

# 水稻黄单胞菌水稻致病变种的超氧化物歧化酶活性及诱导\*

宋凤鸣 葛秀春 郑 重 胡秀卿

(浙江大学植物保护系 杭州 310029)

**摘 要** :以水稻黄单胞菌水稻致病变种(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)的毒性菌株 PXO99<sup>A</sup> 和无毒菌株 PXO99<sup>(pBUavrXa10.F1)</sup> 检测液体培养中菌体超氧化物歧化酶(SOD)活性变化,以说明 SOD 与菌株致病性的关系。结果表明,菌体 SOD 活性高峰出现于延迟期末,之后下降,毒性菌株 SOD 活性高于无毒菌株。两个菌株的 SOD 活性的胞内定位均以胞质为主,占总活性的 70% 以上,酶体周质中 SOD 活性占总活性的 20%~30%。以 50~800 μmol/L 外源 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 处理细菌培养物 1 h,可诱导菌体中 SOD 活性的增加。其中以 200 μmol/L O<sub>2</sub><sup>-</sup> 处理 SOD 活性最高,12 h 菌龄培养物的诱导效果优于 24 h 培养物,对毒性菌株 SOD 的诱导作用更为明显。外源 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 处理后细菌存活率明显降低,24 h 培养物的存活率下降大于 12 h 培养物;毒性菌株存活率下降大于无毒菌株。

**关键词** 水稻黄单胞菌水稻致病变种 活性氧 超氧化物歧化酶

**中图分类号** :Q554 **文献标识码** :A **文章编号** :0001-6209(2000)03-0301-05

植物受病原菌侵染后可引起被侵染组织活性氧(如 O<sub>2</sub><sup>-</sup>、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 等)突增(Oxidative burst),一般认为是一种积极的抗病防卫反应<sup>[1]</sup>,并有直接杀灭微生物的活性。因此,病原菌要侵入并定殖于寄主植物体内就必需克服活性氧的毒害作用。已知植物病原细菌广泛存在活性氧清除酶系统。这方面的研究主要集中在过氧化氢酶的作用上,并证明外源活性氧处理可诱导过氧化氢酶活性的提高<sup>[2~4]</sup>。但对植病细菌超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)的研究很少<sup>[2,5,6]</sup>。本文以引起水稻白叶枯病的水稻黄单胞菌水稻致病变种(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)为材料,比较致病性不同菌株 SOD 活性差异,测试外源 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 处理对菌体 SOD 的诱导及对细菌存活的影响,以说明 SOD 在植物病原细菌致病性中的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试菌株及培养条件

供试菌株见表 1。将供试菌株分别接入改良 523 培养液(K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.4g, MgSO<sub>4</sub> 0.3g, 蛋白胨 8.0g, 酵母浸膏 4.0g, 蔗糖 10.0g, 琼脂 20g, 加水 1L, pH7.2)中,振荡培养(120 r/min, 30℃)24h,取菌液以 5% 的比例接入新鲜培养液中,相同条件培养(下同)。不同时间取样作各项分析。

\* 国家自然科学基金(39300011, 39770490)和浙江省自然科学基金(396293)资助项目

作者简介 宋凤鸣(1965-)男,浙江平湖人,浙江大学植保系副教授,1998 年赴美国威斯康辛大学作访问学者,主要从事植物病理学研究

收稿日期:1998-11-13, 修回日期:1999-03-20

表 1 细菌菌株  
Table 1 Bacterial strains

| Strains                            | Characteristics  | References and sources |
|------------------------------------|--|------------------------|
| PXO99 <sup>A</sup>                 | Wild type, virulent to rice with Xa-10 resistance gene                   | [7]                    |
| PXO99 <sup>Δ</sup> (pBUavrXa10.F1) | Containing <i>avrXa10</i> , avirulent to rice with Xa-10 resistance gene | [7]                    |

## 1.2 SOD 的提取

培养液经 5000 r/min 离心 10 min 收集菌体,用 10 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(内含 30 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, pH7.3)洗涤一次,后将菌体悬浮于 50 mmol/L 磷酸缓冲液中, -20℃ 保存。按 Klotz 和 Hutcheson 的方法<sup>[2]</sup>提取菌体 SOD。

菌体周质 SOD 按 Ferro-Luzzi Ames 等<sup>[8]</sup>的方法提取。1 mL 悬浮于 50 mmol/L 磷酸缓冲液中的菌体加入 15 μL 氯仿 4℃ 放置 15 min, 15000 r/min 离心 10 min, 上清液即为周质 SOD 提取液。沉淀的菌体按上述方法经洗涤和离心后得胞内 SOD 提取液。

## 1.3 SOD 活性测定

按 El-Moshaty 等<sup>[9]</sup>的方法进行。3 mL 反应液组成为:50 mmol/L 磷酸缓冲液、13 mmol/L 甲硫氨酸、75 μmol/L 氮兰四唑、2 μmol/L 核黄素,最后加入 100 μL 酶液。在 28℃、4 kLx 日光灯下光化反应 10 min 后,黑暗终止反应,测 OD<sub>560</sub>。一个酶单位定义为引起 3 mL 反应液中抑制 50% 光化反应所需的酶量。酶液中的蛋白浓度按 Bradford 的方法测定<sup>[10]</sup>,以 BSA 为标准。

## 1.4 外源活性氧对 SOD 活性的诱导及对细菌存活的影响

取培养 12 h 和 24 h 的菌液,加入不同浓度的甲基紫精(methylviologen, O<sub>2</sub><sup>-</sup> 产生源)在光下处理 1 h 后,离心收集菌体,分别按 1.2 和 1.3 节的方法提取并测定 SOD 活性。同样处理的菌液用无菌水作梯度稀释,1 mL 稀释液与 10 mL 培养基混合倒入培养皿中,28℃ 培养 4 d,计数细菌菌落,计算细菌的存活率。

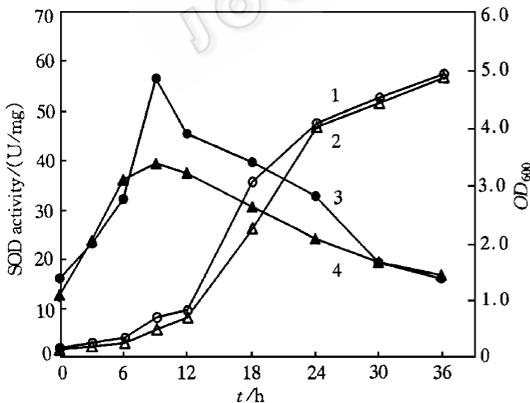


图 1 菌体中 SOD 活性的变化

Fig. 1 SOD activities in bacterial lysates

1. Growth curve of PXO99<sup>A</sup>;
2. Growth curve of PXO99<sup>Δ</sup>(pBUavrXa10.F1);
3. SOD activity in PXO99<sup>A</sup>;
4. SOD activity in PXO99<sup>Δ</sup>(pBUavrXa10.F1).

## 2 结果和分析

### 2.1 不同培养时期菌体 SOD 活性的变化

图 1 显示,在液体培养条件下,两个菌株菌体内 SOD 活性均在培养前期迅速上升,至 9 h 时(延迟期末)达到高峰,进入对数生长期后酶活性开始下降。毒性菌株 PXO99<sup>A</sup> 菌体中 SOD 活性高于无毒菌株 PXO99<sup>Δ</sup>(pBUavrXa10.F1)。

### 2.2 SOD 在细菌菌体中的亚细胞定位

菌体的周质和胞内均有 SOD 活性的

分布,胞内 SOD 活性较高,占总活性的 70% 以上。而周质中的 SOD 酶活性仅占 20% ~ 30%。随着培养时间的延长,周质中的 SOD 活性占总活性的比例略有下降(表 2)。两个菌株 SOD 活性分布一致。

表 2 菌体中 SOD 活性的亚细胞定位

Table 2 Subcellular localization of SOD activities in the bacterial cell

| Strains                             | Subcellular localization | SOD activity/(U/mg) |                     |
|-------------------------------------|--------------------------|---------------------|---------------------|
|                                     |                          | (x̄ ± SD)           |                     |
|                                     |                          | 12h                 | 24h                 |
| PXO99 <sup>A</sup>                  | Cytoplasm                | 44.84 ± 0.37(72.6%) | 34.80 ± 1.92(77.7%) |
|                                     | Periplasm                | 16.90 ± 2.19(27.4%) | 10.01 ± 0.93(22.3%) |
|                                     | Total                    | 61.72(100%)         | 44.81(100%)         |
| PXO99 <sup>Δ</sup> (pBUavrXa10, F1) | Cytoplasm                | 37.21 ± 0.96(72.0%) | 27.43 ± 1.12(76.6%) |
|                                     | Periplasm                | 14.48 ± 2.30(28.0%) | 8.36 ± 1.21(23.7%)  |
|                                     | Total                    | 51.69(100%)         | 36.79(100%)         |

### 2.3 外源 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 对菌体 SOD 的诱导

由表 3 可见,外源 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 可诱导菌体 SOD 活性的提高,以 200 μmol/L O<sub>2</sub><sup>-</sup> 的诱导效果最明显;O<sub>2</sub><sup>-</sup> 处理对培养 12 h 的细菌菌体 SOD 活性的诱导效果较强,对毒性菌株 POX99<sup>A</sup>SOD 的诱导作用更为明显。

表 3 外源 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 处理 1h 后细菌菌体 SOD 活性 (U/mg)

Table 3 SOD activities in bacterial lysates exposed to O<sub>2</sub><sup>-</sup> for 1 h

| Strains                             | c(O <sub>2</sub> <sup>-</sup> )/(μmol/L) |      |      |      |      |      |      |
|-------------------------------------|--|------|------|------|------|------|------|
|                                     | 0  | 50   | 100  | 200  | 400  | 800  |      |
| PXO99 <sup>A</sup>                  | 12 h culture                             | 49.0 | 58.8 | 66.8 | 77.9 | 69.8 | 57.5 |
|                                     | 24 h culture                             | 26.8 | 34.6 | 36.1 | 40.8 | 32.7 | 32.1 |
| PXO99 <sup>Δ</sup> (pBUavrXa10, F1) | 12 h culture                             | 27.2 | 42.0 | 46.1 | 49.7 | 45.8 | 39.1 |
|                                     | 24 h culture                             | 19.1 | 23.4 | 28.5 | 30.6 | 20.8 | 20.4 |

### 2.4 外源 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 处理对细菌存活的影响

以外源 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 不同浓度处理细菌培养液 1 h 后以稀释平板法计数得细菌存活率(图 2)。证明外源 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 处理后供试菌株的存活率明显降低,随着 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 处理浓度的增加,细菌的存活率也下降;O<sub>2</sub><sup>-</sup> 处理后培养 24 h 的细菌存活率下降更为显著;O<sub>2</sub><sup>-</sup> 处理对毒性菌株 PXO99<sup>A</sup> 存活率的影响更大。

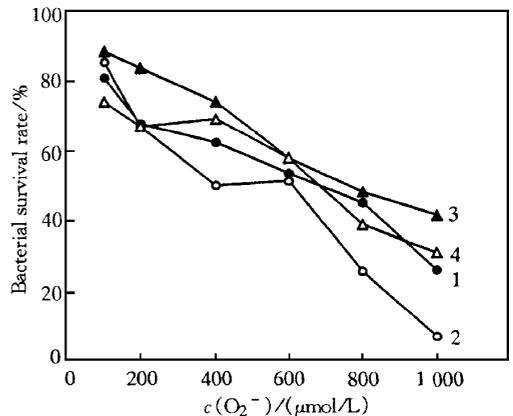


图 2 外源 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 处理 1h 后细菌存活率

Fig. 2 Survival rate of the bacteria exposed to exogenous O<sub>2</sub><sup>-</sup> for 1 h

1. PXO99<sup>A</sup> grown for 12 h;
2. PXO99<sup>A</sup> grown for 24 h;
3. PXO99<sup>Δ</sup>(pBUavrXa10, F1) grown for 12 h;
4. PXO99<sup>Δ</sup>(pBUavrXa10, F1) grown for 24 h.

### 3 讨论

SOD已被认为是一些动物致病菌的致病因子。比如:星状诺卡氏菌(*Nocardia asteroides*)致病菌株 SOD 活性可在活体内防御活性氧毒害<sup>[11]</sup>。而且证明,一些 SOD 缺失突变体的致病力显著低于野生型出发菌株<sup>[12]</sup>。在植物与病原微生物相互作用中需要探索 SOD 是否也是病原生物的致病因子之一<sup>[5]</sup>。本文证明,毒性菌株 SOD 活性高于无毒菌株。但这种差异是否说明毒性菌株能抗御寄主活性氧突增的毒害,从而 SOD 是决定菌株致病性差异的因子之一,还需要做致病过程的实验。同时,有研究认为细菌菌体中 SOD 活性的过分增长会导致菌体功能失调甚至死亡<sup>[13]</sup>。本文在 200  $\mu\text{mol/L}$  以下的外源  $\text{O}_2^-$  处理后,菌株 SOD 活性上升,但存活率开始下降,可能与此有关。

已有研究报告,水稻黄单胞菌水稻致病变种(*X. oryzae* pv. *oryzae*)的 SOD 活性高峰出现于延迟期末<sup>[6]</sup>。本文结果与此一致。但在许多细菌培养中,SOD 活性高峰出现在稳定期初。野油菜黄单胞菌野油菜致病变种(*X. campestris* pv. *campestris*)SOD 活性动态也如此<sup>[5]</sup>。这种差异的原因尚不明确。

大肠杆菌(*Escherichia coli*)具备 3 种类型 SOD,FeSOD 和 MnSOD 存在于细胞质,而 Cu-ZnSOD 存在于周质<sup>[14]</sup>。本文有关供试菌 SOD 活性亚细胞定位的结果是否反映 3 种类型 SOD 在胞内的不同定位需要进一步研究。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] 宋凤鸣,郑 重,葛秀春. 植物生理学通讯,1996,32:377~385.
- [ 2 ] Klotz M G, Hutcheson S W. *Appl Environ Microbiol*, 1992, 58:2468~2473.
- [ 3 ] Katsuwon J, Anderson A J. *Appl Environ Microbiol*, 1990, 56:3576~3582.
- [ 4 ] Katsuwon J, Anderson A J. *Appl Environ Microbiol*, 1989, 55:2985~2989.
- [ 5 ] Smith S G, Wilson T J G, Dow J M, et al. *Mol Plant-Microbe Interact*, 1996, 9:584~593.
- [ 6 ] Chamnongpol S, Mongkolsuk S, Vattanvaiboon P, et al. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61:393~396.
- [ 7 ] Young S A, White F F, Hopkins C M, et al. *Mol Plant-Microbe Interact*, 1994, 7:799~804.
- [ 8 ] Ferr-Luzzi Ames G, Prody C, Kustu S. *J Bacteriol*, 1984, 160:1181~1183.
- [ 9 ] El-Moshaty F I B, Pike S M, Novacky A J, et al. *Physiol Mol Plant Pathol*, 1993, 43:109~119.
- [ 10 ] Bradford M M. *Anal Biochem*, 1976, 72:248~254.
- [ 11 ] Beaman L, Beaman B L. *Infect Immun*, 1990, 58:3122~3128.
- [ 12 ] Tatum F M, Dettileux P G, Sacks J M, et al. *Infect Immun*, 1992, 60:2863~2869.
- [ 13 ] Scott M D, Meshnick S R, Eaton J W. *J Biol Chem*, 1987, 262:3640~3645.
- [ 14 ] Benov L T, Fridovich I. *J Biol Chem*, 1994, 269:25310~25314.

## ACTIVITIES OF SUPEROXIDE DISMUTASE IN *XANTHOMONAS ORYZAE* PV. *ORYZAE* AND ITS INDUCTION\*

Song Fengming Ge Xiuchun Zheng Zhong Hu Xiuqing  
(Department of Plant Protection, Zhejiang University, Hangzhou 310029)

**Abstract:** The activities of superoxide dismutase (SOD) in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* were determined to demonstrate the correlation of SOD activities with the bacterial virulence. In liquid culture, SOD activities of the tested strains reached the maxima at the end of lag phase and then declined. The virulent strain PXO99<sup>A</sup> showed higher SOD activities than the avirulent strain PXO99<sup>A</sup>(pBUavr Xa10. F1). Analysis on the subcellular location indicated that SOD activities detected from the cytoplasm and periplasm were over 70% and 20% ~ 30% of the total, respectively. Treatment of the bacterial culture for 1 h with exogenous O<sub>2</sub><sup>-</sup> at concentration of 50 ~ 800 μmol/L induced SOD activities of both the strains. The treatment with 200 μmol/L resulted in the highest SOD activities. The effect of exogenous O<sub>2</sub><sup>-</sup> on SOD induction was more significant in 12 h-culture than in 24 h-culture, and more notable for the virulent strain PXO99<sup>A</sup>. The treatment with exogenous O<sub>2</sub><sup>-</sup> resulted in significantly decreased survival rate of both the strains. The decreases of survival rate were greater in 24h-culture than in 12h-culture, and more significantly for the virulent strain than for the avirulent one.

**Key words:** *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, Active oxygen species, Superoxide dismutase (SOD)

Supported by China National Foundation of Natural Science (39770490) and Zhejiang Provincial Foundation of Natural Science 396293).

## · · · · · 书 讯 · · · · ·

《戊型肝炎病毒与戊型肝炎》一书由第二军医大学戚中田教授主编,香港亚洲医药出版社出版,大32开,2000年2月正式出版,18万字左右,订价17元(加邮挂费共19元)。本书内容包括戊型肝炎病毒的特性,戊型肝炎病毒基因的克隆与鉴定,戊型肝炎病毒活性的合成与修饰,戊型肝炎的临床表现与病理,戊型肝炎的治疗,戊型肝炎的流行病学与预防和新型肝炎的研究展望。可供临床各科医师、医学院校师生及从事病毒学、分子生物学和基础医学工作的科研与教学人员参考。

联系人:上海翔殷路800号,第二军医大学微生物学教研室 孙如美 谢正阳  
邮编 200433 电话(021)25070268