

大豆中 Glyceollins 诱导和累积研究进展

乞永艳¹, 刘富海²

(1. 中国农业部规划设计研究院, 北京 100026; 2. 北京天宝康高新技术开发有限公司, 北京 100097)

ADVANCES IN INDUCTION AND ACCUMULATION OF GLYCEOLLINS IN SOYBEAN RESEARCH

QI Yong-yan, LIU Fu-hai

(1. Chinese Academy of Agricultural Engineering, Beijing, 100026; 2. Beijing Tianbaokang High-tech. Co., Ltd, 100097)

中图分类号 S565.1 文献标识码 A 文章编号 1000-9841(2007)03-0400-07

随着食用大豆制品与人类健康关系研究的深入, 科学家们发现, 除了大豆本身所固有的异黄酮类化合物具有多种生物学作用外, 大豆的诱导产物 glyceollins 不仅具有植物抗毒素作用, 同时也是一种植物雌激素。关于 glyceollins 呈现雌激素作用的机理, 尤其是在抑制癌细胞增殖方面的作用正在引起越来越多研究者的兴趣^[1]。随着对 glyceollins 雌激素作用研究的深入, glyceollins 有可能成为大豆中的又一健康元素而被引起广泛关注。现将 glyceollins 诱导与累积的研究进展作一简单介绍, 以期对 glyceollins 的深入研究和充分利用提供些许参考。

1 Glyceollins 简介

Glyceollins 是 Keen 等人在给大豆下胚轴接种大雄疫霉 (*Phytophthora megasperma* Drechs. f. sp. *glycinea* Vuan & Erwin 异名 *P. megasperma* var. *sojae* A. A. Hildebrand 和 *P. sojae* Kaufmann & Gerdemann, Pmg) 时发现的一种具有抗菌活性的物质^[2], 共有 6 个异构体^[3-5], 其中 glyceollin I、II 和 III 最常见^[4,6]。最早在氯化铜处理的大豆子叶中发现了很

少量的 glyceollin IV^[5]; 后在阔叶大豆 (*G. tomentella* Hayata) 和灰大豆 (*G. canescens* F. J. Herm) 的某些品种中发现了 glyceollin V (俗名: Canescacarpin) 和 glyceollin VI (俗名: Clandestacarpin)^[7], 但是在这些植物中不存在 glyceollin III, 至今未发现同时存在 glyceollin III 和 glyceollin V 的植物^[8]。

作为大豆在遭遇微生物侵染或非生物激发子作用时产生的一种植物抗毒素, Glyceollins 主要在抗性寄主组织中起抑制病原菌生长的作用^[9-11], 还可对植食性甲虫产生抗食性防御反应^[12]。研究者认为 glyceollins 是通过抑制病菌体内与膜运输有关的活动而起到上述作用的^[13-15]。Glyceollins 不仅具有植物抗毒素作用, 同时也是一种重要的植物雌激素^[1]。

2 Glyceollins 的诱导与累积

作为应激反应产物的 glyceollins 通常存在于遭受刺激的组织中, 而很少存在于未经处理的和只受伤的组织中^[16]。随着检测技术的进步, 近期在未经诱导处理的正常大豆组织中也检测到了微量的 gly-

收稿日期: 2006-08-22

作者简介: 乞永艳 (1970-), 女, 博士, 研究方向生物活性物质及其应用。E-mail: piaoliang_hao@163.com

ceollins^[8]。Glyceollins 的产生、累积及异构体比例的变化与多种因素有关,如激发子种类与浓度、组织器官、大豆品种和生长条件等。

2.1 激发子对 glyceollins 累积的影响

Glyceollins 的诱导产生与激发子的种类和浓度密切相关。诱导下胚轴中 glyceollins 生成的效率由强到弱依次为:硝酸银、氯化铜、Pmg、曲拉通 X-100、L-盐酸-半胱氨酸、氯化汞、硝酸铅、博来霉素硫酸盐、硫酸锌、中性红、硝酸镍和甲醛。当同时使用 0.001 M 硝酸银和 0.001 M 硝酸铅时,两者并不表现协同作用,Glyceollins 的产生效率与单独使用硝酸银时一样。用硝酸银处理前进行紫外线照射会大大降低硝酸银的诱导作用,Glyceollins 明显低于单独使用硝酸银的情况^[17,18]。硝酸银诱导大豆下胚轴产生 glyceollins 的能力与其浓度密切相关,由强到弱依次为:0.001 M、0.0005 M、0.0001 M 和 0.00001 M 的硝酸银^[17]。随着放线菌素 D 浓度由 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 增加到 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$,叶片中 glyceollins 的浓度也逐渐增大,从微量得无法检测增至 30 $\mu\text{g}/\text{g}$ 鲜重和 110 $\mu\text{g}/\text{g}$ 鲜重^[19]。但是曲拉通 X-100 是个例外,下胚轴对 0.5 mg/mL ~ 10 mg/mL 范围内的曲拉通 X-100 的敏感性是一样的^[17]。

大雄疫霉的菌丝体、游动孢子和细胞壁多糖 (PWG) 是研究 glyceollins 诱导体系最常用的生物激发子。在 0.02 $\mu\text{g}/\text{子叶}$ ~ 0.5 $\mu\text{g}/\text{子叶}$ 范围内,Glyceollins 随着激发子用量的增加而增大。而对于下胚轴,PWG 的最低用量为 0.1 $\mu\text{g}/\text{下胚轴}$,1 $\mu\text{g}/\text{下胚轴}$ 的用量时,Glyceollins 累积量达到最高^[2,11,20~23]。曲霉也能诱导 glyceollins 的累积,以 glyceollin I 为主,其中酱油曲霉 (*A. sojae*) 的诱导能力最强,是 Pmg 诱导量的近 3 倍;野生黄曲霉 (*A. flavus*) 处理的子叶中 glyceollins 累积量较低,但也足以抑制黄曲霉毒素 B₁ 的产生^[24,25]。虽然许多病原物可诱导 glyceollins 的累积,但也有例外,如当大豆叶片接种荧光假单胞杆菌 (*Pseudomonas fluorescens*) 和绿脓杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 时,并没有肉眼可见的过敏反应和 glyceollins 的累积^[19]。

大豆的不同组织器官对激发子表现明显的偏好性,0.2% 的十二烷基磺酸钠、1 mg/mL 的 L-盐酸半胱氨酸和 1 mM 的氯化汞能够诱导子叶累积 glyceollins,而对于叶片却无效,碘乙酸钠是叶片最有效的激发子,硝酸银则是下胚轴最有效的激发子^[19]。

2.2 Glyceollins 形成过程中信号分子的作用

大豆组织在受到激发子作用时,会经历一系列复杂而有序的信号调控,并使组织呈现出一些肉眼可见的变化,同时形成应对外界刺激的植物抗毒素 glyceollins^[26~28]。

2.2.1 伤口的作用

在某些大豆品种中(如 Williams),伤口是组织对外界刺激做出反应所必需的。但是,另一些大豆品种(如 Harosoy 和 Bragg)本身具有接收诱导的能力,即 glyceollins 的累积不需要有伤口的刺激作用。已发现的 14 个 Rps 基因位于 7 个不同的位点上,与 Rps7 相连的基因可能与 Harosoy 内在的接收诱导的能力有关,与 Rps1 和 Rps3 位点相连的基因调控着 Williams 接收诱导的能力^[29~31]。

2.2.2 光线的作用

光线对大豆子叶中的各种反应都有很强的诱发作用,尤其是可以大大增强受伤的或“受伤 + PWG”处理中多酚聚合物的累积,同时促进近端细胞中 glyceollins 和远端细胞中异黄酮的累积^[32]。对于未受伤的子叶,光线刺激使 *p*-香豆酰-辅酶 A 在查尔酮合成酶作用下形成柚苷配基-查尔酮,进一步形成染料木素 (genistein),导致丙二酰染料木苷的大量累积,而几乎检测不到 glyceollins 的前体——大豆苷元 (daidzein) 的糖苷大豆苷和丙二酰大豆苷^[28]。

2.2.3 谷胱甘肽的作用

鉴于大量含有硫氢基的有机和无机试剂被证明具有诱导活性以及谷胱甘肽中含有硫氢基并在细胞质中以 mmol/L 级浓度存在的事实,人们推想谷胱甘肽是一种潜在的防御反应信号,当细胞受伤或被切开时,细胞内的谷胱甘肽会迅速释放到质外体,影响或引起信号传导过程^[33~37]。研究证明当 PWG 存在时,谷胱甘肽会大大提高香豆雌酚的含量,基本不影响 glyceollins、大豆苷元和染料木素及其糖苷的累积^[28,38]。

2.2.4 茉莉酸和茉莉酸甲酯的作用

茉莉酸与伤口的应激反应有关,在受伤的、黑暗中生长的大豆下胚轴中有茉莉酸和茉莉酸甲酯的累积^[39]。茉莉酸甲酯可诱导受伤的、黑暗中生长的大豆组织和光照下组培细胞中查尔酮合成酶的转录活性^[40];无光线或 PWG 存在时,茉莉酸甲酯对异黄酮水平基本没有影响,但是可提高光线和 PWG 诱导的异黄酮糖苷的累积;50 μM 以上的高浓度会抑制受伤组织中 PWG 诱导的 glyceollins 的累积。研究者认为茉莉酸在激发诱导反应中可能扮演着“第二信使”的角色,与激发子有很强的协同作用,可认定为是激发子的增效剂,但目前尚未获得直接的

证据来证明这一点^[28,41]。

2.2.5 脱落酸的作用 脱落酸是植物的“抗逆诱导因子”，能够启动植物的抗逆基因，诱导植物体内的抗逆免疫系统，被认为是防御反应中的一种信号分子^[42,43]。2 mM (非生理浓度)的脱落酸会抑制苯丙氨酸氨解酶的转录活性和 glyceollins 的累积^[44]。脱落酸还是光线和 PwG 诱导的异黄酮累积的潜在抑制剂 ($ED_{50} \approx 1 \mu M$)，对 glyceollins 累积的抑制较弱 ($ED_{50} \approx 70 \mu M$)。研究者在肯定脱落酸在苯基丙酸类化合物形成中所起的消极作用的同时，认为对苯丙氨酸氨解酶转录活性的抑制并不能完全归咎于脱落酸的作用。脱落酸的作用可能是显著抑制组织在受到激发子刺激后而引发的异黄酮的从头合成。因此，即使异黄酮的从头合成被抑制了，但是细胞本身含有的异黄酮糖苷仍可水解，释放出游离异黄酮供 glyceollins 合成之需^[28]。

2.3 大豆品种对 glyceollins 累积的影响

Glyceollins 的累积在很大程度上受大豆品种的影响。通常，抗病体系中 glyceollins 的累积量明显高于感病体系，如用 Pmg 同样处理白化苗的下胚轴，在抗病品种 (Harosoy 63) 中 8 h 后可检测到 glyceollin I，12 h 后达到 600 $\mu g/g$ 鲜重；而在感病品种 (Harosoy) 中直到 12 h 时仍未检测到 glyceollin I。据此，研究者曾用 glyceollins 作为指标来建立测试体系用以筛选大豆抗病品种、检验病菌的致病性、研究激发子的诱导效率等^[45]。

不象豆科中的其它植物抗毒素那样广泛存在，Glyceollins 只存在于极为有限的几种植物中。从与大豆属亲缘关系较近的属中挑选一些植物检测它们在接种细菌后 glyceollins 的累积情况，在被检测的 27 个种中，除钩豆属 (*Teramnus*) 有 3 个种可以产生 glyceollin I (没有发现其他异构体) 外，其余的均未检测到 glyceollins；在亲缘关系较远的补骨脂 (豆科，补骨脂属) 中发现了 glyceollin I；在非豆科植物闭鞘姜 (*Costus speciosus*) 中检测到两个异构体。鉴于 glyceollins 的形成严格局限在大豆属中，研究者认为也许可以把 glyceollins 的诱导形成作为豆科植物分类的一个标准^[46]。

2.4 不同器官对 glyceollins 累积的影响

Glyceollins 的累积量及异构体比例随大豆组织器官的不同而变化。也许是由于不同组织的细胞结构和敏感性以及对激发子的吸收扩散能力不同，或者是由于不同器官中营养状况和酶反应体系不同，抑或是由于与 glyceollins 累积有关的其他前体化合物的含量不同，不同大豆器官中 glyceollins 的累积情况不同^[11,47,48]。通常情况下，根部 glyceollins 浓度最低，下胚轴中浓度最高^[45]。

Glyceollin 异构体的比例受激发子的影响很小，主要受大豆品种、植株日龄和组织器官等因素的影响^[48]。不同器官表现出对 glyceollin 几种异构体的不同偏好，经硫酸铜或 Pmg 处理的根部以 glyceollin I 为主，几乎不存在 glyceollin II 和 III^[49,50]；叶片中以 glyceollin III 为主，Glyceollin I、II、III 比例为 1: 3: 6^[34]；经硝酸银或 Pmg 处理的下胚轴中以 glyceollin I 为主，三者比例为 8: 1: 1^[51]；氯化铜处理的植株和豆荚中三者比例分别为 2: 1: 2 和 5: 3: 1^[52]。对于子叶，不同激发子处理时三种异构体比例变化较大，用氯化铜或 Pmg 处理时 glyceollin I 和 III 接近，比例接近于 2: 1: 2^[4,53]，但是用硝酸银处理时以 glyceollin I 为主，比例变为 6: 1: 1^[18]。

2.5 生长和温育条件对 glyceollins 累积的影响

植物在遭遇激发子刺激时首先要识别刺激并打开应激系统，之后调动体内物质和能量资源来产生植物抗毒素，故凡能影响物质流和能量流的因素都将影响 glyceollins 的累积。光照对于生长 6 d 的幼苗中 glyceollins 的累积非常重要，这与大豆的营养供应有密切关系，因此，白化苗中 glyceollins 累积量低于正常生长的幼苗。在诱导前去掉子叶的下胚轴中 glyceollins 累积远远低于正常下胚轴，因为子叶的去除引起蛋白质合成整体水平和氨基酸的下降，导致 glyceollins 合成前期所需底物苯丙氨酸供应的不足，从而降低了 glyceollins 的累积^[54]。用硝酸银处理下胚轴时，诱导处理前的光照情况对 glyceollins 累积的影响大，而处理后温育时的光照情况基本不影响 glyceollins 的累积^[17]。用 Pmg 处理生长 10 d 的子叶时，在感病体系中温育时的光照与否对 glyceollins 累积基本无影响；但在抗病体系中黑暗处温育会使 glyceollins 最大累积量明显低于光照下温育的情况^[11]。

Glyceollins 的累积一般遵循先升高后下降的趋势，但是不同器官或经不同激发子诱导时，Glyceol-

lins 浓度达到最高峰所需的时间不同。用硝酸银处理白化苗的下胚轴时,无论是抗病还是感病品种,48 h 以前 glyceollins 浓度持续升高,48 h 以后开始下降^[17]。正常生长 6~7 d 的下胚轴接种 Pmg 后 24 h 内 glyceollins 持续增加,24~28 h 维持在平台期^[54]。对于叶片,作用较弱的氯化铜在处理 48 h 就达到最大值,随后 glyceollins 浓度开始下降;重铬酸钾在 72h 时达到最大值;而最有效的碘乙酸钠(1 mM)却需要经过 4~5 d 才达到 glyceollins 浓度的最高值^[19]。

2.6 植株日龄对 glyceollins 累积的影响

植株生长日龄不同时,即使对于同一器官 glyceollins 的累积也不相同。成熟组织累积 glyceollins 的能力强于幼嫩组织,但是它们对于硝酸银的敏感性似乎不如幼嫩组织^[55]。用硝酸银浸泡下胚轴 5 min 并保温 24 h 后发现,生长 4 d 和 5 d 的下胚轴 glyceollin 浓度基本相同,且明显高于生长 7 d 和 8 d 的下胚轴中 glyceollins 浓度^[17]。植株日龄不仅影响 glyceollins 的浓度,还影响异构体的比例,硝酸银处理的 5 日龄和 10 日龄的下胚轴中 glyceollin I、II、III 比例分别为:24.3: 1.4: 1 和 13.7: 1.2: 1^[18]。

2.7 大豆中固有的其它异黄酮类化合物对 glyceollins 累积的影响

Glyceollins 的生物合成始于苯丙氨酸,经历 15 步酶促反应而最终形成^[7,8,56] (<http://www.ccrc.uga>),大豆苷元被认为是 glyceollins 的直接前体^[57~59]。

在大豆根部、下胚轴、子叶和新生的叶片中大豆苷元主要以糖苷形式存在。抗病体系中,当子叶经 Pmg 处理后(黑暗中保温),大豆苷元糖苷含量迅速下降,与此相伴的是游离大豆苷元在开始时的大量积累和随后的缓慢降低直至消失,这与 glyceollins 累积的动力学是一致的,Glyceollins 的半衰期为 100 h。但是,目前还不能确认 glyceollins 合成所用的大豆苷元是来自本身已经存在的少量游离苷元还是来源于糖苷水解后形成的游离苷元。在感病体系中,大豆苷元糖苷的水解和游离大豆苷元的大量生成明显滞后,尽管到后期形成了大量、甚至高于抗病体系的游离的大豆苷元,却几乎没有 glyceollins 的累积^[21]。

虽然染料木素不是 glyceollins 合成的直接前体,但是,在抗病和感病品种中丙二酰染料木苷含量均高于大豆苷元糖苷,促使人们研究它们在 glyceol-

lins 合成中的变化。结果发现,丙二酰染料木苷发生水解的进程表与大豆苷元糖苷类似,即在 glyceollins 合成之前释放出其大量的游离苷元——染料木素。目前,还不清楚在遭遇 Pmg 时释放出的这些游离染料木素的代谢去向,但是无论从化学结构角度还是从代谢路径中酶催化角度分析,认为这些游离的染料木素不大可能直接参与 glyceollins 的生物合成^[11],其主要作用是直接对 Pmg 产生毒性^[60]。

2.8 其他因素对 glyceollins 累积的影响

保粒霉素和硫酸链霉素都会阻止叶片在接种丁香假单胞杆菌大豆致病型小种(*Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*)时出现过敏性反应,并抑制 glyceollins 的累积。但是,当将保粒霉素用于经碘乙酸钠处理的叶片时,不能阻止坏死症状的出现,却能抑制 glyceollins 的累积;即使在碘乙酸钠处理 24 h 后再使用保粒霉素也不能使 glyceollins 的累积量达到象单独使用碘乙酸钠时那样高的浓度。与之不同的是,用硫酸链霉素处理经碘乙酸钠处理的叶片时,可以抑制坏死症状的出现,但却对 glyceollins 的累积没有影响。这表明二者的作用机制是不同的,保粒霉素作用于大豆细胞,而非微生物本身;硫酸链霉素则只作用于微生物^[19]。

Glyceollins 的合成在某种程度上也受到乙烯的影响,作为植物在遭遇胁迫时产生应激反应的信号分子,乙烯并没有参与 glyceollins 累积的启动,而是通过调节 glyceollins 合成过程中所需的碳源和能量从子叶向发生代谢反应的位点细胞的转移而影响着 glyceollins 的累积。Glyceollins 的合成还受到氨基酸含量的影响,同时 glyceollins 的合成也影响着植物本身的氨基酸水平。大豆组织中充足的氨基酸储备有利于 glyceollins 的累积,另一方面,它的累积将导致组织中氨基酸总体水平以及最初反应底物苯丙氨酸的大大降低^[54]。

以乳氟禾草灵为代表的二苯醚类除草剂都能够引起氧化损伤^[61],而氧化损伤在某些方面类似于过敏性细胞死亡,过敏性细胞死亡恰与被感染组织接受激发子诱导产生应对的能力有关^[62,63],这也许此类除草剂能够不同程度地增加 PWG 诱导 glyceollins 累积能力的主要原因^[64]。

3 小结

Glyceollins 的形成是一个复杂的系统调控过

程,是外界刺激与植物自身物质和能量转换的直接结果。Glyceollins 的累积受到诸多因素的影响,同时,glyceollins 的产生也影响着大豆本身的某些性状,如抗病性能的提高和某些生物活性成分的改变等。虽然以上结果是研究者们各自不同的试验条件下进行的,存在着试验方法、评判标准、计算方法(如采用量纲)等多方面的不统一性,但是,研究者们多年的努力工作大大加深了对 glyceollins 与大豆关系的认识,对之的深入了解必将有助于进一步改善大豆性状以提高其利用价值,并将有利于对大豆更广泛应用领域的开拓。

参 考 文 献

[1] Burow M. E. , Boue S. M. , Collins Burow B. M. , et al. Phytochemical glyceollins, isolated from soy, mediate antihormonal effects through estrogen receptor α and β [J]. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2001, 86 (4): 1750 ~ 1758.

[2] Keen N. T. , Sims J. J. , Erein D. C. , Rice E, et al. 6a - Hydroxyphaseollin: an antifungal chemical induced in soybean hypocotyls by *Phytophthora megasperma* var. *sojae* [J]. Phytopathology, 1971, 61 :1084 - 1089.

[3] Burden R. S. , Bailey J. A. The structure of the phytoalexin from soybean [J]. Phytochemistry, 1975, 14: 1389 - 1390.

[4] Lyne R. L. , Mulheim L. J. ,Leworthy D. P. New pterocarpinoids phytoalexins of soybeans [J]. Journal of the Chemical Society, Chemical Communications, 1976, 497 - 498.

[5] Lyne R. L. , Mulheim L. J. Minor pterocarpinoids of soybean [J]. Tetrahedron letters, 1978, 34: 3127 - 3128.

[6] Keen N. T. , Partridge J. E. , Zaki A. I. Pathogen - produced elicitor of a chemical defense mechanism in soybeans monogenically resistant to *Phytophthora megasperma* var. *sojae* [J]. Phytopathology, 1972, 62: 768.

[7] Keen N. T. , Lyne R. L. , Hymowitz T. Phytoalexin production as a chemosystematic parameter within the genus glycine [J]. Biochemical Systematics and Ecology, 1986, 14:481 ~ 486.

[8] Kraus G. , Spiteller G. , Mith fer A. et al. Quantification of glyceollins in non - elicited seedlings of *Glycine max* by gas chromatography - mass spectrometry [J]. Phytochemistry, 1995, 40 (3):739 - 743.

[9] Keen N. T. , Kennedy B. W. Hydroxyphaseollin and related isoflavanoids in the hypersensitive resistance reaction of soybean to *Pseudomonas glycinea* [J]. Physiological plant pathology, 1974, 4:173 ~ 185.

[10] Bhattacharyya M. K. , Ward E. W. B. 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: 387 ~ 405.

[11] Graham T. L. , Kim J. E. ,Graham M. Y. Role of constitute isoflavone conjugates in the accumulation of glyceollin in soybean infected with *Phytophthora megasperma* [J]. Molecular Plant Microbe Interactions, 1990, 3:157 ~ 166.

[12] Fischer D. C. , Kogan M. ,Paxton J. Effect of glyceollin, a soybean phytoalexin, on feeding by three phytophagous beetles (Coleoptera: Coccinellidae and Chrysomelidae): dose versus response [J]. Environmental Entomology. 1990, 19 (5): 1278 ~ 1282.

[13] Boydston R. , Paxton J. D. ,Koeppel D. E. Glyceollin: a site - specific inhibitor of electro transport in isolated soybean mitochondria [J]. Plant Physiology, 1983, 7:151 ~ 155.

[14] Weinstein L. I. , Albersheim P. Host - pathogen Interaction XXI-II. The mechanism of the antibacterial action of glycinol, a pterocarpin phytoalexin synthesized by soybean [J]. Plant Physiology, 1983, 72:557 ~ 563.

[15] Darvill A. G. , Albersheim P. Phytoalexins and their elicitors—A defense against microbial infection in plants [J]. Annual Review of Plant Physiology, 1984, 35:243 ~ 275.

[16] Köster J. , Strack D. ,Barz W. High performance liquid chromatographic separation of isoflavones and structural elucidation of isoflavone - 7 - O - glucoside - 6" - malonate from *Cicer arietinum* [J]. Planta medica, 1983, 48:131 ~ 135.

[17] Stössel P. Glyceollin production in soybean [J]. Phytopath. Z. , 1982, 105:109 ~ 119.

[18] Stössel P. , Magnolato D. Phytoalexin in *Phaseolus vulgaris* and *Glycine max* induced by chemical treatment, microbial contamination and fungal infection [J]. Experientia, 1983, 39, 153 ~ 154.

[19] Keen N. T. , Ersek T. , Long M. , et al. Inhibition of the hypersensitive reaction of soybean leaves to incompatible *Pseudomonas* spp. By blasticidin S, streptomycin or elevated temperature [J]. Physiological Plant Pathology, 1981, 18:325 ~ 337.

[20] Ayers A. R. , Ebel J. , Finelli N. , Berger N. , et al. Host - pathogen interactions. IX. Quantitative assays of elicitors' activity and characterization of the elicitor present in the extracellular medium of cultures of *Phytophthora megasperma* var. *sojae* [J]. Plant Physiology, 1976, 57:751 ~ 759.

[21] Moesta P. ,Grisebach H. Investigation of the mechanism of glyceollin accumulation in soybean infected by *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1981, 212(2):462 ~ 467.

[22] Sharp J. K. , McNeil M. , Albersheim P. The primary structures of one elicitor - active and seven elicitor - inactive hexa (β - D - glucopyranosyl) - D - glucitols isolated from the mycelial walls of *Phytophthora mesgasperma* f. sp. *glycinea* [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1984, 259:11321 ~ 11336.

[23] Cheong J. J. , Birberg W. , Fugedi P. , et al. Structure activity relationships of oligo - β - glucoside elicitors of phytoalexin accu-

- mulation in soybean [J]. The Plant Cell, 1991, 3:127 ~ 136.
- [24] Boué S. M. , Carter C. H. , Ehrlich K. C. et al. Induction of the phytoalexin coumestrol and glyceollin by *Aspergillus* [J]. Journal of Agricultural and food chemistry, 2000, 48:2167 ~ 2172.
- [25] Song D. K. , Karr A. L. Soybean phytoalexin glyceollin prevents accumulation of aflatoxin B1 in cultures of *Aspergillus flavus* [J]. Journal of Chemical Ecology, 1993, 19(6):1183 ~ 1194.
- [26] Ward E. W. B. , Buzzel R. I. Influence of light, temperature and wounding on the expression of soybean genes for resistance to *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* [J]. Physiological Plant Pathology, 1983, 23:401 ~ 409.
- [27] Graham M. Y. , Graham T. L. Wound – associated competency factors are required for the proximal cell responses of soybean to the *Phytophthora sojae* wall glucan elicitor [J]. Plant Physiology, 1994, 105:571 ~ 578.
- [28] Graham T. L. , Graham M. Y. Signaling in soybean phenylpropanoid responses. Dissection of primary, secondary, and conditioning effects of light, wounding, and elicitor treatments [J]. Plant Physiology, 1996, 110:1123 ~ 1133.
- [29] Athow K. L. , Laviolette F. A. , Mueller E. H. , et al. A new major gene for resistance to *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* in soybean [J]. Phytopathology, 1980, 70:977 ~ 980.
- [30] Anderson T. R. , Buzzell R. I. Inheritance and linkage of the *Rps* gene for resistance to *Phytophthora* rot of soybean [J]. Plant disease, 1992, 76:958 ~ 959.
- [31] Abbasi P. A. , Graham M. Y. , Graham T. L. Effects of soybean genotype on the glyceollin elicitation competency of cotyledon tissues to *Phytophthora sojae* glucan elicitors [J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 2001, 59:95 ~ 105.
- [32] Graham T. L. Cellular biochemistry of phenylpropanoid responses of soybean to infection by *Phytophthora sojae*. Handbook of Phytoalexin Metabolism and Action [M]. Edited by Daniel M. & Purkayastha R. P. Marcel Dekker, New York, 1995, 85 ~ 116.
- [33] Yoshikawa M. Diverse modes of action of biotic and abiotic phytoalexin elicitors [J]. Nature, 1978, 275:546 ~ 547.
- [34] Ingham J. L. , Keen N. T. , Mulheim L. J. , Lyne R. L. Inducibly – formed isoflavonoids from leaves of soybean [J]. Phytochemistry, 1981, 20: 795 ~ 798.
- [35] Osman S. F. , Fett W. F. Isoflavone glucoside stress metabolites of soybean leaves [J]. Phytochemistry, 1983, 22:1921 ~ 1923.
- [36] Stüssel P. Regulation by sulfhydryl groups of glyceollin accumulation in soybean hypocotyls [J]. Planta, 1984, 160:314 ~ 319.
- [37] Meister A. , Anderson M. E. Glutathion [J]. Annual Review of Biochemistry, 1983, 52:711 ~ 760.
- [38] Graham T. L. , Graham M. Y. Glyceollin elicitors induce major but distinctly different shifts in isoflavonoid metabolism in proximal and distal soybean cell populations [J]. Molecular Plant Microbe Interactions, 1991, 4: 60 ~ 68.
- [39] Reinbothe S. , Mollenhauer B. , Reinbothe C. JIPs and RIPs; the regulation of plant gene expression by jasmonates in response to environmental cues and pathogens [J]. The Plant Cell, 1994, 6: 1197 ~ 1209.
- [40] Gundlach H. , Mueller M. J. , Kutchan T. M. , et al. Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor – induced plant cell cultures [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1992, 89:2389 ~ 2393.
- [41] Creelman R. A. , Tierney M. L. , Mullet J. E. Jasmonic acid/ methyl jasmonate accumulate in wounded soybean hypocotyls module gene expression [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1992, 89:4938 ~ 4941.
- [42] Cottle W. , Kolattukudy P. E. Absciscic acid stimulation of suberization. Induction of enzymes and deposition of polymeric components and associated waxes in tissue cultures of potato tuber [J]. Plant Physiology, 1982, 70:775 ~ 780.
- [43] Pena Cortes H. , Sanchez Serrano J. J. Mertens R. , Willmitzer L. Absciscic acid is involved in the wound – induced expression of the proteinase inhibitor II gene in potato and tomato [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1989, 86:9851 ~ 9855.
- [44] Ward E. W. B. , Cahill D. M. , Bhattacharyya M. K. Absciscic acid suppression of phenylalanine ammonia – lyase activity and messenger RNA, and resistance of soybean to *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* [J]. Plant Physiology, 1989, 91:23 ~ 27.
- [45] Bhattacharyya M. K. , Ward E. W. B. Resistance, susceptibility and accumulation of glyceollins I – III in soybean inoculated with *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* [J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 1986, 29: 227 ~ 237.
- [46] Keen N. T. , Ingham J. L. Hymowitz T. , et al. The occurrence of glyceollins in plants related to *Glycine max* (L.) [J]. Biochemical Systematics and Ecology, 1989, 17(5):395 ~ 398.
- [47] Graham T. L. Flavonoid and isoflavonoid distribution in developing soybean seedling tissues and in seed and root exudates [J]. Plant Physiology, 1991, 95:594 ~ 603.
- [48] Morris P. F. , Savard M. E. , Ward E. W. B. 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, 39:229 ~ 244.
- [49] Morandi D. , Bailey J. A. Isoflavonoid accumulation in soybean roots infected with vesicular – arbuscular mycorrhizal fungi [J]. Physiological Plant Pathology, 1984, 24:357 ~ 364.
- [50] Hahn M. G. , Bonhoff A. , Grisebach H. Quantitative localization of the phytoalexin glyceollin I in reaction to fungal hyphae in soybean roots infected with *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* [J]. Plant Physiology, 1985, 77:591 ~ 601.
- [51] Moesta P. , Grisebach H. Investigation of the mechanism of glyceollin accumulation in soybean infected by *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1981, 212(2):462 ~ 467.

[52] Banks S. W. ,Dewick P. M. Biosynthesis of glyceollins I, II and III in soybean [J]. Phytochemistry, 1983, 22 (12): 2729 ~2733.

[53] Bhattacharyya M. K. ,Ward E. W. B. Expression of gene – specific and age – related resistance and the accumulation of glyceollin in soybean leaves infected with *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* [J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 1986, 29: 105 ~ 113.

[54] Kimpel J. A. ,Kosuge T. Metabolic regulation during glyceollin biosynthesis in green soybean hypocotyls [J]. Plant Physiology, 1985, 77:1 ~7.

[55] Ward E. W. B. , Lazarovits G. , Unwin C. H. ,et al. I. Hypocotyl reaction and glyceollin in soybean inoculated with zoospores of *Phytophthora megasperma* var. *sojae* [J]. Phytopathology, 1979, 69(9):951 ~954.

[56] Grisebach H. , Edelmann L. , Fischer D. ,et al. Biosynthesis of phytoalexins and non – gene inducing isoflavones in soybean. Signal Molecules in Plants and Plant – Microbe Interactions [M]. Edited by Lugtenberg B. J. J. Springer – Verlag Berlin Heidelberg, 1989;57 ~64.

[57] Ebel J. Phytoalexin synthesis; the biochemical analysis of the induction process [J]. Annual Review of Phytopathology, 1986, 24:235 ~264.

[58] Hagmann M. L. ,Grisebach H. Enzymatic rearrangement of flavanone to isoflavanone[J]. FEBS letter, 1984, 175:199 ~202.

[59] Kochs G. ,Grisebach H. Enzymic synthesis of isoflavones[J]. European journal of biochemistry, 1986, 155:311 ~318.

[60] Graham T. L. Constitutive conjugates of daidzein and genistein may play multiple roles in early race specific antibiotic resistance in soybean (Abstract) [J]. Phytopathology, 1989, 79:1199.

[61] Dann E. K. , Diers B. W. ,Hammerschmidt R. Suppression of *Sclerotinia* stems rot of soybean by lactofen herbicide treatment [J]. Phytopathology, 1999, 89:598 ~602.

[62] Graham T. L. ,Graham M. Y. Role of hypersensitive cell death in conditioning elicitation competency and defense potentiation [J]. Physiological and molecular plant pathology, 1999, 55:13 ~20.

[63] Graham T. L. ,Graham M. Y. Defense potentiation and competency; redox conditioning effects of salicylic acid and genistein [J]. Plant Microbe Interactions, 2000, 5:181 ~220.

[64] Landini S. , Graham M. Y. ,Graham T. L. Lactofen induced isoflavone accumulation and glyceollin elicitation competency in soybean[J]. Phytochemistry, 2003, 62:865 ~874.

(上接 399 页)

[9] Murakami H. Antioxidative stability of tempe and liberation of isoflavones by fermentation [J]. Agricultural and Biological Chemistry. 1984,(48):2971 – 2975.

[10] Naim M. Soybean isoflavones ,characterization ,determination ,and antifungal activity[J]. Agriculture Food Chemistry ,1974 ,22 (5) :806 – 810.

[11] 吴定,袁建,周建新,等. 固态发酵豆粕生产大豆异黄酮研究 [J]. 中国粮油学报,2004,19(2):72 – 75.

[12] Adlercreutz H ,Hockerstedt K. Effect of dietary components , including lignans and photestrogens ,on enterohepatic circulation and liver metabolism of estrogens ,and on sex hormone binding globulin[J]. Steroid Biochem. ,1987,27(4):1135 – 1144.

[13] Constantinou A , Kiguchi K. Induction of differentiation and strand breakage in human HL – 60and K – 562 leukemia cells by genistein[J]. Cancer Res. ,1990 ,50(19) :2618 – 2624.

[14] 嵇美华. 发酵豆粕中异黄酮对细菌抑制作用的研究[J]. 四川粮油科技,2003,(2):11 – 12.

[15] 姚明兰,周建新,孙明,等. 发酵豆粕中异黄酮的抗氧化性研究[J]. 中国油脂,2003,28(5):67 – 68.

[16] 汪立君,李里特. 大豆及大豆制品中的抗氧化物质. 中国食品报,2004,1.

[17] 余伯良. 发酵饲料生产与应用新技术[M]. 北京:中国农业出版社,1999,10:2 – 7.

[18] 钟启平. 固态发酵设施与发酵蛋白饲料[J]. 江西饲料, 1997. 4:20 – 22.

[19] 王华,陈有容,齐凤兰. 丹贝发酵新工艺的研究[J]. 食品工业,2002,(3):44 – 46.