

内生真菌香柱菌及其次级代谢

刘 钢

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

Fungal Endophyte-*Epichloe* and Its Secondary Metabolites

Liu Gang

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

关键词: 内生真菌, 香柱菌, 次级代谢

中图分类号: Q939 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2003)01-0132-06

两千年以前人们就已经知道一些牧草对牲畜等动物有毒。1904 年 Freeman 从这些牧草中分离到了一类内生真菌, 后被称为 *Neotyphodium occultans*, 人们才知晓造成这些动物中毒的真正元凶恰恰是这类微生物^[1]。在 20 世纪 30 年代 Sampson 对一些植物的内生真菌作了比较性研究^[2], 这些内生真菌包括 *Neotyphodium lolii* 和香柱菌属(*Epichloe*) 的一些种, 其中香柱菌可以导致一些草类干死病(choke)。而在大多数情况下, 香柱菌及其相关的内生真菌长期生存于它们的宿主植物中, 并不使宿主致病。但真正引起人们对香柱菌重视的原因是 20 世纪 30 年代在美国发生的大批牲畜因误食一些牧草导致中毒死亡的事件。Bacon 在 1977 年指出造成牲畜中度过死亡的原因是和这些牧草共生的一类内生真菌, 被称为 *E. typhina*^[3] 现称为 *N. coenophialum*^[4]。进一步研究发现, 这类内生真菌产生的麦角缬氨酸(ergovaline)等次级代谢物可以使牲畜中毒以致死亡。以后又陆续发现 *N. lolii* 产生吲哚双萜(indolediterpene)类生物碱, 它是引起黑麦草眩晕病(stagger)的主要原因^[6]。随着对内生真菌的深入研究, 人们发现内生真菌产生的这些次级代谢物尽管有些对牲畜有害, 但对宿主植物却大有益处^[6]。这些次级代谢物不仅可以帮助宿主植物抗病虫害, 而且还有利于植物抗旱^[7]。从 20 世纪 90 年代, 人们开始对内生真菌的生态、分布、进化及遗传等进行广泛的研究。

1 香柱菌的生活史

香柱菌属于麦角菌科(Clavicipitace), 它与 Pooidae 亚门中的大多数草类有共生的关系。香柱菌包括有性世代的香柱菌和无性世代的 *Neotyphodium*^[8]。

香柱菌在共生状态下, 主要存在于宿主植物的细胞间隙或是存在于宿主植物的表皮层^[9]。香柱菌不进入宿主植物细胞, 常年与宿主植物和平相处。香柱菌有时会在宿主特定的发育阶段形成子座或菌核, 并经子囊孢子感染其它植物的花和胚珠。

大多数寄生或共生的真菌都有特定的附属器官用来从宿主细胞获取生存所需的营养, 如附属胞等。但是香柱菌不产生这类器官, 它们的生长完全被限定在宿主细胞间隙^[9]。这样一来就使它们必须有一种特殊的方式来从宿主细胞摄取必须的养分。实验表明, *E. festucae* 可以分泌一种酶, 它能使蔗糖转化为六碳糖, 从而吸收入体内^[10]。香柱菌还能够分泌一种类似于枯草杆菌蛋白酶的物质, 它可以降解宿

作者简介: 刘 钢(1970-)男, 吉林省吉林市人, 中国科学院微生物研究所副研究员, 主要从事微生物发育分化及次级代谢工作。E-mail: liugang2@hotmail.com

收稿日期: 2002-04-09, 修回日期: 2002-07-26

主植物细胞壁蛋白,从而来满足内生真菌自身蛋白及其他代谢的需要^[11]。据推测这种物质还可能影响宿主细胞膜,使宿主细胞内的营养成分渗漏到细胞间隙,从而使香柱菌可以充分获取生长所需的各种养分。研究表明,*E. festucae* 在其宿主植物内过量的生长会导致宿主植物严重的发育障碍和黄化^[12],所以在宿主植物内,香柱菌的生长是受严格控制的。在成熟的宿主植物组织内,香柱菌不再生长。这种精确的调控机制有待于进一步阐明。

香柱菌在同一宿主植物中可以用有性方式进行水平传代,也可以用更为有利的无性方式进行垂直传代(图略),无性世代的 *Neotyphodium* 只具有垂直传代方式^[8]。由于香柱菌主要存在于宿主植物花的分生组织、胚珠、种子以及感染了母本植物的果实中,当宿主植物子实体萌发开始生长后,存在于子实体组织间的香柱菌菌丝开始和子实体一同生长,并且存在于该宿主植株的整个生命过程中。在以后的萌芽中,菌丝继续生长,以保证香柱菌在宿主植物中有条不紊的生存。因而存在于同一宿主内的香柱菌就可以借着宿主植物的子实体进行垂直传代。但要感染一个新的宿主系统,则必须通过外在的孢子,香柱菌主要通过子囊孢子进行水平传代。香柱菌的子囊孢子产生于位于宿主植物旗叶周围的香柱菌子座。香柱菌的子座只产生于未成熟的花序及相邻组织周围。一旦香柱菌的子座产生,分蘖的花序就不再生长,因而水平传代的香柱菌常常导致宿主植物的干死病。经苍蝇在香柱菌雌性子座和雄性子座之间作传递,导致子囊孢子的产生,子囊孢子再去感染相邻的健康植物的花,从而完成香柱菌的水平传代。

2 香柱菌的次级代谢

香柱菌以及它的无性世代 *Neotyphodium* 与 C3 类草本植物的共生关系使宿主植物受益^[6]。香柱菌可以使其宿主植物免受有机或无机环境的破坏。研究表明,香柱菌可以帮助其宿主植物防御食草动物、线虫和食草昆虫的吞噬^[13],同时还增强宿主植物的抗旱能力。研究进一步表明,香柱菌的这些能力是与其次级代谢相关的。香柱菌主要产生四种生物碱类次级代谢物,它们分别是:麦角碱(ergot)类生物碱、黑麦震颤素(lolitrems)类生物碱、黑麦草碱(loline)类生物碱和波胺(peramine)^[14]。

2.1 麦角碱类次级代谢物

半数以上的香柱菌在与草类共生的条件下产生麦角碱类次级代谢物。这些代谢物都具有麦角灵环,包括田麦角碱、麦角灵酸和麦角酸等衍生物^[15]。麦角碱类物质对啮食动物有毒,它们可以使牲畜出现体重下降、发烧、血流缓慢、长期不育和产奶量下降等症状。高含量的麦角碱对昆虫也有杀伤作用^[6]。

香柱菌中麦角碱的生物合成研究得利于人们对 *Claviceps purpurea* 中麦角碱生物合成的研究^[15]。在 *C. purpurea* 中,来自初级代谢的甲羟戊酸作为麦角碱的最初底物。由甲羟戊酸形成的二甲基丙烯焦磷酸和色氨酸在二甲基丙烯转移酶(DMATase)的作用下形成二甲基丙烯色氨酸。再经甲基化作用,闭环形成裸麦角碱。裸麦角碱进一步环化形成田麦角碱。其后通过氧化、异构化、酰氨化的不同的作用形成麦角碱类的不同代谢衍生物(图1)。

人们已在 *C. purpurea* 中发现了二甲基丙烯转移酶(DMATase),并成功地克隆了该基因(*dmaW*)^[16]。Wang等^[17]以 *C. purpurea* 的 *dmaW* 为探针,在 *E. festucae* 中克隆到了 *dmaW* 的类基因,说明在香柱菌中麦角碱生物合成是与 *C. purpurea* 中的合成相类似。

研究表明,麦角碱在香柱菌中的生物合成是受香柱菌及其宿主植物的共同调控^[18]。然而,同一香柱菌内生真菌在不同的宿主植物中麦角碱的产量可以相差4倍。这种内生真菌/宿主的共同调控机制还有待阐明。

2.2 黑麦震颤素类次级代谢物

黑麦震颤素是属于吲哚双萜(Indole diterpene)类生物碱,主要由 *N. lolii* C 产生,是导致黑麦草眩晕症的主要原因。其中,黑麦震颤素 B 是研究得最多的一类次级代谢物^[19]。

据推测,黑麦震颤素的生物合成与麦角碱的生物合成相类似,以色氨酸作为黑麦震颤素的基本组成部分。由色氨酸和牻牛儿焦磷酸形成雀稗麦草素。雀稗麦草素经氧化和羟甲基化形成普鲁霍素。一般认

为,从蕈青霉素到黑麦震颠素 B 存在有 paxitriol, lolitriol 和黑麦震颠素 E 等代谢中间物(图 2)。其中,雀稗麦草素的合成被认为是整个黑麦震颠素 B 生物合成的关键。

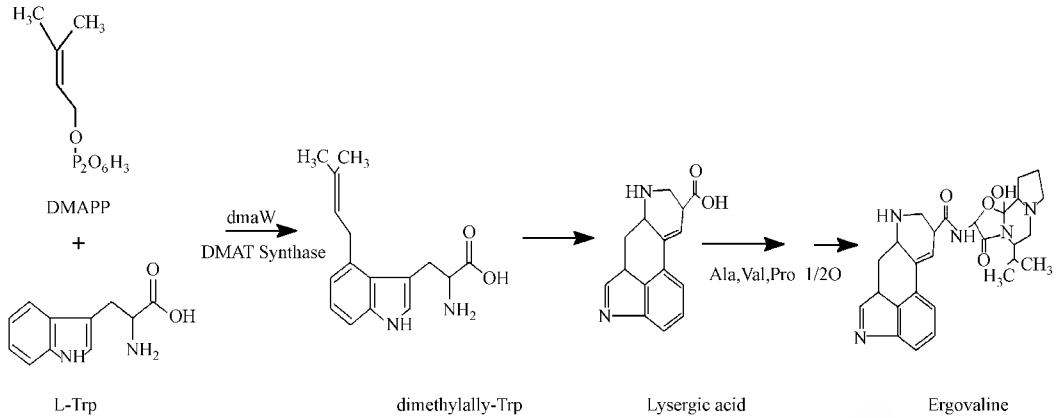


图 1 麦角缬氨酸可能的生物合成途径

由于最近 Young 等从非内生真菌 *Penicillium paxilli* 中成功地克隆到了吲哚双萜的生物合成基因,这就为在香柱菌中克隆相应的基因提供了条件^[20]。同时新西兰的一个研究组也在 *E. festucae* 基因组上找到了一个与黑麦震颠素 B 生物合成相关的遗传位点。

2.3 波胺生物碱次级代谢物

在香柱菌所产生的四种生物碱类次级代谢物中,波胺是最简单的一种。波胺属于吡咯吡嗪类生物碱,也是目前在香柱菌中发现的唯一的吡咯吡嗪类生物碱。波胺对昆虫具有杀伤作用,但对牲畜等脊椎动物无毒^[19]。

从化学组成上看,波胺分子包含一个亲脂性的吡咯吡嗪异源环和一个亲水的侧链。据推测,波胺是由脯氨酸和精氨酸在一个具有多功能域的肽聚合酶的作用下再经环化及缩合反应形成的(图 3)。波胺的具体生物合成途径还有待阐明。

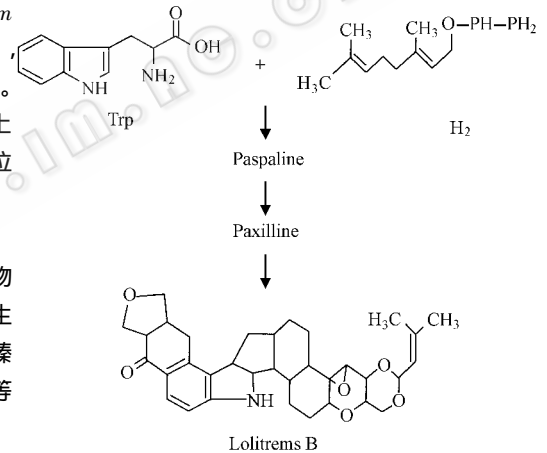


图 2 黑麦震颠素 B 可能的生物合成途径

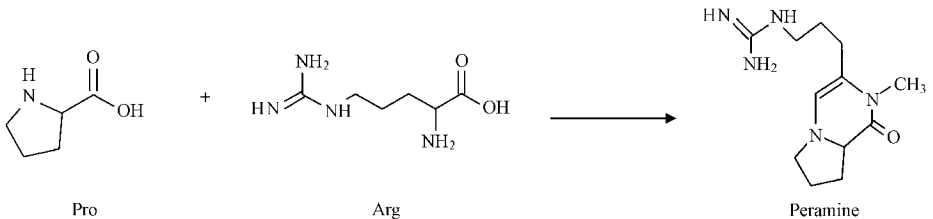


图 3 波胺可能的生物合成途径

研究表明,波胺的生物合成在 *E. typhina* 中由单一遗传位点控制。尽管半数以上的香柱菌菌株产生波胺,但在不同条件下或不同的菌株中,波胺的产量却相差巨大,说明波胺的生物合成是受菌株和宿主的共同调控。

2.4 黑麦草碱类次级代谢物

黑麦草碱的化学结构为苯-1-氨基吡咯酸,属于双吡咯烷类生物碱,广泛存在于香柱菌及其宿主植物的共生体中^[21]。黑麦草碱的产量可达植物干重的1%,对动物无毒,可高效杀灭昆虫,黑麦草碱在帮助宿主植物抗旱方面也具有重要作用。Bush等人^[21]根据双吡咯烷的生物合成途径,提出一个可能的黑麦草碱生物合成途径(图4)。鸟氨酸可能是参与这一途径的最初起始物,在鸟氨酸脱羧酶(ODC)的作用下,鸟氨酸被转化为腐氨酸,腐氨酸与脱羧化的S-腺苷甲硫氨酸(SAM)一起在精氨酸合成酶的作用下形成精氨酸,精氨酸再在精氨酸甲基转移酶的作用下形成甲基精氨酸,然后在多胺氧化酶的作用下成环,形成去甲基黑麦草碱,再次甲基化形成黑麦草碱(图4)。

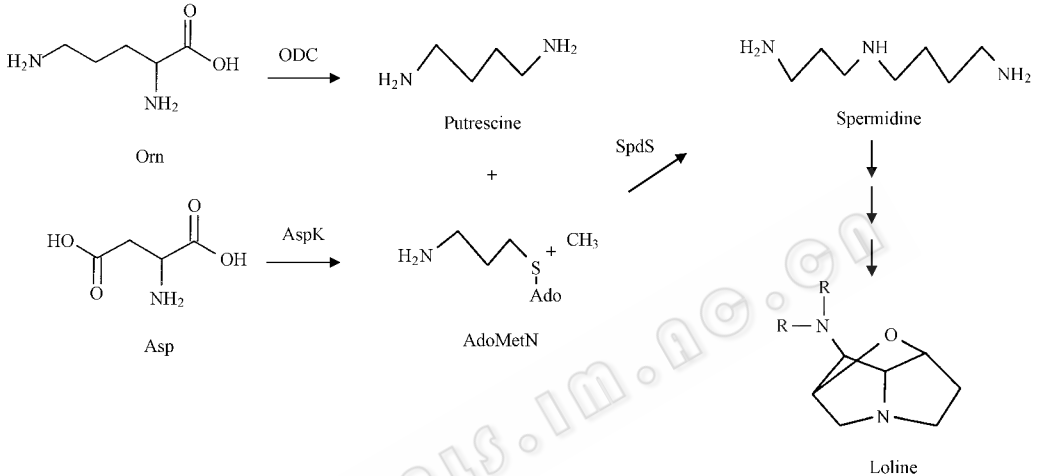


图4 黑麦草碱可能的生物合成途径

由于香柱菌具有有性世代,使其适合于孟德尔遗传学研究。Wilkinson等人通过限制性酶切片片段长度多态性在香柱菌染色体上发现了一个与黑麦草碱生物合成相关的遗传为点(LOL),这样就为黑麦草碱生物合成在遗传学上的研究提供了条件^[22]。Liu等进一步构建了一个含有6144个克隆的香柱菌基因组BAC文库,并以LOL标记为探针,得到了一个包含LOL在内的contig。对围绕LOL的30 kb的DNA序列测定表明,在这一序列中包含有鸟氨酸脱羧酶(ODC),高半胱氨酸聚合酶(HCS),氧化酶,氧化还原酶,脱氢酶等基因的类基因。进一步的遗传学分析表明,这些基因只存在于黑麦草碱的产生菌中,而在一株不产生黑麦草碱的菌株中,这些基因缺失。Blankenship等^[23]通过转录分析表明,这些基因只在黑麦草碱产生的条件下表达。这些证据说明,黑麦草碱的生物合成基因簇很可能位于这一contig中。对这些基因的功能研究将有助于黑麦草碱生物合成途径的阐明。

除上述四类次级代谢产物外,香柱菌还产生固醇,类固醇以及抗真菌的一些代谢物,如倍半萜,吡啶,二乙酰胺等^[24]。

3 香柱菌及其宿主植物共生系统的演化

香柱菌在分类学上是很分散的一群。香柱菌包含有10个种,其中9个种(4个起源于北美,5个起源于欧洲)具有宿主的相对专一性,而*E. typhina*不同于上述9个种,它具有广泛的宿主^[8]。

香柱菌通过两种方式进行传代,而这两种方式又是和宿主紧密相关的。在水平遗传中,受感染的宿主植物不再产生种子,最终导致干死。而不发生干死的受感染的宿主植物将产生携有香柱菌的种子,也就是垂直遗传。这种精密的调控被认为是一种长期的香柱菌与其宿主之间相互进化的结果。

据推测,通过垂直遗传的*Neotyphodium*有很多都是由香柱菌进化来的^[15]。因为在一些条件下,香柱

菌失去了水平遗传的能力,只能通过垂直遗传来传代。例如,*L. perenne* 的共生真菌 *N. lolii* 与 *E. festucae* 就极其相似。更有可能是,*Neotyphodium* 起源于香柱菌的种间杂交。遗传学上的证据支持了这一点。*N. coenophialum* 具有的 β -tubulin 基因(*tub2*)与 *E. festucae*, *E. baconii* 和 *E. typhina* 很相似。另一种从地中海分离到的香柱菌只具有与 *E. festucae* 和 *E. baconii* 相似的 *tub2* 基因,而与 *E. typhina* 的则不同。和有性或无性的单倍体香柱菌菌株相比,杂交后代相对巨大的基因组也说明来自双亲世代的基因经常同时保存在子代中^[25]。同时在香柱菌的不同种间缺少营养生长不相容性很可能是由于它们是通过无性杂交进化来的原因。种间杂交的前提是必须有具有不同遗传性状的内生真菌同时感染同一个宿主植物。最近的研究表明,一个宿主植物可以被多个具有不同遗传性状的内生真菌感染^[26]。

香柱菌祖先所具有的这种广泛的种间杂交能力为其提供了一种特殊的选择优势。可以认为生物碱类次级代谢产物就是其中一种优势。起源于 *E. festucae* 的杂交种或非杂交种都可以产生一种以上的生物碱,为其及其宿主的生存提供了竞争力。

4 结语

香柱菌与其宿主植物的紧密的共生关系,一方面为宿主提供了更强的抗逆作用,同时香柱菌不仅从宿主获取必须的养分,而且可以通过垂直遗传免受外界不利条件的影响。此外,香柱菌在宿主中的生存又受严格调控,它们生存于宿主组织细胞间隙,但又不引起相邻组织细胞的反应,它们从宿主植物收取养分,但又不引起宿主的严重损伤^[27]。这一现象正引起越来越多的科学工作者的兴趣。

香柱菌产生生物碱等多种次级代谢产物。可以说帮助宿主植物应付外界环境的保护机制是这些次级代谢物的主要作用之一。同时生物碱的合成又受到病虫害和干旱等外界条件的调控。而这些外界信号如何通过宿主传递给内生真菌,将是一个十分有趣的课题。

参 考 文 献

- [1] Moon C D , Scott B , Scharld C L , et al . The evolutionary origins of *Epichloë* endophytes from annual ryegrasses . *Mycologia* , 2000 , **92** : 1103 ~ 1118 .
- [2] Sampson K . The systemic infection of grasses by *Epichloe typhina* . *Tul Trans Br Mycol Soc* , 1993 , **18** : 30 ~ 47
- [3] Bacon C W , Porter J K , Robbins J D , et al . *Epichloe typhina* from toxic tall fescue grasses . *Appl Environ Microbiol* , 1977 , **34** : 576 ~ 581 .
- [4] Glenn A , Bacon C W , Price R , et al . Molecular phylogeny of *Acremonium* and its taxonomic implications . *Mycologia* , 1996 , **88** : 369 ~ 383
- [5] Gallagher R T , Hawkes A D , Steyn P S , et al . Tremorgenic neurotoxins from perennial ryegrass causing ryegrass staggers disorder of livestock : Structure elucidation of lolitrem B . *J Chem Soc Chem Commun* , 1984 , **1884** : 614 ~ 616 .
- [6] Clay K . Fungal endophytes of grasses . *Annu Rev Ecol Syst* , 1990 , **21** : 275 ~ 295 .
- [7] Bush L P , Wilkinson H H , Scharld C L . Bioprotective alkaloids of grass-fungal endophyte symbioses . *Plant Physiol* , 1997 , **114** : 1 ~ 7 .
- [8] Scott B . *Epichloe endophytes* : fungal symbionts of grasses . *Current Opinion in Microbiology* , 2001 , **4** : 393 ~ 398 .
- [9] Siegel M R , Jarfors U , Latch G C , et al . Ultrastructure of *Acremonium coenophialum* , *Acremonium lolii* , and *Epichloe typhina* endophytes in host and nonhost *Festuca* and *Lolium* species of grasses . *Can J Bot* , 1987 , **65** : 2357 ~ 2367 .
- [10] Lam C K , Belanger F C , White J F , et al . Mechanism and rate of sugar uptake by *Acremonium typhinum* , and endophytic fungus infecting *Festuca rubra* : Evidence for presence of a cell wall invertase in endophytic fungi . *Mycologia* , 1994 , **86** : 408 ~ 415 .
- [11] Reddy P V , Lam C K , Belanger F C . Mutualistic fungal endophytes express a proteinase that is homologous to proteases suspected to be important in fungal pathogenicity . *Plant Physiol* , 1996 , **111** : 1209 ~ 1218 .
- [12] Christensen M J , Ball O J , Bennett R , et al . Fungal and host genotype effects on compatibility and vascular colonization by

- Epichloë festucae*. *Mycol Res* ,1997 **101** :493 ~ 501.
- [13] Clay K ,Marks S ,Cheplick G P. Effects of insect herbivory and fungal endophyte infection on competitive interactions among grasses. *Ecology* ,1993 , **74** :1767 ~ 1777.
- [14] Siegel M R ,Latch G C ,Bush L P ,et al . Fungal endophyte-infected grasses :Alkaloid accumulation and aphid response. *J Chem Ecol* ,1990 **16** :3301 ~ 3315.
- [15] Berde B ,Schild H O. Handbook of experiment pharmacology , Vol. 49. Ergot alkaloids and related compounds. New York Springer ,Berlin Heidelberg ,1978. 1003.
- [16] Tudzynski P ,Holter K ,Correlá T ,et al . Evidence for an ergot alkaloid gene cluster in *Claviceps purpurea*. *Mol Gen Genet* , 1999 **261** :133 ~ 141.
- [17] Wang J ,Machado C ,Panaccione D ,et al . Ergot alkaloid biosynthesis genes cloned from *Claviceps* and *Balansia*. *Fungal Genet News* ,1999 **46** :120
- [18] Hill N S ,Parrott W A ,Pope D D. Ergopeptide alkaloid production by endophytes in a common tall fescue genotype. *Crop Sci* , 1991 **33** :331 ~ 333.
- [19] Rowan D D. Lolitrems , peramine and paxilline-mycotoxins of the ryegrass-endophyte interaction. *Agric Ecosyst Environ* ,1993 , **44** :103 ~ 122.
- [20] Young C A ,McMillan L ,Telfer E ,et al . Molecular cloning and genetic analysis of an indole-diterpene gene cluster from *Penicillium paxilli*. *Mol Microbiol* ,2001 **39** :1 ~ 13.
- [21] Bush L P ,Fannin F F ,Siegel M R ,et al . Chemistry , occurrence and biological effects of saturated pyrrolizidine alkaloids associated with endophyte-grass interactions. *Agric Ecosyst Environ* ,1993 **44** :81 ~ 102.
- [22] Wilkinson H H ,Siegel M R ,Blankenship J D ,et al . Contribution of fungal loline alkaloids to protection from aphids in a grass-endophyte mutualism. *Mol Plant-Microbe Interact* ,2000 , **13** :1027 ~ 1033.
- [23] Blankenship J D ,Spiering M J ,Wilkinson H H ,et al . Production of loline alkaloids by the grass endophyte , *Neotyphodium uncinatum* , in defined media. *Phytochemistry* ,2001 , **58** :395 ~ 401.
- [24] Yue Q ,Johnson C J ,Gianfagna T J ,et al . Isolation and characterization of fungal inhibitors from *Epichloë festucae*. *J Chem Ecol* ,2000 **26** :279 ~ 292.
- [25] Kuldau G A ,Tsai H F ,Scharl C L. Genome sizes of *Epichloë* species and anamorphic hybrids. *Mycologia* ,1999 **91** :776 ~ 782.
- [26] Christensen M J ,Simpson W R ,AlSamarrai T. Infection of tall fescue and perennial ryegrass plants by combinations of different *Neotyphodium* endophytes. *Mycolog Res* ,2000 **104** :974 ~ 978.
- [27] Hirsch A M ,Kapulnik Y. Signal transduction pathways in mycorrhizal associations :Comparisons with the Rhizobium-legume symbiosis. *Fungal Gnet Biol* ,1998 **23** :205 ~ 212.

致 读 者

感谢广大作者、读者多年来对《微生物学报》的关心和支持。为了使您的科研成果尽快得到交流,本刊2003年每册增加到144面。全部道林纸印刷,内附进口铜版纸印制的黑白图版和彩色图版。发表周期更短,内容丰富翔实,能及时反映我国微生物学科前沿和最新研究水平。在新的一年里《微生物学报》将更好的为科研工作者服务,为促进科技资源信息化最大限度的共享做出积极贡献。

欢迎投稿! 欢迎订阅! 欢迎提出宝贵意见!

《微生物学报》编辑部