

植物的超敏性细胞死亡研究初探^{*}

范文艳

(黑龙江八一农垦大学植物科技学院, 大庆 163000)

摘要: 超敏反应(HR)是植物抗性反应激活所表现出的最为常见的特征。植物的超敏性细胞死亡在生物化学和形态学上有许多特征与动物的细胞凋亡相似,并且受寄主植物的 *R* 基因和病原菌的 *avr* 基因产物相互作用所控制,*R* 基因产物与参与动物细胞凋亡的 CED-4 和 APAF-1 蛋白有相似之处,因此,超敏性细胞死亡明显是细胞程序化死亡(PCD)的一种形式。HR 中有多种信号分子的参与,活性氧是诱导 HR 的一个重要因子,并且活性氧的产生与水杨酸(SA)有着直接的关系。HR 很可能是作为一个信号系统而不是直接作为植物的一种防御机制。

关键词: 超敏反应(HR); 细胞程序化死亡(PCD); 活性氧; 信号转导

中图分类号: Q 942 文献标识码: A 文章编号: 1002-2767(2005)02-0031-04

The Investigation of Hypersensitive Cell Death of Plant

FAN Wen yan

(Heilongjiang August First Land Reclamation University, Daqing 163000)

Abstract: The hypersensitive response (HR) is common characteristic of activating plant resistance response to microbial pathogens. The hypersensitive cell death share a few biochemical and morphological features of animal apoptosis, and is controlled by interaction between host plant resistance (*R*) gene products and those of pathogen avirulence(*avr*) gene. those products have some similarities to CED-4 and APAF-1 proteins that involve in animal apoptosis. Thus hypersensitive cell death appears to be a form of programmed cell death (PCD). There are multiple signaling molecules in plant undergoing HR. Reactive oxygen is a significant factor in triggering the

^{*} 收稿日期: 2004-08-21

作者简介: 范文艳(1972-), 女, 黑龙江省人, 硕士, 讲师, 主要从事植保专业教学与科研工作。Tel: 0459-6819130。

3.2 在不同形态氮素比例处理的过程中,影响了其体内一系列相关酶的变化。比如 NO_3^- 促进硝酸还原酶(NR)起作用,低浓度 NH_4^+ 也有促进作用,尤其是在与 NO_3^- 共存的情况下,但高浓度 NH_4^+ 起抑制作用;另外还有对谷氨酰胺合成酶(GS)及其同工酶^[2~4]的影响,当植物生长在以 NO_3^- 为唯一氮源时,GS 活性都有所提高;而 NH_4^+ 也对 GS 的活性有一定的促进作用,随 NH_4^+ 浓度增加,根和叶片中谷氨酰胺合成酶的活性呈增加趋势。过量的硝酸盐促进 GS 活性,过量的铵使其活性降低。综上所述,甜菜对 NO_3^- 、 NH_4^+ 的亲亲和转运速度受到影响还与不同施氮水平下各种酶的微观调控有关,因此,要研究清楚甜菜氮同化这一问题,还应该从其

内部生理变化角度考虑,进行更深入的研究。

参考文献:

- [1] 余叔文,汤章城.植物生理与分子生物学[M].北京:科学出版社,第二版,1998 290 292
- [2] Chai X-Q, Yin L-P, Liu X-L, et al. Influence of different concentrations of NO_3^- and NH_4^+ on the activity of glutamine synthetase and other relevant enzymes of nitrogen metabolism in wheat roots[J]. Acta Botanica Sinica, 1996, 38(10): 803 808
- [3] Miflin B J, Lea P J. Amino acid metabolism[J]. Annual Review of Plant Physiol, 1977, 28: 299 329
- [4] Fieuw S, Willer brink J. Sugar transport and sugar metabolizing enzymes in sugar beet storage roots[J]. Plant Physiol, 1990, 137(2): 216 223

HR, and salicylic acid(SA) is directly related to generation of reactive oxygen. It is likely that HR acts more as signal system than as a defence mechanism.

Key words: hypersensitive response (HR); programmed cell death (PCD); reactive oxygen; signal transduction

在自然界中,植物经常会受到各种病原物(如,病原真菌、细菌和病毒)的侵害。虽然植物并不象动物具有特定的免疫系统来抵抗病原物的侵害,但植物常常通过特定的和可诱导的防御机制对病原物的侵袭做出响应。这类可诱导的防御反应包括植保素的积累、细胞中离子流出变化、活性氧种类的变化、防御相关基因的表达和超敏性细胞死亡。本文主要对有关超敏性细胞死亡方面的研究进行综述。

1 超敏性细胞死亡的功能

长期以来人们一直认为超敏反应(HR)所引起的细胞死亡可直接限制病原菌的生长和病害的扩展,但目前还未找到有力的证据。然而对真菌来说,它必需在活的植物体中才能生长和扩散。它可能有限地干扰植物抗性反应中HR的作用。由于真菌被阻止可能发生在不同的扩散阶段,因而,很难概括细胞死亡在直接影响真菌生长中的作用。在由专化性活体营养真菌所激发的抗性反应中,细胞死亡的方式也有很大变化。例如, *Peronospora parasitica* 可引起携带有R基因植物体的6种完全不同的细胞死亡方式。在一些情况下,细胞死亡仅发生在被真菌侵染的细胞,而在另一些情况则是发生在远离真菌侵染点的部位。这些细胞死亡的不同方式可能反映了细胞死亡在限制病原菌中有不同的作用,这暗示了R基因不完全激活与抗性反应和阻止病原菌扩展相伴随的细胞死亡,Reuber和Ritter的研究证明了这一点,他们的研究表明,在抗性反应期间只有当某一专化的R基因存在时,抗性相关基因才能被诱导表达^[1,2],并且不同的生理变化可通过不同的抗性基因来调节^[3]。这很可能是抗性反应通过特定的R基因的演化去识别对应的avr产物。例如,Century的研究表明虽然拟南芥的R基因Rpm1和Rpt2分别识别avrRpm1和avrPt2基因,并激活了一些分别以Rpm1和Rpt2控制的特定防御反应,但这两个R基因至少有一个共同的信号转导途径^[4]。这些研究表明HR很可能是作为一个信号系统而不是直接作为植物的一种防御机制。

2 超敏性细胞死亡是一种细胞程序化死亡

细胞程序化死亡(Programmed cell death, PCD)是多细胞生物体中部分细胞在一定的病理或生理条件下,为维持内环境的稳定及适应生存环境而采取的一种由基因调控的主动死亡方式。许多研究表明HR可能是PCD的一种形式,因为植物体发生HR时也表现出细胞凋亡的特征,如番茄原生质体用HR激发子花生四烯酸处理时也形成DNA梯形带、3'末端DNA^[5]。

许多研究结果显示HR是受遗传控制的。根据基因对基因假说,只有植物中含有R基因并且在病原物中有一个对应avr基因时才能导致抗性的产生,而只有其中一个基因存在时则导致植物感病,如*Pseudomonas syringae*菌中avr基因avrRpt2和avrB,与拟南芥R基因RPS2和RPM1对应^[6,7]。转R基因Cf和Xa21的马铃薯和玉米转化植株分别对*Cladosporium fulvum*^[8]和*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*^[9]产生部分抗性。avr基因在马铃薯病毒X中表达降低了激子活性,导致烟草对该病毒低的抗性反应^[10]。由于一些拟南芥突变体中可表现出一个明显的自发的HR或对一个异常刺激的反应,因而认为在抗性反应中,HR是一个受遗传调控的并且对应的调节其它与防御相关的生物化学过程^[11,12]。Dietrich等对拟南芥坏死拟态突变体lsd1研究结果显示,在细胞出现坏死时,不仅可以增强抗性标记特征的表达,也可增加突变体对细菌和卵菌病原菌的抗性^[12]。在无病原物存在的情况下,拟南芥acd2突变体可自发形成细胞坏死并且用致病和不致病细菌接种时可使远离接种部位的健康组织表现出HR^[13],相反,缺少这些隐性突变的野生型植物仅仅用无致病力菌株接种时才表现出HR。研究也表明ACD2和LSD基因具有负向调节HR和各种防御反应功能。Buschages等研究表明隐性等位基因ml-o赋予大麦对目前所知道的*Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*菌中的所有生理小种产生广谱抗性,ml-o基因编码的一个跨膜蛋白在寄主抗性反应中起关键作用^[13]。烟草植物中的R基因也被称为N基因,编码TIR-NBS-LRR家族蛋白,并且该蛋白赋予烟草对TMV病毒产生抗性。对N基因产物的功能分析表明,TIR、NBS、LRR域在诱

导烟草对 TMV 病毒抗性中是必不可少的^[14]。目前的研究表明,还有一些 *R* 基因产物与参与动物细胞凋亡的蛋白 CED-4 和 APAF-1 有许多相似性^[15]。在含有 *R* 基因的转 *avr* 基因植物中, *avr* 基因表达时可引起细胞死亡^[16]。这些研究表明细胞死亡是受遗传调控的,并且这个细胞死亡是由抗性反应中信号转导组成突变而引起的。

3 超敏反应过程中细胞死亡的机制

植物对病原菌的敏感性常常是由遗传调节的。番茄对茎溃疡病的敏感性是由 *asc* 基因调节的,这个基因的存在也导致番茄对 ALL-toxin 毒素的敏感性^[17]。敏感型植物用 ALL-toxin 处理表现出植物对乙烯反应的症。植物经毒素处理后体内乙烯含量增加,而用乙烯抑制剂可部分的抑制症状的发生^[18]。由于乙烯本身不能诱导细胞死亡,因此,乙烯应该是细胞死亡的调节子。虽然,毒素诱导的细胞死亡的分子基础还不确定,但一些研究表明毒素诱导的细胞死亡是一类植物细胞程序化死亡。燕麦经 Victorin 毒素处理后表现出细胞凋亡的生物化学和形态学上的特征^[19,20]。AAL-毒素可诱导毒素敏感型番茄表现出一些与细胞凋亡相似的反应,AAL-toxin 诱导的 PCD 反应与 HR 反应相似,也有 Ca^{2+} 和乙烯的参与^[21],因此,显示出与诱导抗性反应的一些相似性。但莴苣受细菌侵染后诱导的 HR 没有表现出细胞凋亡的形态学特征。这可能表明在 HR 期间有两种或更多种机制影响 PCD。细胞凋亡在动物中是很普遍的现象,但发育期间的 PCD 至少还有另一个机制。如果植物病原菌的致病因子通过调节寄主 PCD 来起作用,如果细胞死亡有多个调节机制,这将是一个值得关注的问题。

4 超敏反应(HR)的执行

超敏反应(HR)同膜损伤、离子跨膜流动、活性氧爆发、蛋白激酶的激活、核酸内切酶激活、DNA 降解、基因表达密切相关。目前对这些事件的上游并不清楚,它可能参与 HR 的调节和执行,并且还可能关系到抗性反应的其它方面。

细胞的离子跨膜流动变化是超敏反应早期的特征。不亲和细菌引起敏感型细胞膜去极化、 K^+ 的外泄、胞外介质的碱化并且发生依赖于 H^+ -ATPase 活性的 K^+/H^+ 交换^[22]。Schaller 等利用 H^+ -ATPase 的抑制剂和激活剂激活了敏感型番茄细胞不同的防御途径,但质子流与细胞死亡之间的联系并不清楚^[23]。BO 蛋白是一个细菌 (*Halobacterium*

halobium) 的质子泵。BO 蛋白在烟草中的连续表达表明 K^+/H^+ 交换在调节 HR 中起重要作用。此外,BO 表达的烟草表现出 DNA 核酸内切酶水平增高,这个酶在 TMV 诱导烟草的抗性期间也被激活^[24]。细胞中的 Ca^{2+} 水平在 HR 执行中也起重要作用。在锈菌激活的 HR 过程中,胞内 Ca^{2+} 的增加似乎是必需的,并且 Ca^{2+} 通道抑制剂阻止了诱导的大豆叶片的 HR 发生^[25]。

虽然活性氧参与 HR 的激活和执行,然而活性氧爆发是否是激发 HR 的主要因子,目前还不清楚。Glazener^[26] 研究发现烟草细胞被 *hrp*-菌株侵染后虽发生活性氧爆发,但并不发生细胞死亡。一些研究表明活性氧的爆发可能在激发 HR 过程中起重要作用,因为激子 P_{mg} 诱导的活性氧爆发可完全被激酶抑制剂 K252A 阻止。当在无致病力细菌激发 HR 期间过氧化氢酶受到抑制而使 H_2O_2 大量产生时,细胞死亡数量也大大增加^[20]。虽然 K252A 可完全阻止由 P_{mg} 激发的活性氧爆发,但不能完全抑制无致病力细菌诱导的细胞死亡,这暗示了 H_2O_2 不可能单独来激发细胞死亡。外源施加 H_2O_2 可引起植物细胞死亡并且可诱导一个假推的 HR 标记基因 *HSR203J* 的转录表达,但当以 *Cladosporium fulvum* 激子激发细胞死亡时所产生的 H_2O_2 的浓度,外源施加 H_2O_2 时不能诱导番茄细胞死亡^[27]。这些研究结果也说明了在抗性反应中 H_2O_2 不足以引起所有的细胞死亡。然而,目前还不清楚是否在所有抗性反应的激活都导致 H_2O_2 的产生。一个可能是如果 H_2O_2 的浓度足够高,那么其它的信号分子是不必要的。这可以说明为什么活性氧诱导的悬浮培养的大豆细胞凋亡所需要的 H_2O_2 浓度是 8mM,而由细菌诱导的烟草细胞的抗性反应所产生的 H_2O_2 量很低,大约只有 $12 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$ 。许多研究表明,水杨酸(SA)可能与活性氧的产生有关,SA 可能是抑制了过氧化氢酶, H_2O_2 在坏死位点增加可能有助于调节细胞死亡的激活。

5 讨论

目前关于 HR 的调节和执行方面还有很多问题未解决。由于在植物中有许多基因影响 HR 的调节,因此,HR 对不同病原菌响应的调节可能不只是一条途径。HR 细胞死亡的机制可能依赖于寄主和病原菌相互作用,因为一些经历 HR 过程的植物细胞死亡没有表现出细胞凋亡的特征。在动物细胞中,活性氧激发的细胞凋亡有两个信号转导机制。这使得植物细胞中活性氧爆发被认为是 HR 激发

的一个可能的因子。虽然 H_2O_2 是诱导 HR 中的重要因子,但是否是 HR 诱导的专化信号还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Reuber TL, Ausubel FM. Isolation of Arabidopsis genes that differentiate between resistance response mediated by the RPS2 and RPM1 disease resistance genes[J]. Plant cell, 1996, 8: 241-249.
- [2] Ritter C, Dangl JL. Interference between two specific pathogen recognition events mediated by distinct plant disease resistance genes[J]. Plant cell, 1996, 8: 251-257.
- [3] Hammond-Kosack KE, Jones JGD. Plant disease resistance genes[J]. Annu Rev Plant Physiol Mol Biol, 1997, 48: 575-607.
- [4] Century KS, Holub EB, Staskawicz BJ. NDR1, a locus of Arabidopsis thaliana that is required for disease resistance to both a bacterial and a fungal pathogen[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995, 92: 6597-6601.
- [5] Dietrich RA, Richberg MH, Schmidt R, et al. A novel zinc finger protein is encoded by a negative regulator of plant cell death[J]. Cell, 1997, 88: 685-694.
- [6] Bisgrove SR, Somonich MT, Smith NM, et al. A disease resistance gene in Arabidopsis with specificity for two different pathogen avirulence genes[J]. Plant Cell, 1994, 6: 927-933.
- [7] Dong X, Mindrinos M, Davis KR, et al. Induction of Arabidopsis defense genes by virulent and avirulent Pseudomonas syringae strains and by a cloned avirulence gene[J]. Plant Cell, 1991, 3: 61-72.
- [8] Lauge R, Dimtriev AP, Joosten MAHJ, et al. Additional resistance gene(s) against Cladosporium fulvum present on the CF-9 introgression segment are associated with strong PR protein accumulation[J]. Mol Plant Microbe Interact, 1998, 11: 301-308.
- [9] Wang GL, Ruan DL, Song WY, et al. Xa21D encodes a receptor-like molecule with a leucine-rich repeat domain that determines race-specific recognition and is subject to adaptive evolution[J]. Plant Cell, 1998, 10: 765-779.
- [10] Kamoun S, Honee G, Weide R, et al. Kooman-Gersmann M. The fungal gene Avr9 and the oomycete gene inf1 confer avirulence to potato virus X on tobacco[J]. Mol Plant Microbe Interact, 1999, 12: 459-462.
- [11] Dietrich RA, Delaney TP, Uknes SJ, et al. Dangl JL. Arabidopsis mutants simulating disease resistance response[J]. Cell, 1994, 77: 565-577.
- [12] Greenberg JT, Guo A, Klessig DF, et al. Programmed cell death in plants: a pathogen-triggered response activated with multiple defense functions[J]. Cell, 1994, 77: 551-563.
- [13] Buschages R, Hollnicher K, Panstruga R, et al. The barley Mlo gene: a novel control element of plant pathogen resistance[J]. Cell, 1997, 88: 695-705.
- [14] Dinesh-Kumar SP, Tham WH, Baker BJ. Structure-function analysis of the tobacco mosaic virus resistance gene N[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97: 14789-14794.
- [15] Biezen EA, Jones JKG. The NB-ARC domain: a novel signaling motif shared by plant resistance gene products and regulators of cell death in animal[J]. Curr. Biol, 1998, 8: 226-227.
- [16] He SY. Type III protein secretion systems in plant and animal pathogenic bacteria[J]. Annu Rev Phytopath, 1998, 36: 363-392.
- [17] Clouse SD, Gilchrist DG. Interaction of the Ase locus in F₈ paired lines of tomato with Alternaria alternata f. sp. lycopersici and AAL-toxin[J]. Phytopathology, 1987, 77: 80-82.
- [18] Moussatos VV, Yang SF, Ward B, et al. AAL-toxin induced physiological changes in Lycopersicon esculentum Mill: roles for ethylene and pyridine intermediate in necrosis[J]. Physiol. Mol. Plant Pathol, 1994, 44: 455-468.
- [19] Tada T, Hata S, Takata Y, et al. Induction and signaling of an apoptotic response typified by DNA laddering in the defense response of oats to infection and elicitors[J]. Mol. Plant-Microbe Interact, 2001, 14: 477-486.
- [20] Yao N, Tada Y, Park P, et al. Novel evidence for apoptotic cell response and differential signals in chromatin condensation and DNA cleavage in victorin-treated oats[J]. Plant J, 2001, 28: 13-26.
- [21] Moore T, Martineau B, Bostock RM, et al. Molecular and genetic characterization of ethylene involvement in mycotoxin-induced plant cell death[J]. Physiol Mol. Plant Pathol, 1999, 54: 73-85.
- [22] Atkinson MM, Baker CJ. Role of the plasmalemma H⁺-ATPase in Pseudomonas syringae-induced K⁺/H⁺ exchange in suspension-cultured tobacco cells[J]. Plant Physiol, 1989, 91: 298-303.
- [23] Schaller A, Oecking C. Modulation of plasma membrane H⁺-ATPase activity differentially activates wound and pathogen defense response in tomato plants[J]. Plant Cell, 1999, 11: 263-272.
- [24] Mittler R, Shulaev V, Lam E. Coordinated activation of programmed cell death and defense mechanisms in transgenic tobacco plants expressing a bacterial proton pump[J]. Plant Cell, 1995, 7: 29-42.
- [25] Xu H, Heath MC. Role of calcium in signal transduction during the hypersensitive response caused by basidiospore-derived infections of the cowpea rust fungus[J]. Plant Cell, 1998, 10: 585-597.
- [26] Glazener JA, Orlandi EW, Baker CJ. The active oxygen response of cell suspensions to incompatible bacteria is not sufficient to cause hypersensitive cell death[J]. Plant Physiol, 1996, 110: 759-763.
- [27] Lu H, Higgins VJ. The effect of hydrogen peroxide on the viability of tomato cells and of the fungal pathogen Cladosporium fulvum[J]. Physiol Mol Plant Pathol, 1999, 54: 131-143.