

冰核真菌研究进展*

唐朝荣 孙福在 赵廷昌

(中国农业科学院植物保护研究所 北京 100094)

关键词: 冰核真菌, 冰核细菌, 冰核活性

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654(2000)05-0374-04

水在 0℃ 以下仍未结冰的现象称为水的过冷却作用, 小体积纯净水的过冷却温度可接近 - 40℃。引起水从液态向固态转变的物质称冰核, 不同种类冰核催化活性差异很大, 非生物冰核可在 - 10℃ 左右诱发小体积水结冰, 而自然界中活性最强的冰核来自生物体, 已报道某些细菌 (如 *Pseudomonas syringae* 和 *Erwinia hericola* 的一些菌株) 可产生在 - 1℃ ~ - 2℃ 下催化水结冰的冰核。研究者将一些可以产生在 - 5℃ 以上具有冰核活性冰核的生物称为冰核生物。自 1974 年 Maki^[1] 首次从赤杨树叶中分离到在 - 2℃ ~ - 5℃ 下诱发植物结冰发生霜冻的冰核细菌 (Ice nucleation active bacteria, 即 INA 细菌) 以来, 冰核细菌引起了许多国家不同学科研究者的广泛兴趣, 并开展了深入细致的基础理论和应用研究, 目前 INA 细菌的研究已应用于霜冻防除、人工造雪制冰、食品

冷藏保鲜、促冰杀虫、高敏检测以及基因表达的报告基因等方面^[2]。

随着生物冰核研究领域的不断拓宽和深入, 新的生物冰核也不断被发现, 1988 年 Kieft^[3] 发现一种可以产生成冰温度高达 - 1.9℃ 冰核的地衣真菌 *Rhizoplaca chrysoleuca*, 这是首次报道真菌具有冰核活性。此后研究者又从水稻二化螟幼虫肠道内、植物体及土壤中分离到多株冰核真菌 (Ice nucleation active fungi, 即 INA 真菌), 并对来源广泛的这些菌株进行了种类鉴定、成冰生物学特性、促冰杀虫等方面的研究。冰核真菌和冰核细菌在冰蛋白水平上的同源性比较及真菌的冰核基因克隆也正在进行中^[3]。本文就冰核真菌领域国内外的研究现状和前景作一概述。

1 冰核真菌的来源和种类

目前已报道了 4 属 11 个种冰核真菌, 除 3 种为地

表1 冰核真菌的种类

学 名	中文名	分离寄主	资料来源
<i>Rhizoplaca chrysoleuca</i>	红脐鳞	岩石地衣	Kieft ^[8]
<i>Lecanora dispersa</i>	鸡皮地衣	岩石地衣	Kieft ^[9]
<i>Pertusaria flavicans</i>	茶渍型地衣	岩石地衣	Kieft ^[9]
<i>Fusarium acuminatum</i>	锐顶镰刀菌	苜蓿豌豆	Pouleur ^[10]
<i>F. avenaceum</i>	燕麦镰刀菌	苜蓿等8个种	Pouleur ^[10]
<i>F. moniliforme</i>	稻恶苗病菌	日本赤松柳杉	Tsumuki ^[11]
<i>F. tricinctum</i>	三线镰刀菌	芸苔、大麦、及土壤中	Richard ^[12] Tsumuki ^[11]
<i>F. oxysporum</i>	尖孢镰刀菌	蚕豆、苜蓿及实验室杂菌	Richard ^[12]
<i>F. graminearum</i>	禾谷镰刀菌	杨树	孙福在 ^[13]
<i>F. sportrichioides</i>	拟枝孢镰刀菌	棉花地土壤和豌豆上	孙福在 ^[13]
<i>F. moniliforme</i> var. <i>subglutinans</i>	串珠镰刀菌的subglutinans变种	水稻二化螟幼虫肠道	Tsumuki ^[11]

衣真菌外, 其余的 8 个种均属于镰刀菌属 (*Fusarium*), 详见表 1。

* 国家自然科学基金资助项目 (No.39770485)

收稿日期: 1999-10-18, 修回日期: 1999-12-08

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

2 地衣和地衣冰核真菌

地衣是真菌和藻类,或真菌和兰细菌,或真菌、藻类和兰细菌共生体。Kieft^[5]初步研究表明岩石地衣的成冰温度比植物附生地衣的高,与光合兰细菌 *Peltigera* sp.共生的地衣产生活性相对较低的冰核。从这些具冰核活性的地衣中未分离到冰核活性细菌,而地衣共生真菌的纯培养物可以产生高活性冰核,这表明地衣冰核可能是由地衣共生真菌产生的。Kieft^[9]对地衣的组成部分即不同共生体纯培养物分别进行冰核活性测定,结果表明仅共生真菌能产生高活性冰核,地衣共生光合生物的成冰温度均低于 -5°C ,进一步说明地衣的冰核活性成分是共生真菌产生的。

3 非共生冰核真菌(free-living INA fungi)

Pouleur^[6]从 20 属 145 个真菌菌株中筛选出 16 个 *Fusarium avenaceum*, 5 个 *F. acuminatum* 在 -5°C 具冰核活性的菌株。*Fusarium avenaceum* 的成冰温度为 -2.5°C , 每克菌丝干重的冰核数高达 10^9 , 研究还发现该菌产生的大型分生孢子具有冰核活性。*Fusarium avenaceum* 和 *F. acuminatum* 都是植物病原菌,引起包括牧草在内多种植物的根腐病,在冷凉地区危害尤为严重。Tsumuki^[10]在昆虫肠道内分离到一株在 -5.5°C 具冰核活性的真菌菌株,鉴定为 *F. moniliforme* var. *subglutinans*^[7]。孙福在^[9]从分离和收集到的 500 多株真菌中筛选出 6 个在 -5°C 具有冰核活性的菌株,分属于 *Fusarium graminearum*, *F. sportrichoides*, *F. moniliforme* 和 *F. avenaceum*, 其中 *F. graminearum* F9502 菌株的活性最高、最稳定,结冰点为 -2.7°C 。

已发现的非共生冰核真菌均属于镰刀菌属,那么冰核活性是否为镰刀菌属或该属某些种的特异性性状? 这一性状是否可以作为镰刀菌种或属一个稳定的分类依据? Pouleur^[6]研究发现 *F. avenaceum* 和 *F. acuminatum* 两个种的全部测试菌株均为 -5°C 具冰核活性的冰核真菌,同菌株来源和寄主无关,并且冰核活性稳定,有些菌株保存 30 多年仍保持较高活性,而其它 20 个属(包括 *Fusarium* 属的 12 个菌株)的 100 多个菌株在该温度下均无冰核活性。Pouleur 据此认为具有冰核活性是这两个真菌种的特有性状,可以作为 *Fusarium* 某些种的一个新的鉴别特征。Tsumuki^[7]、Richard^[8]、孙福在^[9]虽然也只在 *Fusarium* 属中发现冰核真菌,但 Tsumuki^[7]发现冰核活性并非 *F. avenaceum* 和

F. acuminatum 的稳定性状,因为它们的许多菌株不具冰核活性,同时在 Pouleur 研究中未发现冰核活性菌株的 *F. tricinctum*, *F. oxysporum*, *F. graminearum* 和 *F. moniliforme* 中都发现了具冰核活性的菌株。

根据以上研究,笔者认为:冰核真菌可能主要分布在镰刀菌属内,但冰核活性并不具有种特异性。尽管如此,是否具有冰核活性仍可以在真菌分类上应用:如待鉴定菌株为冰核真菌,就可以初步判断它可能属于镰刀菌属的某一个种,然后再检测它是否属于已知的冰核真菌种,这样可以简化未知菌株的鉴定程序。

Pouleur^[6]指出冰核真菌在系统发育上有相关性。几乎所有的地衣真菌都属于子囊菌,而 *Fusarium* spp. 属于半知菌,但若有性世代已知则也属于子囊菌,表明这些系统发育相关真菌的冰核活性性状的起源可能相同。

4 真菌冰核的特性研究

目前对真菌冰核的研究不如细菌冰核深入,难于大量分离真菌冰核阻碍了对其进行深入研究。高活性冰核的产量低,通常每个细胞平均不足 1 个,这样对真菌冰核的研究目前主要靠间接方式,即通过研究各种物理、化学处理对冰核活性的影响来推测真菌冰核的结构和功能。

象细菌冰核一样,地衣冰核似乎也是蛋白质,例如地衣冰核经链霉菌蛋白酶、木瓜蛋白酶处理后冰核活性显著降低^[11],蛋白变性剂盐酸胍和脲可以使其丧失活性,这些都说明地衣冰核的主要成分可能是蛋白质。Kieft^[12]用 γ -射线失活地衣冰核的实验表明地衣冰核的大小随成冰温度的线性增加呈对数增长,表明高活性的真菌冰核可能是有许多小的冰蛋白亚基组成的。

地衣冰核与细菌冰核的性质有很大差别,首先表现在地衣冰核耐热, 60°C 处理后仍有活性。细菌冰核不耐热, 40°C 下很快就丧失活性^[10]。地衣和细菌冰核的差别还表现在地衣冰核在很宽的 pH 范围内活性稳定,例如 Kieft^[11]发现地衣 (*R. chrysroleuca*) 冰核抽提物的结冰点在 pH2~11 的范围内保持稳定,这一特性表明地衣冰蛋白中不带电荷的氨基酸所占的比例可能比较高。与之相比,细菌冰核不耐酸碱, pH4 以下或 pH9 以上活性丧失或受到极大削弱^[13]。地衣和细菌冰核的最大差别在对膜脂的需求上,细菌冰蛋白在革兰氏阴性菌的外膜上产生^[14],成冰活性需脂类物质的参与^[15]。而

地衣 *R. chrysoleuca* 的冰核与之不同,用非极性溶剂如氯仿将冰核粗提物完全去脂化后,仍能在较高温度下催化水结冰^[11],他们还发现巯基修饰剂、凝集素和糖苷酶处理对地衣冰核的活性均没有明显影响,表明巯基和碳水化合物可能都不直接参与地衣冰核的组成或与其活性发挥没有关系。

非共生真菌(*Fusarium*)的冰核与地衣冰核有许多相同的特征,如酸碱适应性强(pH1~13内活性稳定)、耐热(60℃处理10min活性几乎不受影响)、氯仿抽提和脂酶、巯基修饰剂、凝集素和糖苷酶处理对冰核活性影响小^[16]。冰核真菌的培养滤液通过0.22μm的微孔过滤后仍具有较高的冰核活性,似乎表明冰核真菌可以产生胞外冰核^[6]。非共生冰核真菌与地衣真菌冰核的相似性表明它们可能具有相同遗传起源。

目前还不清楚真菌冰蛋白的结构,也不知道是否有其它一些分子如无机辅助因子等参与真菌冰核的成冰过程,对真菌冰核活性的遗传基础同样也未深入研究。Orser(私人通讯)和 Hasegawa^[3]研究表明细菌冰核基因探针与地衣冰核真菌和非共生冰核真菌的染色体DNA都没有同源性序列。地衣和非共生真菌的冰核活性可能是趋同进化的结果,即编码真菌冰核活性的基因和细菌冰核基因的起源可能是独立的,不过真菌冰核可能与其它类群的冰核一样具有相同的内在特性,例如冰核分子量大、冰蛋白具有亲水性氨基酸组成的重复序列。

5 真菌冰核活性的选择有利性

目前对地衣冰核的选择有利性有几种解释,其中最可信的解释是认为地衣冰核活性与地衣的水分吸收有关。许多地衣的生存环境每天经历冻-融循环。冰上的水气压比过冷却水上的低,这样高活性地衣冰核可以增强水分在地衣上凝华。冰核活性地衣就是靠晚间水气凝华、次日冰融化成水来吸收水分,由于地衣主要靠从大气中直接吸收水分,因此冰核活性对某些地衣的生存和繁殖是很有意义的。这种吸收水分的机制尤其适于晚间气温降至0℃以下、但仍高于非生物冰核成冰温度的环境。调查研究为这一理论提供了证据,春秋季节新墨西哥山脉上的晚间气温多为-5℃左右、通常比较干燥,此时采集的地衣 *R. chrysoleuca* 冰核的成冰温度最高、浓度最大,而在寒冬和仲夏,夜间气温分别低于-5℃和高于0℃,降雨量也较春秋季节大,此时采集的

地衣 *R. chrysoleuca* 样品的冰核活性不高。第二种解释是地衣冰核活性与其抗冻性相关,当地衣冰核在较高温度下诱发水结冰时,地衣体内冰晶生长和细胞脱水速率要比在较低温度下发生结冰时低,因此地衣冰核在较高温度下诱发水结冰可能会增强其抗冻性。以上这两个假说并不互相矛盾,地衣冰核活性可以同时促进地衣的水分吸收和增强其抗寒性。

非共生冰核真菌的选择有利性可能与推测的冰核细菌的选择有利性机制相似,即在较高温度下催化水成冰而使这些真菌成为机会植物病原菌(conditional plant pathogen),具体来讲就是通过真菌冰核成冰活性使植物在较高温度下发生冻害,从而促进冰核真菌侵染为害,成为病原菌。霜冻可以加重 *Fusarium* 属真菌引起的苜蓿根腐病发生^[17],与叶面冰核细菌相似,植物根部真菌可能通过在相对较高的温度下催化过冷却水结冰而破坏植物组织,进而获取植物营养、加速对植物根部组织的侵染。但另一方面,包括 *Fusarium* 属在内的一些病原真菌通常并不象病原细菌(如 *P. syringae*)那样依赖于伤口或其它自然孔口侵入植物,这说明 *F. acuminatum* 和 *F. avenaceum* 的冰核活性可能并不是它们侵染植物组织所必须的。

真菌冰核可能同其它生物冰核一起促进大气中的水分在较高温度下发生结冰,从而影响水文循环。这些冰核也可促进植物表面的成冰作用,例如地衣可以在木本植物体表面产生冰核。真菌冰核还可以诱发昆虫体在较高温度下结冰^[10]。

6 真菌冰核的研究应用前景

生物冰核应用研究涉及人工造雪制冰、人工降雨、食品冷藏保鲜、促冻杀虫、高敏检测、报告基因等领域,不过目前这些应用研究主要局限于细菌冰核,但真菌冰核研究应用前景可能会更广阔,因为真菌冰核具有细菌冰核所不具备的独特的特性,如耐热,耐酸碱、活性发挥不需脂类、糖类和巯基基团参与等,这些特性使真菌冰核的应用更具操作性。例如真菌冰核热稳定性好,这使真菌冰核产品易于储藏、货架寿命长。地衣冰核活性发挥不需脂类参与,使其尤其适于在食品行业和免疫学上应用。细菌外膜中含有内毒素不利于细菌冰核应用,而应用地衣冰核则没有这个问题,纯化的地衣冰核用于免疫学测定时,产生的非特异性结合的可能性要比应用与膜脂相连的细菌冰蛋白小。我国三北

地区越冬农作物、牧草、果树和林木的冻害发生严重,加强冰核真菌研究有助于揭示冻害发生与冰核真菌的致冻关系并有助于冻害防除。此外,重要真菌病害(小麦根腐病、苹果腐烂病、杨树烂皮病等)发生与冰核真菌致冻互作关系的阐明及其防治也离不开对冰核真菌的深入研究。由于地衣生长缓慢,因此地衣冰核的应用要靠克隆相应的冰核基因,并在快速生长的微生物中异源表达。但人们对地衣真菌遗传学的研究也仅刚刚起步,阻碍了地衣冰核基因克隆和表达。相比而言,*Fusarium* 属真菌在实验室条件下的生长速率要比地衣快的多,这将会加快此属真菌冰核的研究。克隆真菌的冰核基因、构建高效表达载体,将会加速真菌冰核的研究和开发应用,预测非共生真菌的冰核基因克隆将是今后该领域研究的热点和关键。

参 考 文 献

- [1] Maki L R, Galyon E L, Chang-Chien M *et al.* Appl Microbiol, 1974, 28:456~460.
- [2] 彭于发等主编,植物病理学研究. 北京:中国农业科技出版社,1997:77~82.
- [3] Hasegawa Y, Ishihara Y, Tokuyama T. Biosci Biotech Biochem, 1994, 58(12):2273~2274.
- [4] Kieft T L. Appl Envir Microbiol, 1988, 54:1678~1681.
- [5] Kieft T L, Ahmadjian V. Lichenologist, 1989, 21: 355~362.
- [6] Pouleur S, Richard C, Martin J G, *et al.* Appl Environ Microbiol, 1992, 58:2960~2964.
- [7] Tsumuki H, Yanai H, Aoki T. Ann Phytopathol Soc Jpn, 1995, 66:334~339.
- [8] Richard C, Martin J G, Pouleur S. Phytoprotection, 1996, 77(2):83~92.
- [9] 孙福在,赵廷昌,张敏等. 菌物系统, 1999, 18(2): 149~153.
- [10] Tsumuki H, Konno H, Maeda T, *et al.* J Insect Physiol, 1992, 38:119~125.
- [11] Kieft T L, Ruscetti T. J Bacteriol, 1990, 172:3519~3523.
- [12] Kieft T L, Ruscetti T. Cryobiology, 1992, 29:407~413.
- [13] 孙福在,朱红,何礼远. 中国农业科学,1991,24(3): 57~64.
- [14] Lindow S E, Lahue E, Govindarajan A G *et al.* Mol Plant-Microbe Interact, 1989, 2:262~272.
- [15] Govindarajan A G, Lindow S E. J Biol Chem, 1988, 263:9333~9338.
- [16] 张敏,孙福在,赵廷昌. 中国农业科学,1998,31(6): 50~55.
- [17] Richard C, Willemot C, Michaud R, *et al.* Phytopathology, 1982, 72:293~297.