

寄主选择性植物病原真菌的毒素化学

董金泉 李正平

(河北农业大学植保系 保定 071001)

Wheeler 和 Luke 把那些在病害中起重要病因作用的毒素称为致病毒素(pathotoxin)<sup>[1]</sup>,那么由真菌产生的致病毒素则称为真菌毒素(Mycotoxin)。长期以来,人们一直对那些重要的植物病原真菌毒素进行分离、提纯和化学结构鉴定,发现它们大多数为低分子量的次生代谢产物<sup>[2]</sup>。自从 Tanaka 从梨上的菊池链格孢(*Alternaria kikuchiana*)中发现第一个寄主选择性真菌毒素(Host-selective toxin)以来<sup>[3]</sup>,现

已报道有 9 个属的 21 种植物病原真菌可以产生寄主选择性毒素<sup>[4~9]</sup>其中已有 15 种明确了其化学结构,(见表 1)。实践证明来源于某一病原真菌不同种的真菌毒素[如链孢霉菌(*Alternaria*)的不同种、变种],其化学结构基本上是相似的。有关毒素的研究进展和生物活性已有许多评述<sup>[1,4~6,11,12]</sup>,本文仅介绍植物病原真菌产生的寄主选择性毒素的化学研究进展。

表1 植物病原真菌产生的寄主选择性毒素

毒素名称	产毒病原真菌	所致植物病害	可能的化学结构及文献出处
HV-毒素	<i>H.victoriae</i>	燕麦维多利亚疫病	肽和萜类(Pringle和Braun, 1958; Dorn和Arigoni, 1972)
HC-毒素	<i>H.carbonum</i> race1	玉米圆斑病	环状四肽(pringle和Scheffer, 1997)
HS-毒素	<i>H.sacchari</i>	甘蔗眼(蛇)斑病	倍半萜葡萄糖苷(Steiner和Strobel, 1971)
HMT-毒素	<i>H.maydis</i> raceT	玉米小斑病	线型聚乙酮醇(Payne和Yoder, 1978)
HMC-毒素	<i>H.maydis</i> race C	玉米小斑病	未知
HT-毒素	<i>H.turicum</i> race 2	玉米大斑病	未知
AK-毒素	<i>A.kikuchiana</i>	日本梨黑斑病	环氧十三烯酸脂(Nakashima等, 1982)
AM-毒素	<i>A.mali</i>	苹果斑点落叶病	环状四肽(Okuno等, 1966)
ACT-毒素	<i>A.citri</i> Tangerine pathotype	柑橘褐斑病	未知
AAL-毒素	<i>A.alternata</i> Tomato pathotype	番茄茎枯病	脂类(Bollini等, 1981)
AF-毒素	<i>A.fasciculata</i>	草莓黑斑病	脂类(Nishimura等, 1979)
ACR-毒素	<i>A.citri</i> Rough lemon pathotype	粗皮柠檬褐斑病	羟基化合物(转自沈瑛等, 1987)
ALT-毒素	<i>A.longipes</i> Tobacco pathotype	烟草褐斑病	未知
AB-毒素	<i>A.brassicaceae</i>	白菜黑斑病	肽类(Shivanna和Sawhney, 1993)
PC-毒素	<i>P.bericaria</i>	高粱买罗病	肽(Ranson等, 1994)
PM-毒素	<i>P.hyllosticta</i> maydis	玉米黄叶枯病	线型聚乙酮醇(Kosuge和Nester, 1985)
CC-毒素	<i>C.orynespora</i> cassicala	番茄轮斑病	未知
PTR-毒素	<i>P.pyrenophora</i> tritici repentis	小麦褐斑病	蛋白质(Tomas等1990)
FON-毒素	<i>F.fusarium</i> oxysporium fsp. nicotiana	烟草萎蔫病	糖蛋白(Bhatt, 1989)
SG-毒素	<i>S.septoria</i> glycines	大豆褐斑病	多糖(Song等, 1993)
PT-毒素	<i>P.temphylium</i> vesicarium	欧洲梨褐斑病	未知

1. 蠕孢菌产生的寄主选择性毒素

蠕孢菌属(*Helminthosporium*)真菌是植物上的一类重要致病真菌,在历史上曾引起过重要的作物病害。现已明确该属中的病原真菌是以产生毒素诱致寄主植物

发病的。但迄今为止,具有寄主选择性的真菌毒素仅有 6 个种(或小种)。

1.1 HV-毒素 HV-毒素是由燕麦维多利亚叶枯

1996-02-21 收稿

病菌(*H. victoriae*)产生的寄主选择性毒素,该毒素致病力很强。Luke和Wheeler曾用该病菌的一个强毒株系毒素处理感病燕麦种子根,发现培养滤液即使是稀释120万倍仍可抑制50%根的生长,但对抗病品种来讲欲达同样的抑制效果则最多稀释十几倍。后来Samaddar和Scheffer发现这种毒素主要引起感病燕麦原生质体的迅速裂解,提出原生质膜是HV-毒素作用的初期位点以及蛋白质是毒素的受体的观点<sup>[12]</sup>。关于HV-毒素的化学结构,Pringle和Braun曾提出它有二种成分,一种肽和一个含氮的杂环化合物,其中肽成分中含有天门冬氨酸、谷氨酸、甘氨酸、缬氨酸和两种亮氨酸中的一种<sup>[13]</sup>。Dorn和Arigoni通过试验发现HV-毒素是一种萜类化合物即维多利亚萜类素<sup>[14]</sup>,分子式为 $C_{12}H_{29}NO$ 。这种化合物在真菌培养基质中以游离的碱基存在。Wolpert和Dunkle(1983)用HV-毒素的不同毒性组分处理燕麦叶片,发现对 $CO_2$ 暗固定和水合醛基的形成有明显影响<sup>[15]</sup>。

**1.2 HC-毒素** 该毒素由玉米圆斑炭色蠕孢菌(*H. carbonum*) 1号小种产生,引起玉米的圆斑病。Pringle和Scheffer首次分离到了这种寄主选择性毒素,并鉴定其化学结构为环状肽类物质,成分中含有脯氨酸和丙氨酸(比例1:2),并带有二个不稳定的氨基酸,其中之一已鉴定为 $\alpha$ -氨基-2,3-脱氢-3-甲基戊酸。初步估计HC-毒素的分子量为700Du,并推测脯氨酸和丙氨酸分别为每克分子量1~2个残基,其余未知的化合物被认为是一种羟基氨基酸,它在分解时可能会成为氨、甘氨酸或其他未知化合物<sup>[16]</sup>。Pringle证明HC-毒素的电解还原可成为寄主非选择性毒素,其原因是由于脱氢氨基酸还原成了异亮氨酸<sup>[17]</sup>。Rasmussen和Scheffer通过层析发现HC-毒素有四种毒性组分,其中分离物I为主要组分,含量在每升培养滤液中80~100mg,如果将HC-毒素分离物I的环氧基分解为二醇类,则毒素失去活性<sup>[18]</sup>。Walton和Holden发现HC-毒素的生物合成需要二种酶,即HC-毒素合成酶I和II(HTS-1和HTS-2),其中HTS-1可能使ATP累积并改变无机焦磷酸(ppi)的浓度,进而使L-脯氨酸转变为D-脯氨酸,之后才能形成毒素;而HTS-2可使L-丙氨酸和D-丙氨酸形成氨基酸硫代酯而构成毒素<sup>[19]</sup>。

**1.3 HS-毒素** 甘蔗长蠕孢菌(*H. sacchari*)引起甘蔗的眼(蛇)斑病是近些年来研究最多的致病毒素病

害之一,这种寄主选择性毒素是一种长蠕孢苷(helminthosporiside),它是Steiner和Strobel在1971年首先分离出来的,分子量很小,也不含肽。根据IR、NMR、MS等分析,现已鉴定了它的化学结构,即是一种环丙基- $\alpha$ -半乳糖苷(或称倍半萜葡萄糖苷)<sup>[20]</sup>。Nakajima和Scheffer发现该毒素有A、B、C三种异构体,其中C异构体对甘蔗毒性最强,半乳糖位于半萜环的2和13位置上;从菌丝中可分离到二种游离的倍半萜,一种为HS-毒素C的配基,另一种是HS-毒素C配基的2-酮结构<sup>[21]</sup>。

**1.4 HMT-毒素** 1970年,玉米小斑病在美国大流行,主要是因为玉米小斑菌(*H. maydis*)群体中T小种产生了一种寄主选择性毒素(HMT-毒素),它对cms-T细胞质玉米具高度的选择毒性。Karr从玉米小斑菌T小种培养物滤液和病叶中分离到四种寄主选择性毒素,其中分离物I和II与通常用于萜类鉴定的试剂起阳性反应,经IR、UV、MS和NMR等数据分析证明与已知的四环三萜类物质相似,仅在光谱性质和分子量上有微小的差异,而分离物III是I和II的糖苷<sup>[22]</sup>。后来他又用测定胆甾醇的Liebermann-Burchard方法发现玉米小斑菌的培养物中还有一种毒性成分(即分离物V),这种分离物比其它分离物出现的要早,可能是它们的前体<sup>[23]</sup>。Aranda等认为HMT-毒素由乙酸酯化的和2-N-甲酰基-L-缬氨酸部分酯化了的D-甘露糖醇组成。近十几年来,Payne和Yoder, Kono和Daly, Yang和Yoder等通过大量分析发现HMT-毒素是由 $C_{35}$ 至 $C_{45}$ 骨架组成的线型聚乙酮醇(polyketol)或聚乙酮酰(polyketide)。其主要成分的分子式为 $C_{14}H_{68}O_{13}$ ,分子量为768Du<sup>[24,25]</sup>。Suzuki等曾对上述物质进行了人工合成,得到了几种碳链略短类似物,经过生物测定具HMT-毒素的生理活性。

**1.5 HMC-毒素** 在我国,黄栌芳等曾根据玉米种质资源的现状,提出应把我国玉米小斑菌分成包括中T、中O、中C在内的16个生理小种<sup>[26]</sup>。后来魏建昆等进而证实了C小种在中国的存在。崔洋等通过Sephadex G-25柱层析从玉米小斑病菌C小种培养滤液中分离到了四种分离物,并定名为HMC-亚毒素,其中分离物I和III可诱致cms-C细胞质玉米叶片严重萎蔫,此外认为它们是一种具生物活性的混合物。

**1.6 HT-毒素** Yoka首次报道玉米大斑病菌在

活体外培养可产生几种酶类物质以及可产生某种对热稳定的毒素<sup>[27]</sup>,考虑到玉米对大斑病的抗性是显性单基因控制,人们推测由玉米大斑病菌产生的毒素应该是寄主选择性的<sup>[6]</sup>。董金皋研究小组自1991年以来先后对HT-毒素产生的条件、特性、粗提纯过程中的毒性变化以及有机物萃取进行了研究,发现这种毒素对热稳定,但对光不稳定;HT-毒素可溶于包括乙腈、乙酸乙酯在内的多种有机溶剂;玉米大斑病菌体外液体培养经过滤、加热浓缩、有机物萃取、离心等程序致病活性没有明显变化<sup>[28-31]</sup>。通过用大斑病菌五个菌株毒素(分属于1、2号小种)的生物测定结果表明,2号小种毒素可选择性诱致Ht<sub>1</sub>基因玉米根冠细胞的死亡,抑制种子根的伸长并诱致叶片出现典型的病斑,因而提出HT-毒素是一种寄主选择性毒素<sup>[9]</sup>。通过硅胶GTL层析,发现玉米大斑病菌2号小种毒素有3种毒性组分(I、II、III),而1号小种只有2种毒性组份(缺少IV)。而且IV可选择性诱致Ht<sub>1</sub>基因玉米发病,因此认为它是一种特异性的致病因子<sup>[32]</sup>。目前通过硅胶G柱层析的分离结果表明1号小种I、II分离物又已重复出现,而且经薄层扫描后其色谱图谱和光谱图谱与TLC扫描结果完全类同。经GC-MS, HRMS, NMR等技术鉴定出不具选择毒性的组分I的化学结构为5-羟甲基-2-呋喃甲醛,但还未能鉴定出特异性组分IV的化学结构。

## 2. 链格孢属真菌产生的寄主选择性毒素

在现已报道的21种寄主选择性植物病原真菌毒素中,有8种是由链格孢属(*Alternaria*)病原菌产生的,它们分别可引起多种病害(表1)。已成为当前严重威胁生产的重要病害,正在引起人们的普遍关注。

**2.1 AM-毒素** AM-毒素是由苹果链格孢(*A. mali*)产生的一种寄主选择性毒素。研究表明该毒素是一环状四肽,由丙氨酸、 $\alpha$ -羟基异戊酸、 $\alpha$ -氨基丙烯酸和 $\alpha$ -氨基- $\delta$ -(对甲氧基苯基)-戊氨酸所组成。Okuno等分离并鉴定该毒素是一种缩酚酸肽(depsipeptide),它引起苹果叶片和果实产生特异性的坏死斑,即这种具毒性的环状四肽对苹果某些品种是寄主选择性的<sup>[33]</sup>。随后Ueno等报道AM-毒素可分离提纯出化学结构相类似的三种缩酚酸肽,即AM-毒素I、II和III,其中I为[环( $\alpha$ -羟基异戊酰- $\alpha$ -氨基- $\beta$ -甲氨基-苯基戊酰- $\alpha$ -氨基-丙酰-丙氨酸-内酯)]<sup>[34]</sup>。

## 2.2 AK-毒素 菊池链格孢(*A. Kikuchiana*)产生

的毒素是报道最早的寄主选择性毒素,它对感病的日本沙梨及其亲缘品种毒性极强,但对抗病梨品种却毒性很小甚至无毒。据测定,AK-毒素是一种脂类物质,其化学结构与AF-毒素很相似,仅在2'位上的功能基团不同,AF-毒素是-OH, AK-毒素是-NH。

**2.3 AF-毒素** AF-毒素是由簇生链格孢(*A. fragariae*)产生的一种寄主选择性毒素,它引起草莓的黑斑病。Maekawa等报道AF-毒素可分离到I、II、III三种分离物,其中I引起草莓和日本梨坏死,II只能引起梨叶脉坏死,III对草莓具很高的毒性,但对梨毒性很小<sup>[35]</sup>。Nakatsuta等报道分离物II是三烯醇酸的一个异构体,其化学结构与AK-毒素类似,可能也是脂类化合物<sup>[36]</sup>。

**2.4 其他链格孢属毒素** 在柑桔链格孢(*A. citri*)中有二个致病型,即桔致病型和粗皮柠檬致病型,它们分别只对各自的寄主——桔和粗皮柠檬具选择致病性,而且它们产生的毒素(ACT-毒素和ACR-毒素)也是寄主选择性的,在二种毒素中,已知ACR-毒素的化学结构是一种羟基化合物。Kohmoto从柑桔链格孢桔致病型的培养物滤液中分离出二种寄主选择性毒素,即ACT-毒素Ib和Ic,经HPLC分析,毒素Ib是培养物滤液乙酸乙酯提取物和孢子萌芽液中的主要毒性成分,可引起感病品种叶脉坏死和电解质的快速渗漏。AAL-毒素是由链格孢番茄致病型产生的一种选择性毒素,化学结构是脂类<sup>[37]</sup>。Moussatos等发现番茄对AAL-毒素的敏感性以及对其产生真菌的感病性与番茄中的ASC位点有关,毒素诱致叶片坏死程序取决于寄主组织的成熟度和细胞类型,表现为幼嫩叶片是最敏感的<sup>[38]</sup>。目前对于引起烟草褐斑病的长柄链格孢烟草致病型产生的毒素尚不知其化学结构。最近Shivanna和Sawhney报道引起白菜黑斑病的芸苔链格孢(*A. brassicae*)产生的毒素(destruxin B, homodestruxin B),也为环状肽类化合物,对感病白菜的花粉萌发和花粉管伸长具有强烈抑制作用,因而提出该毒素是一种寄主选择性毒素。

## 3 其他真菌产生的寄主选择性毒素

除上述链格孢属和链格孢属的真菌可以产生寄主选择性毒素外,另有7个属的其它真菌产生的毒素也具有寄主选择性(表1)。

玉米黄叶枯病是由玉米叶点霉(*phyllosticta maydis*)

引起的真菌病害,该真菌产生的PM-毒素也是线型的聚乙醇醇,它选择性地抑制感病玉米幼根的生长,致使叶片失绿,并引起带有T型雄性不育细胞质(Tms)玉米叶片的电解质渗漏的增加<sup>[29]</sup>,线粒体的不可逆膨大以及抑制对氧气的吸收和氧化磷酸化的解偶联。

PC-毒素是高粱买罗病病原——旋卷黑团孢(*Periconia circinata*)产生的寄主选择性毒素,其化学结构可能是一种肽类化合物。Wolpert和Dunkle报道PC-毒素毒害高粱的原初作用位点是细胞质,它引起感病高粱品种的感病基因交替表达,使某些蛋白质特别是16Ku的蛋白质出现4种亚单位;当PC-毒素处理感病高粱根系之后6h之内,高粱则可选择性地合成4种亚单位的蛋白,这种蛋白很可能是由于毒素损伤细胞之后的一种感病表现<sup>[15]</sup>。

至于由山扁豆生棒孢(*Corynespora cassicola*)产生的寄主选择性毒素——CC-毒素,迄今尚未鉴定出其化学结构。最近Song等从大豆壳孢菌(*Septoria glycines*,引起大豆褐斑病)中分离出一种新的寄主选择性毒素,暂时定为SG-毒素,它可在大豆叶片上引起典型的褐斑症状,这种毒素对热稳定。但在46℃下进行真空闪蒸(flash-evaporation)至干燥,会使99%的致病活性丧失,经鉴定这种毒素可能是一种多糖<sup>[8]</sup>。

Tomas等报道引起小麦褐斑病的病原菌*Pyrenophora tritici repentis*产生的寄主选择性毒素是蛋白质,这是迄今为止唯一的较高分子量的次生代谢产物<sup>[41]</sup>。

众所周知,植物病原真菌产生的寄主选择性毒素是一类重要的致病因子,而强调的是真菌毒素的分离、提纯和化学结构的鉴定应该放在任何研究工作的首位,这在探讨真菌毒素的致病机理、真菌毒素产生的分子生物学和遗传学以及真菌毒素的应用实践等诸方面具有十分重要的意义而且也是开展其他研究的基础。

目前,人们开始探讨真菌毒素在病害预防中的反利用,即通过种种手段,如通过对真菌毒素的钝化制成生物农药和人工合成模拟物质用来防除真菌或其他病害;或通过分子生物学的基础研究,抑制产毒遗传基因的表达;更重要的是在分析毒素化学结构和特性的基础上,通过毒素钝化物或其他处理,使毒素的结构发生改变进而失去致病活性等,都会给植物病害的防除提

供新的尝试。可以想象随着真菌毒素化学和分子生物学的研究深入,真菌毒素的应用前景会更加广泛,从而将为人类揭示自然现象,探讨自然规律提供各种依据。

## 参 考 文 献

- [1] Wheeler H, H Luke A. A Rev Microbiol, 1963, 17: 223~242.
- [2] Kohmoto K, H Otnai. Experientia, 1991, 47: 755~764.
- [3] Tanaka S. Men College Agr Kyoto Imp Univ, 1993, 28: 1~31.
- [4] Yoder O C. Ann Rev Phytopathol, 1980, 18: 103~129.
- [5] 章元寿. 真菌学报, 1991, 10(3): 169~181.
- [6] Walton J D, D G Panaccione. Ann Rev Phytopathol, 1993, 31: 275~303.
- [7] Shivanna K R, V K Sawhney. Theoretical and Applied Genetics, 1993, 86: 339~344.
- [8] Song H S, S M Lim, J M Clark Jr. Phytopathol. 1993, 83: 659~661.
- [9] 董金皋. 中国科技优秀论文, 郑州: 河南科学技术出版社, 1994, 73~77.
- [10] Scheffer R P, K R Samaddar. Recent Advances in Phytopathol, 1970, 3: 123~142.
- [11] Strobel G A. Ann Rev Pl Physiol, 1974, 25: 541~566.
- [12] Samaddar K R, R P Scheffer. Physiol Pl Pathol, 1971, 1: 319~328.
- [13] Pringle R B, A C Brann. Nature, 1958, 181: 1205~1206.
- [14] Dorn F, D Arigoni. J Chem Soc Chem Commun, 1972, 1342~1343.
- [15] Wolpert T J, L D Dunkle. Proc Wail Acad Scio USA, 1983, 80: 6576~6580.
- [16] Pringle R B, R P Scheffer. Phytopathol, 1967, 57: 530~532.
- [17] Pringle R B. Pl Physiol, 1973, 51: 493~496.
- [18] Rasmussen J B, R P Scheffer. Pl Physiol, 1988, 86: 187~191.
- [19] Walton J D, E R Holden. Mol Pl Microbe Interact, 1988, 1: 128~134.
- [20] Steiner G W, G A Strobel. J Bio Chem, 1971, 246: 4350~4357.
- [21] Nakdijima H, R P Scheffer. Phytochem, 1987, 26: 1607~1611.
- [22] Karr A L, D B Karr, G A Strobel. Pl Physiol, 1974, 53: 250~257.
- [23] Karr D B, A L Karr, G A Strobel. Pl Physiol, 1975, 55: 727~730.
- [24] Payne G A, O C Yoder. Phytopathol, 1978, 68: 717~744.
- [25] Yang G, O C Yoder. 首届生物技术学术讨论会, 中国北京, 5.

(下转第230页)

(上接第 250 页)

- [26] 罗畔池, 黄梧芳, 张浩等. 植物病理学报, 1981, 11(3): 49~54.
- [27] Yoka P. Bulletin de la Societed Histoire Naturelle de Tozouse, 1975, III(34): 255.
- [28] 董金皋. 生物学杂志, 1992, 46: 22~24.
- [29] 董金皋, 黄梧芳, 康绍兰. 植物病理学报, 1992, 22: 356.
- [30] 董金皋, 王艳霞, 黄梧芳等. 河北农业大学学报, 1993, 16(2): 13~17.
- [31] 董金皋, 黄梧芳, 康绍兰等. 微生物学通报, 1993, 20: 73~77.
- [32] 董金皋, 李正平, 王瑞瑶等. 植物病理学报, 1996, 26(2): 139~144.
- [33] Okuno T. Chem Letters Chem Soc Japan, 1974, 635~638.
- [34] Ueno T. Agr Biol Chem, 1975, 39: 1115~1122.
- [35] Maekawa N, M Yamamoto, S Nishimura. Ann Phytopathol Soc Japan, 1984, 50: 600~609.
- [36] Namiki F, H Okamoto, S Nakatsuta et al. Ann Phytopathol Soc Japan, 1985, 52: 610~619.
- [37] Kohmoto K, Y Itoh, N Shimomura et al. Phytopathol, 1993, 83: 495~502.
- [38] Moussatos V V, W J Lucas, D G Gilchrist. Physiol Mol Pl Pathol, 1993, 42: 359~371. (下转第 233 页)