

丝状真菌菌丝的愈合机制

韦学博 张 岩 邱立友*

(河南农业大学生命科学学院, 农业部农业微生物酶工程重点实验室, 郑州 450002)

摘要 丝状真菌菌丝的愈合机制对其生存、发育和生活方式都有重要影响。目前, 已在丝状真菌中发现有三种不同的愈合机制, 分别是高等真菌子囊菌中的盘菌亚门的真菌伏鲁宁体(woronin body)迅速闭塞损伤菌丝的隔膜孔; 担子菌中的伞菌亚门的真菌的隔膜孔盖(septal pore cap)迅速闭塞损伤菌丝的隔膜桶孔; 低等真菌球囊菌门的丛枝菌根(arbuscular mycorrhiza, AM)真菌的无隔膜菌丝受到损伤后迅速形成隔膜, 继而在隔膜内侧长出菌丝生长点, 生长点延长、融合, 损伤菌丝愈合。该文对丝状真菌愈合机制有关的结构生物学、系统生物学和遗传学等研究进展进行了综述。

关键词 丝状真菌; 愈合机制; 伏鲁宁体; 隔膜孔盖

Hyphal Healing Mechanism in Filamentous Fungi

Wei Xuebo, Zhang Yan, Qiu Liyou*

(College of Life Sciences, Henan Agricultural University, Key Laboratory of Enzyme Engineering of Agricultural Microbiology, Ministry of Agriculture, Zhengzhou 450002, China)

Abstract Hyphal healing mechanism (HHM) plays an important role in the survival, development and lifestyle of filamentous fungi. Three HHMs had been discovered in filamentous fungi. In Pezizomycotina of Ascomycota, woronin bodies rapidly plug septal pores in response to hyphal damage. Septal pore cap (SPC) also acts as an emergency dolipore plugs to seal dolipores rapidly in damaged hyphae of Agaricomycotina (Basidiomycota). The hyphal healing process in Glomeromycota fungi (arbuscular mycorrhiza, AM) is divided into four steps. First, septa are produced at the cut-extremities of each section. Second, the first growing hyphal tip (GHT) appears from the cut-extremities of the section which is or not always the furthest one from the hyphal apex. Third, other GHTs are produced at the extremities of the other sections, and also multiple septa form in the apex side. Fourth, all the cut sections reconnect through the fusing of neighborhood GHTs. In this paper the research progress made in structural biology, systems biology and genetics associated with HHM in filamentous fungi were discussed.

Key words filamentous fungi; hyphal healing mechanism; woronin body; septal pore cap

丝状真菌的菌丝既是其营养体也是其繁殖体, 菌丝通过尖端生长、分枝和不同个体间的融合形成菌丝体^[1-2]。低等真菌如接合菌门(Zygomycota)和壶菌门(Chytridiomycota)的菌丝是无隔膜菌丝, 又称

多核菌丝, 其完整的隔膜仅在繁殖结构中出现。高等真菌如子囊菌门(Ascomycota)和担子菌门(Basidiomycota)的菌丝有隔膜, 隔膜具一中心孔, 相连的隔间通过该孔进行细胞质、细胞核和绝大部分细胞器的交换^[3]。

丝状真菌在生长发育过程中其菌丝时刻都会受到各种环境胁迫导致菌丝受到损伤, 如高渗透压、淹水、剪切作用、其他生物的取食、菌丝老化等。受到损伤的菌丝必须及时愈合才能进一步继续生长发育。因此, 深入研究丝状真菌菌丝损伤的愈合机

收稿日期: 2012-11-19 接受日期: 2012-12-24

*通讯作者。Tel: 0371-63555175, Fax: 0371-63555790, E-mail: qliyou@henau.edu.cn

Received: November 19, 2012 Accepted: December 24, 2012

*Corresponding author. Tel: +86-371-63555175, Fax: +86-371-63555790, E-mail: qliyou@henau.edu.cn

网络出版时间: 2013-2-26 17:15:00

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130226.1715.006.html>

制, 对于应用丝状真菌进行发酵生产和防治由丝状真菌引起的病害都非常重要。

1864年, 俄罗斯微生物学家Woronin^[4]首先描述了属于子囊菌的马粪盘菌(*Ascobolus pulcherrimus*)中存在的一种细胞器。后来, Buller^[1]将之命名为woronin body(伏鲁宁体), 定义为丝状真菌中位于细胞隔膜一侧或两侧的一种细胞器。随后, 在40余种丝状子囊菌中都发现了伏鲁宁体, 并将这些丝状子囊菌在分类上归为盘菌亚门(Pezizomycotina)^[5-7]。伏鲁宁体的功能至今仍不是很清楚。最近的研究认为, 伏鲁宁体是一种新型的过氧化物酶体, 在完整的菌丝中与细胞膜相连, 但当菌丝发生裂解时, 细胞膨压的降低会触发原生质的快速流动, 并驱动伏鲁宁体迅速闭塞和密封隔膜孔, 防止细胞死亡^[8]。因此, 伏鲁宁体与丝状真菌菌丝愈合有关。

Girbardt^[9]在1958年首次报道了担子菌杂色云芝(*Polystictus versicolor*)中有隔膜孔盖(septal pore cap, SPC)。后来在担子菌中发现, 350多种伞菌亚门(Agaricomycotina)的真菌有这种结构^[10-11]。SPC同样具有当菌丝受到损伤时能够闭塞隔膜孔、阻止原生质流失和菌丝愈合的作用^[10]。

无隔膜菌丝损伤后的愈合现象最早是由Buller^[1]在菌根真菌中发现的。平板培养火丝菌(*Pyronema confluens*), 用针划破菌落边缘的菌丝, 菌丝损伤处就会迅速出现隔膜。约经过4 h后, 隔膜处长出新的菌丝, 新的菌丝跨过划伤处, 生长点发生融合。之后, 在其他丛枝菌根(AM)中也发现有相似的菌丝愈合机制^[3]。因此, 在丝状真菌中已发现存在三种不同的菌丝愈合机制, 部分相关真菌种类及其系统进化关系见图1。

1 伏鲁宁体

光学显微观察和电子显微观察平板培养镰刀菌(*Fusarium*)发现, 菌丝的伏鲁宁体环绕在隔膜孔周围。当菌丝衰老或受到损伤时, 伏鲁宁体迅速闭塞隔膜孔, 减少原生质的流失^[12]。同样的现象在球孢瓶束霉(*Ascodesmis sphaerospora*)^[13]、粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)^[14]、产黄青霉菌(*Penicillium chrysogenum*)^[14]和*Arthrinium aureum*^[15]中也可以观察到。在产黄青霉菌中, 受到损伤的菌丝的隔膜孔90%被伏鲁宁体迅速闭塞, 而正常菌丝中仅5%的隔膜孔被伏鲁宁体闭塞^[14]。另外, 恒化培养产黄青霉

持续受到损伤的菌丝的隔膜孔同样发现被伏鲁宁体闭塞^[16]。进一步观察发现, 当粗糙脉孢菌菌丝受到损伤后恢复生长是在闭塞的隔膜内侧长出新的分枝^[17]。

光学显微镜观察从粗糙脉孢菌中纯化得到的伏鲁宁体具有折光特性的结构, 可与其他细胞器明显区分开来^[8,18]。薄切片电子显微镜观察, 伏鲁宁体直径大小范围在100 nm~1 μm, 往往比菌丝隔膜孔直径稍大。伏鲁宁体中心是一个电子致密的核, 被一层单位膜过氧化物酶体膜紧密包裹^[6,19]。在多数真菌中伏鲁宁体中心核的形状如球形, 但在粗糙脉孢菌中则是六角形。伏鲁宁体核可被蛋白酶酶解, 粗糙脉孢菌的伏鲁宁体核是一个19 kDa的蛋白质HEX-1(编码基因是*hex-1*), 属于盘菌亚门中特有的一类蛋白^[8,18], 其序列与真核细胞翻译起始因子eIF-5A具有很高的相似性, 表明二者可能具有进化关系^[8]。粗糙脉孢菌的HEX-1蛋白可以在体外自组装成为六角形晶体。在没有伏鲁宁体的啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中*hex-1*也表达一种能自组装成与伏鲁宁体相似的六角形蛋白, 该蛋白位于过氧化物酶体内^[8]。*hex-1*及其同源基因均编码一个C端序列相同的过氧化物酶体靶信号(peroxisomal targeting sequence, PTS-1), 所以, 伏鲁宁体应是源于过氧化物酶体^[5]。敲除米曲霉(*Aspergillus oryzae*)的*hex-1*, 菌丝中不能形成伏鲁宁体, 隔膜孔不能闭塞, 菌丝的异质性也受到影晌^[20]。所以, 伏鲁宁体除具有促进菌丝愈合功能外, 可能还具有其他生物学功能。

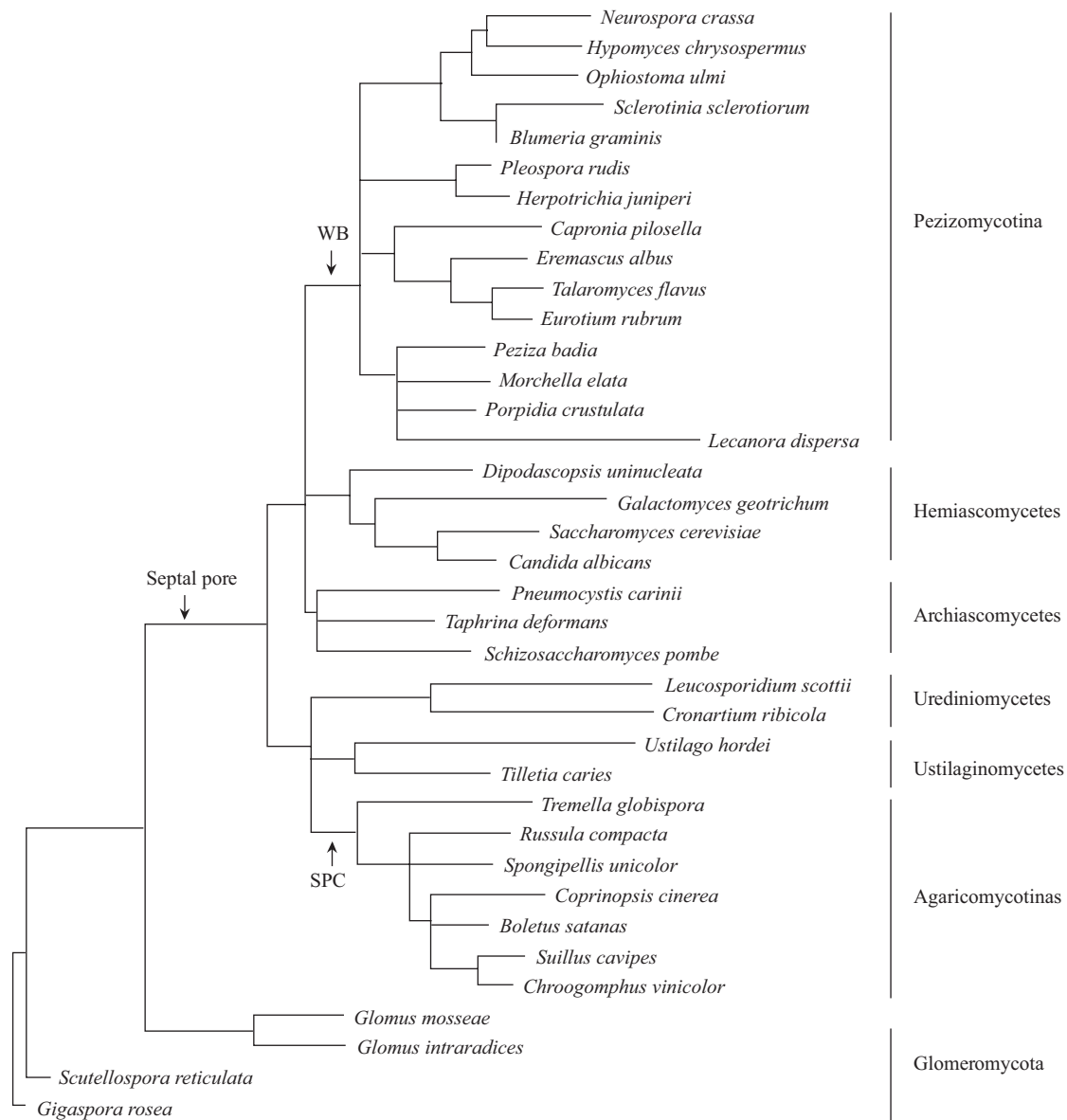
伏鲁宁体是在菌丝尖端的隔间起始合成的, 分别由编码HEX、伏鲁宁分选复合物(woronin sorting complex, WSC)和Leashin(存在于部分盘菌亚门的种中)三种蛋白的基因控制。*hex-1*基因表达合成蛋白HEX, 新合成的HEX通过PTS-1传送到过氧化物酶体中, 并在其中自组装形成极小的蛋白聚集体, 然后被四个WSC及与之相连的四个Leashin包裹成为一个不对称的芽状中间体, 并通过Leashin与细胞隔膜相连^[19]。伏鲁宁体的形态建成及传递到与菌丝尖端隔间紧邻的隔间受WSC的控制^[21]。

2 隔膜孔盖

伞菌的隔膜孔四周具有桶状突起, 称为桶孔隔膜(dolipore septum)。具有桶孔隔膜的真菌往往具有SPC^[22]。SPC可分为三种类型: 泡型、无孔型和有孔

型^[23-24]。裂褶菌(*Schizophyllum commune*)的SPC直径大小范围在450~600 nm, 其上规则地分布有直径约100 nm的小孔。立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)的SPC直径在1 600~2 000 nm, 带有3-5个直径为800 nm的孔。SPC由外层和内层两层膜包裹, 其基部与内质网相连, 具有与内质网相似的化学性质, 可能源于内质网^[11]。Cystofilobasidiales目的花枯锁霉(*Iterosonilia perplexans*)没有SPC, 其桶孔隔膜上覆盖的则是内质网样的链状物^[25], 可能是泡型和无孔型SPC的最古老的结构形式。

Bracker和Butler^[22]最早发现担子菌立枯丝核菌的菌丝受到损伤时, 在光学显微镜下可观察到隔膜孔迅速被闭塞。Aylmore等^[26]用电子显微镜观察证实了这种现象。他们用显微操作针刺云芝(*Coriolus versicolor*)的单核和双核菌丝, 均发现针刺菌丝的原生质流失, 但相邻隔间的隔膜孔立即被闭塞, 从而有效地阻止了原生质的流失。该机制在裂褶菌^[27]和高环柄菇(*Lepiota procera*)^[6]中也得到了证实。Flegler等^[28]发现, 墨西哥裸盖菇(*Psilocybe mexicana*)营养菌丝中桶孔隔膜孔的闭塞物能够被胰岛素和蛋白酶降



WB: 伏鲁宁体; SPC: 隔膜孔盖。
WB: woronin body; SPC: septal pore cap.

图1 真菌基于18S rRNA的系统树及与丝状真菌菌丝愈合相关的细胞特性

Fig.1 Fungal phylogenetic tree with selected hyphal healing mechanism characters based on 18S rRNA

解。Lü和McLaughlin^[29]进一步发现, 木耳(*Auricularia auricula-judae*)的无孔SPC能够有效地控制细胞质的流动, 并阻止大的细胞器通过隔膜孔道。Müller等^[30]报道, 当裂褶菌的菌丝受到胁迫或损伤时, 来自SPC由内质网合成和加工的蛋白即会转运至隔膜孔并将其闭塞。这些结果表明, SPC在菌丝损伤愈合和菌丝胞间联系方面有着重要作用。

从立枯丝核菌SPC中分离得到一种分子量约为18 kDa的蛋白质——SPC18, 它由158个氨基酸组成, 其编码的基因cDNA长477 bp。该蛋白及其基因序列与其他真菌的基因组序列同源性均很低。免疫金分析表明, 隔膜孔闭塞物是SPC18^[10]。裂褶菌SPC由2种主要的蛋白质组成, 分别是Spc14(分子量14 kDa)和Spc33(分子量33 kDa), 编码基因分别是*spc14*和*spc33*, 前者编码一个含86个氨基酸的蛋白, 后者编码一个含239-340个氨基酸的蛋白。二者序列中均可预测含有编码与内质网相连的信号锚序列。*spc33*基因则在绵腐卧孔菌(*Postia placenta*)、黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*)和双色蜡蘑(*Laccaria bicolor*)中有同源基因。敲除基因*spc33*, 菌丝中不能形成SPC, 不能闭塞隔膜孔, 导致菌丝生长和子实体形成受到严重影响^[11]。因此, SPC除具有菌丝愈合功能外, 可能还有其他生物学功能。

3 低等真菌菌丝愈合机制

对低等真菌菌丝愈合机制的研究目前主要集中于能与80%以上的陆生植物形成共生结构丛枝菌根(arbuscular mycorrhiza, AM)的球囊菌门(Glomeromycota)的真菌, 研究比较深入的是球囊霉科(Glomeraceae)、巨孢囊霉科(Gigasporaceae)和盾巨孢囊霉属(*Scutellospora*)的菌株^[31]。

丛枝菌根菌丝愈合过程分为四步: 第一步是形成隔膜, 菌丝受到损伤9~18 min后隔膜即形成; 第二步是长出菌丝生长点(growing hyphal tip, GHT); 第三步, GHT延长、定位和接触; 第四步, GHT融合、原生质流动恢复。在这四个步骤中, 球囊霉与巨孢囊霉、盾巨孢囊霉有明显的不同。巨孢囊霉和盾巨孢囊霉的菌株当菌丝受到损伤时, 第一步在菌丝受损伤处形成隔膜, 随后在菌丝尖端也形成隔膜; 第二步在离菌丝尖端最远处新形成的隔膜内侧最先长出GHT; 第三步在其他新形成的隔膜内侧长出GHT, 在菌丝尖端的隔膜内侧也长出GHT, 从离菌丝尖端

最远处的GHT开始与相邻的GHT发生融合; 第四步, 相邻的GHT陆续发生融合形成菌丝桥, 菌丝尖端的GHT不与相邻的GHT融合, 而是独自进行生长并再次成为主要生长点。相对地, 球囊霉的菌株菌丝受到损伤后愈合的第一步与巨孢囊霉、盾巨孢囊霉相同; 第二步中最先长出的GHT可以不是位于离菌丝尖端最远处新形成的隔膜内侧; 第三步, 各个新形成的隔膜内侧陆续长出GHT, 但菌丝尖端形成的隔膜内侧无GHT长出; 第四步, 被损伤的各部分菌丝片段全部重新连接^[3,31]。

丛枝菌根菌丝愈合的分子机制尚未见报道。

4 展望

丝状真菌菌丝愈合机制还有许多问题亟待回答, 如伏鲁宁体和SPC是如何从过氧化物酶体或内质网进化而来的? 是如何与过氧化物酶体或内质网相互作用的? 过氧化物酶体和内质网是如何控制伏鲁宁体和SPC的数量和质量的? SPC的形成过程是否也与伏鲁宁体相似? 伏鲁宁体和SPC还有哪些其他的功能? 其他低等真菌无隔膜菌丝的愈合机制是否与丛枝菌根相同, 其分子机制是什么? 对丝状真菌愈合机制的深入研究不仅有助于开发利用丝状真菌, 还将有助于揭示丝状真菌的器官发生和系统进化历程。

参考文献 (References)

- 1 Buller AHR. The formation of hyphal fusions in the mycelium of the higher fungi. In: Researches on fungi, vol V. London: Longmans, 1933, 1-74.
- 2 Glass NL, Rasmussen C, Roca G, Read ND. Hyphal homing, hyphal fusion and mycelial interconnectedness. Trends Microbiol 2004; 12(3): 135-41.
- 3 de la Providencia IE, de Souza FA, Fernández F, Delmas NS, Declercq S. Arbuscular mycorrhizal fungi reveal distinct patterns of anastomosis formation and hyphal healing mechanisms between different phylogenetic groups. New Phytol 2005; 165(1): 261-71.
- 4 Woronin M. Zur Entwicklungsgeschichte des *Ascobolus pulcherrimus* Cr. und einiger Pezizen. Abh Senkenb Naturforsch L 1864; 5(6): 333-44.
- 5 Dhavale T, Jedd G. The fungal woronin body. Biology of the Fungal Cell. Berlin: Springer, 2007, 87-96.
- 6 Markham P, Collinge AJ. Woronin bodies of filamentous fungi. FEMS Microbiol Rev 1987; 46(1): 1-11.
- 7 Jedd G. Fungal evo-devo: Organelles and multicellular complexity. Trends Cell Biol 2011; 21(1): 12-9.
- 8 Jedd G, Chua N. A new self-assembled peroxisomal vesicle required for efficient resealing of the plasma membrane. Nat Cell

- Biol 2000; 2(4): 226-31.
- 9 Girbardt M. Über die Substruktur von *Polystictus versicolor* L. Arch Mikrobiol 1958; 28(3): 255-69.
 - 10 van Driel KGA, van Peer AF, Grijpstra J, Wösten HAB, Verkleij AJ, Müller WH, *et al.* Septal pore cap protein SPC18, isolated from the basidiomycetous fungus *Rhizoctonia solani*, also resides in pore plugs. Eukaryot Cell 2008; 7(10): 1865-73.
 - 11 van Peer AF, Wang F, van Driel KG, de Jong JF, van Donselaar EG, Müller WH, *et al.* The septal pore cap is an organelle that functions in vegetative growth and mushroom formation of the wood-rot fungus *Schizophyllum commune*. Environ Microbiol 2010; 12(4): 833-44.
 - 12 Reichle RE, Alexander JV. Multiperforate septations, woronin bodies and septal plugs in *Fusarium*. J Cell Biol 1965; 24(3): 489-96.
 - 13 Brenner DM, Carroll GC. Fine-structure correlates of growth in hyphae of *Ascolesrnis sphaerospora*. J Bacteriol 1968; 95(11): 658-71.
 - 14 Collinge AJ, Markham P. Woronin bodies rapidly plug septal pores of severed *Penicillium chrysogenum* hyphae. Exp Mycol 1985; 9(1): 80-5.
 - 15 Calvo MA, Agut M. Observation of woronin bodies in *Arthrinium aureum* by scanning electron microscopy. Mycopathologia 2002; 153(3): 137-9.
 - 16 Collinge AJ, Miles EA, Trinci APJ. Ultrastructure of *Penicillium chrysogenum* hyphae from colonies and chemostat cultures. Trans Br Mycol Soc 1978; 70(3): 401-8.
 - 17 Trinci APJ, Collinge AJ. Occlusion of septal pores of damaged hyphae of *Neurospora crassa* by hexagonal crystals. Protoplasma 1973; 80(1): 57-67.
 - 18 Tenney K, Hunt I, Sweigard J, Pounder JI, McClain C, Bowman EJ. Hex-1, a gene unique to filamentous fungi, encodes the major protein of the Woronin body and functions as a plug for septal pores. Fungal Genet Biol 2000; 31(3): 205-17.
 - 19 Tey WK, North AJ, Reyes JL, Lu YF, Jedd G. Polarized gene expression determines woronin body formation at the leading edge of the fungal colony. Mol Biol Cell 2005; 16(6): 2651-9.
 - 20 Bleichrodt RJ, van Veluw GJ, Recter B, Maruyama JI, Kitamoto K, Wösten HAB. Hyphal heterogeneity in *Aspergillus oryzae* the result of dynamic closure of septa by woronin bodies. Mol Microbiol 2012; doi: 10.1111/mmi.12077.
 - 21 Liu F, Ng SK, Lu Y, Low W, Lai J, Jedd G. Making two organelles from one: Woronin body biogenesis by peroxisomal protein sorting. J Cell Biol 2008; 180(2): 325-39.
 - 22 Bracker CE, Butler EE. The ultrastructure and development of septa in hyphae of *Rhizoctonia solani*. Mycologia 1963; 55(1): 35-58.
 - 23 McLaughlin DJ, Frieders EM, Lü H. A microscopist's view of hetero-basidiomycete phylogeny. Stud Mycol 1995; 38(6): 91-109.
 - 24 van Driel KG, Humbel BM, Verkleij AJ, Stalpers J, Müller WH, Boekhout T. Septal pore complex morphology in the *Agaricomycotina* (*Basidiomycota*) with emphasis on the Cantharellales and Hymenochaetales. Mycol Res 2009; 113(5): 559-76.
 - 25 Boekhout T. Structural differences between two types of basidiomycete septal pore caps. Microbiology 1998; 144(Pt 7): 1721-30.
 - 26 Aylmore RC, Wakley GE, Todd NK. Septal sealing in the Basidiomycete *Coriolus versicolor*. Microbiology 1984; 130(11): 2975-82.
 - 27 Todd NK, Aylmore RC. Cytology of hyphal interactions and reactions in *Schizophyllum commune*. In: Developing Biology of Higher Fungi. Moore D, Casselton LA, Wood DA, Frankland JC, eds. Cambridge: Cambridge University Press, 1985, 231-48.
 - 28 Flegler SL, Hooper GR, Fields WG. Ultrastructural and cytochemical changes in the basidiomycete dolipore septum associated with fruiting. Can J Bot 1976; 54(19): 2243-53.
 - 29 Lü H, McLaughlin DJ. Ultrastructure of the septal pore apparatus and early septum initiation in *Auricularia auricula-judae*. Mycologia 1991; 83(3): 322-34.
 - 30 Müller WH, Montijn RC, Humbel BM, van Aelst AC, Boon EJMC, van der Krift TP, *et al.* Structural differences between two types of basidiomycete septal pore caps. Microbiology 1998; 144(Pt 7): 1721-30.
 - 31 de la Providencia IE, Fernández F, Declerck S. Hyphal healing mechanism in the arbuscular mycorrhizal fungi *Scutellospora reticulata* and *Glomus clarum* differs in response to severe physical stress. FEMS Microbiol Lett 2007; 268(1): 120-5.