

## 菌体脂多糖在大白菜软腐欧文氏菌 对寄主根表吸附中的作用

董 汉 松

(山东农业大学植保系,泰安 271018)

王 金 生      方 中 达

(南京农业大学植保系,南京 210014)

用两种方法分别洗除菌体胞外多糖 (EPS) 和脂多糖 (LPS), 经在大白菜幼苗上测定表明, 菌体洗除 LPS 后对寄主根表的吸附能力明显减弱, 吸附菌量随无 LPS 的菌体在混合接种体中比例的增高而降低, 在无 LPS 的菌体接种体中加入 LPS 提取物, 可使吸附能力恢复到正常水平; 平行测定的 EPS 不发生上述影响。用 EPS 和 LPS 对根表进行预处理, 均可明显抑制完整菌体 (不洗, 含 EPS 和 LPS) 和无 EPS 的菌体对根表的吸附, 但只有 LPS 预处理使无 LPS 的菌体吸附量提高 2—3 倍。用大白菜对该菌的专化性细菌凝集素 Agin-SD60 所作的菌体凝集试验表明, 菌体洗除 LPS 后不再被 Agin-SD60 所凝集。根据以上结果认为, 菌体脂多糖在大白菜软腐欧文氏菌与寄主的接触识别中可作为细菌识别子起作用。

**关键词** 大白菜软腐欧文氏菌; 脂多糖; 吸附

关于病原细菌-寄主植物相互识别的研究, 在根瘤菌与豆科植物<sup>[1]</sup>、根癌农杆菌与双子叶植物<sup>[2]</sup>相互作用体系以及植物叶斑型细菌性病害系统<sup>[3,4]</sup>中已有大量报道。这些研究表明, 接触识别是病原-寄主相互识别的第一个环节, 是通过病菌对寄主的吸附实现的<sup>[5]</sup>。它的分子机制在于植物识别子 (cognor) 与细菌识别子 (cognon) 之间分子互补的特异联结<sup>[6]</sup>。Cognor 的成分和性质因相互作用体系和寄主植物的不同而异, cognon 则被证明主要是菌体表面的多糖, 依菌类不同而有 EPS、LPS 和 CPS (荚膜多糖)<sup>[6,7]</sup>。

对软腐欧文氏菌 (*Erwinia* spp.) 与它们的寄主间相互识别的研究起步较晚, 主要是因为人们认为这类细菌是弱寄生的伤口侵染菌, 病原与寄主间的专化性水平低<sup>[8,9]</sup>。董汉松<sup>[6,10]</sup>根据近年来对大白菜软腐病的系统研究指出, 软腐欧文氏菌与寄主间的相互作用是按阶段发生的专化性相互反应过程。根系侵入和潜伏侵染是这一相互作用过程中的关键环节<sup>[11,12]</sup>; 接触识别是建立根系侵染和潜伏侵染的必要条件<sup>[13,14]</sup>, 表现为病菌的趋根运动<sup>[14]</sup>、吸附的生物化学特性和寄主专化性以及吸附抑制的菌类与菌株特异性<sup>[15]</sup>。大白菜参与接触识别的 cognor 是一种细菌凝集素 (agglutinin), 定名为 Agin-SD60。Agin-SD60 的菌体凝集活性和与病菌菌体及其 LPS 发生免疫沉淀 (琼脂双扩散试验) 的能力表现出软腐组群 (包括 *E. carotovora* subsp. *carotovora*, subsp. *atroseptica* 和 *E. chrysanthemi*) 的专化性<sup>[15]</sup>。作者从病菌方面对参与接触识别的物质基础作了研究。

本文于 1991 年 12 月 23 日收到。

## 材 料 和 方 法

### (一) 材料

1. 菌株: RL4 是大白菜软腐欧文氏菌 (*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*) 的一个抗利福平菌株, 保存和繁殖方法同前<sup>[12]</sup>。

2. 寄主材料: 所用大白菜品种为福山包头, 种子由山东省农业科学院蔬菜研究所提供, 按 Knop 石英砂育苗法<sup>[14]</sup>获得幼苗。

### (二) 细菌接种体的制备

1. 完整菌体悬浮液: 按以前的方法<sup>[12]</sup>在含利福平 (600  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 的改良肉汁胨培养基<sup>[16]</sup>上制备, 用磷酸缓冲液调节含菌量。

2. 无 EPS 的菌体悬浮液: 用 0.02mol/L、pH7.5 的磷酸缓冲液 (PB) 浸泡菌苔制成菌悬液, 离心 (6000r/min) 清洗 3 次。最后一次沉降的菌体按等体积加 PB 悬浮, 经旋涡混合器充分混合后用灭菌玻棒蘸少许浓菌液涂于灭菌滤纸片上, 滴少许茴香醛-硫酸试剂<sup>[17]</sup>, 以在浸润圈内无颜色反应为菌体不含 EPS, 依颜色反应的有无决定是否再作离心清洗, 最后用 PB 悬浮并调节含菌量。

3. 无 LPS 的菌体悬浮液: 将洗除了 EPS 的菌体沉降物用 LPS 清洗液 (内含 Tris-HCl 10mmol; EDTA·Na 1mmol; NaCl 0.5%, W/V)<sup>[18]</sup> 浸泡 15 分钟, 离心清洗, 反复 3 次后用 PB 制成浓菌液, 按上法测定颜色反应, 以菌液涂抹处及周围不显色判断为菌体不含 LPS。最后用 PB 悬浮, 调节含菌量, 同时经平板生长测定证明菌体存活。

### (三) LPS、EPS 和 Agin-SD60 的提取

1. LPS: 用酚-水法<sup>[19]</sup>提取, 冷冻干燥、火焰烧结密封后于 4℃ 下保存, 使用时用 PB 配制成 8mg/ml 的溶液。

2. EPS: 用酒精沉淀法提取<sup>[20]</sup>, 余法同上。

3. Agin-SD60: 用 Bradshaw-Rouse 等<sup>[21]</sup>的方法从萌发后 3 天的大白菜幼苗中提取, 冷冻干燥和火焰烧结密封后在 4℃ 下保存, 使用时配成浓度为 0.5mg/ml 的溶液。

### (四) 测定内容

在以下测定中, 每处理组合均重复 3 次, 统计结果取平均值。

1. 菌体洗除 EPS 和 LPS 对吸附的影响: 用 3 种方式测定, 一是用以上 3 类菌悬液接种幼根; 二是用无 LPS 的菌体与完整菌体混合接种; 三是将提取的 EPS 和 LPS 分别加到无 LPS 的菌体悬浮液中, 15 分钟 (25℃) 后接种, 接种方法同前<sup>[14]</sup>。按照 Marshall<sup>[22]</sup> 的方法检测不可逆吸附的菌量。对根毛和根细胞表面的吸附菌量分别用微分干涉显微镜计数法<sup>[14]</sup>和平板回收计数法<sup>[23]</sup>测定。

2. 吸附抑制试验: 用 EPS 和 LPS 溶液分别对幼根预处理 30 分钟 (25℃), 按前法对预处理的幼根分别用 3 类菌悬液接种并检测吸附菌量。

3. Agin-SD60 对菌体的凝集: 用玻片凝集法在 Agin-SD60 与 3 类菌体间进行测定。

## 结 果

### (一) 菌体洗除 EPS 和 LPS 对吸附的影响

从表 1 可看出,菌体洗除 LPS 后,无论是对根细胞表面还是对根毛表面的吸附量均明显下降,而菌体洗除 EPS 对吸附无显著影响。

在微分干涉显微镜下测定完整菌体对根毛的吸附时,用玻片涂凡士林薄层的方法测定可吸附菌体(游离)在接种体中的比例对吸附量的影响,发现当接种体含菌量为  $10^5$ — $10^6$  CFU/ml 时,吸附菌量高低主要与可吸附菌体在接种体中的比例变化有关(图 1),而

表 1 菌体洗去 EPS 和 LPS 后对寄主根表的吸附情况

Table 1 The adsorption on root surfaces of Chinese cabbage by intact, EPS- and LPS-free cells of soft rot erwinia

接种的菌体类型 Bacterial cell	吸附菌量* Bacteria adsorbed		吸附菌量降低** Adsorption reduction (%)	
	根细胞表面 On root surfaces (CFU/g)	根毛表面 On root hairs (Bac/mm <sup>2</sup> )	根细胞上 On root surfaces	根毛上 On root hairs
菌体不洗 Intact (CK)	$3.63 \times 10^7$ ( $3.59-3.67 \times 10^7$ )	$8.19 \times 10^6$ ( $8.06-8.34 \times 10^6$ )		
洗去 EPS EPS-free	$3.84 \times 10^7$ ( $3.54-3.96 \times 10^7$ )	$8.18 \times 10^6$ ( $8.12-8.34 \times 10^6$ )	-5.79	0.12
洗去 LPS LPS-free	$8.59 \times 10^5$ ( $8.50-8.95 \times 10^5$ )	$6.87 \times 10^{-1}$ ( $6.07-7.90 \times 10^{-1}$ )	97.63	91.61

\* 不加括号的为平均值,括号内的为测定值范围。  
The unbracketed and bracketed figures indicate the means and ranges of tested values in 3 repeats.  
\*\* 由平均值计算。  
Based on the means.

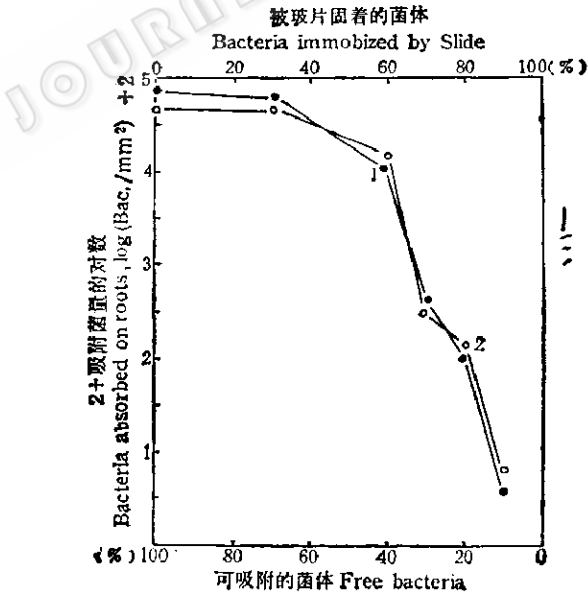


图 1 接种体中可吸附菌体比例与根毛吸附菌量的关系

Fig. 1 The amount of bacteria adsorbed on chinese cabbage root hairs affected by amounts of free bacteria in the inoculum

接种液含菌量 Bacteria in suspen.  $1.10^5$ ;  $2.10^6$

不受接种体含菌量的影响。据此,将无 LPS 的菌体与完整菌体混合接种,结果(表 2)表明,病菌对根细胞表面的吸附量随无 LPS 的菌体在混合接种体中比例的增高而降低。

表 2 两类菌体混合接种对吸附的影响\*  
Table 2 The adsorption inhibition by combined inoculation of intact with LPS-free bacterial cells

接种液含菌量 Bacteria in inocula (CFU/ml)			吸附菌量 Bacteria adsorbed (CFU/g)	吸附菌量降低 Adsorption reduction (%)
不洗 Intact	洗去 LPS LPS-free	菌体比例 Intact/LPS-free		
6.70×10 <sup>8</sup>	0	(CK1)	3.63×10 <sup>7</sup>	0
0	6.70×10 <sup>8</sup>	(CK2)	8.59×10 <sup>7</sup>	97.63
1.68×10 <sup>8</sup>	5.03×10 <sup>8</sup>	1/3	1.56×10 <sup>8</sup>	95.70
3.35×10 <sup>8</sup>	3.35×10 <sup>8</sup>	1/1	1.25×10 <sup>8</sup>	96.55
5.03×10 <sup>8</sup>	1.68×10 <sup>8</sup>	3/1	7.28×10 <sup>8</sup>	79.92

\* 在表 2—表 4 中,各处理的重复间误差均小于 0.5 个数量级,故不列出。  
In tests of Table 2—4, the errors among repeats were less than 0.5 gradient number and neglected to show.

当把提取的 EPS 和 LPS 以溶液状态加到接种体中进行测定时,吸附菌量的变化依菌体类型而不同(表 3)。LPS 的加入可明显降低完整菌体对根细胞表面的吸附量,但可使无 LPS 的菌体的吸附量提高 120 倍,而 EPS 无明显影响。

以上几组结果说明,菌体 LPS 是大白菜软腐欧文氏菌对寄主根表的吸附所不可缺少的成分。

表 3 接种菌悬液中加入 EPS 和 LPS 对吸附的影响  
Table 3 The effects of adding EPS and LPS to inocula on the bacterial adsorption

接种菌体类型 Bacterial Cell	加入 EPS 或 LPS Additives	吸附菌量 Bacteria adsorbed (CFU/g)	吸附菌量降低 Adsorption reduction (%)
不洗 Intact	No(CK)	1.32×10 <sup>8</sup>	
	EPS	1.07×10 <sup>8</sup>	18.94
	LPS	4.23×10 <sup>7</sup>	67.95
洗去 LPS LPS-free	No(CK)	3.13×10 <sup>6</sup>	
	EPS	2.47×10 <sup>6</sup>	21.09
	LPS	3.81×10 <sup>8</sup>	-12072.52

(二) LPS 对病菌吸附的抑制效应

表 4 列出了大白菜幼根用 EPS 和 LPS 预处理对病菌吸附的影响情况。LPS 预处理的影响有两种:① 明显抑制完整菌体(含 EPS 和 LPS)和无 EPS(但有 LPS)的菌体对根细胞表面和根毛表面的吸附;② 使无 LPS(也无 EPS)的菌体吸附量提高 2—3 倍。EPS 预处理的影响情况也有两种:① 明显抑制无 EPS 菌体的吸附,对完整菌体的吸附也有一定的抑制作用;② 对无 LPS(也无 EPS)的菌体吸附影响不明显。

### (三) 不同菌体被大白菜细菌凝集素的凝集情况

表 5 说明, 菌体洗除 EPS 后能更多地被大白菜细菌凝集素所凝集, 而洗去 LPS 后不再被凝集。

表 4 用 EPS 和 LPS 预处理根表对病菌吸附的影响

Table 4 The effects of root pretreatments with EPS and LPS on the bacterial adsorption

预处理物质 Pretreated by	接种体 Inocula*	吸附菌量 Bacteria adsorbed to		吸附菌量降低 Adsorption reduction(%)**	
		根细胞上 Root surfaces (CFU/g)	根毛上 Root hairs (Bac/mm <sup>2</sup> )	根细胞上 On root surfaces	根毛上 On root hairs
不作预处理 No					
CK1	A	$6.70 \times 10^7$	$6.00 \times 10^0$		
CK2	B	$6.71 \times 10^7$	$6.13 \times 10^0$	-0.15 <sup>①</sup>	-2.17 <sup>①</sup>
CK3	C	$1.00 \times 10^7$	$6.90 \times 10^{-1}$	84.85 <sup>①</sup>	88.50 <sup>①</sup>
EPS	A	$3.26 \times 10^7$	$2.13 \times 10^0$	51.34 <sup>①</sup>	64.50 <sup>①</sup>
	B	$9.40 \times 10^6$	$2.33 \times 10^{-1}$	86.09 <sup>②</sup>	96.20 <sup>②</sup>
	C	$9.08 \times 10^6$	$6.24 \times 10^{-1}$	9.20 <sup>③</sup>	9.56 <sup>③</sup>
LPS	A	$4.44 \times 10^6$	$5.60 \times 10^{-1}$	93.37 <sup>①</sup>	90.67 <sup>①</sup>
	B	$6.00 \times 10^6$	$1.86 \times 10^{-1}$	91.06 <sup>②</sup>	96.97 <sup>②</sup>
	C	$2.95 \times 10^7$	$2.62 \times 10^2$	-195.00 <sup>③</sup>	-280.03 <sup>③</sup>

\* A. 完整菌体; B. 无 EPS 的菌体; C. 无 LPS 的菌体。

The bacterial cells are intact in A, EPS-free in B, and LPS-free in C.

\*\* 右上标数码指: ①. 与 CK1 比; ②. 与 CK2 比; ③. 与 CK3 比。

The up-right figures ①, ②, and ③ indicate the calculated values marked were obtained by comparing the tested values with those in CK1, CK2, and CK3.

表 5 大白菜细菌凝集素 Agin-SD60 对菌体的凝集情况

Table 5 Agglutination of the soft rot erwinia by Agin-SD60, an agglutinin from Chinese cabbage seedlings

菌体类型 Bacterial cell	菌悬液含菌量 Bacterial numbers in suspensions (CFU/ml)							PB
	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>9</sup>	
洗去 LPS LPS-free	0	0	0	0	0	0	0	0
洗去 EPS EPS-free	0	50	70	85	100	70	50	0
不洗 Intact	0	30	50	85	85	50	30	0
PB(0.02mol/L pH7.5)	0	0	0	0	0	0	0	0

注: 表中数字为被凝集菌体的百分数。

Notice: The Agin-SD60 concentration used was 0.5μg/ml. Values in the table were percentage of agglutinated bacterial cells.

## 讨 论

病原细菌与寄主植物间的接触识别有分子识别和细胞识别两个过程, 细胞识别由分子识别引发, 表现为病菌对寄主细胞表面的吸附, 而分子识别就是在这种细胞识别中实现的<sup>[6,10]</sup>。对大白菜软腐病系统, 作者曾报道过病菌-寄主接触识别的细胞学特性<sup>[14]</sup>和大白菜细菌凝集素 Agin-SD60 作为 cognor 的作用<sup>[13]</sup>, 在本文中又从 3 个试验层次初步提出了病菌 LPS 在接触识别中的作用。

3 类菌体对寄主根表的吸附能力差别明显。吸附能力因 LPS 的洗除而削弱, 又为 LPS 以溶液状态的补入而恢复, 表明它是病菌吸附不可缺少的成份。这与 LPS 的分子结构有关。革兰氏阴性菌的 LPS 结构组分类似<sup>[12]</sup>, 分子内侧以脂 A 结合在菌体细胞壁上, 外侧的 O-抗原可以作为 cognor 的联结位点而联结植物作为 cognor 起作用的特定分子<sup>[6]</sup>。LPS 作为 cognon 可与植物的 cognor 分子在体外发生分子结合<sup>[16,23]</sup>。当 LPS 先与植物细胞结合后, 因占据了 cognor 联结位点而可以抑制含 LPS 的菌体对植物细胞的吸附<sup>[26]</sup>。因此, 据本研究的结果认为, 菌体 LPS 可以作为大白菜软腐欧文氏菌与寄主接触识别的 cognon 起作用, 寄主细菌凝集素 Agin-SD60 对 3 类菌体凝集作用的差别进一步说明了这一点。对 LPS 分子组成, 尤其是 O-抗原结构特性作进一步研究, 将会加深对这一观念的理解。

本研究中 EPS 对吸附的影响也值得注意。EPS 在接触识别中有两种作用<sup>[6]</sup>: 在少数情况下直接作为 cognon 参与分子识别。在多数情况下则作为 LPS 的掩盖物而阻碍 LPS 与寄主 cognor 的联结。它是菌体表面易扩散的半流体多糖, 对 LPS 与 cognor 联结所起的阻碍作用的大小主要取决于它在菌体的存在量和结合的紧密程度, 而在吸附抑制试验中的抑制作用则与使用量有关<sup>[27]</sup>。在大白菜软腐欧文氏菌中, 它显然是作为 LPS 的掩盖物而起作用。EPS 的这种作用与病菌吸附、侵入和致病性都有关系<sup>[21]</sup>, 有待研究。

## 参 考 文 献

- [1] Vance, C. P. et al.: Molecular Determinants of Plant Diseases, (ed. Nishimura, S. et al.), pp. 271—288, Jpn Sci. Soc. Press, 1987.
- [2] Gelvin, S. B.: *Plant Physiol.*, 92: 281—285, 1990.
- [3] Ragueh, F. et al.: *Physiol. Molec. Plant Pathol.*, 35: 23—33, 1989.
- [4] Matthyse, A. G.: Molecular Determinants of Plant Diseases, (ed. Nishimura, S. et al.), pp. 91—118, Jpn Sci. Soc. Press, 1987.
- [5] Lippincott, J. A. et al.: Plant-Microbe Interactions, Molecular and Genetic Perspectives, Vol. 1, (ed. Kousuge, T. et al.), pp. 195—214, MPC, New York, CMP, London, 1984.
- [6] 董汉松: 植物生理学通讯, 27: 391—396, 1991.
- [7] Carrion, M. et al.: *J. Bacteriol.*, 172: 1725—1731, 1990.
- [8] Perombelon, M. C. M.: *Phytopathogenic Prokaryotes*, (ed. Mount, M. S. et al.), pp. 55—69, Academic Press, New York, London, 1982.
- [9] Goodman, R. N. et al.: *The Biochemistry and Physiology of Plant Disease*, pp. 1—45; 195—149, University of Missouri Press, 1986.
- [10] 董汉松: 烟台师范学院学报(自然科学版), 7(2): 62—67, 1991.
- [11] 王金生等: 植物病理学报, 16: 109—116, 1986.
- [12] 王金生等: 植物病理学报, 15: 171—176, 1985.
- [13] 王金生等: 植物病理学报, 16: 185—191, 1986.
- [14] 董汉松等: 山东农业大学学报, 21: 8—14, 1990.

- [15] Wang, J. S. et al.: Papers and Posters, 7th Int. Conf. on Plant Path. Bac., p. 645, Budapest-Hungary, 1989
- [16] 董汉松等: 中国烟草, 2: 1—5, 1991。
- [17] 张龙翔等: 生化实验方法和技术, 第14—15页, 高等教育出版社, 北京, 1984 年。
- [18] Westphal, O. et al.: Methods in Carbohydrate Chemistry, Vol. 5, (ed. Whistler, R. L.), pp. 14—19, Academic Press, London, 1965.
- [19] Westphal, O. et al.: Z. Naturf., 7B: 148, 1952.
- [20] Brown, C. A. et al.: Physiol. Molec. Plant Pathol., 28: 149—160, 1986.
- [21] Bradshaw-Rouse, J. J. et al.: Appl. Env. Microbiol., 42: 344—350, 1981.
- [22] Marshall, K. C. et al.: J. Microb. Meth., 4: 217—227, 1986.
- [23] 董汉松等: 南京农业大学学报, 1: 46—49, 1987。
- [24] Rivera, M. et al.: J. Bacteriol., 171: 2244—2248, 1989.
- [25] Dazzo, F. B. et al.: J. Membr. Biol., 73: 1—16, 1983.
- [26] Pueppke, S. G.: Plant-Microbe Interactions, Molecular and Genetic Perspectives, Vol. 1, (ed. Kosuge, T. et al.), pp. 215—261, MPC, New York; CMP, London, 1984.
- [27] Coplin, D. et al.: Molec. Plant-Microbe Inter., 3: 271—279, 1990.

## THE ESSENTIAL FUNCTION OF LIPOPOLYSACCHARIDE AS THE BACTERIAL COGNON FOR ADSORPTION OF *ERWINIA CAROTOVORA* SUBSP. *CAROTOVORA* ON CHINESE CABBAGE ROOTS

Dong Hansong

(Department of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Taian 271018)

Wang Jinsheng Fang Zhongda

(Department of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210014)

The cells of soft rot bacterium, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, were washed with two methods to remove their extracellular saccharide(EPS) and lipopolysaccharide(LPS) and then inoculated to roots of Chinese cabbage seedlings, for testifying their adsorption on root cells and root hairs. The bacterial numbers adsorbed irreversibly were detected, and ranged from  $3.63 \times 10^7$  CFU  $\cdot$  g $^{-1}$  to  $1.32 \times 10^8$  CFU  $\cdot$  g $^{-1}$  on root cells and from 70 bac  $\cdot$  cm $^{-2}$  to 600 bac  $\cdot$  cm $^{-2}$  on root hairs when the intact(unwashed, and EPS-and LPS-containing) bacteria were used as inocula at about  $10^8$  CFU  $\cdot$  ml $^{-1}$ . The LPS-free bacteria showed about 92—97% decrease in amount of adsorbed bacteria in comparison with those of intact bacteria. The decrease degree of bacterial adsorption increased with the increment of LPS-free bacteria in the combined inoculum of them with intact ones. The adsorption ability of LPS-free bacteria could be recovered by adding purified LPS in their suspension. The EPS was also tested by the methods mentioned above, and no conspicuous effects were given on the bacterial adsorption. The root pretreatments with purified EPS and LPS could inhibit the adsorption of both intact and EPS-free bacteria, while only the pretreatments with LPS could enhance adsorption of LPS-free bacteria by 2—3 times. The Agin-SD60, an agglutinin from seedlings of Chinese cabbage, was used in a concentration of  $0.5 \mu$ g  $\cdot$  ml $^{-1}$  to examine the differences in agglutination of different types of the bacterial cells in term of surface saccharides. The EPS-free bacteria were able to be agglutinated by the agglutinin better than intact ones. No agglutination was detected in the LPS-free bacteria. From these results, it is seemed that the bacterial lipopolysaccharide functions as the cognon in recognition between the soft rot erwinia and chinese cabbage.

**Key words** Soft rot erwinia; Chinese cabbage; Adsorption; Lipopolysaccharide