

大豆抗疫霉根腐病机制的研究进展^{*}

张淑珍 王维峰^{**} 西芳^{**} 郝连林^{**} 杨庆凯

(东北农业大学大豆研究所, 哈尔滨 150030)

ADVANCES ON THE RESISTANT MECHANISM OF
SOYBEAN TO *PHYOPHTHORA SOJAE*

(*Soybean Institute of North — East Agricultural University, Harbin 150030*)

中图分类号 S435.651 文献标识码 A 文章编号 1000—9841(2001)04—0290—05

大豆疫霉根腐病是由 *Phytophthora sojae* 引起的一种土传病害, 1948 年首次在美国的印地安那州发现, 以后相继在世界很多地方均有报道。由于其危害性大, 传播速度快, 毁灭性强, 已被列为大豆毁灭性病害之一。在国内 1991 年沈崇尧等在东北地区首次发现了该病菌, 1993 年苏彦纯等在黑龙江、吉林、北京分离到病原菌。其后的几年里在我国也分别有对该病的报道。鉴于该病在我国有扩大蔓延的趋势, 对大豆的生产存在着巨大的威胁。因此, 有必要对目前大豆抗疫霉根腐病的抗性机制方面的研究进展情况进行了解与掌握。

植物能产生与植物抗病性有关的生理活性物质。其中有些物质是植物本身所固有的, 有的是由病原物或其他因素诱导产生的, 如植保素、抗毒素、木质素、免疫信息物质等。80 年代以后, 人们尤为重视诱发抗病性。在这里也只对大豆抗疫霉根腐病机制中的诱发抗病性作一叙述。

1 植保素的研究

植保素是寄主和寄生物两个不同代谢系统相互作用中, 植物体内合成与积累的低分子量的微生物的拮抗物。植保素是一种植物体的次生代谢物, 主要是由莽草酸途径, 醋酸—丙二酸途径以及醋酸—甲羟戊酸途径合成。豆科植物中已发现的植保素到目前为止有 102 种, 主要是类异黄酮的衍生物。在

大豆中主要有大豆素 I, 大豆苷, 染料木黄酮等。

Ward 等(1983)^[21]的研究表明在用疫霉根腐病菌接种的亲合反应与非亲合反应中, 在最初都形成大豆素, 只是亲合反应在接种 14 小时后, 大豆素的合成速率较非亲合反应的明显下降。Bhattacharyya—MK 等(1987)^[3]研究了接种后的大豆下胚轴中大豆素 I 的生物合成和代谢, 发现病原菌的侵染诱发了一个代谢途径, 在该途径中大豆素 I 并非最终的产物。Dhawale—S 等(1989)^[6]用大豆疫霉根腐病菌接种具有小种特异性抗性的大豆时发现在大豆的叶部和根部查尔酮合成酶的 mRNA 的累积是不同的, 表明在大豆的不同器官, 抗性表达是不同的。Welle—R 等(1989)^[22]在研究中发现经大豆疫霉根腐病激发子处理大豆细胞后, 诱导了参与到 6'—脱氧查尔酮生物合成过程中的还原酶的生成。Graham—TL 等(1990)^[23]报道在了近等基因系大豆 Williams 及 Williams 79 的幼苗组织中发现了密切相关的异黄酮类物质大豆苷及染料木黄酮以结合体的形式而大量的存在, 并且其数量比在用亲合疫霉根腐病小种接种后的大豆组织中大豆素合成所需要的量要大得多, 并且用非亲合的小种接种后该结合体大量的水解成自由的大豆苷, 随后大豆素大量的合成。在用非亲合的小种接种后的感染组织中发现大豆苷的自由释放被抑制, 并且只有少量的大豆素

* 收稿日期: 2000—10—18

作者简介: 张淑珍(1972—), 女, 博士研究生, 从事大豆遗传育种专业

** 王维峰, 现在黑龙江省农垦勘测设计研究院工作 154002; 西芳, 现在黑龙江省肇东市华润金玉实业有限公司 151100; 郝连林, 黑龙江省林甸县花园乡农业站 166371

的合成。这些结果表明大豆素的生物合成并不只是单纯依靠早期苯丙氨酸及异黄酮代谢的酶的诱导,大豆对疫霉根腐病的抗性可能部分是由于异黄酮的苷元快速的从结合物中释放出来的原因。Fischer—D 等 (1990)^[11]对经激发子处理的大豆细胞培养物中获得的异黄酮合酶进行了纯化,并对其特性进行了研究。该酶通过 5 个步骤得以纯化,又通过凝胶电泳分析确定了它的分子量大约是 29000Da。Yoshikawa (1993)^[12]根据大豆疫霉根腐菌与大豆相互作用产生植保素的事实,提出寄主代谢过程导致植保素的合成与积累的模式。即当非亲合真菌小种与寄主细胞接触后,由于寄主细胞内存在 β -1,3 葡萄糖内切酶作用,胞壁快速的释放植保素激发子。释放的激发子与植物原生质膜互补的受体作用,产生第二信息物质传到细胞核激活调节基因,进一步转录,产生新的 mRNA,合成植保素有关酶,最后形成植保素。Morris—PF (1991)^[13]等研究表明在感疫霉根腐病的大豆幼嫩叶片中,在小种特异抗性的大豆叶中以及具小种非特异抗性的老叶中异黄酮与异黄酮类化合物的含量水平是较低的,说明任何形式的抗性反应都不是由于这些物质组成性地积累。接种后在大豆的叶子及下胚轴中发现此类物质中的几种含量有较大增加,其中包括大豆素。尽管大豆素是异黄酮类化合物中含量最多的物质,但异黄酮类中的其它几种化合物的含量却远远大于它。反映了在大豆中普遍的防御反应涉及到异黄酮类物质生物合成的几个途径的诱导,其中只有一个途径是导致生成大豆素。抗感反应的不同是由于大豆素 I 在抗性品种中较早的开始及随后的更高速的合成。Graham—MY (1991)^[14]等的研究发现在用大豆疫霉根腐病菌的细胞壁葡聚糖激发子处理 Williams 及 Williams 79 的离体子叶时酚类聚合物有一快速大量的累积。用组织化学染色及对酚类沉淀物的定量分析表明这些共价相连的酚类物质包括木质素及木栓质的多聚物以及一些简单的脂化香豆酸和阿魏酸单体。Mackintosh—C 等 (1994)^[15]用结构上不同的蛋白磷酸酶抑制子处理离体的大豆子叶导致了大豆异黄酮类植保素的积累,在合成的植保素中大豆苷占很大比例,同时用激发子处理也得到了类似的结果。在 20—24 小时之后对任何一种蛋白磷酸酶抑制子或激发子反映而产生的黄酮类化合物达到了一个最大值。Vedenyapina—EG (1996)^[16]等用低浓度的异黄酮类植保素大豆素处理大豆疫霉根腐病菌的菌丝,发现它可以抑制固体培养基中的菌丝的辐射生长,

在液体培养基中通过游动孢子的形成和萌发而使菌丝体减少。Enkerli—K (1997)^[17]等用免疫标记和透射电子显微镜对用疫霉根腐病 2 号小种接种的感病和抗病大豆的细胞壁的沉积物的化学成分进行了分析。发现不论接种后沉积物沉积的时间长短也不论寄主的抗感与否都发现在沉积物中存在 β -葡聚糖,木葡聚糖以及阿拉伯半乳糖葡聚糖蛋白,在真菌的细胞壁和寄主的细胞胞间连丝中发现 β -葡聚糖。

2 植保素激发子的研究

所谓激发子就是指能诱发寄主防卫反应的一些生物来源和非生物来源的物质的统称。根据对寄主植物的特异性反应又可分为非专化性和专化性两大类。病原物和寄主都可产生激发子。在大豆疫霉根腐病菌的细胞壁上就具有植保素的激发子。

Yoshikawa, —M. 等 (1993)^[12]报道在大豆细胞膜上存在着来自疫霉根腐病菌壁上的植保素激发子的结合位点,该激发子是由大豆组织中 β -1,3 内切葡聚糖酶释放的。大豆细胞膜上有结合该激发子的高亲合位点,高亲合活性是与富含原生质膜的片段相关。Takeuchi—Y 等 (1990)^[18]用免疫学再次证明 β -1,3 内切葡聚糖酶在大豆中是主要的激发子的释放因子。Bradley—DJ (1992)^[19]等用疫霉根腐病的激发子或谷胱甘肽处理大豆的细胞引起了在细胞壁上富含脯氨酸的结构蛋白的快速溶解。这种溶解与 H₂O₂ 为介质的氧化交叉连接相关,并且是出现在依靠转录防御体系表达之前。交叉连接在下胚轴生长期和在易于受到机械压力的组织中受发育的控制。得出结论:细胞壁上结构蛋白的靠刺激的氧化的交叉连接是一个在植物防御的最初阶段在细胞成熟和细胞壁的强化上具有潜在的重要功能的一个新的细胞调节位点。Ebel—j (1993)^[20]等对在大豆防御反应的活化过程中葡聚糖激发子结合蛋白和信号的传导作了研究,结果表明作为激发子的葡聚糖是在非亲合的接触中在真菌的孢囊萌发的早期阶段产生的。大豆细胞膜上的激发子结合位点的主要成分是一个 70kDa 的蛋白质。激发子参与的激发植保素产生的穿膜信号传递过程涉及到钙离子。Yoshikawa—M (1993)^[12]等对在活体内对由疫霉根腐病侵染后的具有植保素激发活性的激发子的分子结构已被定为 β -1,6 与 β -1,3 联结的葡聚糖,它们是由寄主内的内切葡聚糖酶释放的。在大豆的细胞膜上存在着一个特定的激发子的高亲合位点。亲合活性最高的是富于原生质膜的片段。结合决定于接

种后混合物的 pH 值, 孵育的温度及时间。Okinaka—Y 等 (1995)^[17] 对大豆细胞壁上的葡聚糖酶释放的激发子的主要结构进行了分析, 把它们分成了 4 个部分, 即具有激发子活性的 3 个部分和一个不具活性的部分。糖成分分析表明所有的片段都是由葡糖苷组成。核磁分析表明具活性的激发子的 3 个部分存在着 $\beta-1, 3$ 和 $\beta-1, 6$ 连接物, 而对无活性的部分只存在着 $\beta-1, 3$ 连接。

3 分子生物学

植物的种种抗病机制都是受到遗传基因控制的, 但是对调节抗病有关的控制基因及关于这些基因的转录和翻译因子还未清楚。到目前为止已发现有 20 余种植物抗病基因, 如植保素合成基因, 几丁质酶和 $\beta-1, 3$ 葡聚糖基因等。

Welle—R (1992)^[23] 等把被大豆疫霉根腐病侵染后在植保素合成途径中的第一个中间介质, 即涉及到 6—脱氧查尔酮生物合成的还原酶的 cDNA 克隆到表达载体 pkk233—2 中并转化到大肠杆菌中。Diers—BW 等 (1992)^[24] 等用 RFLP 标记对大豆抗疫霉根腐病位点进行了图谱分析。该研究发现 RFLP 标记与抗性基因位点 Rps1, Rps2, Rps3, Rps4, Rps5 和无效结瘤基因 Rj2 之间的连锁, 同时发现了 Rps2 与 Rj2 的连锁。Uhlmann—A (1993)^[19] 等把可能编码 3 个 4—肉桂酸辅酶 A 的同功酶的 3 个 cDNA 分离出来。扩展的氨基酸序列显示了到目前为止分析的所有植物的 4—肉桂酸辅酶 A 的扩展序列具有同一性的几个区域。使用 2 个 cDNA 片段表明在大豆中 4—肉桂酸辅酶 A 被一个小基因族所编码。这些基因族的有些成员在被亲合或不亲合的疫霉菌小种接种后的大豆根部或用疫霉菌的激发子处理的大豆细胞培养物中被差别表达。在大豆中, 4—肉桂酸辅酶 A 的同功酶具有对肉桂酸底物的不同的亲合性, 并且对环境的应激表现不同, 这说明 4—肉桂酸辅酶 A 可能在一个总的苯丙氨酸代谢进入到以后的代谢途径的分枝点上分配合成的肉桂酸中间产物上起到一个重要的作用。Bhattacharyya—MK (1997)^[11] 等把一个与 Rps1—k 等位基因紧密相连的反转录子 Tgmr 分离并定性。Southern 分析表明该成分被镶嵌在 Rps1—k 的临近区域中。Tgmr 包含着一个长的终止重复序列几 4 个非重叠的开放读码框。在 Tgmr 的内部存在着 gag, 蛋白酶, 整合酶, 反转录酶的保守区域, 但 Tgmr 的蛋白酶和反转录酶却由于存在几个终止子而不起作用。Lohnes—DG (1997)^[14] 等用 Clark 与 Harosoy 的杂交后代对

抗疫霉根腐病的基因 Rps7 进行了分子图谱定位, 将该基因定位在 Clark 与 Harosoy 分子图谱的第 22 个连锁群。

4 其它生理生化因素

Bhattacharyya—MK 等 (1987)^[2] 发现大豆对疫霉根腐病的抗性受温度的影响。分别在 25℃ 和 33℃ 下用不同的病原菌接种不同的寄主, 发现在 33℃ 下用病原菌接种的某些大豆品种下胚轴内苯丙氨酸解胺酶的活性比在 25℃ 下处理的大豆下胚轴内的低。在 25℃ 下抗病的某些品种随温度的升高到 33℃ 而感病。Ward—EWB 等 (1989)^[21] 脱落酸处理抗疫霉根腐病品种大豆的黄花幼苗后在下胚轴接种与未用脱落酸处理的该大豆接种后相比, 发现前者抗性降低。表现苯丙氨酸解胺酶的活性及该酶的 mRNA 的量的累积被抑制, 同时异黄酮植保素及大豆素的含量降低。结果表明在大豆抗疫霉根腐病的反应中, 由于脱落酸含量的影响大豆素的生物合成是受转录水平调控的。Cahill—DM 等 (1989)^[5] 用病原菌的非亲合小种接种大豆后发现在接种后 2—4 小时内, 在侵染部位脱落酸的含量有一急剧的下降, 而在侵染点周围或稍远部位的组织中脱落酸含量在接种后 4—6 小时内才有显著的减少。在亲合组织中脱落酸的含量在接种后 8 个小时才有明显的降低。得出结论脱落酸在特定位置含量的大幅度下降是在非亲合组织中侵染后的早期反应, 与亲合小种接种后的反应是相反的。脱落酸在调节抗性反应中可能起到一定的作用。Yi—Seung Youn (1996)^[26] 等的实验结果表明在疫霉根腐病菌的亲合与非亲合组合中, $\beta-1, 3$ 葡聚糖酶和几丁质酶的同功酶在症状发展的時候在大豆的下胚轴和子叶中累积, 并且它们量的累积是不同的。Yi—Seng Youn (1997)^[25] 等发现用疫霉根病菌接种的大豆会产生一些病原相关的蛋白的累积。在用非亲合接种的大豆下胚轴中发现一个 34kDa 的碱性 $\beta-1, 3$ 葡聚糖酶病原相关蛋白, 并对其进行了纯化。Enkerli—K (1997)^[20] 等用光学显微镜和电子显微镜对用亲合和非亲合病原菌小种接种的大豆的根部的超微结构进行了观察, 发现在所有的接触类型中, 游动孢子的成囊, 萌发及侵染在最初的 30 分钟内是相同的, 在 4 个小时后亲合与非亲合的组合表现才有差别。在亲合的反应中, 疫霉根腐病菌在大豆的皮层细胞内没有启动明显的植物反应的情况下而产生了许多吸器从而表现了很短暂的活体营养阶段, 该过程持续到接种后 10 个小时。到 15 个小时后, 几乎所有的根

都坏死, 维管束组织被阻塞。在非亲合的组织中, 在接种后 4 个小时内几乎没有吸器的产生及细胞的快速坏死。病原菌很少穿透抗性寄主的内皮层, 也几乎没有维管束阻塞的现象。Xu—Chang (1998)^[24] 等研究发现从大豆疫霉根腐病菌的游动孢子的再萌发到孢囊的产生决定于钙的可利用性。既然增加钙在刺激游动孢子的直接萌发上是有效的, 增加钙的土壤可以通过阻止游动孢子的释放而减少病害的蔓延。

从以上研究可以看出, 大豆疫霉根腐病菌非亲合小种侵染寄主后, 被大豆组织的 β —1, 3 内切葡聚糖酶释放的激发子被大豆细胞原生质膜上的 70kDa 的蛋白质接受子所结合, 它们相互作用后, 在大豆中产生了第二信使来传递膜受体上的信号, 使之达到植物的细胞核, 最后导致专化基因的转录, 以一定的时空形式表达植保素的积累。当然这只是一个粗略的模式, 其中植保素合成途径中各中间产物及前体还不甚清楚; 植保素激发子的分子生物学有的也只是建立在推测的基础上; 影响植物抗病的环境因素及生理因素研究得还不够系统。以上是世界各地对大豆抗疫霉根腐病菌机制的研究进展, 作一概括, 以加速我国对该病的研究进展。

参 考 文 献

- 1 Bhattacharyya MK. A copia—like retrotransposon Tgm1 closely linked to the Rps1—k allele that confers race—specific resistance of soybean to *Phytophthora sojae* [J]. Plant Molecular Biology, 1997, 34: 2, 255—264.
- 2 Bhattacharyya MK, Ward EWB. Biosynthesis and metabolism of glyceollin I in soybean hypocotyls following wounding or inoculation with *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* [J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 1987, 31: 3, 407—419.
- 3 Bhattacharyya MK, Ward EWB. Temperature—induced susceptibility of soybeans to *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*: phenylalanine ammonia—lyase and glyceollin in the host; growth and glyceollin I sensitivity of the pathogen [J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 1987, 31: 3, 387—405.
- 4 Bradley—DJ. Elicitor— and wound—induced oxidative cross—linking of a proline—rich plant cell wall protein: a novel rapid defense response [J]. Cell Cambridge, 1992, 70: 1, 21—30.
- 5 Cahill DM, Ward EWB. Rapid localized changes in abscisic acid concentrations in soybean in interactions with *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* or after treatment with elicitors [J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 1989, 35: 6, 483—493.
- 6 Dhawale S. Increase of chalcone synthase mRNA in pathogen— inoculated soybeans with race—specific resistance is different in

- leaves and roots [J]. Plant Physiology, 1989, 91: 3, 911—916.
- 7 Diers BW. Mapping *Phytophthora* resistance loci in soybean with restriction fragment length polymorphism markers [J]. Crop Science, 1992, 32: 2, 377—383.
- 8 Ebel J. Glucan elicitor—binding proteins and signal transduction in the activation of plant defence [C]. Advances in molecular genetics of plant—microbe interactions. Proceedings of the 6th International 1993, Vol. 2.
- 9 Enkerli K. Immunogold localization of callose and other plant cell wall components in soybean roots infected with the oomycete *Phytophthora sojae* [J]. Canadian Journal of Botany, 1997, 75: 9, 1509—1517.
- 10 Enkerli K. Ultrastructure of compatible and incompatible interactions of soybean roots infected with the plant pathogenic oomycete *Phytophthora sojae* [J]. Canadian Journal of Botany, 1997, 75: 9, 1493—1508.
- 11 Fischer D. Purification and characterization of pterocarpan synthase from elicitor—challenged soybean cell cultures [J]. Phytochemistry, 1990, 29: 9, 2879—2882.
- 12 Graham MY, Graham—TL. Rapid accumulation of anionic peroxidases and phenolic polymers in soybean cotyledon tissues following treatment with *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* wall glucan [J]. Plant Physiology, 1991, 97: 4, 1445—1455.
- 13 Graham, TL. Role of constitutive isoflavone conjugates in the accumulation of glyceollin in soybean infected with *Phytophthora megasperma* [J]. Molecular Plant Microbe Interactions, 1990, 3: 3, 157—166.
- 14 Lohnes DG, Schmitthenner AF. Position of the *Phytophthora* resistance gene Rps7 on the soybean molecular map [J]. Crop Science, 1997, 37: 2, 555—556.
- 15 MacKintosh C. Protein phosphatase inhibitors activate anti—fungal defence responses of soybean cotyledons and cell cultures [J]. Plant Journal, 1994, 5: 1, 137—147.
- 16 Morris PF. Identification and accumulation of isoflavonoids and isoflavone glucosides in soybean leaves and hypocotyls in resistance responses to *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* [J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 1991, 39: 3, 229—244.
- 17 Okinaka Y. A structural model for the mechanisms of elicitor release from fungal cell walls by plant β —1, 3—endoglucanase [J]. Plant Physiology, 1995, 109: 3, 839—845.
- 18 Takeuchi Y. Immunological evidence that β —1, 3—endoglucanase is the major elicitor—releasing factor in soybean [J]. Annals of the Phytopathological Society of Japan, 1990, 56: 4, 523—531.
- 19 Uhlmann A, Ebel J. Molecular cloning and expression of 4—coumarate: coenzyme A ligase, an enzyme involved in the resistance response of soybean (*Glycine max* L.) against pathogen attack [J]. Plant Physiology, 1993, 102: 4, 1147—1156.
- 20 Vedenyapina EG. Low concentrations of the isoflavone genistein influence in vitro asexual reproduction and growth of *Phytophthora*

- sojae* [J]. *Phytopathology*, 1996, 86: 2, 144—148.
- 21 Ward, EWB. Absciseic acid suppression of phenylalanine ammonia-lyase activity and mRNA, and resistance of soybeans to *Phytophthora megasperma f. sp. glycinea* [J]. *Plant Physiology*, 1989, 91: 1, 23—27.
 - 22 Wells R, Grisebach, H. Phytoalexin synthesis in soybean cells; elicitor induction of reductase involved in biosynthesis of 6'-deoxychalcone [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1989, 272: 1, 97—102.
 - 23 Wells R, Schröder J. Expression cloning in *Escherichia coli* and preparative isolation of the reductase coacting with chalcone synthase during the key step in the biosynthesis of soybean phytoalexins [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1992, 293: 2, 377—381.
 - 24 Xu Chang. External calcium controls the developmental strategy of *Phytophthora sojae* cysts [J]. *Mycologia*, 1998, 90: 2, 269—275.
 - 25 Yi SeungYoun. Purification and antifungal activity of a basic 34 kDa beta-1, 3-glucanase from soybean hypocotyls inoculated with *Phytophthora sojae f. sp. glycinea* [J]. *Molecules and Cells*, 1997, 7: 3, 408—413.
 - 26 Yi SeungYoun. Differential induction and accumulation of beta-1, 3-glucanase and chitinase isoforms in soybean hypocotyls and leaves after compatible and incompatible infection with *Phytophthora megasperma f. sp. glycinea* [J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 1996, 48: 3, 179—192.
 - 27 Yoshikawa M, Sugimoto, K. A specific binding site on soybean membranes for a phytoalexin elicitor released from fungal cell walls by beta-1, 3-endoglucanase [J]. *Plant and Cell Physiol*, 1993, 34 (8): 1229—1237.

联合发展药材种植—赠 VCD 影碟机

我单位是从事中药种植研究、培育、推广、收购的专业科研机构,是几个著名农业院校和科研机构的科技协作单位,并与几家大型制药厂、药材经销公司建立了长期供应中药材成品业务关系。几年来研究开发出十几个适应大田和室内种植且好种易管、南北适宜的中药材优良品种,在我国各地区春(25月)、秋(811月)种植。我单位在今年喜获丰收的基础上,决定再次向各地扩大联合种植面积。由我部免费供种、负责技术、保价回收产品、对方出土地、劳力。产品回收时一(我)九(你)分成。欲与我单位联营种植者,请写信或打电话联系。经我部研究决定,凡申请种植者均会得到我单位种源、资金无偿扶持,并且为种植户提供上门指导、上门回收产品。(另告:联营者所产的药材一律必须交售本部,由本部保价收购。并签订保价回收合同。回收价:天麻 280 元/kg、泊夫兰 22800 元/kg、药枣 190 元/kg)。为彻底解决种户技术困难,联营者一律赠送步步高 VCD 一部及全套中药材种植、管理、加工、技术光盘。愿合作者请来信联系,签订合同,领取种子。

联系单位:河南省卢氏县亚泰野生资源开发部

邮政编码:472200

联系人:李志恒

联系电话:0398—7870500

图文传真:0398—7863576