

尹义旭,汤伟,咸洪泉. 重组毕赤酵母表达棘孢木霉几丁质酶 gene02524 的酶学性质及抑菌活性[J]. 江苏农业科学,2022,50(9):96-103.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.09.016

重组毕赤酵母表达棘孢木霉几丁质酶 gene02524 的酶学性质及抑菌活性

尹义旭¹, 汤伟¹, 咸洪泉^{1,2}

(1. 青岛农业大学生命学院, 山东青岛 266109; 2. 山东省应用真菌重点实验室, 山东青岛 266109)

摘要:几丁质酶是催化降解几丁质的水解酶,在防治植物真菌病害与虫害方面的应用越来越广泛,是一种重要的生防蛋白。棘孢木霉 TD3104 是一株优良的植物病害生防菌,几丁质酶在抑菌防病过程中发挥重要作用。为克隆表达棘孢木霉 TD3104 几丁质酶基因 *gene02514*,明确酶学性质和抑菌活性,利用毕赤酵母表达系统对目的蛋白进行表达,并通过 Sephadex G-100 凝胶进行纯化,对序列进行分析并研究其酶学性质及进行体外抑菌试验。本研究成功地构建了 pPIC9K/*gene02524* 重组载体,并且经过比对发现其包含 GH18 家族的特征氨基酸序列,获得了毕赤酵母转几丁质酶基因工程菌,表达的重组几丁质酶表观分子量 44.4 ku, $K_m = 2.048\ 2\ \text{g/L}$, $V_{\max} = 0.635\ 5 \times 10^3\ \mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{min})$,最适反应温度为 50 °C,最适 pH 值为 5.0,在 pH 值为 3.5 时稳定性最高;金属离子 Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 可强烈抑制酶活性;可抑制金黄色葡萄球菌等病原真菌的生长。研究结果为解析棘孢木霉几丁质酶在生防中的作用及功能奠定了基础,并为植物病虫害的防治提供了新的基因资源。

关键词:棘孢木霉;几丁质酶;基因表达;毕赤酵母;酶学性质

中图分类号:S188+.3 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2022)09-0096-07

植物真菌病害被认为是对作物产量影响最严重的因素^[1],会造成严重的经济损失^[2]。目前对植物真菌病害的防治普遍采用化学防治,这不仅会污染环境、破坏生态平衡,而且病原菌易产生抗药性^[3],也可能会影响人的健康^[4]。随着人们环保意识以及个人保护意识的增强,生物防治由于其低成本、环境友好等特点逐渐成为防治病害时首先考虑的方法。

用于植物病害防治的生物因子主要包括细菌、真菌、放线菌,目前在生防真菌中木霉菌是应用比较广泛的一类生防菌^[5]。木霉菌对多种植物病害均有防治效果,并且对土壤生态平衡的影响最小,不会损害有助于控制病原体的有益生物体,可以提高植物抗病性,促进养分吸收和肥料利用,改善发

育环境并提高产量^[1]。几丁质酶在木霉菌防治植物病害过程中发挥着重要作用。

几丁质酶(chitinase, EC 3.3.2.14)是以几丁质为底物,通过催化降解 β -1-4-糖苷键将几丁质(chitin)降解为 *N*-乙酰氨基葡萄糖或寡聚 *N*-乙酰氨基葡萄糖的水解酶^[6-7],在自然界中发挥着重要的作用。植物病原真菌的细胞壁主要由葡聚糖和几丁质等物质组成^[8],生防木霉菌会产生几丁质酶及葡聚糖酶等细胞壁降解酶^[8-9],对病原菌的细胞壁进行破坏,从而达到抑制病原真菌的效果,并且几丁质酶在杀虫剂的应用中也有良好的前景^[10-11]。通过基因工程将几丁质酶基因转化到生防菌株或植物中,可以使生防菌生防效果增强或提高植物对病原菌的抗病性^[12-13]。

棘孢木霉(*Trichoderma asperellum*)TD3104 是一株优良的生防菌株,全基因组测序分析发现,该菌株有数十种几丁质代谢相关的基因,其中有 15 个内切几丁质酶基因。由于不同的几丁质酶在生物中发挥着不同的作用,为了之后可以更好地了解几丁质酶系统在木霉中所发挥的作用,尤其是在抑制病原菌方面的作用,本研究以内切几丁质酶基因 *gene02524* 为研究对象,利用巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)表达系统进行异源表达、分离纯化,

收稿日期:2022-02-28

基金项目:山东省重点研发计划(编号:2018GNC110024);山东省青岛市科技惠民示范引导专项(编号:21-1-4-ny-5-nsh)。

作者简介:尹义旭(1996—),男,山东泰安人,硕士研究生,研究方向为生物工程, E-mail:yyx960930@163.com;共同第一作者:汤伟(1986—),女,山东青岛人,博士,研究方向为微生物学, E-mail:tianti_121@163.com。

通信作者:咸洪泉,博士,教授,研究方向为应用微生物学。 E-mail:hqxian0517@163.com。

分析其酶学性质,检测其对病原真菌生长的影响,为解析几丁质酶系统中不同组分在生防中的作用奠定基础。

1 材料与方法

本试验于 2020—2021 年在青岛农业大学完成。

1.1 试验材料

1.1.1 试验菌株 棘孢木霉 TD3104、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 、毕赤酵母 GS115、苹果轮纹病菌 (*Botryosphaeria dothidea*)、新月弯孢菌 (*Curvularia lunata*)、金黄壳囊孢菌 (*Cytospora chrysosperma*)、板栗疫病原菌 (*Cryphonectria parasitica*) 均为笔者所在实验室保存。

1.1.2 试剂 本试验所需的 Trizol、G418 antibiotic 均购自 Invitrogen 公司; *EcoR* I 与 *Not* I、*Stu* I 均购自赛默飞世尔科技公司; pMD18-T vector、*T*₄ 连接酶、DNA Marker、RT-PCR 试剂盒均购自 TaKaRa 公司; 几丁质、质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒均购自生工生物工程(上海)股份有限公司。各类培养基参照 Invitrogen 公司的毕赤酵母表达说明书配制。PCR 引物合成与序列测序均由北京擎科生物科技

有限公司完成,全基因组测序由上海美吉生物医药科技有限公司于 2020 年 2 月完成。

1.2 目的序列的分析及重组载体的构建

Trizol 法提总 RNA 之后反转录得到 cDNA 文库,根据全基因组测序和注释分析得到 *gene02524* 序列(图 1),根据序列设计扩增 *gene02524* 几丁质酶 CDS 的特异性引物 02524S;5' - CCGAATTCTCTGAGGGCGGTTATCGCT - 3';02524A;5' - GGGCGGCCGCTTAGTTATTTGGGAATCCATTCTT - 3'。以 cDNA 文库为模板,利用设计的特异性引物进行扩增,胶回收 PCR 产物,与 T 载体连接转化 DH5 α 感受态细胞,筛选测序得阳性克隆,提取质粒用 *EcoR* I 和 *Not* I 酶切,将回收后的目的片段,与酶切后的酵母表达载体 pPIC9K 通过 *T*₄ DNA 连接酶,16 °C 过夜连接得到重组载体 pPIC9K/*gene02524*,并进行双酶切验证。将正确的质粒通过 *Stu* I 线性化后转入毕赤酵母 GS115。酵母感受态的制备、转化及筛选等操作参考 Invitrogen 公司的酵母表达说明书进行。DNAMAN (<https://www.lynonn.com/dnaman.html>) 和 WebLogo (<http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>) 用来进行氨基酸的比对。

```
ATCTCCAATTACTTTTCATACCAATAAACCATGTCTGAGGGCGGTTATCGCTCAGTCGCCTACTTTGTGAATTGG
TATGCATCATCTAGTTACAACATTAGCATGTGTTTCGCATCTCTCCAGCTGATCCTAATTGTGTGCATCACAGGG
CCATCTATGCTAGAAAGCATAGACCGCAAGATCTCCCGCGATAAATTGACTCATGTCCTCTACGCCTTTGCC
AATGTTTCGCCAAGACAGCGGAGAAGTGTAGGTCATCTTTATTCTCCTCCATCCATTATAAGATGCACTCTGTC
TAACATTATATATGCAGGCATATGACTGATGGCTGGGCGGACACGGACATTACTGGGAGGGTGATTCGTGG
AATGATACCGGCAACAACATGTATGGTTGTCTCAAGCAGCTCAACCTCCTTAAAAAGCGCAACCGAAATCTCAA
GGTTCTGCTGTCCATTGGCGGCTGGACTTATAGCGGCAACTCAAGGGGCGGCTAGCACCAGCAGGGGGG
CGAGACTTCGCAAAATGAGCTTTGAGCTTCTCAAAAATCTCGGGTTCGACGGTTCGACAGTTCGACATTGACTGGGA
TATCTCAAAAATGACAGATGAGGCGAGAAATTTGTTGAGTCTTGCCACTGCTCCGACAGAGAGCTGGATGCCT
ACTCAGCCACGCTTCAAAATACAGCCATTTGAGCTGACTGTAGCTGTCTGCGGGACCCACGCACTTTCTGA
ATTCTCGATATCCAGGCATGGACAGATATCTTGATTTCTGGAATCTGATGGCCTACGACTACGCTGGATCTTG
GGATCAGACAAGCGGACATCAGGCCAATCTCCACGTGTCGCATGACAACCCTACATCTACACCGTTTTCCACTG
ACGCGGCTATTGACCACTACACAAGAAACGGCGTAGCCCCAGCAAGATTGTGCTCGGAATGCCTATCTATGG
CCGTCTTTGAGAATAACAGACGGTCCGGGTAGGCCATAACAACGGCATTGGCGAGGGATCTTTGGGAGAATGG
CATCTTCGACTACAAGTTCTCTCTTCAGGGCTCAACAAGAAATTTACGACCAAGCAATTGGCGCCAGCTACT
GCTATAACCCACAGACGAGAAAGCTTGTCTTACGACACCCCTCATGCAAGCAGAGTTAAGGCTGGGTACAT
CAAGGAGTGGGGTCTCGGAGGCGGTATGTGGTGGGAGAGCAGCGGTGATAAGGAGGGCCACGATAGCCTG
ATTGGAATTGTTGTCAATGAGTTTGGCGGCCCCGAGCGCTCCAGAGGAAGGACAACCTGCATTGATTATCCGC
AGTCAAAGTACGACAACCTGAAGAATGGATTCCAAAATAACTAAGAGCTGAGAGGAGACAGTGAAGGACAAT
AGATTGGCATCTAAGAATAGATAGAAAGATTAAGTAAAATAGAGTACAAAAGAC
```

图1 *gene02524* 全基因组序列

1.3 几丁质酶的诱导表达及分离纯化

几丁质酶的诱导表达、分离纯化及酶活力测定参照汤伟等对几丁质酶 Tachi1 酶学性质研究的方法^[14]。具体为:将重组表达 *gene02524* 工程株在 28 °C、200 r/min 条件下振荡培养,每天加入甲醇诱导,维持甲醇终浓度为 0.5%,并每天通过 DNS 法对酶活性进行检测,3 组重复。待酶活性稳定之后取

菌液上清,将上清液使用硫酸铵沉淀获得蛋白,透析除盐后通过 Sephadex G-100 凝胶纯化。

1.4 几丁质酶的酶学性质分析

1.4.1 几丁质酶的最适温度及温度稳定性测定 分别在 30 ~ 80 °C 温度条件下测定表达的几丁质酶 *gene02524* 的活性,将最高的酶活性定为 100%,分别计算其余处理组的酶活性。并将纯化后的酶液

分别在 35、40、45 °C 温度下孵育一段时间(10、20、30、40、50、60 min),以最高的酶活性为 100%,检测酶活性。

1.4.2 最适 pH 值及 pH 值稳定性的测定 将表达的几丁质酶液在不同 pH 值(3.0~10.0)条件下反应并测定其酶活性,将最高的酶活性定为 100%,测定其余处理的酶活力。pH 值稳定性则是将酶液置于最适温度下于 pH 值为 3.0~10.0 体系中孵育 1 h,以最高的酶活性为 100%,检测其余处理的酶活性。不同的 pH 值由表 1 缓冲体系提供。

表 1 pH 值缓冲体系

pH 值范围	缓冲液
3.0~3.5	甘氨酸-盐酸
>3.5~6.0	柠檬酸-柠檬酸钠
>6.0~8.0	磷酸氢二钠-磷酸二氢钠
>8.0~9.0	Tris-HCl
>9.0~10.0	甘氨酸-氢氧化钠

1.4.3 几丁质酶 gene02524 米氏常数及酶促反应进程曲线的测定 酶促进程曲线为在最适环境中进行酶促反应,利用 DNS 法每隔 10 min 进行取样并测定还原糖产量。将底物稀释至终浓度分别为 25、20、10、5、2.5 mg/mL,在最适条件下进行酶促反应,计算各处理的反应速度,做出 Hans-Woolf 曲线,得出米氏常数 K_m 与 V_{max} 。

1.4.4 测定反应体系中金属离子对酶活性的影响 在酶反应体系中分别加入金属离子(Cu^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ag^+ 、 K^+ 、 Na^+ 、 Mg^{2+} 、 NH_4^+ 、 Ba^{2+}),使其终浓度为 0.05 mol/L,测定不同处理组的几丁质酶 gene02524 活性。将加水处理组的酶活性定义为 100%,计算其余处理的相对酶活性。

1.4.5 变性剂和蛋白抑制剂对酶活性的影响 在最适条件下,分别在体系中配入供试的变性剂和蛋白抑制剂,使尿素终浓度分别为 0.5、3.0 mol/L,十二烷基硫酸钠(SDS)终浓度分别为 0.1%、1.0%,乙二胺四乙酸(EDTA)与 β -巯基乙醇终浓度为 1、10 mmol/L,甘油、异丙醇、甲醇、乙醇的终浓度则分别设置 1% 和 10% 2 个浓度处理,将加入水的处理组的酶活性定义为 100%,测定其余酶活。

1.5 几丁质酶 gene02524 对病原真菌的抑制作用

将供试真菌接种于马铃薯琼脂葡萄糖(PDA)板上,置于 28 °C 培养箱中,待其长满板后取菌块于新的 PDA 平板中央,当菌落生长至 3~4 cm 时,在

距菌落中心 5 cm 处放置 4 个无菌滤纸片,分别加入不同量(3、5、7 μ g)的酶,继续培养。以加灭菌水的处理为对照,参考下式计算抑菌率:

病原菌生长抑制率 = (对照菌落半径 - 处理菌落半径) / 对照菌落半径 \times 100%。

2 结果与分析

2.1 pPIC9K/gene02524 重组质粒构建及序列分析

提取几丁质诱导的棘孢木霉 TD3104 菌丝中的总 RNA(图 2-a),以反转录得到的 cDNA 文库为模板,02524S 和 02524A 为引物,扩增得到 gene02524 基因编码序列全长 1 190 bp(图 2-b),经测序和序列比对,克隆的 CDS 序列正确。gene02524 几丁质酶基因含有 2 个内含子,大小分别为 74、66 bp,编码 397 个氨基酸,预测表达蛋白大小 44.48 ku,理论等电点为 5.67。将氨基酸序列与 GH18 家族的几丁质酶比对,发现其包含 GH18 家族特征的序列 SXGG 及 DXXDXDXE^[15](图 3-a、图 3-b)。构建的克隆载体和酵母重组表达载体分别命名为 pMD-18T/gene02524 和 pPIC9K/gene02524,酶切鉴定结果与预期相符(图 2-c、图 2-d)。将 pPIC9K/gene02524 通过 *Stu* I 线性化后转入毕赤酵母 GS115,经筛选得到表达重组几丁质酶 gene02524 的酵母工程菌 GS115/gene02524。

2.2 几丁质酶的诱导表达及纯化

诱导表达 5 d 之后酶活性趋于稳定(图 4-a),粗酶液经 SephadexG-100 凝胶过滤层析纯化,经 SDS-PAGE 可以发现纯化后的蛋白在 44.4 ku 大小处有一条带(图 4-b),表观分子量与预测大小一致。

2.3 几丁质酶 gene02524 的酶学性质

2.3.1 最适温度及温度稳定性测定 在不同温度下测定 gene02524 蛋白的酶活性,从图 5-a 可以看出,该几丁质酶的最适温度为 50 °C,80 °C 时仍有活性,30~55 °C 范围内具有 50% 以上活性,具有较宽的温度适用性。将 gene02524 酶蛋白置于不同的温度中孵育,并对其剩余酶活性进行检测,可以看到该几丁质酶在 35 °C 以下活力基本没有损失,保温 60 min 后仍有超过 80% 的活力,在 40 °C 与 45 °C 下保温 60 min 后仍然可剩 30% 左右的酶活力(图 5-b)。

2.3.2 最适 pH 值及 pH 值稳定性 研究发现 gene02524 蛋白不仅具有非常广泛的 pH 值适用范围(图 6-a),还拥有非常高的 pH 值稳定性(图 6-b)。

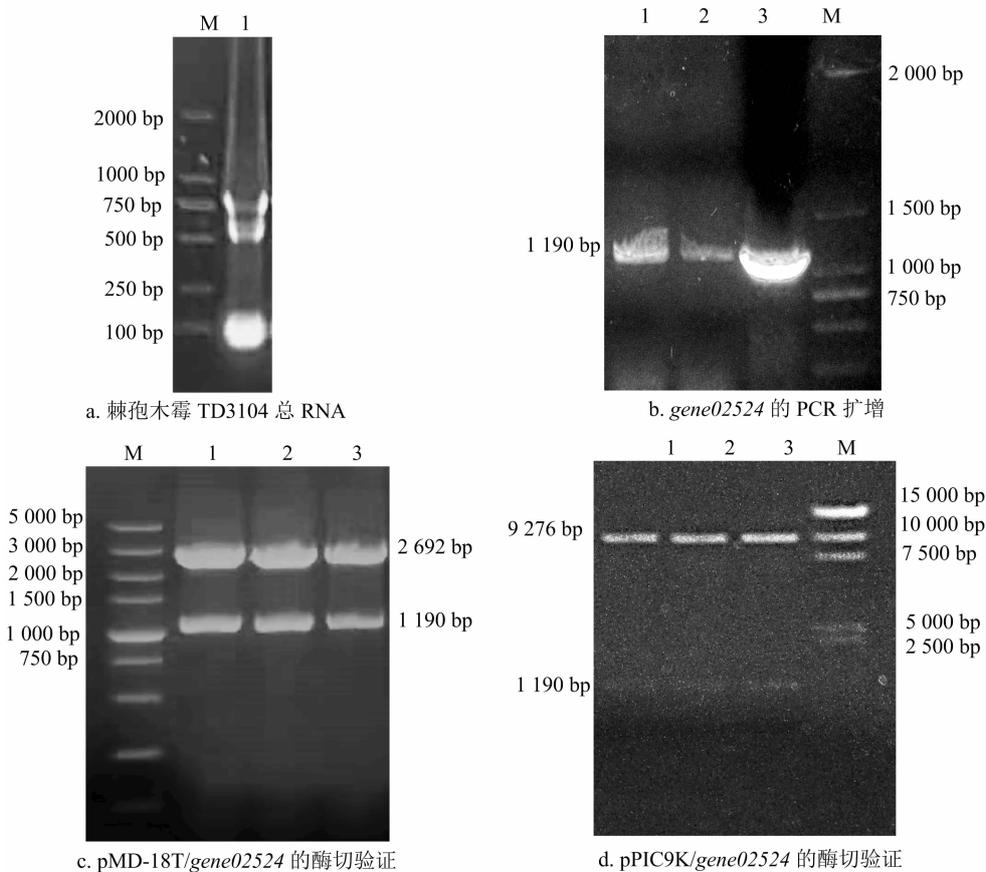


图2 重组表达载体 pPIC9K/*gene02524* 的构建

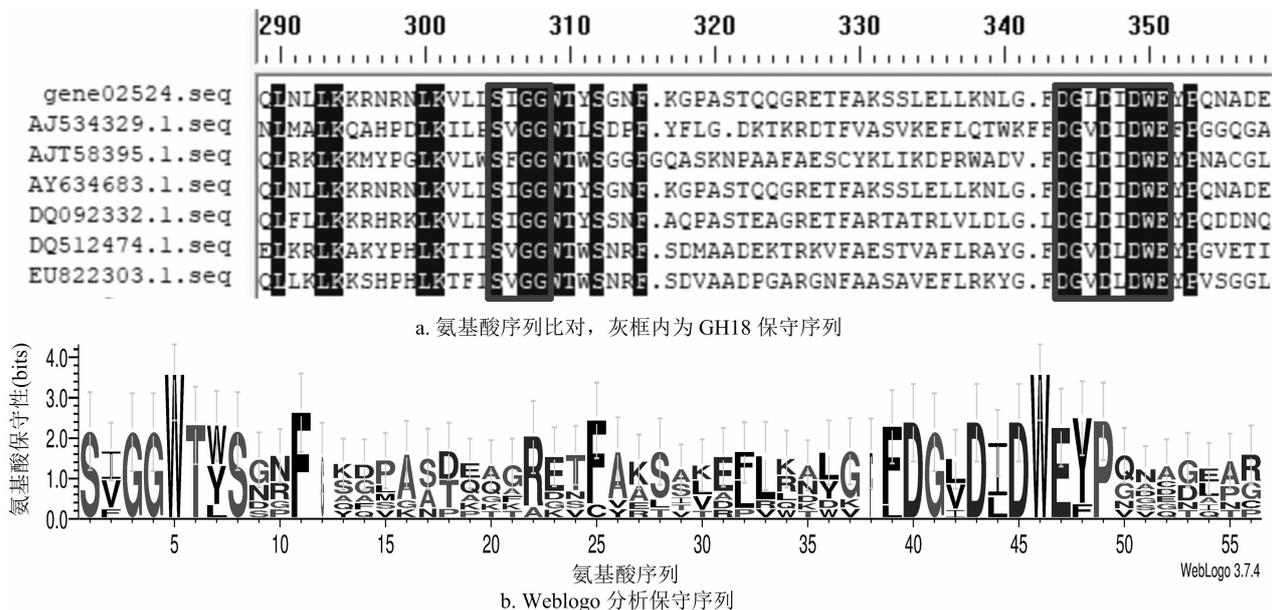
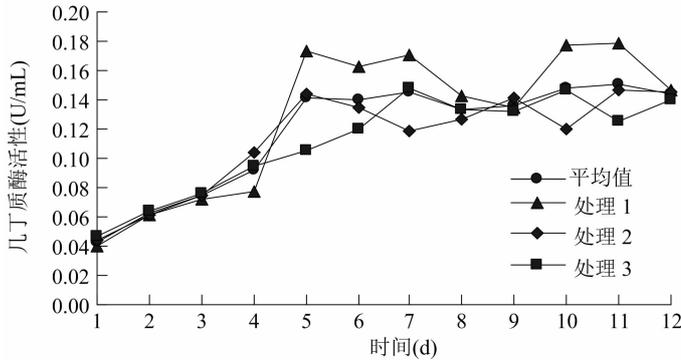


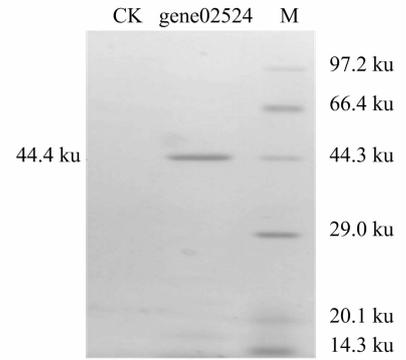
图3 GH18 几丁质酶保守序列分析

在 pH 值 4.0 ~ 10.0 范围内均有较高的催化活性 (剩余酶活 > 50%), 最适 pH 值为 5.0。在 pH 值为 3.5 时酶的稳定性最高, 并且在 pH 值 3.0 ~ 8.5 范围内孵育 60 min 后仍均保有 80% 以上的酶活力。

2.3.3 酶促反应进程曲线及米氏常数的测定
gene02524 重组几丁质酶的酶促反应在 0 ~ 10 min 内随着反应的进行还原糖产量不断增加, 30 min 后趋于稳定 (图 7 - a)。取反应时间 0 ~ 10 min 作酶动

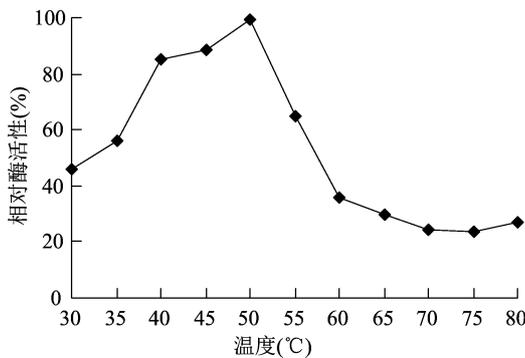


a. 菌液表达 1~12 d 的酶活性检测

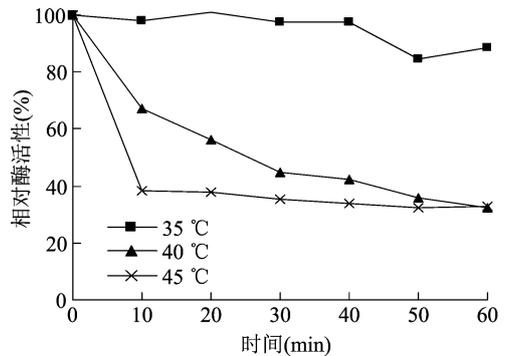


M—Marker; CK—空载体发酵液
b. 纯化 gene02524 蛋白的 SDS-PAGE 分析

图4 重组蛋白发酵时间的筛选及纯化蛋白的 SDS-PAGE 分析

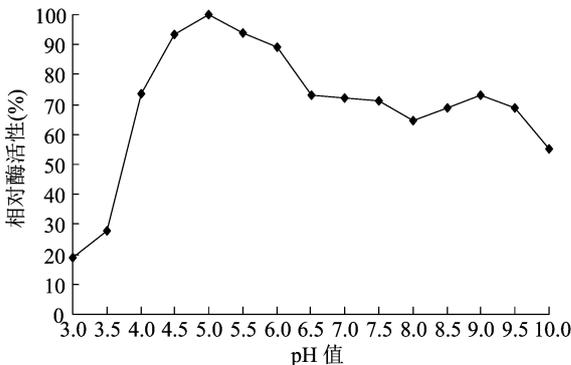


a. 30~80 °C 温度下酶活性的测定结果

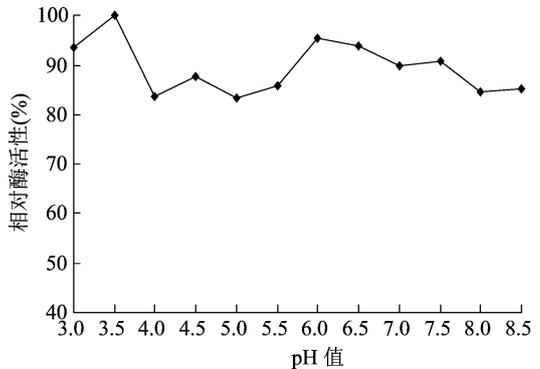


b. 在 35、40、45 °C 温度下孵育不同时间酶活性的变化

图5 最适温度及温度稳定性测定



a. 在不同 pH 值缓冲体系中的 gene02524 蛋白相对酶活性



b. 在不同 pH 值缓冲体系中孵育 60 min 后 gene02524 蛋白的相对酶活性

图6 最适 pH 值及 pH 稳定性测试

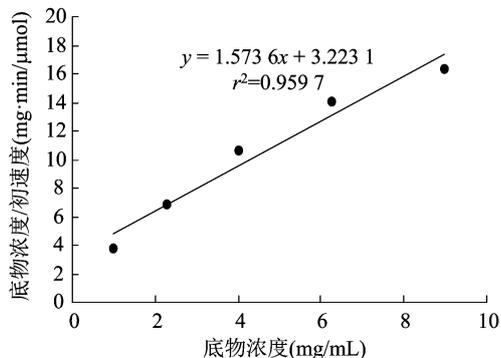
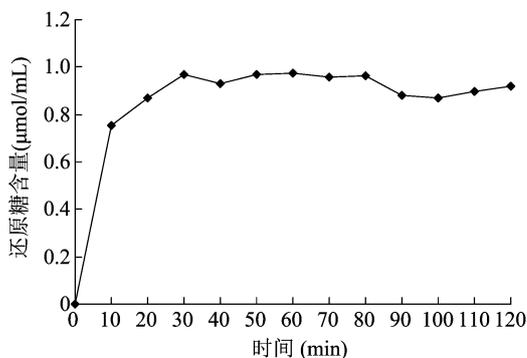
力学 Hans - Woolf 曲线(图 7 - b),当胶体几丁质为底物时,几丁质酶 gene02524 的 $K_m = 2.048 2 \text{ g/L}$, $V_{max} = 0.635 5 \times 10^3 \mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{min})$ 。

2.3.4 金属离子对 gene02524 酶活性的影响 供试金属离子对 gene02524 酶活性有不同程度的抑制作用,研究发现 Cu^{2+} 与 Hg^{2+} 对酶活性抑制作用最强,剩余酶活性均只剩 30% 左右;而 K^+ 、 Na^+ 与 NH_4^+ 则抑制酶活性较小,剩余酶活性均在 70% 以上;其他金属离子相对酶活性在 40% ~ 60% 之间

(表 2)。

2.3.5 变性剂和蛋白抑制剂对酶活性的影响 gene02524 重组几丁质酶对供试变性剂和蛋白抑制剂抵抗力较强,除 SDS 外其他试剂处理后酶活性均剩余 50% 以上;SDS 对 gene02524 酶活性有明显的抑制作用;1 mmol/L EDTA 与 10 mmol/L β -巯基乙醇对酶活性有一定的促进作用(表 3)。

2.4 几丁质酶 gene02524 对病原真菌的抑制作用 纯化后的几丁质酶 gene02524 对供试病原菌生



a. 以胶体几丁质为底物时重组几丁质酶 gene02524 的反应进程曲线 b. 胶体几丁质为底物时重组几丁质酶 gene02524 的 Hans-Woolf 图

图7 酶促反应进程曲线及酶动力学 Hans-Woolf 曲线

表2 金属离子对 gene02524 活性的影响

金属离子	相对酶活 (%)	金属离子	相对酶活 (%)
H ₂ O	100	K ⁺	78
Cu ²⁺	30	Na ⁺	81
Ca ²⁺	57	Ag ⁺	48
Mn ²⁺	59	Mg ²⁺	46
Fe ²⁺	40	Hg ²⁺	33
Ba ²⁺	58	NH ₄ ⁺	72
Zn ²⁺	40		

表3 变性剂和蛋白抑制剂对 gene02524 活性的影响

变性剂和蛋白抑制剂	浓度	相对酶活性 (%)
水		100
尿素	0.5 mol/L	91
尿素	3.0 mol/L	81
SDS	0.1%	31
SDS	1.0%	33
EDTA	1 mmol/L	102
EDTA	10 mmol/L	81
β-巯基乙醇	1 mmol/L	93
β-巯基乙醇	10 mmol/L	107
甘油	1%	85
甘油	10%	88
异丙醇	1%	76
异丙醇	10%	57
甲醇	1%	85
甲醇	10%	67
乙醇	1%	88
乙醇	10%	53

55% ;3 μg gene02524 对新月弯孢菌的抑菌率为 15.56% ,当酶量达到 7 μg 时, 抑菌率增加到 40.00% (表4)。

表4 重组几丁质酶对病原真菌生长的抑制率

病原真菌	用量 (μg)	抑制率 (%)
苹果轮纹病菌	0	
	3	19.87
	5	20.00
	7	26.32
新月弯孢菌	0	
	3	15.56
	5	15.90
	7	40.00
金黄壳孢菌	0	
	3	40.00
	5	55.56
	7	55.62
板栗疫病原菌	0	
	3	25.71
	5	28.57
	7	30.40

3 讨论

微生物几丁质酶的分子量一般在 20 ~ 90 ku 之间,胡仕凤等统计了 8 种木霉的 39 个几丁质酶,发现木霉几丁质酶多为内切酶,并且大多数分子量为 42 ku^[16]。Lorito 等研究发现,木霉几丁质酶是对植物病原真菌非常有效的几丁质酶,不仅能够降解病原菌的菌丝,也对有几丁质复合结构的细胞壁及菌核有降解作用^[17-18]。毕赤酵母异源表达的 gene02524 与原核表达的几丁质酶 Tachi2 相比,热稳定性 gene02524 低于 Tachi2;但是 gene02524 在

长均有一定的抑制作用,并且存在一定的剂量效应。相同用量 gene02524 蛋白对金黄壳孢菌生长抑制作用最强,5 μg gene02524 抑制率便能超过

pH 值 3.0 ~ 8.5 范围内相对酶活性在 80% 以上, 具有更高的 pH 值稳定性^[19]。而 gene02524 与同为酵母异源表达的棘孢木霉几丁质酶 Tachi1 相比, 在热稳定性上低于 Tachi1, 但是在 pH 值稳定性上高于 Tachi1, 并且当环境中存在金属离子及变性剂和蛋白酶抑制剂时 gene02524 有更高的稳定性^[14], 说明 gene02524 与已报道的棘孢木霉几丁质酶相比具有一定的差异性。几丁质酶对很多病原菌都有抑制效果, Olivera 等研究发现不同的几丁质酶作用方式不同^[20], 所以不同的几丁质酶对不同的病原菌抑制效果不同。本研究表达的 gene02524 与已报道的棘孢木霉几丁质酶在酶学性质上有很多差异, 这种酶性质的差异可能导致不同几丁质酶在木霉中执行不同的生物学功能, 有待于进一步深入研究。本研究实现了几丁质酶 gene02524 的酵母表达, 明确了 gene02524 的酶学性质和抑菌活性, 为植物病害的防治提供了新的基因资源, 同时也为进一步研究棘孢木霉中几丁质酶的结构及功能奠定了基础。

4 结论

本研究成功通过毕赤酵母表达系统表达了几丁质酶 gene02524, 蛋白表观分子量为 44.4 ku, 与理论分子量相符, gene02524 基因编码序列全长 1 190 bp, 编码 397 个氨基酸并包含 GH18 家族特征的序列 SXGG 及 DXXDXDXE, 理论等电点为 5.67。最适反应温度为 50 °C, 在 35 °C 下稳定性最好; gene02524 蛋白具有非常广泛的 pH 值适用范围, 在 pH 值 4.0 ~ 10.0 范围内均有较高的催化活性(剩余酶活 > 50%), 最适 pH 值为 5.0, 在 pH 值为 3.5 时稳定性最高; 金属离子对 gene02524 活性有明显影响, 其中 Cu²⁺、Hg²⁺ 强烈抑制酶活性; SDS 强烈抑制酶活性, 1 mmol/L EDTA 与 10 mmol/L β- 巯基乙醇对酶活性有一定的促进作用。gene02524 对供试的病原菌均有不同程度的抑制效果, 抑菌谱较广。

参考文献:

- [1] Sood M, Kapoor D, Kumar V, et al. *Trichoderma*: the “secrets” of a multitasking biocontrol agent [J]. *Plants (Basel, Switzerland)*, 2020, 9(6): 762.
- [2] Roberts M, Schimmelpfennig D, Ashley E, et al. The value of plant disease early - warning systems: a case study of USDA's soybean rust coordinated framework [J]. *Economic Research Report*, 2006, 26: 1 - 48.
- [3] Atreya K. Pesticide use in agriculture: the philosophy, complexities and opportunities [J]. *Scientific Research and Essays*, 2012, 7(25): 2168 - 2173.
- [4] Mwabulambo S G, Mrema E J, Ngowi A V, et al. Health symptoms associated with pesticides exposure among flower and onion pesticide applicators in arusha region [J]. *Annals of Global Health*, 2018, 84(3): 369 - 379.
- [5] 尤佳琪, 吴明德, 李国庆. 木霉在植物病害生物防治中的应用及作用机制 [J]. *中国生物防治学报*, 2019, 35(6): 966 - 976.
- [6] 汤伟, 夏伟, 李雅华, 等. 棘孢木霉 (*Trichoderma asperellum*) 几丁质酶基因的克隆与生物信息学分析 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2012, 28(4): 385 - 392.
- [7] Yang J K, Zhang K Q. Chitin synthesis and degradation in fungi: biology and enzymes [J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2019, 1142: 153 - 167.
- [8] Elsherbiny E A, Amin B H, Aleem B, et al. *Trichoderma* volatile organic compounds as a biofumigation tool against late blight pathogen *Phytophthora infestans* in postharvest potato tubers [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(31): 8163 - 8171.
- [9] de la Cruz 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.
- [10] Chen W, Yang Q. Development of novel pesticides targeting insect chitinases: a minireview and perspective [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(16): 4559 - 4565.
- [11] Mahmood S, Kumar M, Kumari P, et al. Novel insecticidal chitinase from the insect pathogen *Xenorhabdus nematophila* [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 159: 394 - 401.
- [12] Kumar V, Parkhi V, Kenerley C M, et al. Defense - related gene expression and enzyme activities in transgenic cotton plants expressing an endochitinase gene from *Trichoderma virens* in response to interaction with *Rhizoctonia solani* [J]. *Planta*, 2009, 230(2): 277 - 291.
- [13] Shah M R, Mukherjee P K, Eapen S. Expression of a fungal endochitinase gene in transgenic tomato and tobacco results in enhanced tolerance to fungal pathogens [J]. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 2010, 16(1): 39 - 51.
- [14] 汤伟, 李雅华, 刘露, 等. 重组毕赤酵母表达棘孢木霉几丁质酶 Tachi1 的酶学性质研究及表达条件优化 [J]. *微生物学报*, 2012, 52(3): 345 - 352.
- [15] Rosas - García N M, Fortuna - González J M, Barboza - Corona J E. Characterization of the chitinase gene in *Bacillus thuringiensis* Mexican isolates [J]. *Folia Microbiologica*, 2013, 58(6): 483 - 490.
- [16] 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.
- [17] Lorito M, Peterbauer C, Hayes C K, et al. Synergistic interaction between fungal cell wall degrading enzymes and different antifungal compounds enhances inhibition of spore germination [J]. *Microbiology*, 1994, 140(Pt 3): 623 - 629.
- [18] Lorito M, Woo S L, D'Ambrosi M, et al. Synergistic interaction

杨波,姜彩鸽,宋双,等.不同药剂对宁夏葡萄霜霉病田间药效及对葡萄果面微生物群落的影响[J].江苏农业科学,2022,50(9):103-110.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.09.017

不同药剂对宁夏葡萄霜霉病田间药效 及对葡萄果面微生物群落的影响

杨波^{1,2},姜彩鸽¹,宋双¹,张华普¹,张怡¹

(1.宁夏农林科学院植物保护研究所,宁夏银川 750002; 2.宁夏农垦农林牧技术推广服务中心,宁夏银川 750021)

摘要:为筛选对宁夏葡萄霜霉病防治有效、环境友好型的药剂以及明确施药后葡萄果面微生物群落的结构,采用田间药效试验和 Illumina 高通量测序的方法,比较 7 种药剂对葡萄霜霉病的田间防效及施药后葡萄果面真菌和细菌群落组成、结构以及多样性。结果表明,7 种药剂中 47% 春雷王铜对葡萄霜霉病的防治效果最好,在调查的 3 个时间段中,防效均在 82.17%~91.56% 之间,其次防效较好的是生物源农药 0.3% 苦参碱,防效均在 80% 以上。不同药剂处理后葡萄果面微生物的优势属种主要有枝孢属、链格孢属、线黑粉酵母属、马赛菌属和鞘氨醇单胞菌属等,但各处理间微生物的丰富度、多样性、均匀度、结构相似性存在明显差异,微生物物种多样性较高、分布均匀的组分别为 EU 组和 PO 组,而微生物丰度较高的组分别为 PO 组和 BS 组;基于加权 UniFrac 距离矩阵的主坐标分析(PCA)发现 PO 组、PF 组和 MA 组之间真菌群落结构组成相似,而细菌群落组成结构相似的组分别为 KC 组、EU 组和 CK 组。通过对不同药剂的田间防效及施药后葡萄果面微生物群落结构和多样性的初步研究,对微生物群落结构、种类和多样性有了一定的了解,为防治宁夏葡萄霜霉病提供了理论依据,及揭示施药后葡萄果面微生物多样性,提高葡萄酒品质提供了理论支持。

关键词:葡萄;葡萄霜霉病;药剂筛选;生物多样性;主坐标分析

中图分类号:S436.631.1⁺9 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2022)09-0103-08

葡萄霜霉病 (grape downy mildew) 是由葡萄生单轴霜霉 (*Plasmopara viticola*) 引起的一种世界性专性寄生病害,各葡萄产区均有发生,严重危害葡萄产量和品质^[1-2],制约着葡萄产业高质量、可持续发展。宁夏回族自治区(简称宁夏)因独特的地理位置及适宜葡萄生长的气候特点,被认为是我国酿酒葡萄的最佳产地^[3]。随着宁夏葡萄酒产业的欣欣发展,葡萄种植面积也在逐年增加,葡萄霜霉病

作为宁夏葡萄产区最主要的病害,严重影响着葡萄种植业和葡萄酒酿造业^[4]。目前,在葡萄霜霉病的防治中,药剂防治是最直接有效的防治方法,但随着化学药剂“3R”问题的日趋严重,化学药剂对环境破坏等问题凸显,化学农药造成的食品安全事件、农药残留超标事件时有发生,已经不能适应现代葡萄产业的发展、不能保证葡萄生产的正常进行,新型高效环保的杀菌剂及合理安全的用药技术在葡萄生产中迫切需求。

葡萄霜霉病的生物防治近些年成为研究的热点之一,已开发与筛选出一些对葡萄霜霉病有效的生物药剂^[5]。芽孢杆菌 (*Bacillus* spp.) 是国内外开发微生物源农药的重要资源,因其低毒、低污染的特点,在生物防治中得到广泛研究和应用^[6-7],是目前较为理想的微生物农药,研究较多的是枯草芽孢杆菌。陈浩等研究发现枯草芽孢杆菌 B-FS01 在

收稿日期:2021-07-06

基金项目:宁夏回族自治区重点研发计划(编号:2019BBF02013);宁夏回族自治区农业科技自主创新资金(编号:NGSB-2021-4-04)。

作者简介:杨波(1992—),男,宁夏中卫人,硕士,助理农艺师,主要从事植物保护研究。E-mail:752536645@qq.com。

通信作者:张怡,硕士,研究员,主要从事农林病虫害防治技术研究工作。E-mail:nxzh0951@163.com。

between cell wall degrading enzymes and membrane affecting compounds[J]. *Molecular Plant - Microbe Interactions*, 1996, 9 (3):206-213.

[19]张军霞,丛大鹏,李雅华,等.辣孢木霉几丁质酶 *tachi2* 基因的原核表达及酶学性质研究[J]. *中国生物工程杂志*, 2013, 33

(6):45-51.

[20]Olivera I E, Fins K C, Rodriguez S A, et al. Glycoside hydrolases family 20 (GH20) represent putative virulence factors that are shared by animal pathogenic oomycetes, but are absent in phytopathogens[J]. *BMC Microbiology*, 2016, 16(1):232.