

植物病原真菌黑色素与致病性关系的研究进展*

曹志艳 杨胜勇 董金皋**

(河北农业大学真菌毒素实验室 保定 071001)

摘要: 黑色素是一类生物聚合分子的总称, 不同来源的黑色素种类不同, 其中报道较多的是 DOPA 黑色素和 DHN 黑色素。DOPA 黑色素和 DHN 黑色素具有相似的理化性质但其合成底物和途径不同。DHN 黑色素在植物病原真菌中广泛存在, 与病原菌致病能力密切相关。病原菌侵染寄主时黑色素沉积在附着胞细胞壁的内层, 防止了形成膨压的溶质渗透到细胞外, 产生很大的机械压力, 保证病原菌侵入寄主。结合作者的研究结果综述了黑色素的种类、性质及黑色素与病原菌致病性关系等方面的研究进展。

关键词: 黑色素, 附着胞, 侵染能力, 致病性

中图分类号: S435.111 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 01-0154-05

A Review on Relations Between Pathogenicity and Melanin of Plant Fungi*

CAO Zhi-Yan YANG Sheng-Yong DONG Jin-Gao**

(Mycotoxin Laboratory, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001)

Abstract: Melanin is formed by oxidative polymerization of phenolic compounds, basically different kinds of melanin come from different organisms. DOPA melanin and DHN melanin have same physical and chemical characters although they have different biosynthetic pathway. DHN melanin is common in plant fungi and plays an important role on infection. The melanin accumulates in the fungal cell walls and prevents organic and inorganic molecules penetrating out, that insures appressorium's pressure and infection ability. This paper has reviewed the kinds and characters, especially discussed the role of melanin during pathogen infection based on our some research.

Key words: Melanin, Appressorium, Infection ability, Pathogenicity

黑色素 (melanin) 是一类广泛存在于动植物和微生物体内的非均质的类多酚聚合体^[1], 按其合成底物和中间产物的不同可将黑色素分成不同的类别。不同种类黑色素的性质和作用具有很大的相似性, 红外光谱扫描图中具有特征吸收峰。研究表明, 黑色素与许多以机械力侵入寄主的病原菌致病能力密切相关, 缺乏黑色素生成的突变菌株因缺乏足够的膨压而丧失致病能力。黑色素除在病原真菌侵入寄主过程中起作用外, 还能赋予生物体某些特殊防御作用, 如外表修饰、抗辐射、抗氧化、清除自由基等多种功能^[1]。

1 黑色素的种类及生物合成

经对生物体中黑色素合成途径进行的研究表明, 黑色素按其中间产物可分为 4 种: γ -谷氨酰胺酰-3, 4-对苯二酚 (GDBH), 儿茶酚, 多巴 (DOPA), 二羟萘 (DHN)^[2]。

* 国家自然科学基金项目 (No. 30471126)

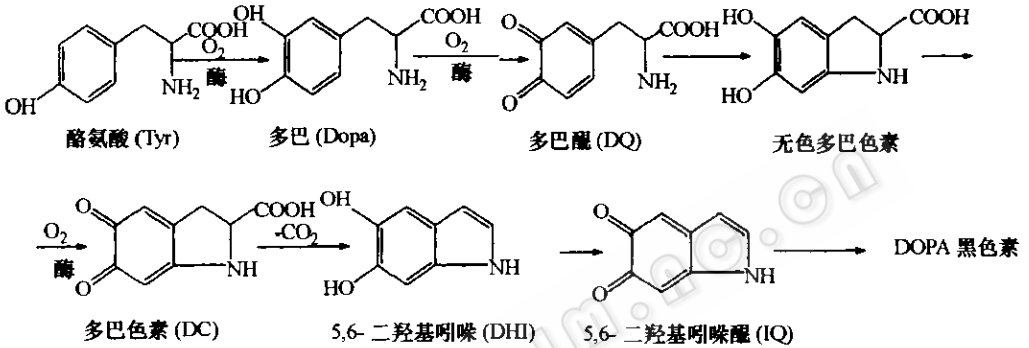
河北省自然科学基金项目 (No. 303208)

** 通讯作者 Tel: 0312-7528266, E-mail: dongjg@21cn.com

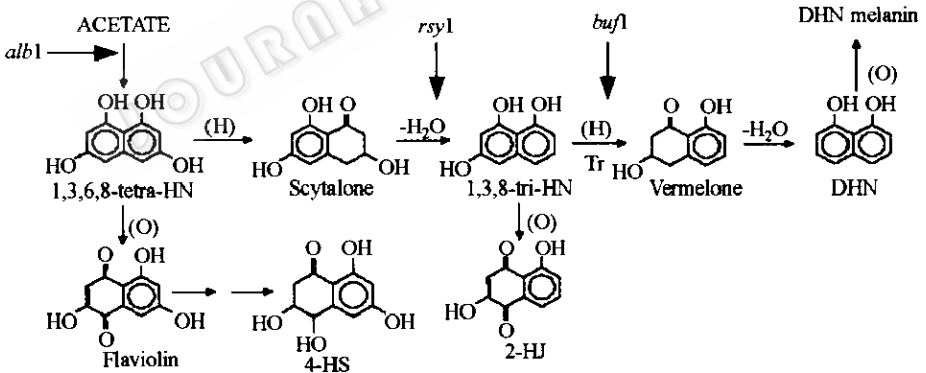
收稿日期: 2005-05-17, 修回日期: 2005-07-05

DOPA 黑色素以酪氨酸为底物，在酪氨酸酶作用下启动一系列生化反应，最终合成黑色素。DHN 黑色素在子囊菌亚门和半知菌亚门真菌中广泛存在，醋酸盐在 *alb1* 基因产物多聚酮 (polyketide) 合成酶的作用下合成羟萘 (4HN)，通过 NADH 作用还原成 scytalone (SCY)，再在 SCY 脱水酶 (由 *rsy1* 基因编码产物) 作用下脱水转化成三羟萘 (3HN)，然后在 *buf1* 基因所编码的酶产物作用下，即依赖于 NADPH 脱氢酶，以 3HN 为底物还原成 Vermelone (VER)，VER 经脱水成二羟萘，最后合成多聚二羟黑色素^[3]。PDA 培养基中添加淡黄霉素和 scytalone (生成 DHN 黑色素的两种主要的中间物质)，培养缺乏产 DHN 黑色素的白化突变菌株，该突变株能够恢复产黑色素的能力，菌落成黑色^[2]。

DOPA 黑色素合成过程^[4]：



DHN 黑色素合成过程^[5]：



人们对黑色素形成的有关酶基因研究十分关注。Chumhey 和 Valent^[6] 采用突变体分离到 *alb1*、*rsy1* 和 *buf1* 3 个基因，它们编码的二羟萘酚 (DHN) - 黑色素合成酶对合成 DHN 黑色素起着关键作用，丧失上述任何一个基因，都会使黑色素形成的能力丧失。

我们在研究中发现，玉米大斑病菌菌株 01-23 与菌株 01-24 的黑色素红外光谱图一致，但与乌贼墨汁黑色素 (具有 DOPA 黑色素特性) 有差异。乌贼墨汁黑色素：3,300 ~ 3,400 cm^{-1} 吸收峰为吲哚的 NH 伸缩振动峰；1,600 ~ 1,620 cm^{-1} 附近强吸收峰 (特征吸收峰) 为 C = C 的伸缩振动峰。玉米大斑病菌黑色素：3,400 cm^{-1} 处吸收峰为聚合物中-OH 吸收峰，2,900 ~ 2,930 cm^{-1} 强吸收峰，2,810 ~ 2,860 cm^{-1} 和 1,450 ~ 1,460 cm^{-1} 处吸收

峰为脂肪族 C-H 伸缩振动峰, $1,700 \sim 1,980\text{cm}^{-1}$ 的弱吸收峰代表芳香环振动峰, 与文献^[2]报道的 DHN 黑色素吸收峰一致。而 GDBH 黑色素在 $1,100\text{cm}^{-1}$ 处有特征峰。在培养玉米大斑病菌的 PDA 培养基中加入浓度为 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ 的三环唑(专一抑制 DHN 黑色素形成), 能够有效的抑制玉米大斑病菌黑色素生成。说明玉米大斑病菌黑色素的合成属于 DHN 途径。

2 黑色素的性质

黑色素(melanin)在细菌、真菌及动植物体内均能产生,属高分子量的化合物,为非均质的类多酚聚合物,扫描电镜下观察其结构为无定形小颗粒(图1)。

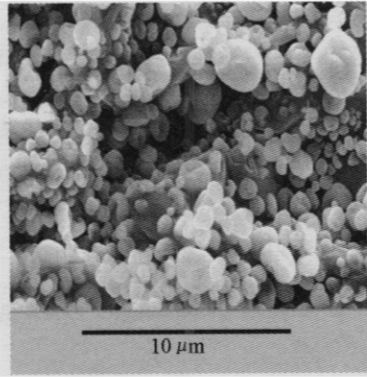


图1 乌贼墨汁黑色素(购于Sigma公司)
扫描电镜照片($\times 4,800$)

微生物所产生的黑色素主要分为胞内和胞外黑色素。当前,研究微生物胞外分泌黑色素的报道比较多。彭方^[7]等从土壤中筛选得到一株产黑色素能力高、快而且产量大的 T1 菌株。段晓红^[8]等用固定化细胞方法固定产酪氨酸酶的细菌,以酪氨酸为底物生产黑色素获得成功。

本实验室对玉米大斑病菌胞内黑色素进行理化性质研究时发现,玉米大斑病菌黑色素与 Sigma 公司生产的乌贼墨汁黑色素、酪氨酸人工合成黑色素(DOPA)具有相近的

理化性质,见表1。

表1 玉米大斑病菌黑色素与乌贼墨汁黑色素、DOPA 黑色素理化性质比较

性质	01-23 胞内 黑色素	01-24 胞内 黑色素	乌贼墨汁 黑色素	DOPA 黑色素
水溶性	-	-	-	-
1mol/L KOH (100℃)	+	+	+	+
有机溶剂(乙醇、甲苯、丙酮)	-	-	-	-
10% NaClO 漂白	+	+	+	+
30% H ₂ O ₂ 漂白	+	+	+	+
7mol/L HCl 沉淀	+(pH=2)	+(pH=2)	+(pH=2)	+(pH=2)
紫外光区吸收峰	+ 217nm	+ 218nm	+ 219nm	+ 219nm
可见光区吸收峰	-	-	-	-
LogOD 值对波长作图所得直线斜率	-0.0028	-0.0030	-0.0030	-0.0029

注: + 表示反应或存在吸收峰, - 表示不反应或不存在吸收峰

3 DHN 黑色素与病原菌致病性的关系

植物病原真菌能够成功侵入寄主组织并在寄主组织中生长繁殖是其致病的基本条件,生物间经过长期的协同进化,形成了多样而复杂的互作机制。许多真菌可以形成明显的有黑色素的侵染细胞,其侵染寄主的机制以直接机械侵入为主,细胞壁降解酶

对细胞的软化作用为辅^[9]。

许多真菌黑色素由多聚二羟萘(DHN)所组成,它是戊二酮生物合成途径的末端产物^[3]。研究表明,对于许多植物病原真菌来讲,DHN黑色素都被认为是重要的毒力因子,因为已经黑色素化的附着胞外壁可以使病菌积累足够的膨压穿透寄主细胞^[10]。在孢子侵入前,大量的黑色素沉积在附着胞细胞壁的内层,形成一黑色素层(图2)^[12],使细胞壁上的孔径小于1nm,仅允许水分子等小分子物质通过,而甘油等有机分子不能透过细胞壁,防止了形成膨压的溶质渗透到细胞外,产生很大的机械压力,这在梨黑星病菌(*Venturia inaequalis*)和大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae*)中均有报导^[9]。附着胞其小孔与基物表面相接触使得小孔成为病菌与基物进行大量的物质信息交流的窗口,这种状况对以后附着胞侵染寄主,与寄主建立寄生关系是极为重要的。对于以机械力侵染寄主组织的病原菌来说,没有黑色素就没有正常附着胞,黑色素缺乏的突变菌株附着胞缺少足够的膨压侵入寄主的表皮,即附着胞就会丧失侵入能力,最终使得病原菌丧失致病性^[11]。因此产生黑色素是病菌具有致病性和侵入寄主的前提。

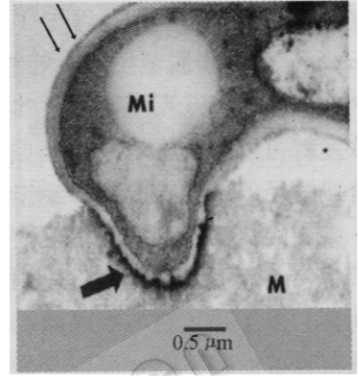


图2 *Microsphaeropsis ochracea* 透射电镜照片^[12]

许多真菌,如稻瘟病菌(*Pyricularia oryzae*)和瓜类炭疽病菌(*Colletotrichum orbiculare*)侵染时产生的附着器必须经黑色素化才具有侵染能力;禾谷炭疽病菌也产生与稻瘟病菌相似的黑色素附着胞,Bechinger^[12]等测量了禾谷炭疽病菌侵入栓产生的压力,禾谷炭疽菌附着胞的直径约为7μm~9μm,而穿透植物表皮的侵染栓仅有2μm。Chida和Sisler在1987就确定了稻瘟病菌黑色素缺乏的突变菌株因缺乏足够的机械力而不能穿透寄主组织;Hignett和Kirkham证实了黑色素与苹果黑星病菌在苹果组织中的侵入和生长密切相关;Smereka等人在研究苹果黑星病菌与苹果叶片组织相互作用的过程中发现在病菌附着胞壁中积累着一层黑色素。Kim^[16]等近期研究发现黑色素可以加固细胞壁,提高分生孢子和菌丝对寄主免疫系统的抵抗力,增强了病原菌的侵染能力。

4 黑色素的作用

黑色素不仅与真菌致病力密切相关,保证病原菌附着胞产生足够的膨压穿透寄主组织,还能作为紫外线吸收剂、抗氧化剂和新型天然药物载体,是目前所知的唯一保护生物体免受辐射伤害的天然内源生物聚合物^[13]。黑色素已被用作苏云金芽孢杆菌(Bt)光保护剂,使其免受阳光紫外线的损害,延长杀虫时效。最近研究发现,黑色素能有效地清除活性氧自由基,保护生物大分子如DNA免受氧化损伤^[14]。黑色素对菌丝的生长和繁殖不起作用,但它可以加强真菌在不良环境条件下的生存和竞争能力,保护微生物免受紫外线和溶菌酶等的作用^[15],与真菌的抗逆性、缓冲外界逆境(温度过高过低、光线过强过弱等)对细胞的伤害有关。

5 DHN 黑色素合成的抑制因子

alb1、*rsy1* 和 *buf1* 基因编码二羟萘酚-黑色素合成酶^[6]，它们的任何单基因突变子都形成不含黑色素的附着胞。三环唑 (tricyclazole) 等农药可以抑制 *buf1* 基因所编码的酶的活性，附着胞经三环唑处理后甘油的浓度明显低于野生型，使附着胞丧失穿透能力的高膨压，病原菌丧失致病性，但其本身对病原菌的毒性很小。已报道三环唑可以抑制 DHN 黑色素形成过程中 1, 3, 6, 8-4 羟基萘到 scytalone、1, 3, 8-3 羟基萘到 Vermelone 的两步脱氢反应，能够有效专一地防治稻瘟病菌^[16]，是黑色素的生物合成抑制剂。本实验室采用不同浓度的黑色素培养玉米大斑病菌，结果发现，10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的三环唑浓度就可以抑制玉米大斑病菌黑色素的产生，且对菌落生长的影响很小。黑色素生物合成途径的特异抑制剂已经作为农药，用于防治可形成黑色素附着胞的真菌病害。

常用的化学药剂防治植物真菌病害，不仅污染了环境也增大了病原菌的抗药性，尤其是一些化学农药的盲目使用会加强病原菌附着胞的黑化程度^[2]，给寄主带来更大的伤害。由于黑色素与病原菌的致病性密切相关，而且病原菌中黑色素与动植物体内黑色素合成途径不同，可以开发生物病原菌黑色素特定抑制剂来防治真菌病害。因此，明确黑色素种类及其生化合成途径和调控机制，研究在基因水平上对附着胞机械穿透力进行调节，可为真菌病害防治和新型杀真菌剂的研制奠定基础。

参考文献

- [1] 李建波, 宋欣, 曲音波. 微生物学通报, 2004, 31 (1): 50~54.
- [2] Souad E B, Nicole B, Odile C. Can J Microbiol, 2002, 48: 349~358.
- [3] 林福呈. 植物病理学报, 2001, 31 (5): 97~101.
- [4] Kim L, Martin S, Bernhard J, et al. Fungal Genetics and Biology, 2003, 38: 143~158.
- [5] Tea L R, Michael H W. Can J Microbiol, 2003, 49: 110~119.
- [6] Chumley F G, Valent B. Molecular Plant-microbe Interaction, 1990, 3: 135~143.
- [7] 彭方, 王伟, 彭珍荣. 氨基酸和生物资源, 1996, 4: 1~4.
- [8] 段晓红, 毛歆, 彭珍荣. 武汉大学学报, 1997, 2: 249~253.
- [9] 王洪凯, 林福呈, 王政逸. 菌物学报, 2004, 23 (1): 151~157.
- [10] Tina K, Michael H W, Tea L R, et al. FEMS Microbiology Letters, 2004, 232: 203~209.
- [11] 林福呈, 李德葆. 微生物学通报, 1997, 24 (3): 167~170.
- [12] Bechinger C, Giebel K F, Schnell M, et al. Science, 1999, 285: 1896~1899.
- [13] 倪丽娜. 微生物学通报, 2004, 31 (1): 55~59.
- [14] 李晓燕, 刘志洪, 王鹏, 等. 武汉大学学报, 2003, 49 (6): 693~696.
- [15] Jung K L, Hyung M J, Sang Y K. Applied and environmental microbiology, 2003, 69 (6): 3427~3424.
- [16] 张传清, 周明国, 薛娜. 中国水稻科学, 2005, 19 (1): 79~84.