

## 研究论文

## 莜麦类甜蛋白Permatin抑制木霉菌活性的机制研究

范韶华<sup>1#</sup>, 焦慧娟<sup>2#</sup>, 刘健<sup>2</sup>, 韩德平<sup>2</sup>, 石亚伟<sup>2\*</sup><sup>1</sup>太原师范学院生物科学与技术学院, 太原 030619; <sup>2</sup>山西大学生物技术研究所,

教育部化学生物学与分子工程重点实验室, 太原 030006)

**摘要:** 类甜蛋白(thaumatin-like proteins, TLPs)是一个高度复杂的蛋白质家族, 与植物、动物和真菌的宿主防御和发育过程有关。TLPs已在多种植物中被发现, 具有广谱抗真菌活性。近年来, 植物来源的抗真菌蛋白在植物抗病原菌中具有广泛的应用前景, 然而关于莜麦来源的抗真菌蛋白研究比较少。本研究从莜麦中分离纯化得到莜麦类甜蛋白Permatin, 通过带毒平板法测定了Permatin蛋白对木霉菌的半抑制浓度; 然后利用Delta Vision显微镜观察了Permatin蛋白对木霉菌孢子萌发及菌丝生长的影响; 进一步结合碘化丙啶(propidium Iodine, PI)染色研究Permatin蛋白对木霉菌菌丝及孢子细胞膜通透性的影响。结果显示, Permatin蛋白对木霉菌的半抑制浓度为0.73  $\mu\text{mol/L}$ , 可以显著抑制木霉菌孢子的萌发及菌丝的生长, 并且能够破坏真菌菌丝及孢子细胞膜的通透性。本研究为莜麦Permatin蛋白在农业领域的应用提供了理论基础。

**关键词:** Permatin; 孢子萌发; 菌丝生长; 细胞膜通透性

## Mechanism on the inhibitory activity of *Avena* thaumatin-like proteins Permatin against *Trichoderma*

FAN Shaohua<sup>1#</sup>, JIAO Huijuan<sup>2#</sup>, LIU Jian<sup>2</sup>, HAN Deping<sup>2</sup>, SHI Yawei<sup>2\*</sup><sup>1</sup>College of Biological Science and Technology, Taiyuan Normal University, Taiyuan 030002, China;<sup>2</sup>Institute of Biotechnology, Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering of Ministry of Education, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

**Abstract:** Thaumatin-like proteins (TLPs) are a highly complex protein family associated with host defense and development processes in plants, animals and fungi. TLPs have been found in a variety of plants with broad-spectrum anti-fungal activity. In recent years, the anti-fungal proteins derived from plants have a wide range of application prospects in plant resistance to pathogenic bacteria. However, there are relatively few studies on anti-fungal protein derived from *Avena*. In this study, the Permatin was isolated and purified from *Avena*. The half inhibitory concentration of Permatin against *Trichoderma* was determined by Radial Growth Assay. Then, the effect of Permatin on spore germination and mycelia growth of *Trichoderma* was observed by Delta Vision microscope. The effect of Permatin on the permeability of *Trichoderma* mycelia and spores cell membrane was further investigated by combining with Propidium Iodide Staining. The results showed that the half inhibitory concentration of Permatin on *Trichoderma* was 0.73  $\mu\text{mol/L}$ , which could significantly inhibit

收稿日期: 2023-26-08

基金项目: 山西省基础研究计划自由探索类项目青年基金项目(202203021222246)

#共同第一作者: 范韶华, E-mail: 1002997200@qq.com; 焦慧娟, E-mail: sk071jiaohuijuan@126.com

\*通信作者: E-mail: yaweishi@sxu.edu.cn

the spores germination and mycelium growth of *Trichoderma*, and could also destroy the permeability of fungal mycelium and spore cell membranes. This study provides a theoretical basis for the application of Permatin from *Avena* in agriculture.

**Key Words:** Permatin; spore germination; hyphae growth; membrane permeability

植物在生长过程中面临多种环境因子的生存胁迫, 主要包括病原体(细菌、真菌和线虫)的感染、干旱、高温、盐度和氧化胁迫等。因此, 植物在长期的进化历程中会产生不同的防御策略来对抗这些因子。其中, 由植物防御相关激素基因编码的病程相关蛋白就是其中一种<sup>[1]</sup>, 根据其序列特征、生理学功能、血清学、免疫学或酶学特性, 病程相关蛋白可被分为17个蛋白家族<sup>[2]</sup>, 其中病程相关蛋白家族蛋白5与西非草本植物 *Thaumatococcus danielli* 分离纯化得到的甜蛋白具有高度的同源性, 且结构相似, 因此病程相关蛋白家族蛋白5也被称为类甜蛋白(thaumatin-like proteins, TLPs)<sup>[3]</sup>。

TLPs也是食物过敏原的一种<sup>[4]</sup>, 在苹果<sup>[5]</sup>、葡萄<sup>[6]</sup>、樱桃<sup>[7,8]</sup>、甜椒<sup>[9]</sup>、猕猴桃<sup>[10]</sup>、桃子<sup>[11]</sup>、香蕉<sup>[12]</sup>等水果中均可表达。此外, 在香蕉<sup>[13]</sup>、桃子<sup>[11]</sup>、猕猴桃<sup>[14]</sup>和葡萄<sup>[15]</sup>中分离得到的TLPs还具有抗真菌活性。从荔枝果实中提取得到的TLPs具有促炎症作用<sup>[16]</sup>。近年来, 在转基因植物中过表达TLPs已被证实可以增强宿主对病原体的抵抗力。例如, 在花生、水稻或棉花中过表达TLPs基因可增强植物对灰葡萄孢菌、尖孢镰刀菌、番茄枯萎菌<sup>[17]</sup>、交链孢霉<sup>[18]</sup>和大丽轮枝菌<sup>[19]</sup>的抵抗力; 在转基因土豆中过表达茶树TLPs基因可增强其对疫霉的抗病力<sup>[20]</sup>。以上研究表明, TLPs在植物分子育种中具有很好的应用前景。

TLPs基因广泛表达于薯蓣、单子叶植物、裸子植物、苔藓植物和藻类等180多种植物中<sup>[21]</sup>。其中部分TLPs蛋白家族成员对立枯丝核菌、链格孢菌、禾谷镰刀菌、茄病镰刀菌、轮枝菌和疫霉菌具有较强的抗真菌活性<sup>[22-24]</sup>。

TLPs还参与宿主对生物胁迫的反应过程, Koiwa等<sup>[25]</sup>研究发现, TLPs的抗真菌效果与TLP亚型的组合和真菌种类有关。研究表明, TLPs的抗真菌活性与 $\beta$ -1,3-葡聚糖(病原真菌的

细胞壁成分)的结合能力有关<sup>[26]</sup>。从大豆皮里提取得到的TLPs中的Asp和Glu残基通过与线性 $\beta$ -1,3-葡聚糖相互作用可以逆转或保留葡聚糖水解作用<sup>[27]</sup>。然而, 莨麦TLPs的抗真菌机制还没有报道。本文主要研究了Permatin蛋白处理前后木霉菌的生理变化, 揭示了Permatin蛋白抗真菌的作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株及主要试剂

木霉菌(*Trichoderma* spp)为本实验室保存; 天然Permatin蛋白和NusA-Permatin重组蛋白样品为本实验室通过大肠杆菌原核表达纯化所得。

### 1.2 主要仪器

本实验使用的主要仪器有: 低速离心机(艾本德公司)、去卷积活细胞工作站(GE公司)、生化恒温培养箱(上海知楚仪器有限公司)。

### 1.3 Permatin蛋白对木霉菌半抑制浓度 $IC_{50}$ 的测定

通过带毒平板法获得天然Permatin蛋白对木霉菌的半抑制浓度(half maximal inhibitory concentration,  $IC_{50}$ )。首先, 把不同容量的蛋白质样本与融化的马铃薯葡萄糖琼脂培养基(温度40~42 °C)混合均匀, 然后将融化的培养基倒入平板中, 制作带毒平板。然后, 把直径5 mm的木霉菌菌片接种到带毒平板中, 在27 °C恒温培养箱中培养48 h, 并对菌丝生长情况进行观察和记录。在对照组中菌丝生长到距离培养皿边缘0.5 cm时, 计量菌落直径, 然后取3次测定的平均值。菌落扩散直径(mm)=平均测得的菌落的扩散直径(mm)-5(菌片直径mm)。用下述公式计算抑制率: 相对抑制率=(未处理组菌落扩散直径-处理组菌落扩散直径)/未处理组菌落扩散直径。通过数据分析和计算, 得出反映抑制活性的回归方程( $y=ax+b$ ), 从而求得半抑制浓度( $IC_{50}$ )。

### 1.4 Permatin蛋白对木霉菌孢子萌发的影响

在27℃恒温条件下培育出长势良好的木霉菌,将ddH<sub>2</sub>O加入马铃薯葡萄糖琼脂培养板中,用移液枪反复吹打绿色木霉菌孢子。接着,收集悬浮的孢子并放入1.5 mL离心管中,再用蒸馏水培养2~3周。取出4个无菌离心管,每个管中分别加入浓度为 $1 \times 10^6$ 个/mL孢子悬液50  $\mu$ L,再各自加入天然Permatin蛋白、NusA蛋白和NusA-Permatin蛋白,保证其最终浓度为10  $\mu$ mol/L,最后加入足量的无菌水,直到每个管的最后体积都为100  $\mu$ L,然后将其置于27℃恒温培养箱中培育24 h,之后从各管取出10  $\mu$ L悬浮液制片。运用Delta Vision显微镜观察孢子萌发的情况,并统计孢子的萌发数量,最后制作孢子萌发抑制柱形图。

### 1.5 Permatin蛋白对木霉菌菌丝生长的影响

取4个已经灭菌的离心管,向每个无菌离心管中加入浓度为 $1 \times 10^4$ 个/mL孢子悬液100  $\mu$ L,置于27℃恒温培养箱中培育24 h。然后分别向其中加入适量的天然Permatin蛋白、NusA蛋白、NusA-Permatin蛋白,保证其终浓度为10  $\mu$ mol/L,再加水直到终体积达到200  $\mu$ L。在27℃恒温培养箱中培育12 h后,分别取10  $\mu$ L悬浮液制片。最后在Delta Vision显微镜下观察木霉菌菌丝的形态。

### 1.6 Permatin蛋白对木霉菌孢子和菌丝体通透性的影响

向4个无菌离心管逐一加入浓度 $1 \times 10^6$ 个/mL孢子悬液各50  $\mu$ L,接着分别加入Permatin蛋白、NusA蛋白、NusA-Permatin蛋白,使其最后浓度达到10  $\mu$ mol/L。接下来在27℃恒温培养箱中培养5 h,然后以5 000 r/min的速度进行离心,收集菌体,并用1 mL的磷酸盐缓冲液洗涤3次。随后加入终浓度为25  $\mu$ g/mL的核染料(PI),并在不透光的37℃环境下孵育15 min,然后用1 mL的磷酸盐缓冲液洗涤3次,分别取出10  $\mu$ L制片。PI是一种溴化乙啶的类似物,能穿过损伤的细胞膜对细胞中的遗传物质DNA进行染色。利用Delta Vision显微镜观察和分析孢子细胞核的染色情况。

将50  $\mu$ L的孢子悬液(浓度为 $1 \times 10^5$ 个/mL孢子)分别加入4个无菌离心管中,然后27℃恒温培养箱中培育24 h。接下来,分别向离心管中添加适量的天然Permatin蛋白、NusA蛋白、NusA-Permatin蛋

白,确保其最终浓度为10  $\mu$ mol/L,27℃恒温培养箱培育5 h。5 000 r/min离心收菌,用1 mL磷酸盐缓冲液洗涤3次,加入PI(浓度为25  $\mu$ g/mL)于37℃避光孵育15 min,然后用1 mL磷酸盐缓冲液洗涤3次,从每个样品中取出10  $\mu$ L制片,通过Delta Vision显微镜观察木霉菌菌丝体细胞核的染色情况。

### 1.7 统计学分析

所有数据都来源于3次重复独立实验的平均值 $\pm$ 标准偏差。数据的统计学分析采用ANOVA和Student's *t*-tests分析。Origin软件用于分析所有实验数据。 $P < 0.05$ 被认为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Permatin蛋白对木霉菌的IC<sub>50</sub>测定

经过48 h的恒温(27℃)培养,木霉菌菌丝很快扩散,对照组的菌丝开始蔓延生长至平板边缘。大部分菌丝为基内生菌丝,个别菌丝形成了柔毛状的气生菌丝。菌落背面颜色以无色开始,并从外侧往内侧呈绿色及黄绿色渐变。平展产孢区形成的分生孢子,最初为白色,但随后转变为绿色。结果表明,天然Permatin蛋白的浓度与其对木霉菌菌丝的生长抑制呈正相关,浓度越高,其抑制率越高(图1)。在处理实验数据时,我们以Permatin蛋白样本浓度作为X轴,相对抑制率作为Y轴<sup>[28]</sup>,得出抑制活性回归方程 $y = 64.057x + 2.4665$  ( $R^2 = 0.9951$ )(图1)。经过计算,我们得到天然Permatin蛋白对木霉菌的IC<sub>50</sub>值为0.73  $\mu$ mol/L。

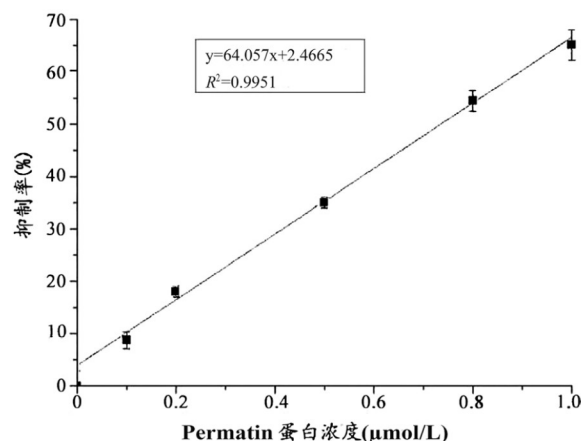


图1 天然Permatin蛋白对木霉菌抑制性IC<sub>50</sub>值的测定

## 2.2 Permatin蛋白抑制木霉菌孢子的萌发

在27℃恒温培育环境中, 对照组的木霉菌孢子能够正常萌发, 并长出健壮饱满的菌丝体; 但在Permatin蛋白、NusA-Permatin蛋白处理的实验组中, 大部分孢子依旧停留在休眠状态(图2A)。我们通过统计木霉菌孢子萌发数量, 计算出了木霉菌孢子的相对萌发率。结果表明, 天然Permatin蛋白和NusA-Permatin蛋白能够显著抑制木霉菌孢子的萌发(图2B)。

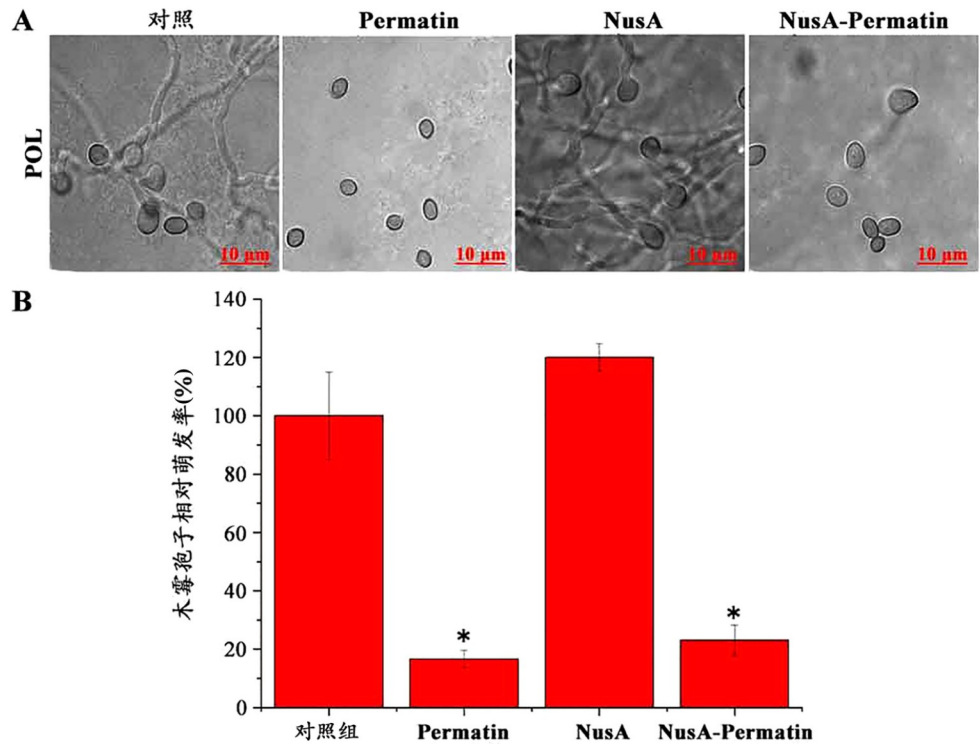
## 2.3 Permatin蛋白导致木霉菌菌丝体膜壁破裂

对照组中, 木霉菌菌丝体形态正常, 菌丝体粗细均匀, 健壮饱满, 分枝较多; 然而, 在天然Permatin和NusA-Permatin蛋白处理组中, 我们可以

观察到木霉菌菌丝体遭受了严重的损坏和崩解, 仅能观察到少量的孢子和菌丝体细胞碎片(图3)。该结果表明, 天然Permatin蛋白和NusA-Permatin蛋白对木霉菌菌丝体具有强大的破坏能力, 能够破碎木霉菌丝体的壁膜, 进而导致木霉菌菌丝细胞死亡。

## 2.4 Permatin蛋白增加木霉菌孢子、菌丝细胞膜通透性

为了进一步揭示Permatin蛋白如何抑制木霉菌孢子的萌发, 我们采用PI染色检测了Permatin蛋白对木霉菌孢子和菌丝体细胞膜通透性的影响。PI染色结果表明, 天然Permatin蛋白和NusA-Permatin蛋白能够破坏木霉菌孢子细胞膜(图4)和菌丝体细胞膜(图5)的完整性, 增加膜通透性, 引发孢子和菌



A: Delta Vision下观察Permatin蛋白对木霉菌孢子萌发的影响; B: Permatin蛋白对木霉菌孢子萌发的影响的数据统计图。\* $P<0.05$ , 与对照组比较

图2 Permatin蛋白对木霉菌孢子萌发的影响

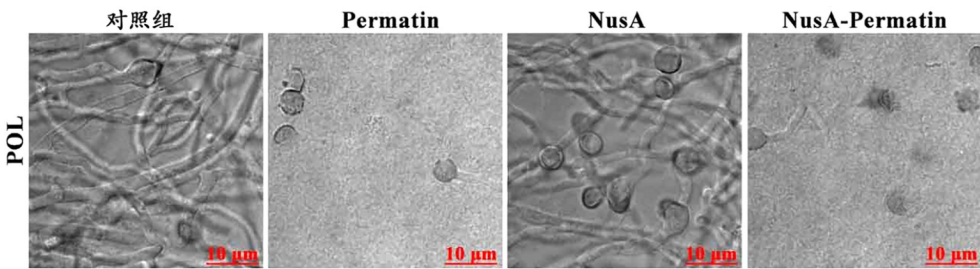


图3 Delta Vision下观察Permatin蛋白对木霉菌菌丝形态的影响

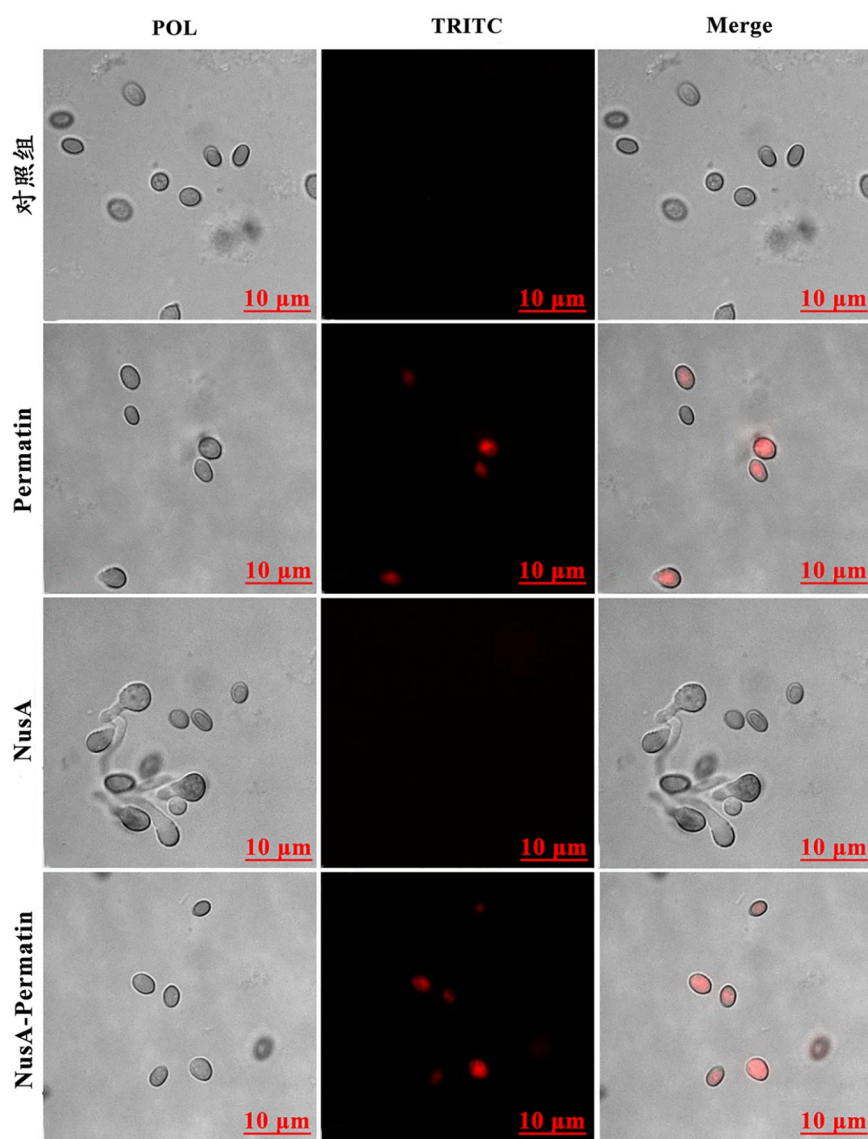


图4 Permatin蛋白对木霉菌孢子通透性的影响

丝体细胞内部物质外泄，进而抑制孢子萌发，造成木霉菌菌丝体死亡。

### 3 讨论

真菌传染病是全球人类健康最致命的威胁之一。全球每年有近200万人死于真菌感染，死亡人数随着免疫功能低下人群的增加而持续上升<sup>[29,30]</sup>。因此，研发抗真菌蛋白对于防治真菌感染传染病具有重大意义。越来越多的具有抗真菌活性的TLPs成为抗真菌药物研发的首选。从罗勒中分离的TLPs能够显著抑制酿酒酵母、毕赤酵母和白色念珠菌的生长<sup>[31]</sup>；从芭蕉中纯化的TLPs对尖孢镰

刀菌、黑曲霉菌、烟曲霉菌和绿色木霉菌的生长具有抑制作用<sup>[13]</sup>；从玉米种子中分离的TLPs对不同植物病原真菌的生长和繁殖具有显著抑制作用<sup>[32]</sup>；从大麦中分离的与TLPs高度同源的蛋白R和S对绿色木霉菌和白色念珠菌生长具有抑制作用<sup>[33]</sup>。本研究证明，从莠麦中提取纯化的TLPs-Permatin蛋白能够显著抑制木霉菌的生长，为Permatin蛋白在防治木霉菌感染引起的真菌传染病方面的研究提供了理论基础。接下来，我们将通过检测Permatin蛋白对其他真菌(如金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌等)活性的影响，进一步验证Permatin的抗真菌活性。

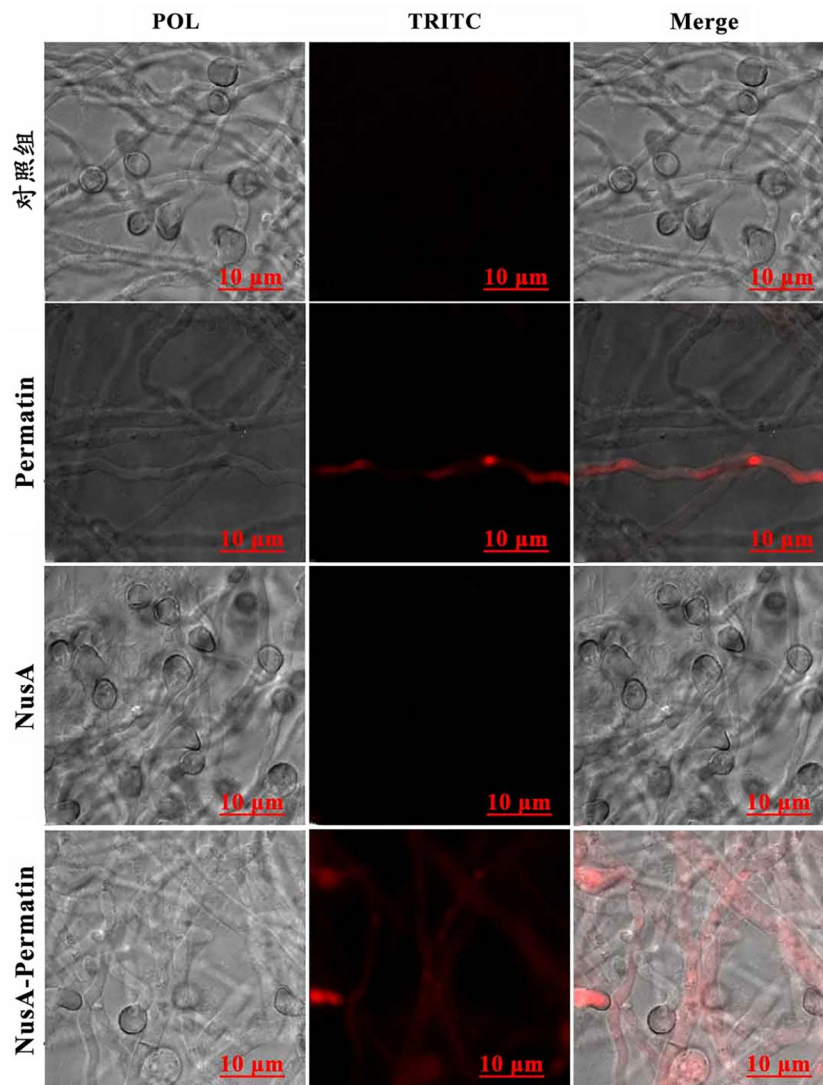


图5 Permatin蛋白对木霉菌菌丝体通透性的影响

植物产生的抗真菌蛋白和肽是植物抵抗病原菌感染和胁迫的重要防御机制。真菌污染高等植物,特别是农作物,不仅降低了它们的营养价值,而且可能产生有毒的代谢物(真菌毒素),进而引起食品安全问题。TLPs转基因作物明显提高了植物对生物胁迫和非生物胁迫的抵御能力。将从罗勒中分离得到的TLPs在拟南芥中过表达,增强了拟南芥对核盘菌和灰葡萄孢菌的抗性以及对干旱和高盐度的耐受性<sup>[34]</sup>。从大麦中分离的TLPs通过农杆菌转入油菜中,油菜对土壤病原体根肿病菌的抗性增强<sup>[35]</sup>。过表达TLPs的转基因烟草植物对大丽轮枝杆菌和尖刀镰胞杆菌具有较强的抗性。除此之外,这些植物对盐度和干旱也有较强的耐

受性<sup>[36]</sup>。从山茶中分离的TLPs在马铃薯中过表达增强了马铃薯对壳孢菌和马铃薯晚疫病菌的抗性<sup>[37]</sup>。我们的前期研究表明,苡麦Permatin蛋白能够抑制尖刀镰孢菌菌丝生长<sup>[38]</sup>。本研究中,我们发现,Permatin蛋白能够明显抑制木霉菌的孢子萌发和菌丝体生长,进而抑制木霉菌的活性。该研究进一步验证了苡麦Permatin蛋白的抗真菌活性,提示我们可以将Permatin基因在一些农作物中过表达,进而增强该作物的抗尖刀镰胞杆菌和木霉菌活性,为该蛋白在农业领域的应用提供了新的视角。

食用菌和药用菌已经成为一类非常重要的作物,在许多国家进行商业种植,但由于绿霉菌病

的增加对其产量和数量构成了严重威胁<sup>[39]</sup>。绿霉菌病是食用菌和药用菌栽培过程中经常发生的一种常见疾病,症状是表面有绿色、绒毛状菌丝。木霉菌是绿霉菌病的病原体,绿霉菌病主要由一组广泛存在于土壤、健康植物、木材或其他真菌中的腐生真菌引起,它们被广泛用于控制真菌病原体,生产抗生素、酶和生物燃料<sup>[40,41]</sup>,以及水和土壤中的生物修复外源性化合物<sup>[42,43]</sup>。因此,探索抑制木霉菌活性的物质对食用菌和药用菌的栽培及生产尤为重要。本研究结果证实,Permatin蛋白对木霉菌活性抑制的 $IC_{50}$ 值为 $0.73\ \mu\text{mol/L}$ ,但该结果与从植物中获得的天然物质对常见致病菌的 $IC_{50}$ 值比较要低很多<sup>[38]</sup>。本结果说明Permatin蛋白可能是防治木霉菌引起的食用菌和真菌感染的最佳生物药剂。

目前,关于TLPs详细的抑菌机制尚不完全清楚。根据文献报道,TLPs的抑菌机制主要有以下三种假说:(1) TLPs的抗真菌作用是由于抑制菌丝生长<sup>[44]</sup>和孢子萌发或孢子萌发活力<sup>[45]</sup>;(2) TLPs通过信号转导途径削弱防御性细胞性屏障并增加其细胞毒性发挥抑菌功效<sup>[46]</sup>;(3) TLPs通过与细胞表面受体结合进而激活单磷酸腺苷活化蛋白激酶(AMPK),进而导致真菌细胞程序性死亡<sup>[47]</sup>。本研究表明,Permatin蛋白通过破坏木霉菌菌丝体和孢子细胞膜的通透性抑制木霉菌丝的快速生长和孢子萌发,进而抑制木霉菌的活性,达到抗真菌的效果。

在本研究中,我们证实了从苡麦中分离的TLPs-Permatin蛋白对木霉菌孢子萌发和菌丝体生长具有明显的抑制作用,并进一步验证了Permatin蛋白的抑菌机制。Permatin蛋白通过破坏木霉菌孢子和菌丝体细胞膜的完整性,抑制孢子萌发和菌丝体生长,进而抑制木霉菌的活性。本研究为Permatin将来在抗真菌病传染、植物种子育种以及食用菌栽培等方面发挥作用提供了理论基础。

## 参考文献

- [1] Narusaka Y, Narusaka M, Abe H, et al. High-throughput screening for plant defense activators using a BETA-glucuronidase-reporter gene assay in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biotechnol*, 2009, 26(3): 345-349
- [2] van Loon LC, Rep M, Pieterse CMJ. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu Rev Phytopathol*, 2006, 44(1): 135-162
- [3] van der Wel H, Loeve K. Isolation and characterization of thaumatin I and II, the sweet-tasting proteins from *Thaumatococcus daniellii* Benth. *Eur J Biochem*, 1972, 31(2): 221-225
- [4] Breiteneder H, Radauer C. A classification of plant food allergens. *J Allergy Clin Immunol*, 2004, 113(5): 821-830
- [5] Krebitz M, Wagner B, Ferreira F, et al. Plant-based heterologous expression of Mald 2, a thaumatin-like protein and allergen of apple (*Malus domestica*), and its characterization as an antifungal protein. *J Mol Biol*, 2003, 329(4): 721-730
- [6] Pastorello EA, Farioli L, Pravettoni V, et al. Identification of grape and wine allergens as an endochitinase 4, a lipid-transfer protein, and a thaumatin. *J Allergy Clin Immunol*, 2003, 111(2): 350-359
- [7] Inschlag C, Hoffmann-Sommergruber K, O'Riordain G, et al. Biochemical Characterization of Pruav2, a 23-kD thaumatin-like protein representing a potential major allergen in cherry (*Prunus avium*). *Int Arch Allergy Immunol*, 1998, 116(1): 22-28
- [8] Izumi E, Hidaka S, Hiroi A, et al. Thaumatin-like protein (Pruav2) is a cherry allergen that triggers percutaneous sensitization in mice. *Foods*, 2021, 10(1): 134
- [9] Leitner A, Jensen-Jarolim E, Grimm R, et al. Allergens in pepper and paprika. *Allergy*, 1998, 53(1): 36-41
- [10] Gavrović M, Spasić M, Cirković VT, et al. Quantification of the thaumatin-like kiwi allergen by a monoclonal antibody-based ELISA. *Mol Nutr Food Res*, 2008, 52(6): 701-707
- [11] Palacín A, Tordesillas L, Gamboa P, et al. Characterization of peach thaumatin-like proteins and their identification as major peach allergens. *Clin Exp Allergy*, 2010, 40(9): 1422-1430
- [12] Leone P, Menu-Bouaouiche L, Peumans WJ, et al. Resolution of the structure of the allergenic and antifungal banana fruit thaumatin-like protein at 1.7-Å. *Biochimie*, 2006, 88(1): 45-52
- [13] Yasmin N, Saleem M. Biochemical characterization of fruit-specific pathogenesis-related antifungal protein from basrai banana. *Microbiol Res*, 2014, 169(5-6): 369-377
- [14] Wang H, Ng T. Isolation of an antifungal thaumatin-like protein from kiwi fruits. *Phytochemistry*, 2002, 61(1): 1-6
- [15] Yan X, Qiao H, Zhang X, et al. Analysis of the grape (*Vitis vinifera* L.) thaumatin-like protein (TLP) gene family and demonstration that TLP29 contributes to disease resistance. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 4269
- [16] Chen H, Wang K, Xiao H, et al. Structural characterization

- and pro-inflammatory activity of a thaumatin-like protein from pulp tissues of *Litchi chinensis*. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(23): 6439-6447
- [17] Singh NK, Kumar KRR, Kumar D, et al. Characterization of a pathogen induced thaumatin-like protein gene AdTLP from *Arachis diogeni*, a wild peanut. *PLoS One*, 2013, 8(12): e83963
- [18] Velazhahan R, Muthukrishnan S. Transgenic tobacco plants constitutively overexpressing a rice Thaumatin-like protein (PR-5) show enhanced resistance to alternaria alternata. *Biologia Plant*, 2003, 46(3): 347-354
- [19] Munis MFH, Tu L, Deng F, et al. A thaumatin-like protein gene involved in cotton fiber secondary cell wall development enhances resistance against *Verticillium dahliae* and other stresses in transgenic tobacco. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 393(1): 38-44
- [20] 金红, 岳东霞, 周良炎, 等. 利用类甜蛋白基因诱导表达提高马铃薯对晚疫病的抗性研究. 华北农学报, 2001, 16(1): 67-72
- [21] De Jesús PC, Ferreira NJ, Pacifico BNJ, et al. Plant thaumatin-like proteins: function, evolution and biotechnological applications. *Curr Protein Pept Sci*, 2020, 21(1): 36-51
- [22] Vitali A, Pacini L, Bordi E, et al. Purification and characterization of an antifungal thaumatin-like protein from *Cassia didymobotrya* cell culture. *Plant Physiol Biochem*, 2006, 44(10): 604-610
- [23] Chowdhury S, Basu A, Kundu S. Cloning, characterization, and bacterial over-expression of an osmotin-like protein gene from *Solanum nigrum* L. with antifungal activity against three necrotrophic fungi. *Mol Biotechnol*, 2015, 57(4): 371-381
- [24] Saeidi M, Zareie R. Prediction, isolation, overexpression and antifungal activity analysis of *Medicago truncatula* var. *truncatula* putative thaumatin like proteins (TLP-1, -2, -3, -4 and -5). *Turk J Biol*, 2020, 44(4): 176-187
- [25] Koiwa H, Kato H, Nakatsu T, et al. Crystal structure of tobacco PR-5d protein at 1.8 Å resolution reveals a conserved acidic cleft structure in antifungal thaumatin-like proteins. *J Mol Biol*, 1999, 286(4): 1137-1145
- [26] Menu BL, Vriet C, Peumans W, et al. A molecular basis for the endo-β1,3-glucanase activity of the thaumatin-like proteins from edible fruits. *Biochimie*, 2003, 85(1-2): 123-131
- [27] Liu C, Cheng F, Sun Y, et al. Structure-function relationship of a Novel PR-5 protein with antimicrobial activity from soy hulls. *J Agric Food Chem*, 2016, 64(4): 948-959
- [28] Quiroga EN, Sampietro AR, Vattuone MA. Screening antifungal activities of selected medicinal plants. *J EthnoPharmacol*, 2001, 74(1): 89-96
- [29] Brown GD, Denning DW, Gow NAR, et al. Hidden killers: human fungal infections. *Sci Transl Med*, 2012, 4(165): 165rv13
- [30] Pappas PG, Alexander BD, Andes DR, et al. Invasive fungal infections among organ transplant recipients: results of the transplant-associated infection surveillance network (TRANSNET). *Clin Infect Dis*, 2010, 50(8): 1101-1111
- [31] Rather IA, Awasthi P, Mahajan V, et al. Molecular cloning and functional characterization of an antifungal PR-5 protein from *Ocimum basilicum*. *Gene*, 2015, 558(1): 143-151
- [32] Huynh QK, Borgmeyer JR, Zobel JF. Isolation and characterization of a 22 kDa protein with antifungal properties from maize seeds. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992, 182(1): 1-5
- [33] Hejgaard J, Jacobsen S, Svendsen I. Two antifungal thaumatin-like proteins from barley grain. *FEBS Lett*, 1991, 291(1): 127-131
- [34] Misra RC, Sandeep RC, Kamthan M, et al. A thaumatin-like protein of *Ocimum basilicum* confers tolerance to fungal pathogen and abiotic stress in transgenic *Arabidopsis*. *Sci Rep*, 2016, 6(1): 25340
- [35] Reiss E, Schubert J, Scholze P, et al. The barley thaumatin-like protein Hv-TLP8 enhances resistance of oilseed rape plants to *Plasmodiophora brassicae*. *Plant Breeding*, 2009, 128(2): 210-212
- [36] Zhu L, Zhang X, Tu L, et al. Isolation and characterization of two novel dirigent-like genes highly induced in cotton (*Gossypium barbadense* and *G-hirsutum*) after infection by *Verticillium dahliae*. *J Plant Pathol*, 2007, 89: 41-45
- [37] Acharya K, Pal AK, Gulati A, et al. Overexpression of camellia sinensis thaumatin-like protein, cstlp in potato confers enhanced resistance to macrophomina phaseolina and phytophthora infestans infection. *Mol Biotechnol*, 2013, 54(2): 609-622
- [38] 刘健. 苡麦病程相关蛋白Permatin抗真菌机理的初步分析[D]. 太原: 山西大学, 2015
- [39] Lu BH, Zuo B, Liu XL, et al. *Trichoderma harzianum* causing green mold disease on cultivated *Ganoderma lucidum* in Jilin province, China. *Plant Dis*, 2016, 100(12): 2525
- [40] Degenkolb T, von Döhren H, Fog Nielsen K, et al. Recent advances and future prospects in peptaibiotics, hydrophobin, and mycotoxin research, and their importance for chemotaxonomy of *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Chem Biodiversity*, 2008, 5(5): 671-680
- [41] Jun H, Kieselbach T, Jönsson LJ. Enzyme production by filamentous fungi: analysis of the secretome of *Trichoderma reesei* grown on unconventional carbon source.

- [Microb Cell Fact](#), 2011, 10(1): 68
- [42] Harman G, Lorito M, Lynch J. Uses of *Trichoderma* spp. to alleviate or remediate soil and water pollution. *Adv Appl Microbiol*, 2004, 56: 313-330
- [43] Ezzi MI, Lynch JM. Biodegradation of cyanide by *Trichoderma* spp. and *Fusarium* spp.. [Enzyme Microb Tech](#), 2005, 36(7): 849-854
- [44] Anand A, Lei Z, Sumner LW, et al. Apoplastic extracts from a transgenic wheat line exhibiting lesion-mimic phenotype have multiple pathogenesis-related proteins that are antifungal. [Mol Plant Microbe Interact](#), 2004, 17(12): 1306-1317
- [45] Grenier J, Potvin C, Asselin A. Barley pathogenesis-related proteins with fungal cell wall lytic activity inhibit the growth of yeasts. [Plant Physiol](#), 1993, 103(4): 1277-1283
- [46] Yun DJ, Ibeas JI, Lee H, et al. Osmotin, a plant antifungal protein, subverts signal transduction to enhance fungal cell susceptibility. [Mol Cell](#), 1998, 1(6): 807-817
- [47] Narasimhan ML, Coca MA, Jin J, et al. Osmotin is a homolog of mammalian adiponectin and controls apoptosis in yeast through a homolog of mammalian adiponectin receptor. [Mol Cell](#), 2005, 17(2): 171-180