

镰刀菌分子鉴定与重要应用的研究进展

王世伟* 王卿惠 李小鹏 张其法 马兆魁 唐海平

(齐齐哈尔大学生命与农林学院 抗性基因工程与寒地生物多样性保护重点实验室 黑龙江 齐齐哈尔 161005)

摘要: 镰刀菌(*Fusarium* sp.)在土壤及动植物体内广泛分布。由于其形态变异大,有关镰刀菌的分类一直是一个难题。随着 PCR 技术发展,镰刀菌的分子标记和 rDNA 分析等鉴定方法的建立,提高了镰刀菌形态学鉴定的准确性,为镰刀菌进一步研究和应用奠定了基础。镰刀菌能产生多种重要的酶类,包括纤维酶、果胶酶和木聚糖水解酶等。通过生物转化可获得重要药物或药物中间体,因此具有潜在商业价值。镰刀菌能降解多种环境污染物,在环境保护中具有重要潜力。特别是能通过生物转化生产生物乙醇,解决能源危机问题。本文较详细地介绍了镰刀菌的鉴定和产酶情况,对镰刀菌产生的主要酶的性质、作用以及在生产生物乙醇方面的应用进行了详细综述。

关键词: 镰刀菌, 分子鉴定, 酶系, 生物乙醇, 进展

Progress in molecular identification in the genus *Fusarium* and its important applications

WANG Shi-Wei* WANG Qing-Hui LI Xiao-Peng ZHANG Qi-Fa
MA Zhao-Kui TANG Hai-Ping

(Key Laboratory of Resistance Gene Engineering and Preservation of Biodiversity in Cold Areas, College of Life Sciences and Agriculture and Forestry, Qiqihar University, Qiqihar, Heilongjiang 161005, China)

Abstract: *Fusarium* is a large genus of filamentous fungi and widely distributed in soil and associated with plants. Because of its great morphological variation, the classification of *Fusarium* has always been a thorny problem in the academic circle. With the PCR technology, the identification methods of molecular markers and rDNA analysis of *Fusarium* improved the accuracy of morphological identification, and laid a foundation for further research and application of *Fusarium*. *Fusarium* can produce a variety of key enzymes, including cellulase, pectinase and xylan hydrolase. The important drugs or drug intermediates can be obtained via the bio-transformation, so they have potential commercial value. *Fusarium* can degrade a variety of environmental pollutants and has important

Foundation items: College Student's Innovation and Entrepreneurship Training Program of Heilongjiang Province in 2016 (201610221026); The Science and Technology Research Project of Heilongjiang Province Education Department (12541855)

*Corresponding author: E-mail: wsw888535@sohu.com

Received: June 12, 2017; **Accepted:** September 22, 2017; **Published online** (www.cnki.net): September 26, 2017

基金项目: 2016年黑龙江省大学生创新创业训练计划资助项目(201610221026); 黑龙江省教育厅科学技术研究项目(12541855)

*通信作者: E-mail: wsw888535@sohu.com

收稿日期: 2017-06-12; 接受日期: 2017-09-22; 网络首发日期(www.cnki.net): 2017-09-26

potential in environmental protection. In particular, biological ethanol can be produced through biological transformation to solve the energy crisis. In the paper, the identification and enzyme production of *Fusarium* species are described in detail. The properties of the main enzymes from *Fusarium* and the application in the production of bioethanol are reviewed in detail.

Keywords: *Fusarium* sp., Molecular identification, Enzyme system, Bioethanol, Advance

镰刀菌属(*Fusarium* sp.)为真菌中较大的属,广泛分布于自然界。在形态分类学上,镰刀菌无性世代原属半知菌亚门(Deuteromycotina);有性世代属子囊菌亚门(Ascomycotina)。镰刀菌菌丝(Hypha)有隔,分枝;分生孢子梗(Conidiophore)分枝或不分枝,有大、小两种形态。小型分生孢子(Microconidia)为卵圆形至柱形;大型分生孢子(Macroconidia)为镰刀形或长柱形。这些形态特征为镰刀菌的鉴定提供了有益参考。但是,镰刀菌属形态复杂,易受外界环境影响而发生变异。因此,单凭形态学特征鉴定镰刀菌,常产生不确定的结果,影响了后续研究工作的开展。采用分子生物学技术,使DNA分子成为区分物种、变种、地理株的有效手段,为镰刀菌鉴定提供了更科学的方法。镰刀菌在自然界中能产多种酶类,可进行有效生物转化,为镰刀菌开发、利用和获得具商业价值产品创造了条件。例如,手性 α -氨基苯乙醇是合成重要药物的中间体。生措等^[1]以 α -氨基苯乙酮盐酸盐为模型底物,从土壤中筛选到一株高立体选择性催化底物产生R型、S型相应醇菌株,对映体过量值(e.e.)达99%。经鉴定该菌株为镰刀菌。蔡伟建等^[2]研究了一种镰刀菌对2,4,6-三氯苯酚(TCP)的降解规律。可见镰刀菌在降解环境中有毒物质上也具有很大潜力。镰刀菌也能产紫杉醇,艾海新等^[3]从红豆杉韧皮部组织中分离、筛选到11株产Taxol真菌,其中真菌LNUF014为镰刀菌。程龙等^[4]从南方红豆杉中分离到内共生真菌Y1117,为镰刀菌属的一个新种,命名为美丽镰刀菌(*F. mairei* Cheng L. et Tao WY.)。但无论如何,镰刀菌生物转化离不开其菌体内产生的大量的酶。因此,对镰刀菌酶系深入细致地研究,具有重要理论和应用价值。本文针对镰刀菌的分类、生物质降解酶以及乙醇生产情况进行了较为详细的综述。

1 镰刀菌分类和鉴定

1.1 镰刀菌形态学鉴定

1.1.1 镰刀菌形态学奠定分类鉴定的基础

镰刀菌是真菌中最难鉴定,但极具经济价值的菌属。自1935年德国人Wollenweber和Reinking^[5]把镰刀菌划分为16组65种分类系统以来,各国学者对该属进行了大量形态学研究。俞大绂^[6]较早对镰刀菌属形态学分类进行了研究,于1955年发表了《中国镰刀菌属(*Fusarium*)菌种的初步名录》,为我国镰刀菌后续分类研究奠定了基础。

1.1.2 形态学观察与新技术结合促进镰刀菌分类鉴定

一直以来,人们采用形态学或基于形态学的改进方法鉴定了大量的镰刀菌。沈瑞清等^[7]研究了宁夏镰刀菌属种类、分布,鉴定出9种镰刀菌,包括燕麦镰刀菌(*F. avenaceum*)、同色镰刀菌(*F. concolor*)、黄色镰刀菌(*F. culmorum*)、禾谷镰刀菌(*F. graminearum*)、串珠镰刀菌(*F. moniliforme*)、雪腐镰刀菌(*F. nivale*)、尖孢镰刀菌(*F. axysporum*)、茄类镰刀菌(*F. solani*)以及1种未定名镰刀菌属。王家和等^[8]选取7个培养性状数据,对47个镰刀菌进行了生物学性状测定,根据向量夹角余弦法相似系数和系统聚类分析的类平均法,利用电子计算机进行数值分类,在“种”水平上将47个镰刀菌菌株分开,与传统分类鉴定符合率达91.5%。洪坚平等^[9]从山西省13个主要土壤类型的1012个土样中分离出333株镰刀菌,依据布斯镰刀菌属分类系统,鉴定了一株柔毛镰刀菌(*F. flocciferum corda*),为中国新记录种。可见,形态学与新技术结合能较有效鉴定镰刀菌。但是,由于镰刀菌某些性状不稳定,单凭形态学鉴定难以准确反映其系统发育关系。因此,有必要结合分子生物学技术对镰刀菌进行更加

准确、系统地鉴定。

1.2 镰刀菌分子生物学鉴定

1.2.1 利用分子标记鉴定镰刀菌

以分子生物学为基础建立系统发育学种(Phylogenetic species), 能弥补形态学鉴定的不足, 更科学地反映镰刀菌系统发育关系。1989年 Guadet等^[10]首次应用分子生物学方法鉴定了镰刀菌, 经各国学者共同努力, 20多年来已经澄清了镰刀菌属中很多种间、种内系统发育关系; 建立了镰刀菌的“有性型-无性型”联系。近年来, 镰刀菌进化、分类与鉴定的新方法不断出现, 如 RFLP、RAPD、AFLP、SSR、ISSR 等分子标记技术, 提高了镰刀菌鉴定的准确性和科学性。与 RAPD 和 RFLP 相比, ISSR 能揭示更多的多态性, 鉴定精确度大幅度提高。王建明等^[11]为了阐明美丽组中尖孢镰刀菌和芬芳镰刀菌(*F. redolens*)的遗传差异性和亲缘关系, 利用 ISSR 对 35 株菌进行了分析。研究发现, 供试 35 株镰刀菌可明显分成 2 个 ISSR 类样(IG)。IG1 全部为尖孢镰刀菌, 而 IG2 全部为 *F. redolens*。ISSR 的类样划分与菌种分类之间存在相关性, 说明 ISSR 能

有效区分镰刀菌种间和种内的遗传差异。

1.2.2 核基因组 rDNA 分析

镰刀菌属系统学研究的主要基因位点有许多, 但目前核糖体 DNA (rDNA)和 EF-1 α 延伸因子两类基因位点应用最为广泛^[12-13]。rDNA 是鉴定镰刀菌的理想方法, 其最大优点是既具有保守性, 又存在变异性。对大多真核生物而言, rDNA 包括外转录间隔区(ETS)、18S rRNA 基因、转录间隔区(ITS, 包括 5.8S rRNA 基因序列)、28S rRNA 基因和非转录区(NTS)。rDNA-ITS 序列具多拷贝重复序列, 全序列一般为 500–800 bp。使用通用引物进行 PCR, 很容易从含量低或高度降解 DNA 样品中扩增出 rDNA-ITS 序列。由于不同真菌种间或同种分离株间的 rDNA 存在高度变异, 因此 rDNA 分析已成为鉴定镰刀菌的理想方法。

表 1 为近年来国内学者对镰刀菌进行分子鉴定的情况。从表 1 可知, 研究者从不同地域、样品中, 分离、鉴定出大量镰刀菌。由此可见, 镰刀菌属具有丰富的地域、样品和菌种多样性。在鉴定镰刀菌时, 多数学者把形态学和分子生物学鉴定相统一,

表 1 不同来源镰刀菌样品的分离和 rDNA 鉴定

Table 1 *Fusarium* sp. identified from different samples using rDNA analysis

产地 Places of origin	分离源 Separation sources	Molecular identification	获得菌株 Strains obtained	菌株数/分离率 Number of strains/ Separation rate	参考文献 References
Yunnan	<i>Cymbidium</i>	ITS1/ITS4; rDNA-ITS	<i>Fusarium</i> sp.	—	[14]
Zhanjiang	<i>Galaxea fascicularis</i>	rDNA-ITS	<i>Fusarium</i> sp.	—	[15]
Jiangsu	Huai rice 5	ITS and 28S rDNA	<i>Fusarium</i> sp.	2	[16]
Hunan	Turmeric	rDNA-ITS	<i>Fusarium</i> sp.	51.00%	[17]
Yunnan, Sichuan, Guangdong and Shanxi	Aloe Kuraso	ITS1 and ITS4 rDNA-ITS	<i>Fusarium</i> sp.	12.69%	[18]
Tianshan	Grass and soil	18S rRNA; DGGE	<i>Fusarium</i> sp.	—	[19]
Jiangsu	Watermelon root	Morphology	<i>Fusarium oxysporum</i> LD; <i>Fusarium oxysporum</i> LB; <i>Fusarium solani</i> LC; <i>Fusarium proliferatum</i> LA; <i>Fusarium verticillioides</i> XA; <i>Fusarium verticillioides</i> XB	6	[20]
Jiangsu	Sea Asparagus	18S rRNA rDNA-ITS	<i>Gibberella avenacea</i> (<i>Fusarium avenaceum</i>)	1	[21]
Henan	Corn	ITS1-5.8S-ITS4 rDNA-ITS	<i>Fusarium verticillioides</i>	1	[22]

使镰刀菌鉴定更加准确。植物内生真菌中镰刀菌属往往是优势菌群,从上述参考文献可知,该菌属占微生物菌种比例在 12.69%–51.00%之间。

总之,为了准确鉴定镰刀菌,需要形态学和分子生物学相互印证,使鉴定方法更加完善。Ayob 等^[23]从野生长春花中分离到丝状真菌,首先通过扫描电镜观察了孢子和菌丝亚显微结构,然后进行了 ITS 的 DNA 检测,发现了纤维素酶呈阳性腐皮镰刀菌。单基因位点最大简约性分析,可以解决镰刀菌鉴定许多问题,但有时还需要对多个基因位点统一进行分析^[24]。Abe 等^[25]使用 DNA 条码技术研究具腐烂症状玉米种子颗粒中的微生物,发现轮枝镰刀菌(*F. verticillium*)是优势菌种。rDNA 分析不仅能为真菌种间及种下鉴定提供重要信息,也为镰刀菌的鉴定提供了可靠、快捷和准确的方法。18S rRNA 基因和 28S rRNA 基因比 ITS 保守,适应于较高水平类群间系统分析。相比之下,由于 rDNA-ITS 区进化速率较快,常被用于较低分类阶元,如属和种的分类鉴定。可以相信,随着 DNA 测序技术发展,镰刀菌鉴定的准确性必然进一步提升。

1.2.3 EF-1 α 基因分析鉴定镰刀菌

通过分析 EF-1 α 基因的差异,可以实现对镰刀菌系统发育学种的鉴定。作为真核生物多肽链延伸因子,EF-1 α 可结合并将氨酰 tRNA 置于核糖体 A 位点。对镰刀菌而言,EF-1 α 在种水平上具丰富信息量,不存在无 EF-1 α 基因特例。因此,只要设计出通用引物,便可运用此基因位点,鉴定镰刀菌^[26]。李金花等^[27]为阐明甘肃马铃薯镰刀菌干腐病的优势病原,从张掖等 6 县市采集的表现该症状马铃薯薯块中分离获得 293 株镰刀菌。形态学鉴定发现,其中以接骨木镰刀菌(*F. sambucinum*)和茄病镰刀菌为优势菌种。利用 EF-1 α 基因引物对接骨木镰刀菌菌株 GAUF-F12 进行 PCR 扩增、测序,并在 GenBank 上与其他菌株进行比对。结果发现,GAUF-F12 与 GenBank 登记的 5 个接骨木镰刀菌相似性均达 99%,与形态学的鉴定结果一致。可见,采用 EF-1 α 基因对镰刀菌鉴定也是完全可行的。

2 镰刀菌产酶情况研究

2.1 镰刀菌产纤维素酶

2.1.1 纤维素酶作用机制

纤维素酶(Cellulase)对纤维素类物质进行降解,可获得丰富的生物产品及生物燃料。这对解决能源危机、促进社会可持续发展,具有重要战略意义^[28]。根据催化功能不同,纤维素酶可分为内切葡聚糖酶(EC 3.2.1.4,来自真菌的简称 EG)、外切葡聚糖酶(EC 3.2.1.91,来自真菌的简称 CBH)和 β -葡聚糖苷酶(EC 3.2.1.21,简称 BGL)。内切葡聚糖酶随机切割纤维素多糖链内部无定型区,产生不同长度寡糖和新链末端。外切葡聚糖酶作用于这些还原性和非还原性纤维素多糖链末端,释放葡萄糖或纤维二糖。 β -葡萄糖苷酶水解纤维二糖产生两分子葡萄糖。了解纤维素酶作用机理,对纤维素酶的应用具有重大意义。

2.1.2 镰刀菌产纤维素酶

镰刀菌纤维素酶产量高、活性大,有广泛的作用底物。表 2 为近年国内对镰刀菌产纤维素酶的研究。傅筱冲等^[33]建立一种分解纤维素真菌快速分离方法。将一种水不溶性呈色基团作为底物和唯一碳源,用与微晶纤维素交联的纤维素酶加以检测,通过测定培养液 OD_{550} 值,能快速从样品中分离筛选出纤维素分解菌。Chepchak 等^[34]从土壤和植物体中分离到能以植物废弃物为碳源,并具有内切葡聚糖酶活性的尖孢镰刀菌。研究发现,菌株均能水解滤纸、向日葵、麦秸和玉米秸秆。纤维素水解活力依菌株、底物和培养时间有所变化,为秸秆利用创造条件。Olajuyigbe 等^[29]在研究尖孢镰刀菌产 β -葡萄糖苷酶时发现,以纤维素为底物,在发酵 192 h 内(pH 3.0–11.0) β -葡萄糖苷酶均能保持较高酶产量。该酶具有很高热稳定性,在 70 °C 保温 180 min,酶活力仍保留 83%。在实际工业生产上,提高 β -葡萄糖苷酶热稳定性具有潜在价值,不仅能改善纤维素复合物的水解,大量生成可发酵糖,而且对能源再生和生物燃料生产都具有意义。

表 2 镰刀菌产纤维素酶研究

Table 2 Study on the cellulase from the different strains of *Fusarium* sp.

菌株 Strains	产酶情况 Enzyme production situations											参考文献 References
	产酶类型 Enzyme types	碳源 Carbon sources	氮源 Nitrogen sources	pH	时间 Time (h)	温度 Temperature (°C)	释放葡萄糖 Glucose yields	内切葡聚糖酶 CMCase	β -葡萄糖苷酶 β -Glucosidase	滤纸酶活力 FPA	应用 Application	
	<i>Fusarium oxysporum</i>	β -葡萄糖苷酶	-	-	6.0	96	30	2.121 μ mol/mL	-	177.5 U/mg	-	
<i>Fusarium oxysporum</i> XA-1	纤维素酶	香蕉秆, 水葫芦	香蕉秆, 水葫芦	-	32	-	香蕉秆 27.3%、水葫芦 29.8%	4 083.2 U/g	3 258.8 U/g	773.2 U/g	秸秆 \rightarrow 糖	[30]
<i>Fusarium</i> B-5	纤维素酶	-	-	-	72	28	-	5.20 IU/mL	-	2.09 IU/mL	-	[31]
<i>Fusarium</i> sp.	甲基纤维素酶	稻草 秸秆	NaNO ₃	-	108	32	-	-	-	-	-	[32]

从表 2 可以看出, 对镰刀菌产纤维素酶的研究多集中在下面几个方面: (1) 镰刀菌的分离和鉴定; (2) 产纤维素酶菌株的培养; (3) 产纤维素酶菌株发酵条件优化; (4) 不同金属离子对产生的纤维素酶的影响等。

然而, 单凭一种镰刀菌的纯培养物对纤维素进行降解远不能达到预期的目标。地球上丰富的纤维素资源, 需要复合菌系的共同作用才能被有效降解。因此, 降解纤维素复合菌系的研究具有更高研究价值。

2.1.3 复合菌系和复合酶系的优势

为了弥补单株镰刀菌产纤维素酶产量不足的问题, 有人对“复合菌系”进行了研究。Shang 等^[35]从土壤及腐烂秸秆中筛选到一组高效降解纤维素的复合菌系, 经过形态学和分子生物学鉴定, 真菌 F1 为葡萄座腔菌、F2 为米根霉及 F5 为尖孢镰刀菌。当以秸秆作为碳源时, 复合菌系纤维素分解活力比 F5 单菌活力提高了 23%, 说明复合菌系对纤维素降解效果优于单一菌株。除利用多菌系外, 还要考虑同一菌株产“复合酶系”问题。de Almeida 等^[36]研究发现, 轮枝镰刀菌能产新型多酶复合物(E1C)和自由内切葡聚糖酶——E2 (GH5)。E1C 酶复合物包括 2 个

内切葡聚糖酶(GH6 和 GH10)、1 个外切纤维素酶(GH7)和 1 个木聚糖酶 (GH10)。在 80 °C 下, 酶表现出最大的活力; 在 50–60 °C 范围内, 酶均具热稳定性。E1C 和 E2 两种酶均表现出内切 β -1,3-葡聚糖酶活性。E1C 对纤维五糖、纤维四糖和纤维三糖底物的活力依次增强。E2 酶以同样效率水解纤维五糖、纤维四糖和纤维三糖。E1C 比 E2 酶表现出更高稳定性和水解能力。推测复合酶系之所以具有优势, 可能源于不同蛋白质(酶)之间相互作用。深入研究复合酶类中蛋白质之间的相互作用, 探索不同酶之间的作用机理, 在理论和实际应用上均具有重要的价值, 将成为解决纤维素难以降解的有效途径。

2.1.4 镰刀菌纤维素酶的纯化和性质

纤维素酶的纯化和酶学性质的研究, 是镰刀菌酶学重要基础工作。表 3 列举近年来具有代表性的 3 种镰刀菌所产的纤维素酶纯化和酶学性质。从表 3 可以看出, 镰刀菌纤维素的纯化符合其他酶纯化的一般原理和方法, 即用多步层析(如疏水层析、离子交换层析和凝胶过滤层析)使酶比活力达到最大, 最终使酶蛋白达到同质水平。纯化后对影响酶活的各种参数(温度、酸碱度等)进行优化, 探索金属离子对酶的影响。

表 3 镰刀菌产纤维素酶纯化和性质

Table 3 Study on purification of the cellulase from the different strains of *Fusarium* sp.

菌种 Strains	发酵 Fermentation	纯化 Purification	酶学性质 Enzymatic properties									参考文献 References	
			家族 Families	激活剂 Activators	抑制剂 Inhibitors	分子量 MW (kD)	等电 点 pI	酸碱度 pH	温度 Temperature (°C)	酶活力 EA (U/mL)	比酶 活 SA↑		
<i>Fusarium</i>	30 °C, 120 r/min, 108 h	ASF→Sephadex G-100→DEAE- Sephadex A-50→SDS- PAGE	Cellulase	—	—	—	—	—	—	—	35.25	19.56 times	[37]
<i>Fusarium</i> Q7-31T	Oat straw	Sephacry S-100 →DEAE→ Egn20	GH7	Fe ²⁺	Na ⁺ , Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , Zn ²⁺ , K ⁺ , Hg ²⁺	55.37	7.44	6.0	40	—	—	—	[38]
<i>Fusarium</i> Q7-31T	1% Peptone, 0.5% Oat straw, 20 °C, 120 r/min, 3 d	Sephacry S-100 →DEAE→ Egn21	GH5	—	Fe ²⁺ , Ca ²⁺ , K ⁺ , Na ⁺ , Mn ²⁺ , Hg ²⁺	44.20	4.91	6.0	40	—	—	—	[39]

最近,Zhao 等^[40]使用单一凝胶过滤层析纯化了尖孢镰刀菌 β -葡萄糖苷酶(BGL)。研究发现,在 pH 5.0 和 60 °C 条件下, BGL 对纤维二糖具有最佳的酶活力。在同样的条件下,酶对底物 4-硝基苯基- β -D-吡喃葡萄糖苷和纤维二糖的 K_m 和 V_{max} 值分别为 2.53 mmol/L、268 U/mg 和 20.3 mmol/L、193 U/mg。BGL 在酸性 pH 下稳定性很高,在模拟胃条件下,与商业用 Novo188 相比,补充尖孢镰刀菌 BGL 使纤维素释放更多的糖。目前对镰刀菌中纯化的纤维素酶性质的研究包括电泳法分子量、酶的抑制和激活。但总的看来,对镰刀菌产纤维素酶的作用机理研究较少,今后需加强此方面的研究。对纤维素酶机制的研究可以先获得纯酶,然后对酶进行酶蛋白的结晶,通过 X-射线衍射分析酶单晶体的结构和催化机制。也可以通过基因克隆或 PCR 方法测序基因的序列,然后通过同源建模方法模拟酶分子的立体结构,通过活性中心和催化部位的氨基酸分析研究酶的功能。

2.1.5 镰刀菌纤维素酶的特殊性

目前根据蛋白质结构域中氨基酸序列相似性,将不同来源的碳水化合物活性酶(Carbohydrate-active enzyme, CAZy)分成不同蛋白质家族。其分类依据是 aa 序列相似度,高于 30% 即被归为同一 GH 家族。

目前糖苷水解酶已超过 131 个家族。纤维素酶属于糖苷水解酶中的一类,是专门催化水解纤维素链中 β -1,4-糖苷键的酶的总称。纤维素酶类分布至少在 17 个 GH 家族中,是糖苷水解酶数据库中家族数目最多的一类^[41]。从表 3 可知,一种镰刀菌(Q7-31T)即存在分属不同 GH7、GH5 家族的 2 种类型的纤维素酶(Egn20 和 Egn21)。由此可见,尽管纤维素酶家族酶庞大,研究起来又会出现许多困难,但对其研究意义重大。CAZy 包括糖苷水解酶类、糖基转移酶类、多糖裂解酶类以及糖酯酶,具有降解、修饰及生成糖苷键功能。植物细胞壁降解酶(PCWDEs)也属于这类酶。研究发现,植物能释放的抑制蛋白(PIPs)能抵消 PCWDEs 作用,从而减少降解酶对植物的危害。Chang 等^[42]报道,大豆猝死综合症病原菌(*F. virguliforme*)能产生降解纤维素和果胶质的多种 CAZy,可逃避 PIPs 抑制作用。大豆猝死综合症病原菌包含其他病原真菌或卵菌所没有的酶家族,如 GH131、多糖裂解酶 PL9、PL20 和 PL22。对真菌产生的 PCWDEs 作用机理进行深入研究,不仅能有效地防止镰刀菌对植物侵害,同时也为人们研究、利用和开发能降解多种含纤维素物质的镰刀菌资源提供宝贵的数据。提高纤维素酶对某些盐类的抗性一直为人们所重视。Xu 等^[43]通过添加咪唑盐

离子液, 培养富集耐离子液(IL)微生物。对受化学品污染的小生态环境微生物类群进行研究, 从富集物中获得的产生纤维素酶尖孢镰刀菌 BN 菌株, 能在浓度高达 10% 的 1-乙基-3-甲基磷酸咪唑鎓盐中生长, 菌株分泌的纤维素酶对 ILS 具有较高的抗性。在含磷酸盐和硫酸盐自由基培养基上具有稳定构象。该菌株经过复合生物加工, 能直接将通过 IL 预先处理稻谷转化为生物乙醇, 为解决能源危机问题提供了菌种资源。

本实验室通过对北大仓酒大曲中总真菌进行分离和纯培养, 获得一株纤维素酶高产菌, 命名为 M1。通过形态学分析, M1 菌株分生孢子有大、小两种形态, 小型分生孢子为卵圆形, 有隔膜; 大型分生孢子为镰刀形, 有较多的横隔。含有分枝分生孢子梗。形态学鉴定符合镰刀菌特征。经过 rDNA-ITS 分析, M1 为尖孢镰刀菌, GenBank 登录号为 KY436001.1。该菌生长旺盛, 易于培养, 为纤维素酶高产菌株, 具潜在应用价值(待发表)。

2.2 镰刀菌产果胶酶

2.2.1 果胶酶

果胶酶(Pectinase)是能分解果胶质的酶类。依据底物不同, 其可分为果胶酯酶(Pectinesterase, EC 3.1.1.11, 简称 PE)、多聚半乳糖醛酸酶(Polygalacturonase, EC 3.2.1.15, 简称 PG)和果胶裂解酶(Pectinlyase, EC 4.2.2.2, 简称 PL)。目前果胶酶在食品工业中具有重要研究价值。

2.2.2 镰刀菌产生的果胶酶

果胶是由含有数百至约 1 000 个脱水半乳糖醛酸残基组成的线形多糖聚合物, 其分子质量在 50–150 kD 之间。李文强等^[44]在柑橘脱囊衣过程中, 研究了尖孢镰刀菌发酵液中果胶酶系中 3 个组分活性。发现 Fe^{2+} 、 Zn^{2+} 显著促进 PE 酶活力。 Mg^{2+} 和 Fe^{2+} 能提高 PG 酶活力, 而 Fe^{2+} 对 PL 酶具有促进作用。该研究为橙汁脱囊衣生产工艺优化、实现安全、高效、低成本橙汁生产提供了科学数据。

Yadav 等^[45]通过硫酸铵分级分离、羟甲基纤维素和凝胶过滤(Sephadex G-100)柱层析, 纯化了多隔

镰刀菌(*F. decemcellulare* MTCC2079)果胶裂解酶(PL), 其分子量约为 45 kD, 该酶最适 pH 9.0 时, 最适温度为 50 °C。其二级结构属于 $\alpha+\beta$ 类型, 具有较少 β -片层。纯化酶具有高效分解浸渍猪屎豆属纤维能力。

2.3 镰刀菌产木聚糖酶

2.3.1 木聚糖酶

为应对气候变化, 利用木质纤维素等可再生资源取代石化燃料, 是获得生物燃料的重要途径。木聚糖水解酶系包括 β -1,4-内切木聚糖酶、 β -木糖苷酶、 α -L-阿拉伯糖苷酶、 α -D-葡糖苷酸酶、乙酰基木聚糖酶和酚酸酯酶。在自然情况下, 它们可降解木聚糖中大量的半纤维素, 广泛应用于生物燃料、造纸、食品及饲料工业^[46-47]。然而, 木聚糖(Xylan)是一种异质多糖, 其完全水解需要一系列复杂木聚糖水解酶的共同作用。因此, 研究产木聚糖酶菌株及其产酶机制具有重要意义。

2.3.2 镰刀菌产木聚糖酶

分离高产木聚糖酶菌株以提高木聚糖酶活性, 一直是研究热点。郟卫那等^[48]以木聚糖为唯一碳源, 从长期堆放枯枝败叶的土壤中筛选到木聚糖酶活性相对稳定的尖孢镰刀菌 MJ23 菌株。在最适条件下, 该菌木聚糖酶活力可达 186 U/mL。通过模拟动物体内对饲料中半纤维素组分的消化过程发现, 添加木聚糖酶分别可使猪、鸡饲料中木糖生成量提高 28% 和 16%。可见该镰刀菌株在饲料加工业中具有重要潜力。

鉴定菌株是否产木聚糖酶的简单办法是看菌株是否能有效分解含木聚糖类物质。Ramanjaneyulu 等^[49]从 450 个能利用木聚糖真菌培养物中, 鉴定出 2 株镰刀菌(BVKT R2 和 BRR R6)。通过响应面法对其生产的木聚糖酶发酵条件进行了优化, 使木聚糖酶活力达 4 560 U/mL。Alvarez-Navarrete 等^[50]为了选择和鉴定来自不同生态系的产胞内木聚糖酶的丝状真菌, 从果树林、园艺和森林生态系中获得 103 个真菌。在以木聚糖作为主要碳源的固体培养基上, 通过评价木聚糖水解指数, 测定了真菌降解

木聚糖能力；并通过分子工具对菌株进行了选择和鉴定。研究发现，9个分离物除1个属于茎点霉属外，其余均为镰刀菌属。腐皮镰刀菌(59号分离物)显示出最高木聚糖水解指数(0.964±0.042)，具有较高木聚糖水解活性(3.823±0.210 U/mg)。可见，不同生态系中所含的产木聚糖酶菌株具有一定多样性，但优势菌群均为镰刀菌。de Almeida等^[51]通过相伴因素设计(CDDR design)，优化了轮枝镰刀菌内切葡聚糖酶和木聚糖酶的生产工艺，使其酶活力大幅度提升，利用粗酶提取物优化糖化和甘蔗渣发酵工艺，乙醇得率高达9.7 g/L。Obruca等^[52]研究发现，腐皮镰刀菌(F-552)深层发酵能产木质纤维素酶，酶混合物包括水解酶和木质素分解酶，前者包括纤维素酶、木聚糖酶和蛋白酶；后者包括锰依赖过氧化物酶(MnP)、木质素过氧化物酶(LiP)和漆酶(Lac)。向发酵培养基中添加木质纤维素和化学诱导物能明显影响酶产量，与对照培养基相比，其中玉米糠明显提高了纤维素酶和木聚糖酶产量；将过氧化氢添加到发酵瓶中，将引起轻微氧化压力，木质素分解酶产量达最大化，说明酶与应对过氧化氢压力有关。可见，在木聚糖酶作用的过程中，选择合适底物是十分重要的。在培养基中添加某种对发酵有影响的物质(例如H₂O₂)，不但可以增加木聚糖酶的活力，更重要的是可以部分解释酶的作用机理。

2.3.3 镰刀菌产木聚糖酶家族、表达、纯化与调节研究

木聚糖是自然界中除纤维素之外含量最丰富的多糖，占植物细胞干重的35%。作为植物细胞中半纤维素的主要成分，对其开发利用具有深远意义。然而自然界中很大一部分木聚糖尚未被有效利用，造成资源浪费。*Fusarium commune*菌株能产生宽泛木质纤维素降解酶，能高效率降解和利用天然半纤维素。Huang等^[53]研究发现，使用肽模式识别技术揭示了147个编码糖苷水解酶和6个编码溶解性多糖单氧酶(AA9和AA11)基因。其中包括所有相关纤维素降解酶(GH3、GH5、GH6、GH7、GH9、GH45和AA9)和丰富的半纤维素酶。进一步应用肽

模式识别技术，揭示了9个GH10和7个GH11家族酶亚家族，还发现该菌中未报道的YL10A、XYL10B和XYL11酶分属GH10亚家族1、亚家族3和GH11亚家族1。这些木聚糖酶已经在*Pichia Pink*系统中表达。研究发现，纯化的重组XYL10A具有很高特异酶活性，在碱性条件下，XYL10B既具有内切β-1,4-d-木聚糖酶活性，又具有β-木糖苷酶活性。XYL11是真正的木聚糖酶。由此可见，基因工程化的该菌株是一个有希望用于木质纤维素生物质降解酶来源菌株。赵联正等^[54]采用Sephacry S-100凝胶柱层析和DEAE弱阴离子交换柱层析法纯化了镰刀菌(Q7-31)的木聚糖酶Xyn9。经鉴定Xyn9是介于GH10和GH11家族之间的新型内切木聚糖酶。Gómez等^[55]研究发现尖孢镰刀菌内切β-1,4-木聚糖酶Xyl2是一种有希望的糖苷水解酶11家族的酶。Xyl2酶具有很高的木聚糖酶活力和β-木糖苷酶活力，有望成为一种可持续降解木聚糖的新型生物催化剂。转录激活子XlnR(Xlr1/Xyr1)是真菌木聚糖、纤维素降解以及d-木糖经戊糖代谢途径得以利用的主要调解者。XlnR同系物一般发现于丝状子囊菌，并且常常被认为在不同的真菌中具有同样的功能。Klaubauf等^[56]比较了野生型和5个真菌(*F. raminearum*、*M. oryzae*、*Trichoderma reesei*、*Aspergillus niger*和*A. nidulans*)的XlnR/Xlr1/Xyr1突变型。通过相关底物生长性能分析，并对分泌蛋白组和纤维素酶活性研究，确定了这些真菌不同细胞外酶谱系。经过蛋白体组X随标识符PXD001190的变化分析，发现在丝状真菌内XlnR的细微调节作用与真菌适应特别群落生境相关。可见，深入研究其特性和转运机制对木聚糖酶的开发和应用有实际意义。

2.4 镰刀菌产酶机理和蛋白组学研究

镰刀菌蛋白质组学和产酶的分子机理研究是未来的研究方向。长时间以来，为了控制植物的病原体，人们往往只关注于如何防治由真菌引起的植物病害的发生，对植物“病原微生物的利用”却少有关注。有研究表明，导致植物枯萎病的尖孢镰刀菌

能分泌降解宿主细胞壁的降解性酶, 对亚麻(*Linum usitatissimum*)产量造成了巨大影响。为了更好理解植物抗病机理, Wojtasik 等^[57]发现, 在亚麻籽苗和镰刀菌共同保温情况下, 细胞壁多聚物基因表达和相应多聚物水平呈一定相关性。尖孢镰刀菌侵染不能影响细胞壁多聚物组成, 但植物细胞壁多聚物经过基因表达和重排发生了变化, 从而使其结构发生了改变。由此, 我们可以推测, 病原微生物在与植物细胞相互作用的过程中, 可能分泌了某些(或某种)特殊的蛋白质因子, 它们可能作用于植物的基因组, 或作用于调节基因表达的各类因子, 最终影响植物细胞壁成分和结构的变化。植物和病原体之间的作用, 可以为我们阐明微生物产酶的机理提供参考数据。因此, 在研究植物和微生物之间作用时, 要看到变化的两个方面: 对于植物, 要研究植物抗微生物的机理, 以更好地保护植物; 对于微生物, 要考虑其基因和产酶的变化, 以便充分利用微生物产酶的变化规律, 更好地将其应用于工业生产。Kumar 等^[58]使用定量免标记蛋白质组学(Quantitative label-free proteomics)和基于核磁共振的代谢组学, 研究了鹰嘴豆与相容性和非相容性尖刀链球菌相互作用期间根代谢动力学。结果发现, 在抗性敏感植物中, 与 *Foc* (*F. oxysporum* f. sp. *ciceri*)保温的蛋白质和代谢物能进行差异表达。候选基因表达分析表明, 在同 *Foc* 接触时, 鹰嘴豆蛋白组和代谢组内存在变异。对抗性植物而言, 其碳氮代谢、氧活性、木质化及植物抗毒素等方面均有很大提高。接种 *Foc* 时, 某些与病原体相关蛋白水平明显增高。总的来说, 代谢流中所观察的模块决定于植物 Chickpea-*Foc* 之间相互作用。Ravalason 等^[59]发现, 轮枝镰刀菌菌株分泌酶(分泌蛋白质组)可潜在影响木质纤维素物质糖化作用。将 *T. reesei* 生产的纤维素酶和轮枝镰刀菌分泌蛋白质组混合, 能有效分解麦秆, 提高葡萄糖、木糖和树胶醛糖的释放率。酶活力测定揭示了一个宽泛的半纤维素酶和果胶酶的范围。通过蛋白质组学方法, 从 166 个分泌蛋白中鉴定出 57 种潜在蛋白质, 可用于木质纤维

素水解。可见, 蛋白质组学是一种研究镰刀菌木聚糖酶产生和相互作用的强有力的武器。赤霉病是一种世界范围的毁灭性的病害, 一般由禾谷镰刀菌引起。多菌灵(MBC)可控制赤霉病。Liu 等^[60]研究了禾谷镰刀菌 *locus* FGSG_04220, 一种与酿酒酵母 ScSWI6 相关的序列同系物, 因此命名为 FgSWI6。研究发现, 删除 FgSWI6 能引起菌丝体对 MBC 的敏感性, 使菌丝生长减少, 并影响分生孢子生长。缺乏 FgSWI6 的细胞生产效率下降、子囊壳减小, 使子囊和子囊孢子产生缺陷。研究还发现, FgSWI6 与病原体纤维素利用、锂耐受性和脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)生产直接相关。FgSWI6 的删除还可削弱 *F. graminearum* 对小麦的毒力。由此可见, FgSWI6 的存在对真菌病原体的生长、发育, 以及对多菌灵抗性是必不可少的。对其相关基因及表达的进一步研究, 将有助于揭示木聚糖被酶降解的机理。

3 镰刀菌生物转化生产生物乙醇的研究进展

3.1 镰刀菌相关酶系及其在生产生物乙醇中的作用

能源危机是当今世界所面临的巨大挑战。各国政府对清洁、高效地开发、利用生物乙醇等燃料, 表现出极大的关注。镰刀菌是解决这一世界性能源问题不可多得的真菌资源。深入研究镰刀菌生物乙醇的转化机理, 将为解决该问题提供理论和技术支撑。尖孢镰刀菌是木质纤维素生物转化乙醇极具潜力的微生物, 具有分解生物质成单糖的酶系。在无氧和微氧的条件下, 通过发酵将单糖转化为生物乙醇。de Almeida 等^[61]研究了轮枝镰刀菌乙醇的生产, 其分解葡萄糖、木聚糖和及其混合物获得乙醇的产量分别为 0.47、0.46 和 0.50 g/g (乙醇/糖)。王丙莲等^[62]筛选获得一株能发酵玉米秸秆生产乙醇的丝状真菌 ZW-21, 经 18S rRNA 基因序列分析鉴定其为镰刀菌属。在限氧条件下培养 5 d, 其乙醇最高产量高达 22.1 g/L。另外, 研究尖孢镰刀菌基因组中乙醛脱氢酶, 有助于阐明乙醇代谢途径和机理。范金霞等^[63]对尖孢镰刀菌基因组数据库进行了

搜索,发现 23 条假定乙醛脱氢酶蛋白属于醛脱氢酶超家族。根据其蛋白分子质量大小进行了系统命名,研究了蛋白的等电点、催化位点、磷酸化位点、亚细胞定位。通过多序列比对构建系统发育树,最终获得了一条乙醛脱氢酶基因序列,为尖孢镰刀菌乙醛脱氢酶基因的功能验证及乙醇代谢机理的研究奠定了基础。Anasontzis 等^[64]研究了葡糖代谢和戊糖磷酸途径的 2 个主要的酶——葡萄糖磷酸变位酶和转醛醇酶。在无氧条件下,乙醇产量增加和乙酸产量减少同时出现。代谢组学分析表明,基因修饰不但能加速微生物代谢率,也影响不同代谢物相对浓度。因此,推测分支酸途径应该另有一个支路。深入对镰刀菌产乙醇酶系及其作用机理,将为生物乙醇的现代化生产提供科学依据。

3.2 镰刀菌生产生物乙醇的一体化生物加工

一体化生物加工过程(Consolidated bioprocessing, CBP)是指在不添加任何外源水解酶的情况下,直接将木质纤维素原料一步转化为生物化学品的生物加工过程。木质纤维素生物质的一体化生物加工,为获得可再生能源(如生物乙醇)提供了一个可行而有效的途径。Anasontzis 等^[65]研究发现,在无氧和微厌氧状态下,尖孢镰刀菌既能够降解木质纤维素的生物质变成糖,也能发酵单糖生产酒精。然而,其应用中遇到的最大难题是木质纤维素对酶的抗性。为更好地理解其生理和代谢途径,解决抗性所产生的“瓶颈”,CBP 是极其重要的途径。真菌尖孢镰刀菌为木质纤维素生产乙醇的 CBP 提供了理想的菌种资源。CBP 通过基因工程,将水解酶的生成、木质纤维素的降解以及生物产品的生产等功能集成到一个生物体上。Ali 等^[66]认为就底物代谢而言,CBP 将水解和发酵 2 个步骤合二为一,能克服底物的抗性,减少木质纤维素代谢的繁琐步骤。在生物乙醇的工业生产上能发挥巨大潜能。

3.3 镰刀菌分解纤维素的过程中乙醇抑制机制初探

CBP 为木质纤维素生物加工生产可再生能源——生物乙醇提供了新途径。尖孢镰刀菌宿主“共糖

化”和发酵木质纤维素生产生物乙醇是其与生俱来的能力,因此是一种很有前途的生物催化剂。微生物分解纤维素的 CBP 过程中,受到的主要挑战是乙醇抑制。Hennessy 等^[67]利用根癌农杆菌介导转化(ATMT)产生尖孢镰刀菌表型多样性的方法,研究了在 CBP 过程中遇到的酒精耐受性问题,构建了基因突变转化子(N=1563)的随机突变文库,以分离酒精敏感或耐受表型来筛选酒精耐受性菌株,经三轮筛选,选择暴露于 6%乙醇和 0.75%正丁醇的转化生长,分别较野生型(WT)增加($\geq 11.74\%$)和下降($\leq 43.01\%$)。使用基本组分分析(PCA)评估了转基因个体和菌株表型多样性水平。在相对于野生型乙醇压力下,发现了一个菌株(Tr259)属于降低生长表型。研究发现其降低生长的原因是一个与假定的糖转运体(FOXG_09625)基因同源的编码区受到了破坏。定量 PCR (RT-PCR)显示,在乙醇介导的($P < 0.05$)压力下,与野生型相比,在 Tr259 内 FOXG_09625 发生了差异表达($P < 0.05$)。聚类分析表明,镰刀菌和其他丝状真菌内假定的糖转运体具有多种功能,酵母糖转运体部分形成相对保守的家族。该研究证实 ATMT 与表型筛选相结合对选择应对乙醇胁迫引起的遗传变异具有潜力。这是镰刀菌乙醇耐受性调查的第一步,继续深入研究将促进生物燃料的开发和利用。

4 结语与展望

1809 年 Link 以粉红镰刀菌(*F. roseum* Link)为模式种建立了镰刀菌属。目前国际上存在至少 10 种镰刀菌形态学分类系统。但是传统分类学研究方法存在局限性,必需结合分子标记和主效位点基因 rDNA-ITS、EF-1 α 延伸因子等分子手段,构建出一套完善的镰刀菌分类方法。镰刀菌能产生诸如纤维素酶、果胶酶、木聚糖酶等多种重要的酶类,在生物转化,特别是生物乙醇生产方面具有巨大潜力,有望解决能源危机问题。结合基因和蛋白质组学、基因和蛋白质工程手段,研究镰刀菌产生的各种相关酶类的催化特点和作用机制,继而对镰刀菌

产生的酶进行分子改造, 以获得诸如生物乙醇等生物燃料及其他生物产品, 是解决棘手的能源危机问题最好的途径。镰刀菌通过生物转化能生产重要药物或药物中间体, 在医药、食品、轻工等行业均具潜在价值。随着基因组学、蛋白质组学、结构组学等先进技术的迅速发展, 镰刀菌的分类鉴定、产酶和生物转化的研究将更加深入, 必将为高效开发和利用镰刀菌提供新途径。

REFERENCES

- [1] Sheng C, Ren J, Wang M, et al. Isolation of microorganisms for asymmetric reduction of prochiral α -aminoacetophenone and optimization of reaction conditions[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2012, 18(2): 281-286 (in Chinese)
生措, 任杰, 王敏, 等. 不对称还原 α -氨基苯乙酮菌种的筛选及转化条件优化[J]. 应用与环境生物学报, 2012, 18(2): 281-286
- [2] Cai WJ, Pan JY, Li JW. Biodegradation characteristics and mechanism of 2,4,6-trichlorophenol by *Fusarium* sp. in solution[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2016, 36(9): 3187-3192 (in Chinese)
蔡伟建, 潘俊雅, 李济吾. 镰刀菌(*Fusarium* sp.)对 2,4,6-三氯苯酚的降解特性及其机制[J]. 环境科学学报, 2016, 36(9): 3187-3192
- [3] Ai HX, Feng YK, Zhu CY, et al. Isolation and identification of a taxol-producing endophytic fungus LNUF014[J]. Journal of Microbiology, 2010, 30(4): 58-62 (in Chinese)
艾海新, 冯玉康, 朱春玉, 等. 1 株产紫杉醇内生真菌 LNUF 014 的鉴定及产物检测[J]. 微生物学杂志, 2010, 30(4): 58-62
- [4] Cheng L, Ma QM, Tao GJ, et al. Systemic identification of a paclitaxel-producing endofungus[J]. Industrial Microbiology, 2007, 37(4): 23-30 (in Chinese)
程龙, 马奇明, 陶冠军, 等. 一株产紫杉醇的丝状真菌的系统分类鉴定[J]. 工业微生物, 2007, 37(4): 23-30
- [5] Wollenweber HW, Reinking OA. Die Fusarien, ihre Beschreibung, Schadwirkung und Bekämpfung[M]. Berlin: Paul Parey, 1935
- [6] Yu DF. A preliminary list of fusaria in China[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 1955, 1(1): 1-18 (in Chinese)
俞大綬. 中国镰刀菌属(*Fusarium*)菌种的初步名录[J]. 植物病理学报, 1955, 1(1): 1-18
- [7] Shen RQ, Zhang P, Guo CJ, et al. Study on fungi belonging to *Fusarium* Link in Ningxia Hui Autonomous Region[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2012, 40(16): 8869-8870, 8875 (in Chinese)
沈瑞清, 张萍, 郭成瑾, 等. 宁夏镰刀菌属(*Fusarium* Link)真菌的研究[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(16): 8869-8870, 8875
- [8] Wang JH, Fang ZJ. Preliminary study on the numerical taxonomy of *Fusarium*[J]. Journal of Yunnan Agricultural University, 1993, 8(2): 100-104 (in Chinese)
王家和, 方子节. 镰刀菌数值分类初步研究[J]. 云南农业大学学报, 1993, 8(2): 100-104
- [9] Hong JP, Guo MX, He YC, et al. A newly recorded species of *Fusarium* in China[J]. Journal of Fungal Research, 2007, 5(3): 129-130, 133 (in Chinese)
洪坚平, 郭明霞, 贺运春, 等. 镰刀菌属一个中国新记录种[J]. 菌物研究, 2007, 5(3): 129-130, 133
- [10] Guadet J, Julien J, Lafay JF, et al. Phylogeny of some *Fusarium* species, as determined by large-subunit rRNA sequence comparison[J]. Molecular Biology and Evolution, 1989, 6(3): 227-242
- [11] Wang JM, Li RQ, Chang YD, et al. ISSR analysis of genetic diversity of *Fusarium oxysporum* and *F. redolens*[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2011, 41(4): 337-344 (in Chinese)
王建明, 李蕊倩, 畅引东, 等. 尖孢镰刀菌及芬芳镰刀菌遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 植物病理学报, 2011, 41(4): 337-344
- [12] Sampietro DA, Marín P, Iglesias J, et al. A molecular based strategy for rapid diagnosis of toxigenic *Fusarium* species associated to cereal grains from Argentina[J]. Fungal Biology, 2010, 114(1): 74-81
- [13] Yli-Mattila T, Paavanen-Huhtala S, Bulat SA, et al. Molecular, morphological and phylogenetic analysis of the *Fusarium avenaceum*/*F. arthrosporioides*/*F. tricinctum* species complex—a polyphasic approach[J]. Mycological Research, 2002, 106(6): 655-669
- [14] Wang ZN, Li J, Zhang YJ. rDNA ITS analysis of mycorrhizal fungi of *Cymbidium* plants[J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 2013, 41(4): 191-196 (in Chinese)
王芝娜, 李杰, 张银杰. 中国兰属植物菌根真菌的 rDNA ITS 分析[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2013, 41(4): 191-196
- [15] Xu J, Chen B, Lei XL, et al. Phylogenetic diversity analysis of cultured symbiotic fungi of *Galaxea fascicularis* L.[J]. Microbiology China, 2011, 38(8): 1193-1198 (in Chinese)
徐佳, 陈彬, 雷晓凌, 等. 丛生盔形珊瑚共附生可培养真菌多样性分析[J]. 微生物学通报, 2011, 38(8): 1193-1198
- [16] Du LH, He XY, Liu LP, et al. Fungal diversity of Huaidao No. 5 rice and the dominant culturable fungal strains during storage[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2016, 49(7): 1371-1381 (in Chinese)
都立辉, 和肖营, 刘凌平, 等. 淮稻 5 号的真菌多样性及其储藏过程中可培养的优势真菌[J]. 中国农业科学, 2016, 49(7): 1371-1381
- [17] Shu L, Yi LB, Zhang L, et al. Endophytic mycobiota in the rhizoma of *Curcuma longa*[J]. Chinese Journal of Microecology, 2010, 22(8): 690-692, 696 (in Chinese)
舒琅, 易浪波, 张丽, 等. 姜黄根茎内生真菌区系分析[J]. 中国微生态学杂志, 2010, 22(8): 690-692, 696
- [18] Ma Y, Wang LH, Li YM, et al. Community diversity of endophytic fungi of *Aloe barbadensis*[J]. Microbiology China, 2014, 41(11): 2235-2243 (in Chinese)
马瑜, 王莉衡, 李英梅, 等. 库拉索芦荟内生真菌菌群的多样性研究[J]. 微生物学通报, 2014, 41(11): 2235-2243
- [19] Liu LB, Zhang Y, Sun ZH, et al. Isolation and PCR-DGGE studies of the fungal pathogens from pastures with high incidence of sheep facial eczema on the northern slope of Tianshan mountains[J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2014, 45(10): 1718-1725 (in Chinese)

- 刘良波, 张豫, 孙志华, 等. 天山北坡绵羊面部湿疹高发草场病原真菌分离及 PCR-DGGE 分析[J]. 畜牧兽医学报, 2014, 45(10): 1718-1725
- [20] Wang XH, Zhu Z, Ma XL, et al. Identification and characterization of pathogens causing fusarium wilt of watermelon from field greenhouses[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2012, 35(6): 61-67 (in Chinese)
王小慧, 朱震, 马雪莲, 等. 田间大棚西瓜枯萎病原菌的分离与鉴定[J]. 南京农业大学学报, 2012, 35(6): 61-67
- [21] Zhao YH, Wang XM, Wang H, et al. Isolation and identification of two endophytic fungus strains from *Salicornia bigelovii*[J]. Food Science, 2013, 34(15): 148-153 (in Chinese)
赵育卉, 王晓敏, 王惠, 等. 两株盐生海芦笋内生真菌的分离与鉴定[J]. 食品科学, 2013, 34(15): 148-153
- [22] Pei DL, Liu CY, Wu JY. The identification of pathogen *Fusarium verticillioides* causing maize ear rot in Henan[J]. Journal of Maize Sciences, 2011, 19(1): 136-138,142 (in Chinese)
裴冬丽, 刘春元, 吴建宇. 河南省玉米穗粒腐病原串珠镰刀菌鉴定[J]. 玉米科学, 2011, 19(1): 136-138,142
- [23] Ayob FW, Simarani K. Endophytic filamentous fungi from a *Catharanthus roseus*: identification and its hydrolytic enzymes[J]. Saudi Pharmaceutical Journal, 2016, 24(3): 273-278
- [24] Yli-Mattila T, Paavanen-Huhtala S, Parikka P, et al. Molecular and morphological diversity of *Fusarium* species in Finland and north-western Russia[J]. European Journal of Plant Pathology, 2004, 110(5/6): 573-585
- [25] Abe CAL, Faria CB, de Castro FF, et al. Fungi isolated from maize (*Zea mays* L.) grains and production of associated enzyme activities[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2015, 16(7): 15328-15346
- [26] Rahjoo V, Zad J, Javan-Nikkhah M, et al. Morphological and molecular identification of *Fusarium* isolated from maize ears in Iran[J]. Journal of Plant Pathology, 2008, 90(3): 463-468
- [27] Li JH, Wang D, Chai ZX, et al. Isolation and identification of the dominant pathogens causing potato *Fusarium* dry rot in Gansu Province[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2011, 41(5): 456-463 (in Chinese)
李金花, 王蒂, 柴兆祥, 等. 甘肃省马铃薯镰刀菌干腐病优势病原的分离鉴定[J]. 植物病理学报, 2011, 41(5): 456-463
- [28] Zhang XM, Li DD, Wang LS, et al. Molecular engineering of cellulase catalytic domain based on glycoside hydrolase family[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2013, 29(4): 422-433 (in Chinese)
张小梅, 李单单, 王禄山, 等. 纤维素酶家族及其催化结构域分子改造的新进展[J]. 生物工程学报, 2013, 29(4): 422-433
- [29] Olajuyigbe FM, Nlekerem CM, Ogunyewo OA. Production and characterization of highly thermostable β -glucosidase during the biodegradation of methyl cellulose by *Fusarium oxysporum*[J]. Biochemistry Research International, 2016, 2016: 3978124
- [30] Han HB, Cheng SM, Liu JF, et al. Screening and identification of cellulase-producing strain of *Fusarium* sp. and its enzymological properties[J]. Modern Chemical Industry, 2014, 34(7): 61-65 (in Chinese)
韩寒冰, 程水明, 刘杰凤, 等. 一株产纤维素酶镰刀菌的筛选、鉴定与酶学性质[J]. 现代化工, 2014, 34(7): 61-65
- [31] Lu C, Chen JN, Wang YQ, et al. Screening and identification of a cellulase-producing fungus and optimization of its fermentation condition[J]. Journal of Central South University of Forestry & Technology, 2012, 32(6): 118-122,127 (in Chinese)
陆晨, 陈介南, 王义强, 等. 一株产纤维素酶真菌的筛选及产酶条件优化[J]. 中南林业科技大学学报, 2012, 32(6): 118-122,127
- [32] Zheng JH, Yu JP. Fermentation procedure of cellulase from *Fusarium* sp.[J]. Journal of Mountain Agriculture and Biology, 2010, 29(5): 409-414 (in Chinese)
郑金花, 郁建平. 镰刀菌产纤维素酶液体发酵工艺研究[J]. 山地农业生物学报, 2010, 29(5): 409-414
- [33] Fu XC, Yuan L, Guo JJ, et al. Rapid screening of cellulose degradation Fungus from paddy soil[J]. Jiangxi Science, 2015, 33(6): 822-825 (in Chinese)
傅筱冲, 袁林, 郭建军, 等. 从稻田土壤中快速筛选分离纤维素降解真菌[J]. 江西科学, 2015, 33(6): 822-825
- [34] Chepchak TP, Kurchenko IN, Iur'eva EM. Biodegradation of agricultural plant residues by *Fusarium oxysporum* strains[J]. Mikrobiologichnyi Zhurnal, 2014, 76(4): 41-46
- [35] Shang TT, Li QH, Deng SG. Screening and isolation of highly efficient cellulose-degrading Microorganisms and construction of complex Microbial system[J]. Agricultural Science & Technology, 2015, 16(4): 639-644,652
- [36] de Almeida MN, Falkoski DL, Guimarães VM, et al. Characteristics of free endoglucanase and glycosidases multienzyme complex from *Fusarium verticillioides*[J]. Bioresource Technology, 2013, 143: 413-422
- [37] Zheng JH, Yu JP. Separation and purification of cellulase in culture medium of *Fusarium*[J]. Chemistry and Bioengineering, 2010, 27(12): 65-68 (in Chinese)
郑金花, 郁建平. 镰刀菌发酵培养液中纤维素酶的分离纯化[J]. 化学与生物工程, 2010, 27(12): 65-68
- [38] Tian F, Xie ZL, Guo J, et al. Purification, identification and characterization of an endoglucanase Egn20 from *Fusarium* sp. Q7-31T[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2015, 55(8): 1042-1049 (in Chinese)
田飞, 谢占玲, 郭璟, 等. 镰刀菌 Q7-31T 内切葡聚糖酶 Egn20 的分离纯化鉴定及酶学特性[J]. 微生物学报, 2015, 55(8): 1042-1049
- [39] Chang XY, Xie ZL, Zhang FM, et al. Purification and characterization of endoglucanase Egn21 from *Fusarium* sp. Q7-31T[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2017, 57(1): 33-42 (in Chinese)
常鑫园, 谢占玲, 张凤梅, 等. 镰刀菌 Q7-31T 内切葡聚糖酶 Egn21 的分离纯化及酶学性质[J]. 微生物学报, 2017, 57(1): 33-42
- [40] Zhao ZP, Ramachandran P, Kim TS, et al. Characterization of an acid-tolerant β -1,4-glucosidase from *Fusarium oxysporum* and its potential as an animal feed additive[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(23): 10003-10011
- [41] Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, et al. The carbohydrate-active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics[J]. Nucleic Acids Research, 2009, 37(D1): D233-D238
- [42] Chang HX, Yendrek CR, Caetano-Anolles G, et al. Genomic characterization of plant cell wall degrading enzymes and *in silico*

- analysis of xylanases and polygalacturonases of *Fusarium virguliforme*[J]. BMC Microbiology, 2016, 16: 147
- [43] Xu JX, Wang XF, Hu L, et al. A novel ionic liquid-tolerant *Fusarium oxysporum* BN secreting ionic liquid-stable cellulase: consolidated bioprocessing of pretreated lignocellulose containing residual ionic liquid[J]. Bioresource Technology, 2015, 181: 18-25
- [44] Li WQ, Wu FF, Li HQ, et al. Effect of metal ions on pectic enzyme activity in *Fusarium oxysporum* fermentation[J]. Journal of Shaoyang University (Natural Science Edition), 2015, 12(4): 50-56 (in Chinese)
李文强, 吴菲菲, 李化强, 等. 金属离子对尖孢镰刀菌发酵液中果胶酶活性的影响[J]. 邵阳学院学报: 自然科学版, 2015, 12(4): 50-56
- [45] Yadav S, Dubey AK, Anand G, et al. Purification and biochemical characterization of an alkaline pectin lyase from *Fusarium decemcellulare* MTCC 2079 suitable for *Crotalaria juncea* fiber retting[J]. Journal of Basic Microbiology, 2014, 54(S1): S161-S169
- [46] Gonçalves HB, Jorge JA, Oliveira WP, et al. Extracellular β -fructofuranosidase from *Fusarium graminearum*: stability of the spray-dried enzyme in the presence of different carbohydrates[J]. Journal of Microencapsulation, 2013, 30(7): 624-631
- [47] Guo J, Xie ZL. Overview of fusarium species and Xylanase[J]. Chinese Qinghai Journal of Animal and Veterinary Sciences, 2015, 45(4): 51-54 (in Chinese)
郭璟, 谢占玲. 镰孢菌属及木聚糖酶的研究概述[J]. 青海畜牧兽医杂志, 2015, 45(4): 51-54
- [48] Qie WN, Zhang LY, He J, et al. Research progress on Xylanase production by micro-organisms[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2014, 42(7): 387-391 (in Chinese)
郗卫那, 张兰英, 何健, 等. 微生物产木聚糖酶研究进展[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(7): 387-391
- [49] Ramanjaneyulu G, Reddy BR. Optimization of xylanase production through response surface methodology by *Fusarium* sp. BVKT R2 isolated from forest soil and its application in saccharification[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 1450
- [50] Alvarez-Navarrete M, Reyna López GE, Flores-García A, et al. Selection and molecular identification of fungal isolates that produce xylanolytic enzymes[J]. Genetics and Molecular Research, 2015, 14(3): 8100-8116
- [51] de Almeida MN, Guimarães VM, Falkoski DL, et al. Optimization of endoglucanase and xylanase activities from *Fusarium verticillioides* for simultaneous saccharification and fermentation of sugarcane bagasse[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2014, 172(3): 1332-1346
- [52] Obruca S, Marova I, Matouskova P, et al. Production of lignocellulose-degrading enzymes employing *Fusarium solani* F-552[J]. Folia Microbiologica, 2012, 57(3): 221-227
- [53] Huang YH, Busk PK, Lange L. Cellulose and hemicellulose-degrading enzymes in *Fusarium commune* transcriptome and functional characterization of three identified xylanases[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2015, 73-74: 9-19
- [54] Zhao LZ, Xie ZL, Zhao P, et al. Purification, identification and enzymatic characteristics of a new xylanase Xyn9 from *Fusarium* sp. Q7-31[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2015, 43(5): 42-45 (in Chinese)
赵联正, 谢占玲, 赵朋, 等. 一种新的镰刀菌 Q7-31 木聚糖酶 Xyn9 的分离纯化鉴定及酶学特性[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(5): 42-45
- [55] Gómez S, Payne AM, Savko M, et al. Structural and functional characterization of a highly stable endo- β -1,4-xylanase from *Fusarium oxysporum* and its development as an efficient immobilized biocatalyst[J]. Biotechnology for Biofuels, 2016, 9: 191
- [56] Klaubauf S, Narang HM, Post H, et al. Similar is not the same: differences in the function of the (hemi-) cellulolytic regulator XlnR (Xlr1/Xyr1) in filamentous fungi[J]. Fungal Genetics and Biology, 2014, 72: 73-81
- [57] Wojtasik W, Kulma A, Dymińska L, et al. Evaluation of the significance of cell wall polymers in flax infected with a pathogenic strain of *Fusarium oxysporum*[J]. BMC Plant Biology, 2016, 16: 75
- [58] Kumar Y, Zhang LM, Panigrahi P, et al. *Fusarium oxysporum* mediates systems metabolic reprogramming of chickpea roots as revealed by a combination of proteomics and metabolomics[J]. Plant Biotechnology Journal, 2016, 14(7): 1589-1603
- [59] Ravalason H, Grisel S, Chevret D, et al. *Fusarium verticillioides* secretome as a source of auxiliary enzymes to enhance saccharification of wheat straw[J]. Bioresource Technology, 2012, 114: 589-596
- [60] Liu NN, Fan FY, Qiu DW, et al. The transcription cofactor FgSwi6 plays a role in growth and development, carbendazim sensitivity, cellulose utilization, lithium tolerance, deoxynivalenol production and virulence in the filamentous fungus *Fusarium graminearum*[J]. Fungal Genetics and Biology, 2013, 58-59: 42-52
- [61] de Almeida MN, Guimarães VM, Falkoski DL, et al. Direct ethanol production from glucose, xylose and sugarcane bagasse by the corn endophytic fungi *Fusarium verticillioides* and *Acremonium zeae*[J]. Journal of Biotechnology, 2013, 168(1): 71-77
- [62] Wang BL, Feng D, Liang XH, et al. Identification of strain *Fusarium* sp. ZW-21 and bioethanol production by corn straw hydrolysate fermentation[J]. Shandong Science, 2015, 28(6): 65-72 (in Chinese)
王丙莲, 冯东, 梁晓辉, 等. 镰刀菌(*Fusarium* sp.) ZW-21 的鉴定及其利用玉米秸秆水解液发酵产乙醇研究[J]. 山东科学, 2015, 28(6): 65-72
- [63] Fan JX, Huang XM, Zhang BX. The characteristic analysis of aldehyde dehydrogenase gens from *Fusarium oxysporum*[J]. Genomics and Applied Biology, 2014, 33(2): 260-265 (in Chinese)
范金霞, 黄晓梅, 张炳秀. 尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)乙醛脱氢酶基因的特征分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2014, 33(2): 260-265
- [64] Anasontzis GE, Kourtoğlu E, Villas-Boas SG, et al. Metabolic engineering of *Fusarium oxysporum* to improve its ethanol-producing capability[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 632
- [65] Anasontzis GE, Christakopoulos P. Challenges in ethanol production with *Fusarium oxysporum* through consolidated bioprocessing[J]. Bioengineered, 2014, 5(6): 393-395
- [66] Ali SS, Nugent B, Mullins E, et al. Fungal-mediated consolidated bioprocessing: the potential of *Fusarium oxysporum* for the lignocellulosic ethanol industry[J]. AMB Express, 2016, 6(1): 13
- [67] Hennessy RC, Doohan F, Mullins E. Generating phenotypic diversity in a fungal biocatalyst to investigate alcohol stress tolerance encountered during microbial cellulosic biofuel production[J]. PLoS One, 2013, 8(10): e77501