

植物病原细菌中超氧阴离子释放及其释放位点的研究

李 欣¹ 李红玉^{1*} 庞新跃¹ 王金生² 李敏权³

(¹ 兰州大学生命科学学院 兰州 730000)

(² 南京农业大学农业部病虫害监测与治理重点实验室 南京 210095)

(³ 甘肃农业大学植物保护学系 兰州 730060)

摘 要 实验发现很多植物病原细菌具有自身释放超氧阴离子的现象,其释放规律与菌株的致病性可能存在一定的关系。并且植物病原细菌超氧阴离子的释放是多位点的,在细胞膜、细胞壁及无菌滤液中用化学方法及电子自旋共振法(Electron spin resonance,ESR)都能够检测到超氧阴离子的释放。无论是自然生理状态下,还是 SOD 酶活性被抑制后,都显示各组分中无菌滤液的超氧阴离子浓度最高,可能是植物病原细菌超氧阴离子释放的主要位点。

关键词 植物病原细菌,超氧阴离子释放,电子自旋共振(ESR)

中图分类号 Q6 **文献标识码** A **文章编号** 0001-6209 (2005) 02-0283-05

快速、短暂、大量的活性氧产生称为氧化爆发(Oxidative burst),它是重要的早期植物防御反应^[1,2]。超氧阴离子的产生和释放是氧化爆发中的活性氧的主体之一^[3],在植物防御反应中超氧阴离子与其他种类的活性氧相比可能具有更重要的作用^[4],研究表明超氧阴离子清除剂的加入能够抑制植物的过敏反应,显示超氧阴离子的产生对植物的过敏反应是必需的^[5,6]。一般认为,植物寄主与病原菌互作中释放的超氧阴离子主要来自于寄主植物细胞质膜结合的 NADPH 氧化酶复合物^[7,8]。我们以前的实验发现植物与病原菌互作发生时产生的超氧阴离子可能是互作双方超氧阴离子释放的综合结果,不但寄主植物释放超氧阴离子,病原菌也释放超氧阴离子^[9]。尤其是病原菌中的超氧阴离子释放,是一种较新的观点。为了深入研究这一现象,我们运用 ESR 技术对病原菌自身超氧阴离子的释放现象和释放机理进行较为系统的研究,这些试验结果将为进一步研究寄主植物-病原菌相互作用过程中病原菌超氧阴离子的释放打下基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 药品 :Tiron (1, 2-dihydroxybenzene-3, 5-disulfonic acid) 购于 Sigma 公司;对氨基苯磺酸、 α -奈

胺、盐酸羟胺、DDC (Diethyldithiocarbamate) 购于上海 Sangon 公司。

1.1.2 菌株 本实验采用的 11 株植物病原细菌,均由南京农业大学植物保护学系农业部病虫害监测与治理重点实验室提供。黄单胞菌属水稻白叶枯病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*),分别为中国系统菌株 KS-6-6、ZHE173 和 OS-14,日本系统菌株 JXO III 和 JXO V,菲律宾系统菌株 PX086、PX099 和 PX0112。黄单胞菌属条斑病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*) RS105。假单胞菌属菌株 *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* NC 2038,标记为 PPB2038。欧文氏菌属马铃薯软腐病菌(*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*),标记为 Ecco。

采用 NA 培养基(pH 7.0):每升含蔗糖 10g,蛋白胨 5g,酵母粉 1g,牛肉浸膏 3g,琼脂 16g。将冻干保存的下列菌株取干粉划线接种到 NA 平板上,28℃培养 48h 以上,挑单菌落于 NA 液体培养基中,28℃振荡培养至菌液混浊,甘油保存菌种,备用。

1.2 植物病原菌超氧阴离子释放能力曲线的测定

按照文献[10]的羟胺氧化法(化学法)进行超氧阴离子浓度测定,并绘出超氧阴离子的释放时间曲线;再用超氧阴离子的浓度除以病原菌 10^9 的细胞数,得到每 10^9 cfu 植物病原菌释放的超氧阴离子量,即超氧阴离子的释放能力曲线。

基金项目 国家自然科学基金(30170238)

* 通讯作者。Tel 86-931-8910109;Fax 86-931-8912561;E-mail:lihy@lzu.edu.cn

作者简介 李 欣(1979-),女,河北省邯郸市人,博士研究生,研究方向为植物-病原菌相互作用。E-mail:lixin2004@st.lzu.edu.cn

其他作者 段建功¹,杨福军⁴(⁴ 兰州生物制品研究所,兰州,730060)

收稿日期 2004-07-08,修回日期 2004-12-09

1.3 植物病原细菌各组分的分级分离

从超氧阴离子释放时间曲线上比较各个植物病原细菌,选出超氧阴离子释放强且释放高峰较早的细菌——黄单胞菌属水稻白叶枯病菌中国系统菌株 OS-14 为植物病原细菌代表菌株,分级分离制备各组分。对数期菌悬液低速离心(5240r/min, 10min)得到菌体细胞,用等体积无菌水重悬,得到菌悬液样品。取出一部分菌悬液用 0.22 μ m 微孔滤膜过滤,制备无菌滤液^[9]。余下菌悬液用石英砂破碎细胞,离心除去未破碎的细胞。上清离心(14400r/min, 20min)得到细胞壁组分的沉淀^[11],上清备用。细胞壁沉淀用 0.1 体积水重悬得到 10 倍浓缩的细胞壁样品,再稀释 10 倍得到 1 倍的细胞壁样品;上清超速离心(40000r/min, 30min)得到细胞膜组分沉淀^[12],用 0.1 体积水重悬得到 10 倍浓缩的细胞膜样品。再稀释 10 倍得到 1 倍的细胞膜样品。重复 3 次以上分级分离制备各组分,用上述化学法和 ESR 法同时分别检测各组分的超氧阴离子浓度。

将菌悬液平行培养两组。分级分离制备各组分前 1h,在菌悬液中加入 DDC^[13,14]使终浓度为 1mmol/L,为处理组。与对照组一起按照上述方法制备各组分,ESR 检测对照组和处理组样品超氧阴离子浓度变化。

1.4 电子自旋共振法检测超氧阴离子信号^[15, 16]

对样品中超氧阴离子的信号用电子自旋共振法(ESR)进行检测。以 Tiron 为超氧阴离子的特异性捕捉剂,将 Tiron 加入样品溶液中,使捕捉剂终浓度为 10mmol/L,混匀,立即吸入一端封闭的玻璃毛细管中,5min 时放入德国 Bruker ER-200D 型 ESR 波谱仪的样品腔中检测超氧阴离子信号。

测试条件:微波频率,9.45GHz;微波功率,10mW;调制频率,100kHz;调制,1Gpp;增益,5 $\times$ 10⁵;时间响应,0.5s;中心磁场,3380G;扫场宽度,200G。

1.5 稀释与浓缩处理

将 OS-14 对数期菌悬液离心收集菌体,按照 1/24,1/18,1/9,1/6,1/3,1/2,1,6,20,21,24 倍体积用无菌水重悬菌体沉淀,0.22 μ m 微孔滤膜过滤制备无菌滤液。化学法检测稀释及浓缩处理菌悬液对无菌滤液中超氧阴离子释放的影响。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 进行统计学分析。

2 结果

2.1 植物病原细菌超氧阴离子释放能力时间曲线

由于多种植物病原细菌的生长速度不同,在同一时间菌悬液浓度有一定的差异。因此,简单的比较菌株的超氧阴离子释放浓度的差异并不能代表植物病原细菌超氧阴离子的释放能力。用病原菌悬液中超氧阴离子的浓度除以菌浓度,即为每 10⁹ cfu (Colony-forming units) 病原菌释放超氧阴离子的能力^[17](图 1)。

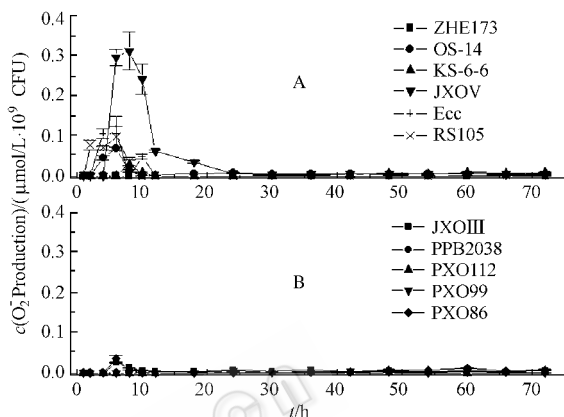


图 1 植物病原细菌超氧阴离子释放能力曲线

Fig. 1 The contrast in the time curves of O_2^- production in phytopathogenic bacteria

A: Strains with high O_2^- generating ability; B: Strains with little O_2^- generating ability.

由图 1 可见,供试病原细菌 O_2^- 的产生能力明显分为两类,图 1-A 类病原菌在对数期之前(0~20h)具有较高的 O_2^- 产生能力。随着菌株的生长,释放能力降到很低。图 1-B 类病原菌 O_2^- 的释放能力在病原菌的整个生长时期内都很低,基本没有 O_2^- 的释放。日本系统的 JXO III 和 JXO V 菌株的释放能力分属 A、B 两类,表现出显著的差异(SPSS 四种分析方法全部 $P < 0.05$)。

2.2 超氧阴离子释放主要位点的确定

为了进一步揭示病原菌超氧阴离子释放的内在规律和释放位点,我们对分级分离后的植物病原菌各个组分的超氧阴离子释放进行检测。选择释放能力曲线结果中显示的超氧阴离子释放较强且释放高峰较早的菌株——黄单胞菌属水稻白叶枯病菌中国系统菌株 OS-14 作为植物病原细菌的代表,并以其为实验对象,检测各组分超氧阴离子的释放情况。

2.2.1 化学法分别测定各个组分超氧阴离子的释放:OS-14 的无菌滤液中的 O_2^- 浓度($4.165 \pm 0.001155 \mu\text{mol/L}$)在各个组分中是最高的。同时,细胞壁($0.383 \pm 0.003644 \mu\text{mol/L}$)、细胞膜($0.302 \pm 0.00611 \mu\text{mol/L}$)等组分也均检测到少量的 O_2^- 存

在。这个结果与在动物病原菌——肠球菌中检测到胞外 O_2^- 的产生^[17] 等研究结果是一致的。

2.2.2 ESR 法检测各个组分的超氧阴离子信号 :由于化学法易受多种因素的干扰^[10] ,而且对细胞壁、细胞膜等部位微量超氧阴离子无法精确检测,我们采用更为直接、敏感性更高的电子自旋共振 (ESR) 方法对植物病原细菌 OS-14 各个组分的超氧阴离子释放进行检测,以进一步明确病原细菌中超氧阴离子释放的规律和主要位点。

信号显示,在分级分离得到的 OS-14 各个组分中,菌悬液、无菌滤液中检测到的超氧阴离子的 ESR 信号较强,而且相差不大。细胞壁和细胞膜中的超氧阴离子信号较弱,显示病原菌超氧阴离子释放的主要是在无菌滤液中(图 2)。McRae 等^[15, 16] 对 Tiron 和 DMPO 的比较研究结果显示,捕捉剂 Tiron 比通常使用的 DMPO 的灵敏性高,能够特异性捕捉超氧阴离子,并产生更稳定的信号,所以本实验采用 Tiron 为捕捉剂。3 次重复的 ESR 检测具有稳定的结果(图 2) 各个组分中,无菌滤液很可能是超氧阴离子释放的主要位点。这一结果和化学法的结论是一致的。

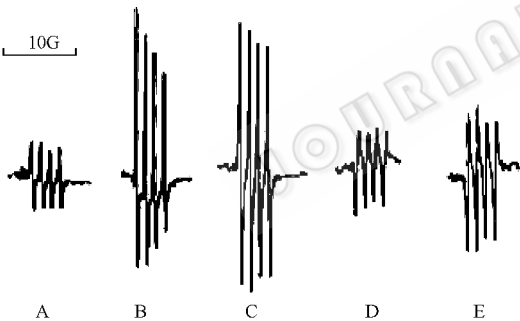


图 2 OS-14 各个组分 ESR 信号的比较

Fig.2 ESR spectra of O_2^- in cellular fractions of OS-14

A : Control ; B : Bacterial suspension ; C : Filtrate ; D : Cell wall ; E : Cytomembrane.

2.2.3 DDC 处理对各组分超氧阴离子释放的影响 :为了排除各组分中超氧阴离子清除酶 SOD 对 O_2^- 释放的干扰,用 SOD 酶的特异性抑制剂 DDC 处理 OS-14 各组分,检测各组分 O_2^- 释放的真实能力。DDC 处理后各组分的 O_2^- 浓度均略微下降。但无菌滤液仍是 O_2^- 释放最高的组分。植物病原细菌的无菌滤液很有可能是 O_2^- 释放能力最强的组分,即 O_2^- 释放的主要位点。

2.2.4 病原菌超氧阴离子释放的自我调节 稀释处理并不能按照稀释倍数降低无菌滤液超氧阴离子的

释放浓度,浓缩处理也不能有效的提高无菌滤液中超氧阴离子的释放。在 1/18 ~ 20 倍之间,无菌滤液中的超氧阴离子浓度能够维持大致稳定的水平 ($3.512 \pm 1.763 \mu\text{mol/L}$)。同时,相应的超氧阴离子释放能力也随着稀释倍数的加大上升,随浓缩倍数的提高降低。暗示植物病原菌对其自身超氧阴离子的释放具有一定的调节能力,使超氧阴离子的浓度维持在一个大致稳定的水平。

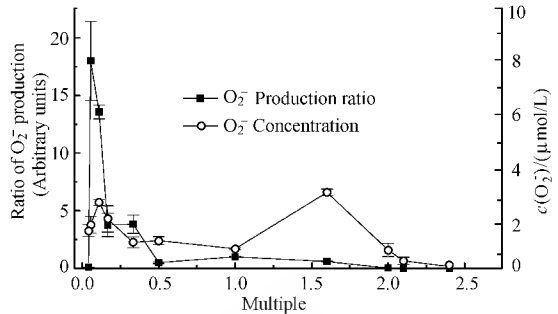


图 3 稀释及浓缩处理对无菌滤液中超氧阴离子的影响

Fig. 3 The effect of concentration and dilution on O_2^- concentration in filtrate

To show the figure more clearly, the 16-fold,20-fold, 21-fold, 24-fold concentrating treatments were placed in 1.6, 2.0, 2.1, 2.4 points, respectively.

2.3 各个组分超氧阴离子信号特性的差异

菌悬液中的 ESR 信号图谱中有复杂的超氧阴离子的信号裂分,可能包含两种或两种以上的不同 G 值的超氧阴离子存在 此外,菌悬液中的超氧阴离子信号的衰减速度非常快,甚至在检测完 1 次信号之前就有明显的信号峰的降低。无菌滤液中的 ESR 信号衰减速度与菌悬液相比要慢得多。

细胞壁中超氧阴离子的 ESR 信号较弱。在相同的检测条件下,细胞壁浓缩 10 倍后,大幅增强的信号峰证明细胞壁中的确有较弱的超氧阴离子存在,而且衰减较慢。与细胞壁类似,细胞膜超氧阴离子的信号也较弱。浓缩后大幅增强的信号峰同样证明细胞膜中超氧阴离子的存在,并具有较高的稳定性。

3 分析和讨论

我们研究植物病原细菌自身特性的目的是为了更好地了解互作情况下植物病原细菌超氧阴离子的释放特性和这些超氧阴离子对超氧阴离子释放互作的贡献。实验显示,植物病原细菌自身完全具备超氧阴离子的释放功能,其主要释放位点是细菌滤液,也就是病原菌的泌出物上。

供试菌株分成了两类。一类供试菌株超氧阴离子释放能力很强,另一类供试菌株则基本没有超氧阴离子释放能力(图 1)。其中与水稻 IR26 发生非亲和反应的黄单胞菌属水稻白叶枯病菌日本系统的 JXOV 菌株处于第一类,而与之发生亲和反应的 JXO III 在 O_2^- 释放上处于另一类,而对于水稻早生爱国 3 号,二者正好相反;中国系统,菲律宾系统菌株也出现类似的现象,即针对某一特定寄主植物的亲和菌株与非亲和菌株恰好都分布在上述 O_2^- 释放规律不同的两个菌株类群中。这是个非常有意思的实验现象。它使我们有理由猜测某一病原细菌的致病菌株和非致病菌株的种种本质差别中可能包含了 O_2^- 释放方面的差别。动物病原菌研究显示:离体条件下,动物病原菌能够检测到 O_2^- 释放并发现其产生与病原菌侵染有一定的联系^[17]。根据上述结果我们猜测,植物病原细菌中 O_2^- 的产生有可能和其致病性存在一定的联系。

DDC 处理后,无菌滤液仍然是 O_2^- 浓度最高的组分,与 DDC 处理前的结果一致。无论在 O_2^- 的释放能力上,还是在细胞自然状态下维持的 O_2^- 浓度上,显示无菌滤液很有可能都是植物病原细菌释放 O_2^- 的主要位点。DDC 处理后各组分的 O_2^- 浓度均下降,并没有因为对 SOD 清除 O_2^- 作用的抑制而出现 O_2^- 浓度的升高。这样,SOD 酶的作用就很有可能不仅仅是清除 O_2^- ,而 O_2^- 的产生也不仅仅是被动的被 SOD 酶清除这么简单。

在大肠杆菌中的研究显示,SOD 对大肠杆菌有非常重要的作用。Gort 等^[18]提出正常细胞新陈代谢中足够的 O_2^- 的产生就是为了保证充足的 SOD 的合成观点。很有可能 SOD 的合成不是简单为了清除 O_2^- ,反而由于 SOD 在胞内的重要作用,细胞释放 O_2^- 促进 SOD 的合成,维持正常的细胞生理生化环境,SOD 的活性很可能对胞内的 O_2^- 具有反馈调节的作用。

Gort 等^[18]指出,大肠杆菌中 O_2^- 主要是氧和呼吸链还原组分间的反应形成的,一般维持在 2×10^{-10} mol/L 的稳定水平。Imlay 等^[19]也提出,大肠杆菌正常细胞内的 O_2^- 的积累被限制在 2×10^{-10} mol/L 内。我们有关 DDC 的实验结果初步验证了 Gort 及 Imlay 等多个学者提出的假设。不同倍数的稀释及浓缩处理菌悬液后制备无菌滤液,释放的 O_2^- 维持在一定的水平,也显示无菌滤液乃至菌悬液具有

O_2^- 释放自我调节能力。表明植物病原细菌细胞内可能也存在一个稳定的 O_2^- 环境。

初步的研究表明,本实验中植物病原菌分泌到胞外的能释放 O_2^- 的功能分子可能是一类非酶分子——有机酸类(未公开数据),蛋白质酶类并没有参与胞外组分——无菌滤液中 O_2^- 的释放及其调控。暗示植物病原菌胞外 O_2^- 可能是通过非酶途径释放,与胞内受酶类调控的 O_2^- 释放可能具有截然不同的机理。文献[20, 21]指出,大肠杆菌胞内 O_2^- 释放与肠球菌胞外 O_2^- 释放也存在酶类调控及非酶途径的差异。以前的许多研究表明,有机酸是一类重要的与植物病原菌致病性紧密相关的分子^[22-24],但对其作用机理一直不清楚,本实验可以为其作用机理以及病原菌胞内胞外不同途径的 O_2^- 释放及其调控的研究提供一些新的思路。

参 考 文 献

- [1] Lamb C, Dixon R A. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1997, **48**: 251 - 275.
- [2] Doke N. Involvement of superoxide anion generation in the hypersensitive response of potato tuber tissue to infection with an incompatible race of *Phytophthora infestans* and to the hyphal wall components. *Physiol Plant Pathol*, 1983, **23**: 345 - 357.
- [3] Przemyslaw W. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem J*, 1997, **322**: 681 - 692.
- [4] Jabs T, Tschöpe M, Colling C, et al. Elicitor-stimulated ion fluxes and O_2^- from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *Plant Biology*, 1997, **94**: 4800 - 4805.
- [5] Able J A, Guest I D, Sutherland W M. Use of a new tetrazolium-based assay to study the production of superoxide radicals by tobacco cell cultures challenged with avirulent zoospores of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. *Plant Physiol*, 1998, **117** (2): 491 - 499.
- [6] Mur A L, Brown R L, Darby M R, et al. A loss of resistance to avirulent bacterial pathogens in tobacco is associated with the attenuation of a Salicylic acid-potentiated oxidative burst. *The Plant Journal*, 2000, **23**(5): 609 - 621.
- [7] Sagi M, Fluhr R. Superoxide production by plant homologues of the gp91 (phox) NADPH oxidase. Modulation of activity by calcium and by tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiol*, 2001, **126**: 1281 - 1290.
- [8] Blokhina O B, Chirkova T V, Fagerstedt K V. Anoxic stress leads to hydrogen peroxide formation in plant cells. *J Exp Bot*, 2001, **52**: 1179 - 1190.
- [9] Li H Y, Wang J S. Release of active oxygen species from phytopathogenic bacteria and their regulation. *Chinese Science Bulletin*, 1999, **44**(1): 71 - 75.

- [10] Schneider K, Schlegel G H. Production of superoxide radicals by soluble hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus* H16. *Biochem J*, 1981, **193** : 99 – 107.
- [11] Ketela T, Green R, Bussey H. *Saccharomyces cerevisiae* Mid2p is a potential cell wall stress sensor and upstream activator of the PKC1-MPK1 cell integrity pathway. *J Bacteriol*, 1999, **181**(11) : 3330 – 3340.
- [12] Norling B, Zak E, Andersson B, *et al.* 2D-isolateion of pure plsma and thylakoid membrane from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEBS Lett*, 1998, **436** : 189 – 192.
- [13] Papadakis K A, Roubelakis A K. The generation of active oxygen species differs in tobacco and grapevine mesophyll protoplasts. *Plant Physiology*, 1999, **121** : 197 – 205.
- [14] Takahama U, Takahama S M, Egashira T. Reduction of exogenous cytochrome c by *Neurospora crassa* conidia : Effects of superoxide dismutase and blue light. *J Bacteriol*, 1982, **152**(1) : 151 – 156.
- [15] McRae G D, Thompson E J. Sencence-dependent changes in superoxide anion production by illuminated chloroplasts from bean leaves. *Planta*, 1983, **158** : 185 – 193.
- [16] Gönner V M, Schlösser E, Neubacher H. Evidence from electron-spin resonance for the formation of free radicals during infection of *Avena sativa* by *Drechslera* spp. . *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 1993, **42**(6) : 405 – 412.
- [17] Huycke M M, Joyce W, Wack M F. Augmented production of extracellular superoxide by blood isolates *Enterococcus faecalis*. *J Infect Dis*, 1996, **173**(3) : 743 – 746.
- [18] Gort S A, Imlay A J. Balance between endogenous superoxide stress and antioxidant defenses. *J Bacteriol*, 1998, **180** (6) : 1402 – 1410.
- [19] Imlay A J, Fridovich I. Assay of metabolic superoxide production in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 1991, **266**(11) : 6957 – 6965.
- [20] Imlay A J. A metabolic enzyme that rapidly produces superoxide, fumarate reductase of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 1995, **270** (25) : 19767 – 19777.
- [21] Huycke M M, Moore D, Wendy J, *et al.* Extracellular superoxide production by *Enterococcus faecalis* requires demethylmenaquinone and is attenuated by functional terminal quinol oxidases. *Molecular Microbiology*, 2001, **42**(3) : 729 – 740.
- [22] Noda T, Sato Z, Kobayashi H, *et al.* Isolation and structural elucidation of phytotoxic substances produced by *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*. *Ann Phytopath Soc*, 1980, **40** : 663 – 666.
- [23] Bidochka M J, Khatourians G G. The implication of metabolic acids produced by *Beauveria bassiana* in pathogenesis of the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1991, **58** : 106 – 117.
- [24] Cessna G S, Sears E V, Diekmann B M, *et al.* Oxalic acid, a pathogenicity factor for *Sclerotinia sclerotiorum*, suppresses the oxidative burst of the host plant. *Plant Cell*, 2000, **12** (11) : 2191 – 2200.

Production and releasing sites of superoxide anion in phytopathogenic bacteria

LI Xin¹ LI Hong-yu^{1*} PANG Xin-yue¹ WANG Jin-sheng² LI Min-quan³

(¹ School of Life Sciences, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

(² Key Laboratory of Monitoring and Management of Plant Diseases and Pests, Ministry of Agriculture, Department of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

(³ Department of Plant Protection, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730060, China)

Abstract : Many phytopathogenic bacteria were founded to release the superoxide anion (O_2^-) by themselves from different sites and the production of O_2^- was related to the pathogenicity of strains. The presences of O_2^- in cytomembrane, cell wall and filtrate were confirmed by chemical method and electron spin resonance (ESR). The results show that filtrate may be the primary site of O_2^- production due to its higher O_2^- generating activity either in the presence or the absence of DDC. Additional lines of evidence further suggested a regulatory mechanism of O_2^- production in phytopathogenic bacteria.

Key words : Phytopathogenic bacteria, Superoxide anion production, Electron spin resonance (ESR)

Foundation item : Chinese National Natural Science Fund (30170238)

* Corresponding author. Tel : 86-931-8910109 ; Fax : 86-931-8912561 ; E-mail : lihy@lzu.edu.cn

Other authors : DUAN Jian-gong¹, YANG Fu-jun⁴ (⁴ Lanzhou Institute of Biological Products, Lanzhou 730060, China)

Received date : 07-08-2004