,木霉菌具有抗菌作用的结论进一步得到了认定。木霉菌产生的抗菌物质种类较多且结构差异较大,目前已经鉴定出的有几十种,主要包括:吡啶类、萜类、肟类、烷基吡喃酮、丁烯羟酸内酯、环硫氧化呋喃和肽类化合物。根据抗生素的性质可将这些抗生素分为三类:(1)水溶性的抗生素,如一些萜类化合物;(2)“疏水”肽类抗生素,这类化合物有离子载体活性,在肽链上存在一个或多个极性位点;(3)挥发性的抗生素,如大多

数肟类化合物,微生物中被认为具有显著生态优势的就是能够产生这类抗生素的木霉菌或粘帚霉菌。这些物质有时并不稳定,在一定条件下可转化为不具抗菌活性的化合物,如绿毛菌素(Viridin)是一种对土传病原菌有效的抗生素,但其性质不稳定,易转化为还原产物绿毛菌醇。这种还原产物只有极小的抗菌活性,却起着除草剂的作用,可毒害农作物;有的木霉菌可以产生对真菌、革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌都起作用的抑制成分——木菌素(Dermadine)。研究表明,木菌素是一种不饱和异戊酸,如绿毛菌素和环孢菌素(免疫抑制剂)等。Dennis 等人先后报道过乙醛也是一种由木霉菌产生的重要的挥发性抗生素,孙彩云等人证实了木霉菌株 SMF2 的固体发酵液中存在着抗生素,利用该抗生素防治姜瘟青枯假单胞菌(*Pseudomonas solanacearum*)取得了很好的效果。大多数木霉菌可产生多种抗生素,如哈茨木霉产生 12 种抗生素,康氏木霉产生 9 种,绿色木霉产生 10 种,钩状木霉产生 7 种,长枝木霉(*T. longibrachiatum*)产生 3 种,多孢木霉产生 2 种,木素木霉产生 2 种。

1.1.2.4 诱导抗性

诱导植物产生抗病防卫反应一般经历信号识别、信号传导及防卫基因表达 3 个环节。信号识别是使植物细胞进入信息状态,而且通过信号传导,使防卫反应基因接收信号而表达。木霉菌能够诱导寄主植物的各部分组织对病原菌产生抗性。木霉菌的诱导抗性机制与寄生作用、抗生作用无直接关系。把哈茨木霉接种到黄瓜根部后,可诱导植株产生一系列的抗病相关蛋白,包括许多水解酶类,其作用原理类似于化学诱变剂的处理。棉花木霉菌诱导棉花可产生半棉酚、棉酚和脱氧半棉酚等萜类物质,直接增强棉花对立枯丝核菌的抑菌活性。木霉菌还会影响代谢途径中酶的活性,棉花根部过氧化物酶的活性水平显著高于对照组,这也是木霉菌诱导的结果。

1.1.2.5 酶的溶菌作用

木霉菌有时不与寄主菌丝直接接触,同样可以引起寄主菌丝的解

体,这与木霉菌分泌的几丁质酶、 β -1,3-葡聚糖酶、纤维素酶、木聚糖酶和蛋白酶等酶类有关。有研究报道,真菌细胞壁在这些酶类的作用下会发生分解,细胞原生质体被破损。在对植物病原菌不产生抗生素的抗生作用中,溶菌酶起到重要作用。木霉菌与病原菌相互接触后产生的几丁质酶,能够抑制丝核菌(*Rhizoctonia*)、镰刀菌(*Fusarium*)、核盘菌、腐霉菌(*Pythium*)等植物病原菌的生长,同时能够抑制芽管伸长及孢子的萌发。木霉菌分泌的几丁质酶不但能降解病原菌成熟的菌丝顶端,也能降解细胞壁以及菌核。Elad 利用荧光显微镜观察,证实了在哈茨木霉侵染白绢病菌(*Sclerotium rolfii*)以及立枯丝核菌的接触点上酶活性的提高。在防治腐霉菌及立枯丝核菌的研究中,通过添加几丁质增强几丁质酶的活性,最终提高了哈茨木霉生防制剂的防治效果。Brückner 等从绿色木霉及长枝木霉培养液中分离提取出一组特殊的抗菌肽,分别命名为绿毛菌素和长枝木霉素(*Trichobrachin*),并测定了两种抗菌肽的氨基酸序列。

1.1.2.6 辅助机制

辅助机制虽然算不上木霉菌主要的生防机制,但它具有以下几个特点:(1)可以促进植物的生长。(2)同时具有增强其他防治的效果。如哈茨木霉 T-203(*T. harzianum* 203)对增加植物根系对矿质元素的吸收有明显作用;康氏木霉(*T. koningii*)对棉花和菜豆的生长发育有明显的促进作用;钩状木霉 T-382(*T. hamatum* 382)和堆肥共同作用可抑制黄瓜疫霉病对黄瓜幼苗的侵害。(3)有利于改善植株对营养成分的吸收。蒋家珍等人的研究表明,木霉菌与3种致病真菌之间存在着明显的互作关系。魏林从哈茨木霉培养液中分离出活性物质,并研究了活性物质对豇豆的促生作用。

1.1.3 木霉菌的水解酶

肉座菌和木霉菌能产生多种水解酶,例如几丁质酶、葡聚糖酶、淀

粉酶等,能够降解同或异单体多聚糖,这也是为什么它们能够利用多种基质生长,并且分布如此广泛的原因。另外,木霉菌还具有光谱的蛋白酶活性,可以保护自身的生境,也能与其他微生物竞争营养物质。红褐肉座菌(*H. jecorina*)基因组的序列测定结果使得我们能够更加详细深入地了解酶编码基因,例如发现编码纤维素酶的基因有 12 个。目前,里氏木霉(*T. reesei*)基因组的测序工作已经完成,总大小为 33 MB。唐雯等人应用生物信息学方法,分析了其中的 9 997 个开放阅读框(ORF)所编码的氨基酸序列,获得了 294 个可能的分泌蛋白序列,将蛋白序列按照功能进行了分类,同时用搜索模体的方法在未知功能的序列中找到具有关键模体的序列,初步确定其潜在的功能。

1.1.3.1 几丁质酶

几丁质是以 β -1,4-糖苷键连接的 N-乙酰基-D-葡萄糖胺同源聚合物,是生物圈中最为丰富的聚合物之一,很多类群的生物体能够产生几丁质降解酶,例如原生生物、细菌、真菌、植物、无脊椎动物和脊椎动物,甚至包括人类。几丁质酶的降解一般与多种生物过程有关,例如自溶现象、形态发生和营养,也与除重复寄生现象以外的真菌和其他生物体的关系密切相关,例如植物-真菌以及昆虫-真菌的相互作用。根据最终产物和催化机理,几丁质酶可以分为外切和内切两大类。Reese 等在 1968 年阐述了内切酶和外切酶的概念。Lorito 等人在 1996 年提出了几丁质酶的分类系统,主要依据是酶反应的最终产物,主要分为三类:

(1)内切几丁质酶(EC3.2.1.14),可以任意裂解几丁质和几丁质寡聚物,并释放出可溶性、低相对分子质量的混合物,双乙酰几丁质二糖是该酶的主要成分。

(2)壳二糖酶,可以从非还原末端裂解几丁质和几丁质寡聚物,释放的最终产物主要是双乙酰几丁质二糖。

(3)N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶(EC3.2.1.52),同壳二糖酶一样,也是可从非还原末端裂解几丁质和几丁质寡聚物,释放 N-

乙酰葡萄糖胺单体 (GlcNAc), 而且只有这一种酶可以水解 (GlcNAc)₂。该酶对糖苷配基的耐受力较强, 可以利用生色底物来检测其酶活性。还发现 N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶能够催化转糖基反应, 因此在聚合物化学中可以用来合成区域或者立体选择性聚合物。除了外切的 N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶外, 也有内切的 N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶。

内切几丁质酶催化几丁质和几丁寡糖中连接 N-乙酰- β -葡萄糖苷的 β -1,4-糖苷键的水解反应, 最终产物依据内切机理而不同, 有的最终产物全部为 (GlcNAc)₂, 有的则为 (GlcNAc)₃。按照上面的定义, 重要的一点是, 如果几丁质酶通过对几丁寡糖非还原末端的逐个降解释放 GlcNAc, 则该酶不能被认为是外切几丁质酶。外切几丁质酶应当是逐步水解释放 N,N-二酰基壳二糖, 但是开始于底物的非还原末端。

由于木霉菌的几丁质酶的酶谱多种多样, 因此, 这方面的研究还有许多困难。首先, 木霉菌分泌的几丁质酶在滤液中容易被降解; 其次, 研究人员所依据的木霉菌分类标准不同, 他们鉴定的木霉菌也可能不同, 因此, 从不同木霉菌中分离到的几丁质酶也有所差异。

克隆几丁质酶编码基因是检测木霉菌几丁质酶多样性的可靠方法。编码 42 kD 的内切几丁质酶基因 (*ech42*) 同其他菌株的几丁质酶基因具有高度同源性, 也是经常被克隆的一个基因, 不同木霉菌的 *ech42*, 其核苷酸序列差异高达 35%, 氨基酸序列差异达 17%, 这种差异与菌株的系统发育有关。该基因是木霉菌系统发育研究领域的一个很有用的基因, 可用来鉴别木霉菌的不同种群。目前, 克隆到的几丁质酶基因如表 1-1 所示。

2002 年, Kim 等人从 *T. virens* 中克隆到 3 个编码 42 kD 内切几丁质酶的基因。这些基因与 *T. hazianum* 的 *chit33* 或 *T. atroviride* 的 *nag1* 同源性问题需要进一步研究。

表 1-1 从木霉菌中已经克隆的几丁质酶基因

基因	木霉菌	菌株	编码蛋白质
<i>chit42</i>	<i>T. viride</i>	LTR-2	42 kD 内切几丁质酶
<i>Th-En42</i>	<i>T. atroviride</i>	P1	42 kD 内切几丁质酶
<i>ech42</i>	<i>T. atroviride</i>	Imi206040	42 kD 内切几丁质酶
<i>chit42</i>	<i>T. harzianum</i>	Cect2413	42 kD 内切几丁质酶
<i>chit42</i>	<i>T. virens</i>	Gv29-8	42 kD 内切几丁质酶
<i>Th-ch</i>	<i>T. harzianum</i>	Tam-61	42 kD 内切几丁质酶
<i>ENC1</i>	<i>T. cf. harzianum</i>	T25-1	42 kD 内切几丁质酶
<i>chit33</i>	<i>T. harzianum</i>	CECT2413	33 kD 内切几丁质酶
<i>nag1</i>	<i>T. atroviride</i>	P1	73 kD N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶
<i>Exc1</i>	<i>T. cf. harzianum</i>	T25-1	73 kD N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶
<i>Exc2</i>	<i>T. cf. harzianum</i>	T25-1	N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶

1.1.3.2 葡聚糖酶

葡聚糖酶具有水解真菌细胞壁最外层覆盖的葡聚糖层的作用,最终导致细胞壁骨架受损,细胞受到损伤。根据该酶作用于糖苷键结合位点的不同,可分为 β -1,2-葡聚糖酶、 β -1,3-葡聚糖酶、 β -1,4-葡聚糖酶、 β -1,6-葡聚糖酶。葡聚糖的水解是内切葡聚糖酶和外切葡聚糖酶共同作用的结果,葡聚糖酶广泛存在与动植物、藻类、细菌和真菌体内,木霉菌中的多数生防菌株也产生葡聚糖酶,在重复寄生过程中,木霉菌依靠葡聚糖酶等这类细胞壁裂解酶攻击病原真菌的细胞壁。

(1) β -1,3-葡聚糖酶,该酶能催化 β -1,3-葡聚糖多聚体,而很多植物的病原真菌细胞壁的主要成分都是 β -1,3-葡聚糖和几丁质,因此,该酶的水解活性能够抑制真菌的生长与增殖,病原真菌及其细胞壁成分等能诱导木霉产生 β -1,3-葡聚糖酶。在体外,病原和非病原真菌生长则受这该酶的抑制,因此, β -1,3-葡聚糖酶是一种抗真菌物质。木霉菌产生的 β -1,3-葡聚糖酶与它们防治植物真菌病