

专论与综述

菌寄生真菌分子生物学研究进展

李 多 川

(山东农业大学植保系 泰安 271018)

关键词 菌寄生真菌, 植物病害, 分子生物学

分类号 Q939.5

菌寄生真菌(mycoparasites)是一类具有重要理论和应用价值的真菌。它们不仅对植物病害有防治潜力,而且对阐明生物间的寄生现象及信号传递有重要意义。近几年,菌寄生真菌的研究有较大进展,重点有两个方面。一个属理论研究领域,研究方向集中在菌寄生真菌与寄主真菌相互识别的分子机制;另一个属应用研究领域,集中在菌寄生真菌产生的细胞壁降解酶的调节、纯化、基因克隆以及外源细胞壁降解酶基因转入菌寄生真菌中等方面。本文论述如下。

1 菌寄生真菌与寄主真菌相互识别的分子机制

生物间相互识别的分子基础是当今生命科学研究的热门,也是生物间相互关系研究中的焦点和难点。菌寄生(mycoparasitism)是菌寄生真菌与寄主真菌间的一种寄生方式,是自然界普遍存在的一种真菌与真菌之间的相互作用。目前,国外学者已对死体营养菌寄生真菌(necrotrophic mycoparasites)和活体营养菌寄生真菌(biotrophic mycoparasites)与它们的寄主真菌之间相互识别的分子机制进行了研究。

Elad等^[1]选择死体营养菌寄生真菌哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*)和钩状木霉(*T.hamatum*)与寄主真菌作为研究的模式系统,首次证明寄主真菌立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)细胞表面的凝集素在识别中起作用。他们将O型血红细胞加到培养有哈茨木霉和钩状木霉与立枯丝核菌的赛璐玢膜上发现,血红细胞可吸附在立枯丝核菌的菌丝表面,而不吸附在哈茨木霉和钩状木霉的菌丝表面;也可以吸附到纯培养的立枯丝核菌菌丝表面上。吸附作用可被20mM墨角藻糖溶液所抑制。利用B型大肠杆菌代替血红细胞进行

实验证明,B型大肠杆菌可吸附在立枯丝核菌的菌丝表面上。制备的立枯丝核菌凝集素可以使B型大肠杆菌凝集,20mM墨角藻糖溶液可显著抑制凝集反应。标记的对墨角藻糖特异性结合的凝集素可与哈茨木霉的菌丝和孢子结合,说明哈茨木霉细胞壁上存在墨角藻糖。Barak等^[2]利用死体营养菌寄生真菌哈茨木霉和钩状木霉与寄主真菌齐整小核菌(*Sclerotium rolfsii*)同样证明,寄主真菌齐整小核菌细胞表面的凝集素在识别中起作用,并利用分子筛层析的方法纯化了这种凝集素^[3]。它是一种糖蛋白,对B型大肠杆菌有凝集作用,20mM葡萄糖和甘露糖溶液可抑制凝集反应。当该凝集素与蛋白酶和 β -1,3-葡聚糖酶作用后,凝集反应受到抑制,表明凝集素中的蛋白质残基和糖残基可能参与凝集反应。Inbar和Chet^[4]将纯化的齐整小核菌凝集素结合到尼龙纤维上,有寄主真菌凝集素的尼龙纤维表现寄主真菌菌丝的作用。菌寄生真菌哈茨木霉菌丝可以特异性地缠绕在这种尼龙纤维上,进一步证明了凝集素在识别中的作用。

Manocha和Chen^[5]选择吸器性活体营养菌寄生真菌(biotrophic haustorial mycoparasite) *Piptocephalis virginiana*与寄主真菌细小被孢霉(*Mortierella pusilla*)为研究体系,证明寄主真菌细胞表面的两种糖蛋白分子(b和c)在识别中起重要作用。这两种糖蛋白分子具有凝集素的作用,它们同时存在对菌寄生真菌*P. virginiana*萌发的孢子具强的凝集力;当缺乏它们或它们单独存在时,凝集力显著下降。葡萄糖和N-乙酰胺

国家自然科学基金资助(39700097)

1997-10-24收稿

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

基葡萄糖可抑制凝集反应。制备的凝集素 b 和 c 的多克隆抗体,能有效地抑制 *P. virginiana* 吸附在细小被孢霉菌丝的表面上。利用标记的对 N-乙酰氨基葡萄糖和葡萄糖特异性结合的凝集素探针技术,证明菌寄生真菌 *P. virginiana* 细胞表面存在 N-乙酰氨基葡萄糖和葡萄糖等糖分子^[6]。

根据上述研究结果,Manocha 和 Sahai^[6]正式提出菌寄生真菌与寄主真菌相互识别的凝集素——糖 (agglutinin or lectin-carbohydrate) 相互作用模型。他们认为寄主真菌细胞表面的凝集素与菌寄生真菌细胞表面的糖分子(可能与蛋白质结合)的特异性结合,使寄主与寄生物达到相互识别的作用。这个模型已得到一些学者的承认^[7,8]。

2 菌寄生真菌细胞壁降解酶的基因克隆

在菌寄生真菌与寄主真菌的相互作用中,菌寄生真菌产生的细胞壁降解酶(如几丁质酶、葡聚糖酶、蛋白酶)起重要作用。一方面,它们参与菌寄生真菌侵染寄主真菌的过程。死体营养菌寄生真菌产生细胞壁降解酶,消解和杀死寄主真菌,从而获得营养;吸器性活体营养菌寄生真菌侵入寄主真菌时,产生细胞壁降解酶,消解寄主真菌细胞壁,以有助于侵入。另一方面,菌寄生真菌产生的细胞壁降解酶对植物病原真菌的孢子萌发、芽管伸长和菌丝生长有强烈抑制作用。这种直接的抗菌作用,能够用于病害的生物防治。鉴于以上两方面的意义,一些学者已对菌寄生真菌产生的几丁质酶、葡聚糖酶和蛋白酶等细胞壁降解酶进行了研究。

菌寄生真菌可产生三种类型的几丁质酶:N-乙酰-β-氨基葡萄糖苷酶、内切几丁质酶和外切几丁质酶或几丁二糖酶。目前已从哈茨木霉的不同菌株中分离纯化出 N-乙酰-β-氨基葡萄糖苷酶、内切几丁质酶和外切几丁质酶^[8]。最近来自菌寄生真菌哈茨木霉 PI 菌株中的两种内切几丁质酶基因已被克隆。Hayes 等^[9]从哈茨木霉 PI 菌株中分离出 CHIT42 的 cDNA,它具有 1554 个 bp,编码具有 424 个 AA 的蛋白质。推导的成熟几丁质酶的分子量为 42.66kw,接近从该菌株中纯化的几丁质酶的分子量(41ku)。Garcia 等^[10]也克隆了编码 CHIT43 的基因。通过对它编码的几丁质酶 N-端 AA 序列分析和与推导的核酸序列分析表明,该基因编码的几丁质酶具有一个 34 个 AA 的信号肽,它在转录后被切除。cDNA 序列与染色体基因序列比较发现,该基因

有 3 个内含子、3' 端的 209bp 的非翻译区和 240bp 的启动子区。这个基因的 cDNA 在 *E. coli* 中可以表达^[11]。Limon 等^[12]从哈茨木霉 CECT2413 菌株中分离出 CHIT33 的 cDNA,它编码 321 个 AA 的蛋白质,具 10 个 AA 的信号肽。该基因在染色体基因组中好像是单拷贝的。

菌寄生真菌产生的葡聚糖酶在菌寄生中的作用已得到证明。菌寄生真菌哈茨木霉 PI 菌株的内切型 β-1,3-葡聚糖酶,分子量为 78ku,纯化的酶对灰葡萄孢 (*Botrytis cinerea*) 孢子萌发和芽管伸长有强烈的抑制作用。菌寄生真菌哈茨木霉 CECT2413 菌株的一种内切型 β-1,6-葡聚糖酶,分子量为 43ku,它对多种植物病原真菌的生长有抑制作用^[8]。目前仅有一种菌寄生真菌的 β-葡聚糖酶基因被克隆。Lora 等^[13]从哈茨木霉 CECT2413 菌株中分离和克隆了内切型 β-1,6-葡聚糖酶的 cDNA。

菌寄生真菌产生的蛋白酶研究很少。Geremia 等^[14]从哈茨木霉 IM206040 菌株中鉴定了一种丝氨酸蛋白酶,证明它与菌寄生过程有关。Geremia 等^[14]已将这种丝氨酸蛋白酶基因克隆。目前,尚未见到菌寄生真菌蛋白酶纯化的报道。

3 外源细胞壁降解酶基因在菌寄生真菌中的表达

为了提高菌寄生真菌防治植物真菌病害的效果,一些学者已将一些外源细胞壁降解酶基因克隆到菌寄生真菌中。*Serratia marcescens* 是一种细菌,产生的几丁质酶可引起齐整小核菌菌丝的迅速消解。Haran 等^[15]用带有 *S. marcescens* 几丁质酶基因的 p^{SL3} 质粒和带有 amds 标记的质粒 p^{3SR2} 对哈茨木霉的原生质体进行共转化,得到了克隆有 *S. marcescens* 几丁质酶的转化菌株。与野生型菌株相比,该转化菌株对齐整小核菌有较大的抑制作用。

4 菌寄生真菌细胞壁降解酶的诱导

菌寄生真菌细胞壁降解酶除组成性酶外,多数属诱导性酶。该类酶的诱导主要有 3 种方式^[8]:(1)底物诱导 众多的研究证明,几丁质、纯化的真菌细胞壁和葡聚糖可诱导菌寄生真菌细胞壁降解酶的产生。(2)寄主真菌诱导 当菌寄生真菌哈茨木霉和钩状木霉寄生在寄主真菌齐整小核菌和立枯丝核菌菌丝上时,寄主真菌可诱导菌寄生真菌产生几丁质酶、葡聚糖酶和蛋白酶。Inbar

和 Chet^[7]研究了菌寄生真菌哈茨木霉与寄主真菌齐整小核菌在菌寄生过程中几丁质酶的动态变化。在接触之前,两种真菌均有组成性 β -1,4-乙酰胺基葡萄糖苷酶;接触之后,齐整小核菌的几丁质酶活性消失,而哈茨木霉的N-乙酰胺基葡萄糖苷酶(CHIT102)活性显著增加;随着寄生关系的发展,CHIT102活性减少,而CHIT73活性产生,并在48小时时活性达到最高。(3)凝集素诱导 Inbar 和 Chet^[7]利用寄主真菌齐整小核菌的纯化凝集素证明,该凝集素可以诱导菌寄生真菌哈茨木霉的CHIT102几丁质酶产生,与用寄主真菌齐整小核菌诱导的几丁质酶情形是一致的。他们认为,寄主真菌诱导菌寄生真菌产生细胞壁降解酶是寄主真菌的凝集素与菌寄生真菌细胞表面的糖分子(糖蛋白)相互识别的结果,同时寄主真菌的凝集素也是菌寄生真菌细胞壁降解酶产生的信号分子^[8]。我们提出利用寄主真菌凝集素防治植物病害的设想。由于寄主真菌凝集素可以诱导菌寄生真菌细胞壁降解酶的产生,如果我们利用生物技术大量生产出这种凝集素,它诱导菌寄生真菌产生细胞壁降解酶,这些酶消解和杀死寄主真菌和植物病原真菌,从而达到防治植物病害的目的。

参 考 文 献

[1] Elad Y, Barak R, Chet I. *J Bacterol*, 1983,154:

1431~1435.

- [2] Barak R, Elad Y, Mirelman D, *et al.* *Phytopathology*, 1985,77:458~462.
- [3] Barak R, Chet I. *J Appl Bacterol*, 1990,69:101~112.
- [4] Inbar J, Chet I. *J Bacterol*, 1992,174:1055~1059.
- [5] Manocha M S, Chen Y. *Can J Microbiol*, 1991,37:377~383.
- [6] Manocha M S, Sahai A S. *Can J Microbiol*,1993,39:269~275.
- [7] Inbar J, Chet I. *Microbiology*,1995,141:2823~2829.
- [8] Haran S, Schickler, H, Chet I. *Microbiology*, 1996,142:2321~2331.
- [9] Hayes C K, Klemsdal S, Lorito M, *et al.* *Gene*, 1994,138:143~148.
- [10] Garcia I, Lora J M, De La Cruz J, *et al.* *Curr Genet*,1994,27:83~89.
- [11] Carsolio C, Gutierrez A, Jimenez B, *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994,91:10903~10907.
- [12] Limon M C, Lora J M, Garcia I, *et al.* *Curr Genet*, 1995,28:478~483.
- [13] Lora J M, De La Cruz J, Llobell A, *et al.* *Mol Gen Genet*, 1995,247:639~645.
- [14] Geremia R, Goldman G H, Jacobs D, *et al.* *Mol Microbiol*, 1993,8:603~613.
- [15] Haran S, Schickler H, Peer S, *et al.* *Biol Control*, 1993,3:101~108.