

水稻植保素的生物化学研究进展*

王煜 李文新 徐宁淳**

(华中师范大学生命科学学院 武汉 430079)

PROGRESS ON BIOSYNTHESIS OF PHYTOALEXINS IN RICE

Wang Yu Li Wenxin Xu Ningchun **

(College of Life Sciences, Central China Normal University Wuhan 430079)

关键词 水稻, 植保素, 生物合成

Key words Rice, Phytoalexin (PA), Biosynthesis

稻瘟病是水稻三大流行病害之一,其防治方法目前仍以化学药剂保护为主。农业可持续发展迫切需要用经济有效、环境相容性的防治方法,代替对环境有着诸多负面影响的杀菌剂。抗病育种虽然是其中一个途径,但为获得稳定抗病性水稻品种所进行的杂交、回交及后代选择等过程相当费时,难以跟上致病性稻瘟病菌生理小种的变异速度^[1]。植保素(Phytoalexin, PA)是植物受到病原菌侵袭时,在宿主体内合成并积累的低分子量抗菌性物质。由于PA具有侵染可诱导性和体外抗菌活性,它的合成和累积被认为可能是植物的一种重要抗病机制。以此为基础开发环保型生物杀菌剂极具潜力。因此,研究水稻对稻瘟病菌的防御机制,尤其是水稻PA的合成及抗病机理就显得非常重要。在水稻中,迄今已发现了多种水稻PA。目前已知结构的有从水稻叶中分离到的稻壳酮A、B(MA、MB)^[2,3]、水稻素A~F(oryzaalexins A~F, OA~OF)^[4~6]、樱花素(Sakuralexin, SA)^[7],及从水稻茎中分离到的Phytocassavins A~D^[8]。关于这些PA的发现以及结构将另文叙述。本文主要对几个代表水稻PA的生物合成途径及其抗稻瘟病侵染机理的研究进展进行综述。

1 水稻PA的生物合成

1.1 双萜类PA的生物合成

水稻中的双萜类PA包括MA、MB和OA~OF,其生物合成途径如图1所示。一般认为,这类PA由甲羟戊酸经牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸(GGPP)而合成。

Wickham和West发现,经紫外线照射水稻叶片的无细胞提取液中有ent-isopimarane-8(14),15-diene和9 β -H-pimarane-7,15-diene,并暗示他们有可能分别是OA~OF和MA、MB的合成前体^[9]。Hideki

收稿日:1999-07-02,修回日:1999-08-25。第一作者:女,1970年5月出生,讲师,从事植物病害免疫方面研究。

* 国家自然科学基金资助项目(编号39670371)。

** 现通信地址:日本东京大学理学部。

Kato, Kodama 等从紫外线照射的水稻叶片中分离出 ent-isopimarane-8(14),15-diene-3 β -ol^[10]。该物质不具抗菌活性,但在有氧和 NADPH 的存在下,可转化为具抗菌活性的双萜类水稻 PA(OD,OE)。有趣的是该酶促反应受细胞色素 P₄₅₀ 抑制剂的阻碍^[10]。这表明依赖于细胞色素 P₄₅₀ 的羟基化反应对具抗菌活性的 OD,OE 的最终生成是必不可少的。此外,依赖于细胞色素 P₄₅₀ 的单加氧酶能催化 PA 的生物合成^[11-13]。由此看出,细胞色素 P₄₅₀ 在植物防御机制中起着重要的作用。

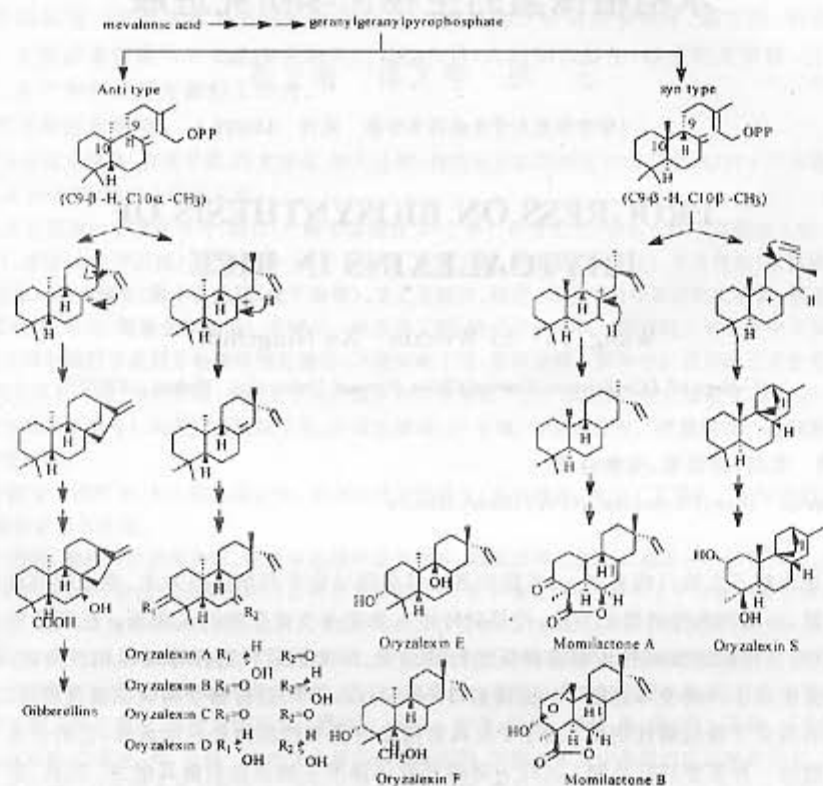


图1 双萜类水稻 PA 的生物合成推定图

Fig.1 Biosynthetic pathway for diterpene phytoalexins in rice

1.2 黄烷酮类 PA 的生物合成途径

黄烷酮类水稻 PA 仅包括 SA。Kodama, Miyakawa 等用紫外线照射、CuCl₂ 处理、稻瘟菌感染等方法首次从水稻叶片中提取出 SA, 并发现它具有很强的抗菌力并在感染部位大量积累, 而其前体物——三羟黄烷酮几乎无抗菌性^[14]。由此推测, 三羟黄烷酮 7 位上的羟基甲基化是产生抗菌活性的原因。SA 是由碳水化合物经乙酰辅酶 A 途径或莽草素途径生成的(图 2)。

黄烷酮生物合成的中心步骤是, 3 分子的丙二酰辅酶 A 与 4-Coumaroyl-CoA 由苯基苯乙烯酮合成酶催化生成 15 个碳原子的中间产物苯基苯乙烯酮, 经苯基苯乙烯酮异构酶的转化作用, 生成三羟黄烷酮, 再甲基化生成 SA^[15]。然而长期以来都不能从水稻无性细胞系中诱导出该物质, 直到最近我们实验室才通过改进培养基的方法从中诱导出 SA^[16]。1996 年, Randeep Rakwal, Morifumi Hasegawa 等^[17], 从紫外线照射的水稻叶片中分离出 SA, 并发现以 S-腺苷蛋氨酸为甲基供体, 这些叶片的粗提液能催化三羟黄烷酮 7 位上的羟基甲基化, 从而生成 SA。通过进一步分析, 他们发现了健全水稻叶片中并不含有的三羟黄烷酮。7-O 甲基化转移酶(NOMT)在经紫外线照射后大量增加, 且该酶能使其他黄烷酮甲基化, 但不能使 SA 甲基化。可见, NOMT 是一类特异诱导酶, 它与植物的防御反应密切相关。

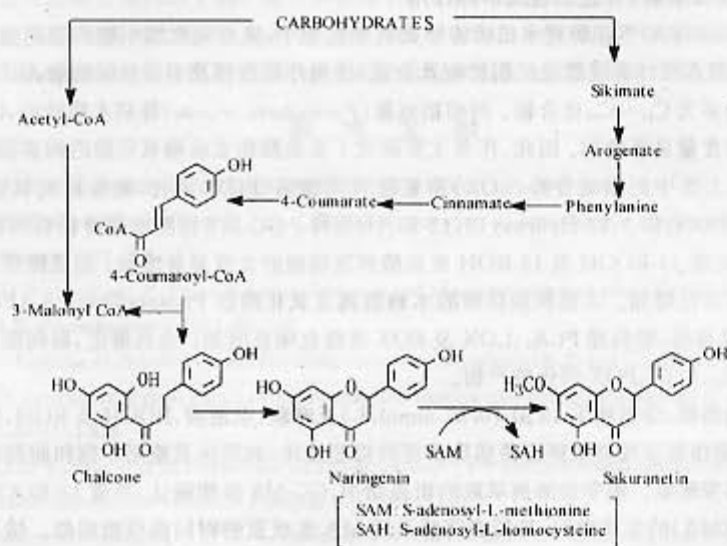


图 2 樱花素的生物合成推定图

Fig. 2 Biosynthetic pathway for SA

2 水稻 PA 生物合成机理研究进展

水稻 PA 是在生物诱导子(稻瘟菌等)或非生物诱导子(如 CuCl_2 、UV 等)的作用下,经细胞内信号传导系统的传递,通过调控基因活动,诱导生成一系列蛋白质最终生成 PA,抵御外界胁迫(图 3)。

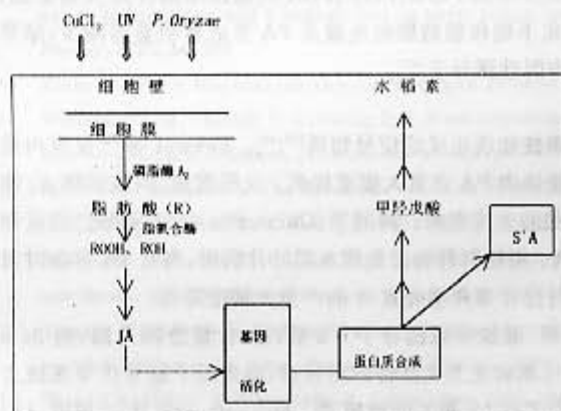


图 3 水稻 PA 合成机理推定图

Fig. 3 Biosynthetic mechanism for production of phytoalexins in rice

虽然其具体的合成机制尚不明,但已发现诸多因子在其合成过程中的作用。现简述如下。

2.1 寡糖在水稻 PA 生成中的作用

以 1~6 β 连接为主链并带有 1~3 β 侧链的寡糖能作为植物免疫系统的诱导子,是美国 Albersheim 在 1984 年发现的^[18]。关于这方面的研究多在双子叶植物中进行。

Yamada、Shibuya 研究组发现菌类细胞壁几丁质片断对水稻培养细胞 PA 的诱导作用,并在蛋白质磷酸化、活性氧生成、茉莉酸(Jasmonic acid, JA)合成及关联遗传子发现等的细胞应答中扮演重要角色^[19~27]。从几丁质片断诱导体的结合试验推定,在水稻培养细胞微粒体组分中,存在

高亲和性的结合部位。受体多存在于原生质膜,平均 1 mg 原生质膜蛋白有约 33 pmol 的结合部位^[28~31]。Ito、Kadu(未发表)根据亲和性标记的实验结果,判定这种结合部位类似大豆葡聚糖结合蛋白。贺来、伊藤等人成功解离到几丁质的结合蛋白,并在可溶蛋白质组分中检出单一区带的 75 kD 的原生质膜蛋白^[31]。

2.2 不饱和脂肪酸在水稻 PA 生物合成中的作用

李文新、Kodama 等人^[32]在研究水稻病害防御机制过程中,发现氧化型不饱和脂肪酸对 PA 的生成诱导作用。为了把握水稻叶各碳数级的脂肪酸及含量,使用外源饱和及不饱和脂肪酸,GC-MS 检测确认水稻叶含有脂肪酸多为 $C_{12} \sim C_{18}$ 化合物。判明稻瘟菌(*Pyricularia oryzae*)罹病水稻叶中, C_{18} 不饱和脂肪酸亚油酸和亚麻酸含量显著增加。因此,作者主要研究了亚油酸和亚麻酸氧化物的病害防御作用。外源亚油酸、亚麻酸经大豆中的脂氧合酶(LOX)和氢过氧化物酶(POX)氧化,制备得到氧化物 9,13-Hydroperoxy(9,13-ROOH)和 9,13-Hydroxy(9,13-ROH)标样。GC-MS 检测水稻叶稻瘟病罹病部的 70% 甲醇抽出组分中,发现 13-ROOH 及 13-ROH 亚油酸和亚麻酸的含量显著增加。结果提示了氧化关联酶群受病原菌侵染而活性增加。不饱和脂肪酸的水解游离及氧化酶群 Phospholipase A_2 (PLA $_2$)、LOX 及 POX 活性测定结果表明,罹病部 PLA $_2$ 、LOX 及 POX 活性也明显增加。由此推定,罹病部不饱和脂肪酸游离及氧化是 PLA $_2$ 、LOX、POX 活化的产物。

在水稻叶片创伤部,分别滴下 15 μ L (0.05 mmol/L) 亚麻酸、亚油酸、ROOH 及 ROH, 24 h 后观察发现,施用氧化物的创伤部呈现类似稻瘟菌感染病斑的褐变症状,对照区及施用不饱和脂肪酸的部位未发生或仅轻度发生褐变现象。褐变部溶剂萃取的粗提物中,GC-MS 检测确认,外源 13-ROOH 及 13-ROH 诱导水稻代表 PA(MA)的生成蓄积,与稻瘟菌感染后 MA 生成量的时间曲线极相似。结果进一步说明了伴随稻瘟菌侵染,内源 ROH、ROOH 生成蓄积增加与 PA 生成有关。

ROH 和 ROOH 是水解酶 PLA $_2$ 、氧化酶 LOX 及 POX 酶群活性产物。在水稻叶创伤部分别施用酶活性抑制剂的实验结果也表明,阿的平盐酸盐抑制 PLA $_2$ 活性,导致亚油酸、亚麻酸的水解游离受阻;13-ROOH 和 13-ROH 含量减少 50.8%~72.5%,OD、MA 及 SA 生成量也相应减少 28.4%~41.5%。去甲基二氢愈创木酸(nordihydroguaiaretic acid)和绿原酸(chlorogenic acid)分别抑制 LOX 及 POX 活性,氧化物 13-ROOH 和 13-ROH 的生成量下降 38%~50.9%,水稻 PA 类蓄积减少 55.1%~75%。直接施用酶合成 13-ROH、13-ROOH 后,水稻叶 PA 大量生成。

综上所述,罹病水稻叶中氧化物的游离及氧化关联酶 PLA $_2$ 、LOX、POX 的活性增加,PA 大量生成。关联酶群活性受阻导致不饱和脂肪酸的游离、氧化不饱和脂肪酸的生成及 PA 生成蓄积显著减少,结果说明 18 碳氧化不饱和脂肪酸是水稻 PA 生成的内源性诱导子^[32]。

2.3 茉莉酸(JA)在水稻 PA 生物合成中的作用

JA 被认为是诱导植物中次生代谢物包括防御性物质生成的信号物质^[33,34]。Rakwal 等^[35]发现内源 JA 诱导水稻 PA 的生成,在水稻叶片上施加 JA 使体内 PA 含量大幅度提高。众所周知,磷脂酶 A_2 和脂氧合酶不仅与脂肪酸的释放有关,而且与茉莉酸的生成有关。阿的平(Quinacrine)和去甲基二氢愈创木酸分别是磷脂酶 A_2 (PLA $_2$)和 POX 的抑制剂。用这两种物质处理水稻叶片病斑,当有 JA 存在时对樱花素和稻壳素 A 的生成无影响;当无 JA 存在时樱花素和稻壳素 A 的产量大幅度降低。

此后,通过对水稻叶片中 PA 生成的研究发现,施加外源诱导子 6 h 后,JA 含量急剧升高,但 24 h 后才出现 SA 的积累^[26,36]。由此可见,这些 JA 有可能转化为无活性的结合态,或生成了信号传导系统上的另一功能物质。迄今,人们在植物体内发现了许多与 JA 相关的物质^[36]。据 Tamogami 等^[37]报道,JA-氨基酸结合物诱导 PA 生成积累,尤其是 JA-phe 比 JA 更能提高 NOMT 活性。由此推测,JA-phe 可能是胁迫水稻体内信号传导系统中位于 JA 之后的内源诱导子。可见,JA 或其代谢物可能是水稻体内信号传导系统的末端内源诱导子。

3 结语与展望

水稻与稻瘟菌的互作关系是目前植物病理学中研究真菌与植物相互关系的前沿模式系统之一。对水稻 PA 生物合成机理的深入研究,将对植物真菌病害的防治策略产生积极的作用。寡糖和 JA 对水稻 PA 的诱导作用,涉及到细胞对胁迫信号的识别及其在水稻体内的传导和其关联基因的诱导表达。但目

前我们对这一过程还缺乏深入的了解。进一步研究 JA 与基因诱导表达之间的关系,有可能揭示 PA 末端内源诱导子。另外,目前对水稻 PA 的研究,多数偏重于新型 PA 的发现及其机理研究,只有把外源因子对水稻 PA 生成的诱导过程和植物自体防御反应结合起来研究,才能全面地了解二者间的关系。

参 考 文 献

- 1 周建明,朱群,白永廷.稻瘟病侵染水稻的机理.植物生理学通讯,1999,35(1):49
- 2 Cartwright D W, Langecake P, Pryce R J *et al*. Chemical activation of host defence mechanisms as a basis for crop protection. *Nature*, 1977, 267: 511
- 3 Cartwright D W, Langecake P, Pryce R J *et al*. Isolation and characterization of phytoalexins from rice as momilactones A and B. *Phytochemistry*, 1981, 20: 535
- 4 Akatsuka T, Kodama O, Sekido H *et al*. Novel phytoalexins (oryzaalexins A, B and C) isolated from rice blast leaves infected with *pyricularia oryzae*. Part 1: isolation, characterization and biological activities of orzaalexins. *Agri Biol Chem*, 1985, 49(6): 1 689
- 5 Sekido H, Endo T, Suga R *et al*. Oryzaalexin D (3,7-dihydroxy-(+)-santalolipimaradiene), a new phytoalexin isolated from blast-infected rice leaves. *J Pesticide Sci*, 1986, 11: 369
- 6 Kato H, Kodama O, Akatsuka T *et al*. A diterpene phytoalexin from UV-irradiated rice leaves. *Phytochemistry*, 1994, 36(2): 299
- 7 Kodama O, Miyakawa J, Akatsuka T *et al*. Sakuranetin, a flavanone phytoalexin from ultraviolet-irradiated rice leaves. *Phytochemistry*, 1992, 31(11): 3 807
- 8 Koga J, Shimura M, Oshima K. *Tetrahedron*, 1995, 51(29): 7 907
- 9 Wickham K A, West C A. *Arch Biochem Biophys*, 1992, 293: 320
- 10 Kato H, Kodama O, Akatsuka T. Characterization of an inducible P_{450} hydroxylase involved in the rice diterpene phytoalexin biosynthetic pathway. *Arch Biochem Biophys*, 1995, 327: 316
- 11 Fujita M, Asahi T. Different intracellular localization of two cytochrome P-450 systems, ipomeamarone 15-hydroxylase and cinnamic acid 4-hydroxylase, in sweet potato root tissue infected with *ceratocystis fimbriata*. *Plant Cell Physiol*, 1985, 26: 389
- 12 Kochs G, Werck-Reichhart D, Grisebach H. *Arch Biochem Biophys*, 1992, 293: 187
- 13 Whitehead I M, Threlfall D R, Ewing D F. 5-epi-aristolochene is a common precursor of sesquiterpenoid phytoalexins capsidiol and debneyol. *Phytochemistry*, 1989, 28: 775
- 14 Heller W, Forkmann G. The flavonoids synthesis. Hall, Chapman and London, 1992: 399
- 15 李文新, 扶惠华, 王煜等. 水稻细胞悬浮系稻瘟病抗性物质的生成诱导. 中国学术期刊文摘, 1999, 1: 133
- 16 Rakwal R, Hasegawa M, Kodama O. A methyltransferase for synthesis of the flavanone phytoalexin sakuranetin in rice leaves. *Biochem Biophys Research Communications*, 1996, 222: 732
- 17 Yamada A, Shibuya N, Kodama O *et al*. Induction of phytoalexin formation in suspension-cultured rice cells by N-acetylchitooligosaccharides. *Biosci Biotech Biochem*, 1993, 57: 405
- 18 Sharp J K, Valent B, Albersheim P. *J Biol Chem*, 1984, 259: 1 312
- 19 Kuchitsu K, Kikuyama M, Shibuya N. *Protoplasma*, 1993, 174: 79
- 20 Kikuyama M, Kuchitsu K, Shibuya N. Membrane depolarization induced by N-acetylchitooligosaccharide elicitor in suspension-cultured rice cells. *Plant Cell Physiol*, 1997, 38: 902
- 21 朽津和幸, 小松节子, 平野久夫. 日本植物生理学会 1994 年度年会讲演要旨集, 1994: 124
- 22 Kuchitsu K, Kosaka H, Shiga T *et al*. *Protoplasma*, 1995, 188: 138
- 23 Nojiri H, Sugimori M, Yamane H *et al*. Involvement of jasmonic acid in elicitor-induced phytoalexin production in suspension-cultured rice cells. *Plant Physiol*, 1996, 110: 387
- 24 川上显, 西洋洋子, 朽津和幸. 第 16 回分子生物学会讲演要旨集, 1993: 189
- 25 Minami E, Kuchitsu K, He D-Y. *Plant Physiol*, 1996, 37: 563

- 26 Barber M S, Bertram R E, Ride J P. *Physiol Mol Plant Pathol*, 1989, **34**: 3
- 27 Kaku H, Shibuya N, Xu P *et al*. *Physiol Plantaru*, 1997, **100**: 111
- 28 Felix G, Regenass M, Boller T. *Plant J*, 1993, **4**: 307
- 29 Shibuya N, Kaku H, Kuchisu K *et al*. *FEBS Lett*, 1993, **329**: 75
- 30 Shibuya N, Ebisu N, Kamada Y *et al*. Localization and binding characteristics of a highaffinity binding site for N-acetylchitooligosaccharide elicitor in the plasma membrane from suspension cultured rice cells suggest a role as a receptor for the elicitor signal at the cell surface. *Plant Cell Physiol*, 1996, **37**: 894
- 31 贺来华江, 伊藤エキ, 涉谷直人. 日本植物生理学会 1996 年度年会讲演要旨集, 1996.
- 32 Li W X, Kodama O, Akatsuk T. Role of oxygeated fatty acids in rice phytoalexin production. *Agric Biol Chem*, 1991, **55**: 1 041
- 33 Gundlach H, Muller M J, Kuchan T M *et al*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89**: 2 389
- 34 Farmer E E, Johnson R R, Ryan C A. Regulation of expression of proteinase inhibitor genes by methyl jasmonate and jasmonic acid. *Plant Physiol*, 1992, **98**: 995
- 35 Rakwal R, Tamogami S, Kodama O. A methyltransferase for synthesis of the flavanone phytoalexin sakuranetin in rice leaves. *Biosci Biotech Biochem*, 1996, **60**: 1 046
- 36 Hamberg M, Gardner W. *Biochem Biophys Acta*, 1992, **1 165**: 1
- 37 Tamogami S, Rakwal R, Kodama O. Phytoalexin production by amino acid conjugates of jasmonic acid through induction of naringenin-7-O-methyltransferase, a key enzyme on phytoalexin biosynthesis in rice (*Oryza sativa* L.). *Federation Euro Biochem Soci*, 1997, **401**: 239