

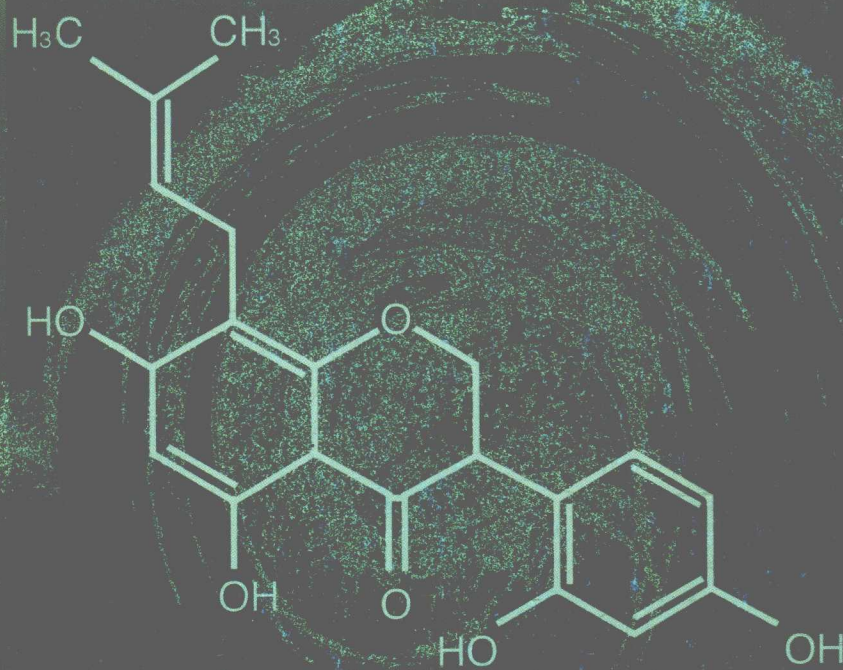
Zhibaosu Daixie yu Zhiwu
Fangyu Fanying

植保素

代谢与植物

防御反应

何水林 编著



广东科技出版社

植保素代谢与植物防御反应

何水林 编著

广东科技出版社

·广 州·

图书在版编目 (CIP) 数据

植保素代谢与植物防御反应/何水林编著. —广州:
广东科技出版社, 2002.4

ISBN 7-5359-3102-2

I. 植… II. 何… III. 植物-杀菌素-研究
IV. Q946.887

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2002) 第 046631 号

出版发行: 广东科技出版社

(广州市环市东路水荫路 11 号 邮码: 510075)

E-mail: gdkjzbb@21cn. com

http: //www. gdstp. com. cn

出 版 人: 黄达全

经 销: 广东新华发行集团股份有限公司

排 版: 广东科电有限公司

印 刷: 广东省佛山市粤中印刷公司

(广东省佛山市普澜公路石头乡 邮码: 528041)

规 格: 787mm × 1 092mm 1/16 印张 13.25 字数 340 千

版 次: 2002 年 4 月第 1 版

2002 年 4 月第 1 次印刷

定 价: 35.00 元

如发现因印装质量问题影响阅读, 请与承印厂联系调换。

前 言

病害是影响作物产量、品质和生产效益的主要因素，特别是占其中绝大多数的真菌病害，危害尤甚。安全、有效的病害防治不仅关系到当前农业的增效和农民增收，而且还关系到生态环境的保护和农业的可持续发展，因而受到了人们的高度重视。20 世纪化学农药在农业上得到广泛的应用，虽然在一定时期、一定程度上缓解了病害对作物生产的危害，但也带来了病原菌抗药性的增强、农产品品质的降低、农产品生产成本的提高、农业对化石能源的高度依赖和大量施用农药造成的巨大环境隐患等问题。因此，寻求可持续的病害防治替代手段，已成了当今人类面临的亟待解决的重要课题。

植物在长期的进化过程中，逐步形成、发展了巧妙的自我防御反应 (self-defence reaction) 机制，使植物在自然环境中频繁发生的病害存在下仍然得以世代繁衍，生生不息。在作物遗传改良过程中，强化作物自我防御功能是提高作物抗病性、促进农业可持续发展的有效对策之一。病原菌侵染作用下合成植保素是植物防御反应的重要方面，在植物抗病过程中扮演着十分重要的角色。虽然直到 20 世纪 40 年代植保素才作为一个科学的命题引起人们的重视，但经过 60 来年的研究，人类已在植保素的植物化学、病理、生理、生化、分子生物学和生物技术等相关领域取得了重要的研究进展。特别近年来，植保素的分子生物学和生物技术应用研究已发展成为国际上多学科交叉的、十分活跃的研究领域。新技术、新方法被及时地应用到植保素研究中，新的研究成果不断涌现。从浩瀚的文献中整理、归纳和总结前人的有关研究成果，不仅对从事植保素研究的人们有所裨益，而且对作物科学的发展有重要的理论意义，对种植业生产的发展也有实际意义。然而，尽管在不同的研究阶段对植保素研究的各个侧面已有不少的综述和评论 (Cruickshank, 1963, 1978, 1980; Chappell, 1995; Kuc, 1972, 1976; Ingham, 1972, 1973, 1982; Deverall, 1972, 1976; Purkayastha, 1973, 1985, 1986; Van Etten 等, 1976; Keen 等, 1982; Sequiera, 1983; Yoshikawa, 1983; Kuc 等, 1985; Ebel, 1987; Wood, 1986; Dixon, 1992)，但是，较为全面系统的植保素专著还不多见。

鉴于此，作者结合自己的教学和研究工作，从 1996 年即开始尽可能多地收集植保素研究领域的有关研究资料，1999 年底开始着手写作本书。期间，曾以所撰写的部分内容为教材，在福建农林大学作物栽培与耕作学专业博士研究生课程以及生物化学和分子生物学专业硕士生课程中开展了“植保素代谢基础与应用研究”的专题讲座，及时根据研究生们的反馈意见进行修改、补充和完善，并追踪最新研究动态，几经修改，最终形成了本书的初稿。本书根据植保素的植物化学、生物化学、分子生物学、生态遗传、信号传递和生物技术等几个方面的问题，相应地分为六个章节。其中涉及的一些次生代谢物尚未有明确的中译文，只好沿用英文。书中所列的参考文献，主要供读者查阅。

本书稿中虽包括了作者近年来在辣椒植保素及倍半萜环化酶分子生物学方面部分已发表或来不及发表的研究内容，但大部分资料来自于国内外研究者在植保素相关领域的研究成果。因此，本书的完成和出版，实际上凝聚着世界各国众多的研究者们长期的辛劳和汗水。值此书出版之际，作者谨向所有为植保素研究付出辛勤劳动、作出贡献的人们致以诚挚的敬意。

书中涉及到许多生命科学的前沿，一些问题仍在探索之中，新的成果又不断涌现。限于作者学识水平，未能形成高屋建瓴的态势，对于繁多资料的处理尚可能有挂一漏万之嫌，书中欠妥和错误之处也在所难免。本书属作者大胆的尝试，旨在抛砖引玉，衷心地希望读者提出宝贵

意见，以便今后进一步完善提高。

近年来，作者与本书有关的研究得到了福建省教委优秀留学回国人员资助项目及科技项目（K2001059）、福建省自然科学基金项目（B0110016）和国家自然科学基金项目（30170638）的资助，在本书的整理、编写过程中，得到了福建农林大学校长、国家有突出贡献的中青年专家、博士生导师郑金贵研究员的热情鼓励和指导，得到了业师福建农林大学甘蔗所所长、博士生导师陈如凯教授的热情鼓励、指导和支持。此外，还得到了韩国庆北大学农学院金吉雄教授、申东贤教授和韩国全南大学白镜焕教授的指导和帮助及福建农林大学亚热带果树生物技术研究所以赖钟雄博士的热情帮助。研究生王晓峰、王燕华、刘锋、许明、张丹凤、陈福禄和李冰莲等同志在文字和图表的编辑和校对中付出了辛勤的劳动，在此一并致以诚挚的谢意。

何水林

2001年8月28日

于福州金山

目 录

第一章 植保素及其在植物抗病反应中的作用	(1)
第一节 植保素及其研究概况	(1)
一、植保素的概念	(1)
二、植保素的研究历史概况	(5)
第二节 植保素的种类及其在植物中的分布	(6)
一、植保素的种类	(6)
二、几种主要植物中的植保素	(9)
三、植物植保素合成与分布特点	(12)
第三节 植保素在植物防御反应等中的作用	(13)
一、植保素的抗病作用	(13)
二、植保素在寄生物对病原菌小种专化抗性中的作用	(17)
三、植保素在病原菌专一性寄生系统中的作用	(18)
四、植保素对植物的效应	(19)
五、植保素对昆虫的效应	(19)
六、植保素的抗病机制	(19)
七、植保素与人类健康	(23)
第四节 植保素研究的应用前景	(24)
一、为抗病育种提供选择依据	(24)
二、为开发新农药提供理论依据	(25)
三、植保素作为生物农药的开发	(25)
四、通过基因工程在目标植物中表达外源植保素基因以提高植物抗性	(25)
第二章 植保素代谢及其调控	(27)
第一节 植保素等次生代谢物的生物合成途径	(27)
一、次生代谢物的生物合成途径	(27)
二、次生代谢物合成的基本初始前体及次生代谢物的分布	(39)
第二节 植保素合成代谢调控	(41)
一、多酚类主要植保素的生物合成及其调控	(42)
二、萜类植保素生物合成途径及其调节	(45)
三、生物碱植保素的合成及其调控	(55)
四、植保素合成的“代谢频道”	(58)
第三节 病原菌对植保素的分解作用和对植保素合成的抑制作用	(61)
一、病原菌对各类植保素的降解作用	(61)
二、病原菌对植保素的降解作用与其对植保素的耐性及其致病力的关系	(66)
三、病原菌对植保素降解的酶学基础	(67)
四、病原菌对植保素的降解作用诱导	(67)
五、病原菌对植保素合成和积累的抑制作用	(69)
第三章 植保素生物合成关键酶的分子生物学	(70)

第一节 植保素生物合成过程中关键酶的分子克隆	(70)
一、基因分离手段及其在植保素合成关键酶基因分离上的应用	(70)
二、基因鉴定方法及其在植保素合成有关基因鉴定中的应用	(74)
三、已克隆的与植保素合成有关基因	(77)
第二节 植保素合成关键酶的结构与功能关系	(78)
一、主要酶编码序列结构与功能关系分析	(79)
二、植保素合成关键酶的结构与功能关系研究	(90)
第三节 植保素基因结构及其诱导型表达启动子调控元件	(94)
一、诱导型基因调控序列	(94)
二、植保素合成有关基因在植物基因组中的分布	(104)
第四章 诱发因子与植保素诱发	(107)
第一节 诱发因子	(107)
一、生物诱发因子	(107)
二、非生物诱发因子	(112)
第二节 主要植保素的诱发及其生态遗传效应	(113)
一、主要植保素的诱导合成	(113)
二、植保素诱发的生态效应	(117)
三、植保素诱发的遗传效应	(120)
第三节 诱发因子诱导植保素合成的分子基础	(121)
一、诱发因子对植保素诱发作用及其与关键酶蛋白基因的转录与翻译的关系	(121)
二、诱发因子对植保素生物合成途径中关键酶蛋白基因表达的调节	(122)
第四节 诱发因子在病害防治中的可能作用	(130)
一、合成诱导化合物对病害的防治作用	(130)
二、不同诱发因子提高植物抗性的幅度及机制	(132)
三、植保素合成的诱导化合物对主要作物病害防治效果	(132)
第五章 植保素诱发过程中的信号传递	(137)
第一节 植物细胞表面专一性的诱发因子受体	(137)
一、生物诱发因子的结合蛋白	(137)
二、G 蛋白及其在植保素诱发合成信号传递中的作用	(141)
第二节 钙信使系统与植保素的合成	(141)
一、在病原菌或诱发因子作用下细胞内 Ca^{2+} 水平的变化和调节	(141)
二、几种诱发因子-植物系统中 Ca^{2+} 信使系统的作用	(144)
三、其他离子在植保素诱导合成中的信使作用	(147)
第三节 cAMP 信使系统	(147)
一、胞内信使 cAMP 的产生、传递和灭活	(147)
二、cAMP 在植保素诱发过程中的作用	(148)
第四节 IP_3 和 DG 信使与植保素的诱导合成	(148)
一、 IP_3 和 DG 信使	(148)
二、 IP_3 和 DG 信使与植保素的诱导合成	(149)
第五节 活性氧、膜脂过氧化与植保素的合成	(150)

一、活性氧代谢	(150)
二、在诱发因子或病原菌侵染作用下植物细胞活性氧代谢及膜脂过氧化作用	(152)
三、病原菌或诱发因子作用下猝发的活性氧及膜脂过氧化作用与信号传递	(153)
第六节 茉莉酸在植保素诱导合成中的信使作用	(155)
第七节 磷酸激酶及蛋白质磷酸化与植保素的合成	(156)
一、磷酸化及蛋白激酶在信号传递中的作用	(156)
二、植保素诱导合成过程中蛋白磷酸化/脱磷酸化的作用	(157)
第八节 植保素生物合成诱发过程中的信号传递途径	(158)
第六章 植保素开发应用的生物技术	(161)
第一节 植保素的基因工程	(161)
一、植物基因工程	(161)
二、植保素代谢基因工程	(166)
三、植保素合成途经中关键酶基因诱导型启动子的开发应用	(170)
第二节 植保素等植物次生代谢物的离体培养生产	(171)
一、植物培养系统	(171)
二、植保素等次生代谢物合成的“二阶段”调节策略	(178)
三、次生代谢物生物合成中的反馈调节	(180)
四、固定化植物细胞培养系统与植保素生产	(181)
五、生物反应器在次生代谢物生产中的应用	(183)
参考文献	(185)

第一章 植保素及其在植物抗病反应中的作用

当真菌孢子落到植物组织或器官上，必须克服一系列复杂的防御障碍，才能萌发、侵入植物细胞并继续扩展，直至最终危害植物。植物防御障碍包括物理障碍（如厚角质层）和化学障碍，后者包括在病原菌侵染诱导作用下植物细胞发生的水解酶（葡聚糖酶和几丁质酶）的分泌、通过蛋白质交联（cross-linking）导致细胞壁的加固、部分细胞过敏性坏死、活性氧猝发、具有抗病作用的植保素的诱导合成和植物内具有抗病作用的组成型次生代谢物的存在等多个方面。其中，植保素的诱导合成是一种重要的防御反应，其在植物抗病作用中的可能利用价值近几十年来引起了人们的关注。

第一节 植保素及其研究概况

一、植保素的概念

植保素是植物在生物诱发因子（biotic elicitor）或非生物诱发因子（abiotic elicitor）诱导作用下合成的小分子次生代谢物，能抵抗或抑制入侵病原菌的扩展。植保素（phytoalexin）一词来源于古希腊语，其中“phyto”指“植物”，“alexin”的意思是 ward of substances（防御物质），即具有防御作用的植物次生代谢物质。

Muller 和 Borger 1940 年在罹病马铃薯块茎上检测到抗真菌的物质，首先提出植保素概念，即植保素是在寄生物侵染后，活体寄主产生的具有抗病作用的化学物质。但当时对植保素的化学性质几乎一无所知。1956 年，Muller 进一步将植保素定义为：由寄主和寄生物的两套代谢系统相互作用产生的能抑制侵入到植物中的致病微生物的“抗生素”（antibiotics）。此后，研究发现，植物不仅在病原菌的侵染作用下合成植保素，而且在短波辐射（紫外线、 γ 射线等）、重金属盐、 O_3 、各种合成化合物和磁场力等诱导作用下也能合成植保素。于是，植保素的概念被进一步修正为“植物在生物诱发因子或化合物和环境因子作用下，通过代谢活动合成的低分子量的抗病次生物质”（Ingham, 1973; Poxton, 1980）。

属于植保素的植物次生代谢物种类繁多，结构各异，作用方式也不尽相同。它们具有以下共同点：

1. 具有抗病作用

植保素具有拮抗病原菌，对病原菌在寄主细胞内的扩展有一定程度的抑制作用。一般来说，植保素对真菌的抑制作用高于其对细菌的作用。植保素鉴定的依据之一是生物测试（bioassay），生物测试一般用植保素直接处理病原菌，考察其对病原菌的效应，只有对病原菌具有抑制作用的次生代谢物才被称为植保素。迄今所鉴定的各种植保素均能不同程度地抑制病原菌的生长。例如，从水稻分离的多种植保素具有不同程度的抑制稻瘟病作用（表 1-1）。茄科植物中的一种重要植保素辣椒醇（capsidiol）在浓度为 3.75mM 时，几乎完全抑制辣椒疫霉的生长，但处理后的辣椒疫霉放回到没有辣椒醇的培养基中，可逐渐恢复其生长能力；5mM 的

辣椒醇可完全抑制辣椒疫霉的生长，处理后的辣椒疫霉放回到无辣椒醇的培养基中不能恢复生长能力。从菊苣假单孢菌侵染的 *Polymnia sonchifolia* 中分离到的植保素 4'-羟基-3-(3-甲基正丁醇) 苯乙酮、4'-羟基-3'-(3-甲基-2-正丁醇) 苯乙酮及 5-乙酰基-2-(1-羟基-1-甲基乙基) 呋喃苯分别在 500×10^{-6} M、 250×10^{-6} M 和 50×10^{-6} M 下完全抑制真菌 *Bipolaris* 分生孢子萌发。

黄酮类和异黄酮类植保素都具有不同程度的抑制病原菌 [*C. cucumerinum*，黄瓜叶霉病（瓜枝孢）] 的作用，它们的最小抑制浓度有一定的差别，最小抑制浓度为 25℃ 下真菌孢子（大约 2×10^6 个孢子/mL）在 Czapeck Dox 液体培养基中停止生长时的异黄酮浓度范围），但所有的异黄酮植保素在用 TLC 生物测试时，均表现抑制病原菌的活性（Adesanya 和 Roberts, 1995）（表 1-2）。除了抗菌作用外，植保素还对病原菌的侵染具有一定的阻碍作用。例如，豌豆白粉菌（*Erysiphe pisi*）接种到豌豆植株上后，可诱导豌豆植株产生豌豆素，由于该菌对豌豆素的耐性较高，孢子萌发的抑制浓度高达 $ED_{50} = 530 \times 10^{-6}$ M，但如果在接种白粉菌前，人为地给豌豆施加豌豆素时，只需要 30×10^{-6} M 就能显著降低白粉菌的侵染率。

十字花科植物在病原菌侵染后诱导产生的吲哚类生物碱植保素也表现出较强的杀菌或抑菌活性。例如，Brassinin 和 Cyclobassinin 在 5×10^{-4} M 的浓度下，能抑制黑胫茎点霉的致病或非致病菌株孢子萌发达 4d 之久，在相同浓度下，植保素 Brassilexin 可使上述菌株孢子的萌发被完全抑制达 14d 之久。Brassinin 和 Brassilexin 可使 *P. lingam* 菌丝的生长速率比对照显著降低。拟南芥植保素 Camalexin 对真菌病原菌瓜枝孢和细菌性病原菌丁香假单胞菌均有抑制作用。Blassilexin 可抑制斑点小球腔菌孢子的萌发和菌丝的生长，当 Blassilexin 的浓度为 $75 \mu\text{M}$ 时，斑点小球腔菌孢子的萌发被完全抑制，当 Blassilexin 的浓度仅为 $9 \sim 10 \mu\text{M}$ 时，斑点小球腔菌菌丝的生长就被显著抑制。

从多种植物中分离鉴定出的植保素在 $10 \sim 100 \mu\text{M}$ 的浓度范围内具有杀菌活性。

2. 植保素仅在病原菌等生物或非生物诱发因子作用下合成、积累，在正常植物细胞中不合成

参与植物细胞抗病反应的次生代谢物中，除了被各种诱发因子诱导合成的小分子量植保素外，还有一类组成型表达、具有抗病作用的次生代谢物。这种组成型具有抗病作用的次生代谢物在植物中通常有 3 种类型：第 1 种类型在病原菌侵染以前就已存在，其浓度可高到足以阻止大部分真菌的侵染，这种类型被称为“prohibitins”；第 2 种类型在病原菌侵染前浓度一般很低，但在病原菌侵染后，其浓度大幅度升高以阻止病原菌的扩展，这种类型被称为“inhibitins”；第 3 种类型是在病原菌侵染后产生的具有抗病作用的次生代谢物，但这种次生代谢物的合成并不涉及基因的表达和相应生物合成途径的启动，而仅仅是由不具活性的结合态通过水解作用等简

表 1-1 不同的水稻植保素对稻瘟菌的抑制作用（引自文献王煜的资料）

水稻植保素	ED ₅₀	
	孢子萌发	菌丝伸长
樱花素	15	5
水稻 S	20	—
水稻素 D	23	9
水稻素 E	62.5	—
水稻素 B	68	18
水稻素 F	103	—
水稻素 A	130	35
水稻素 C	136	35
Phytocassane A	20	—
Phytocassane B	4	—
Phytocassane C	7	—
Phytocassane D	25	—

单的生化反应转变而成, 这种类型次生代谢物被称为 “post-inhibitor”。

表 1-2 异黄酮植保素对 *Cladosporium cucumerinum* 和 *Aspergillus niger* 孢子的抑制作用 (Adesanya 等, 1995)

植保素	具有抑制活性的最小浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	
	黑曲霉	瓜枝孢
异黄酮类植保素		
1. 大豆黄素	50 ~ 75	50 ~ 75
2. 染料木黄酮	50 ~ 75	50 ~ 75
3. 异樱黄素	50 ~ 75	25 ~ 50
4. 2'-羟基大豆黄素	25 ~ 50	50 ~ 75
5. 2'-羟基染料木黄酮	50 ~ 75	25 ~ 50
6. 2'-甲氧基染料木黄酮	50 ~ 75	25 ~ 50
7. 2'-羟基异樱黄素	25 ~ 50	50 ~ 75
8. 2,3-脱氢吉维酮	25 ~ 50	25 ~ 50
异黄烷酮植保素		
9. dalbergioidin	75 ~ 100	50 ~ 75
10. isoferreirin	10 ~ 25	10 ~ 25
11. 5'-脱氧吉维酮	25 ~ 50	50 ~ 75
12. 吉维酮	10 ~ 25	25 ~ 50
13. 2',4',5'-甲基吉维酮	25 ~ 50	10 ~ 25
14. 环吉维酮	50 ~ 75	50 ~ 75
15. 1',2'-去氢环吉维酮	25 ~ 50	50 ~ 75
紫檀素植保素		
16. 去甲基苜蓿素	25 ~ 50	50 ~ 75
17. 异苜蓿素	10 ~ 25	50 ~ 75
18. 苜蓿素	10 ~ 25	25 ~ 50
19. 菜豆啉	10 ~ 25	40 ~ 50
20. 菜豆素	25 ~ 50	50 ~ 60
异黄烷		
21. 去甲基牛角花醇	25 ~ 50	50 ~ 75
22. 菜豆素异黄烷	10 ~ 25	50 ~ 75
香豆素类植保素		
30. aureol	25 ~ 50	50 ~ 75

植保素的合成涉及特定基因在病原菌或诱发因子作用下的诱导表达和特定生物合成途径的启动，这是植保素区别于一般抗病次生代谢物的根本之处。例如，用致病疫霉和 *Magaporthe grisea* 分别处理水稻悬浮细胞，处理的悬浮细胞中合成并积累了 Oryzalexin、phytoalexin 和 momilactone 等植保素，在未处理的水稻悬浮细胞中则检测不出上述抗病次生物质。我们用各种诱发因子处理辣椒离体叶片或烟草悬浮细胞，不同程度地诱导了倍半萜环化酶 mRNA 的积累和倍半萜环化酶活性表达，合成和积累了辣椒醇 (capsidiol) 等倍半萜类植保素，在对照中检测不出倍半萜环化酶的 mRNA 及酶活性，也没有倍半萜类植保素的积累。

植保素受诱发因子诱导，特别是受病原菌侵染诱导合成这一特性，是植物在长期进化过程中发展起来的经济有效的抗病策略。这种策略至少有以下两个方面的意义：一是可避免植保素组成型合成导致对植物细胞的毒害作用；二是可减少植保素组成型表达导致物质能量无谓的消耗。此外，重金属盐和紫外线等逆境胁迫也能不同程度地诱导植物合成次生代谢物，推测植保素在植物抗逆反应中也起到一定的作用。

由于植保素的合成涉及特定基因表达的诱导和特定生物合成途径的启动，因此，植保素合成和发生作用的时间较迟，一般在病原菌侵染后 1~2d 后才发生作用。

有时，一种次生代谢物在一种植物上是植保素，而在另一种植物上却是组成型的次生代谢物。例如，樱花素在病原菌侵染诱导的水稻叶片中被诱导合成，而在黑醋栗的叶片中，却是组成型次生代谢物。同一种次生代谢物 momilactone A 在水稻谷壳和茎中，是组成型次生代谢物，而在水稻叶片中，却是诱导型表达的植保素。燕麦的 avenanthramides 类化合物既可以组成型方式存在，也可以诱导型的植保素形式存在。其中在燕麦种中主要以组成型方式存在，以 avenanthramide C 含量最高，比 avenanthramide A 和 avenanthramide B 多两倍以上。但是，在叶片中，avenanthramide 主要以植保素的形式存在，并以 avenanthramide A 最多。可见，鉴定一种次生代谢物是否是植保素，要看这种次生代谢物是否是在诱发因子作用下重新合成的，而不能仅从这种次生代谢物的分子结构或是它的生物合成途径来判断。

3. 植保素对病原菌抑制作用的专化性不强

一种植保素往往对一种植物上的多种病原菌，甚至其他种植物上的病原菌都具有抑制作用，几种作物的植保素基因工程研究结果充分地说明了这一点。例如，将从葡萄上克隆的芪合酶基因（芪合酶是葡萄素、白藜芦醇等植保素生物合成过程中的关键酶）转到水稻和烟草等作物上，发现转基因水稻较对照增强了对白叶枯病、稻瘟病等水稻重要病害的抗性；转基因烟草也较对照增强了对烟草主要病害的抗性 (Hain 等, 1993)。另一方面，修饰多种植物非寄主性病原菌对寄主植保素的代谢活性，也能使多种非寄主性病原菌转化为寄主性病原菌。例如，将豌豆素去甲基酶基因转入到玉米病原菌，转基因的玉米病原菌能感染豌豆，造成危害。

4. 植保素均为小分子次生代谢物

植保素均为小分子次生代谢物，即分子量一般小于 1 000。因此，植保素一般不包括具有抗病作用的多肽或蛋白质。

按分子量大小及其作用方式，参与植物防御反应的化合物可分为高分子量化合物和低分子量化合物。高分子量化合物按其作用方式又可分为 2 类：第 1 类是在抗病反应中充当物理障碍的物质，包括角质、木栓质、木质素、胼胝质、羟脯氨酸、富含甘氨酸糖蛋白、与多酚类物质交联的细胞壁多糖和类黑色素等；第 2 类高分子化合物为酶，可抑制病原菌，包括几丁质酶、 β -1,3-葡聚糖酶、蛋白酶、核糖核酸酶及其他通过水解作用产生生物活性分子的酶。例如 β -糖苷酶和 α -糖苷酶，这两种酶可释放抗菌糖苷，作为合成其他抗菌物质的前体，或通过氧化

作用将现存的化合物氧化成醌、聚合物、自由基（过氧化物酶和多酚氧化酶等）而起到抗病作用。例如，在过氧化物酶的催化作用下，以 NAD^+ 、 NADP^+ 为底物合成的过氧化氢就参与了植物的防御反应。几丁质酶、 β -1,3-葡聚糖酶和其他植物或微生物的水解酶也能分解释放植物、真菌或细菌中的具有抗菌作用的细胞壁碎片，如脱乙酰几丁质等，这些释放的物质有的可充当诱导植保素合成的诱发因子。最后一类高分子物质通过某种机制抑制病原菌的生长或发育，如致病相关蛋白和渗透素（osmotin）等。

低分子量抗病物质包括在病原菌侵入后起作用的化合物如单宁酸、蔗糖酯、糖苷、水杨酸等多酚类、茉莉酸、花生四烯酸、乙烯、多肽、寡糖和活性氧等。分子量小的植保素在抗病作用中可能有其独特的优势，可以节约物质和能量等，且低分子量的化合物可能更容易穿透病原菌的细胞壁和细胞膜，从而能更好地发挥其抗病的功能。

二、植保素的研究历史概况

早在 1911 年，法国植物学家 Noel Bernard 就发现真菌 *Rhizoctonia repens* 在侵染兰花和 *Loroglossum Hircinum* 的块茎后不久，即停止进一步扩展；将感染 *Rhizoctonia repens* 病原菌的兰花块茎置于琼脂糖固体培养基上，之后，琼脂糖凝胶也能抑制病原菌进一步扩展，说明某些抗病物质已释放到琼脂糖固体培养基上。Muller 和 Boger 1940 年在研究马铃薯感染致病疫霉的病理反应中发现马铃薯切块与 *P. infestans* 非致病病原菌菌株共培养 24 h 后，再与致病病原菌株共培养，结果发现致病病原菌株不能诱导马铃薯块茎切块产生致病症状，推测非致病病原菌菌株的侵染使寄主合成了某些抗菌物质，致使致病病原菌在寄主中的扩展受到抑制，由此，Muller 和 Boger 首次提出植保素概念。之后，他们又进行了一系列开创性研究，对最初的植保素概念进行了修正。几乎与 Muller 等同时，Hiura 等（1943）从甘薯上分离出一种具有抗真菌活性的化合物，后经 Kubota 和 Matsuura（1953）进一步鉴定为黑孢霉酮。Gaumann 和 Kern 于 1959 年从 *Rhizoctonia repens* 感染的兰花块茎上分离到植保素红门兰醇。1960 年 Cruickshank 等分别从豌豆和菜豆中分离鉴定出豌豆素和菜豆素这两种重要的植保素。Klarman 和 Gerdemann 1963 年报道指出：大豆对 *Phytophthora* 3 个种的抗性与病原菌侵染作用下诱导合成的植保素有关。Purkayastha 和 Deverall 分别在 1964 年和 1965 年报道蚕豆葡萄孢对扁豆生长的抑制作用及扁豆的稳定生长与植保素的诱导合成有关。以上早期研究的结果，使人类初步认识到植保素在植物抗病反应中可能起到一定的作用。之后，植保素的分离、鉴定及其代谢基础研究手段取得 3 次重大的进展，第 1 次是 20 世纪 50 年代底物的同位素标记技术在植保素代谢途径研究中的应用；第 2 次是 20 世纪 70 年代植物细胞培养技术应用到次生代谢物研究中，为植保素代谢途径中的酶的分离和纯化提供充足的细胞来源，并促进了植保素代谢基础研究；第 3 次是 20 世纪 80 年代到 90 年代，分子生物学手段及基因工程技术的应用，将植保素代谢机制的研究推向分子水平，并将植物合成植保素的功能推向基因工程改造阶段。由于这些手段和技术的应用，植保素的研究无论从广度还是深度上都有很大的拓展。综合分析近几十年来植保素的研究文献，呈现以下轮廓：

1940~1959 年：主要开展（1）新的抗菌化合物（植保素）的探测、分离、特性描述、鉴定和生物测试；（2）影响植保素生理因素研究；（3）不同寄生物和非寄生物对各种植保素的敏感性分析；（4）植保素的诱发；（5）植保素的作用机制；（6）植保素的合成与植物抗病的关系等方面的研究。

1960~1969 年：除继续以上 6 个方面的研究之外，还开展（7）植保素的诱发机理；（8）

植保素合成的寄主专一性；(9) 植保素的生物合成；(10) 植保素的降解；(11) 同一植物在不同真菌诱导作用下植保素的结构确定；(12) 合成植保素对寄主植物代谢的影响；(13) 植保素合成有关基因的鉴定等方面的研究。

1970~1979 年：除继续上述 13 个方面研究外，还开展了 (14) PAL 与植保素的合成；(15) 细菌和病毒作用下的植保素合成；(16) 植保素代谢；(17) 植保素对病害的控制；(18) 植保素的诱发；(19) 植保素诱发因子的分离和特性研究；(20) 诱发因子的结构；(21) 植保素的分类特性；(22) 植保素和植物免疫；(23) 植保素合成的抑制；(24) 植保素诱发因子的作用机制；(25) 植保素合成的组织特异性；(26) 来源于细菌的植保素诱发因子；(27) 植保素的解毒及有关酶；(28) 植保素、植物抗原与植物抗性的关系等方面的研究。

1980~1989 年：除进行上述 28 个方面的研究外，还开展了 (29) 小种专化的植保素诱发因子；(30) 植保素的毒性机制；(31) 影响植保素诱发的因子；(32) 植保素的放射免疫分析；(33) 植保素化学和作用模式；(34) 植物细胞培养生产植保素体系等方面的研究。

1990 年至今：除继续进行上述 34 个方面的研究外，还开展了 (35) 植保素的灵敏快速检测技术；(36) 植保素在种间杂种后代中的合成；(37) 基因编码的植保素合成过程中的关键酶；(38) 植保素合成有关基因的克隆及其结构和功能的研究；(39) 植保素有关基因工程；(40) 植保素诱发合成过程中的信使系统等方面的研究。

第二节 植保素的种类及其在植物中的分布

一、植保素的种类

自 20 世纪 50 年代和 60 年代首先分离并鉴定出黑孢霉酮、豌豆素和菜豆素等植保素以来，随着 TLC、GC、GC-MS、HMR 等微量和痕量物质分离和分析手段的建立和完善及生物测试方法的改进，越来越多植保素得到发现并得到鉴定。根据初步统计，目前已在 22 科植物中发现了植保素。从不同植物中分离鉴定的植保素主要有异黄酮 (isoflavonoids) 及黄酮、萜类 (terpenoids) 和生物碱类等小分子次生代谢物。

(一) 多酚植保素

苯丙烷代谢途径中的多酚类次生代谢物包括简单的酚酸 (如苯甲酸和水杨酸等)、羟基肉桂酸 (如绿原酸等)、木脂体类 (含两个 C_6C_3 单位)、鞣质 (水溶性高分子多酚)、香豆素、芪、黄酮和异黄酮等。已分离和鉴定的苯丙烷代谢途径中的植保素多分布在黄酮、异黄酮、芪和香豆素中。

1. 异黄酮和类黄酮植保素

异黄酮及类黄酮类化合物是广泛分布于植物界的 15 碳基本骨架的化合物 ($C_6C_3C_6$)，黄酮类化合物含有两个芳香环 (图 1-1)，分别命名为 A 环和 B 环，A 环和 B 环之间是含氧的杂环。根据黄酮类的 C 骨架和 C_3 杂环的氧化程度及 $-OH$ 、 $-OCH_3$ 和糖基化程度，可将黄酮类化合物分为：

(1) 黄酮 (flavones) 和黄烷酮 (flavanones)。该类化合物的 C_4 位一般为羰基，例如水稻 sakuranetin 就是黄烷酮类植保素。橙酮 (aurone) 是一种类黄酮色素，一般主要以组成型的形式存在于金鸡菊属植物的花卉中，但 *Cephalocereus senilis* 的培养细胞在诱发因子的

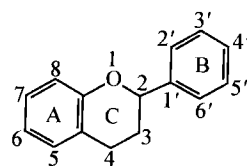


图 1-1 黄酮类化合物的两个芳香环

诱导作用下能作为植保素被诱发合成。

(2) 异黄酮酮 (isoflavones) 和紫檀素 (pterocarpan)。该类化合物中, B 环被移到 C₃ 的位置, 并经进一步修饰反应而成。豌豆素、菜豆素、吉维酮、苜蓿素、脱甲基苜蓿素、nissolicarpin, fruticarpin, nissicarpin, 大豆素 II、大豆素 III、牛角花醇、牛角花素、甜菜素、甜菜加林、高丽槐素、三叶草根素、大豆醇等植保素属于这类化合物。异黄酮类植保素曾被认为是仅存在于豆科植物的植保素, 但是最近已在单子叶植物生姜中发现菜豆素 II 和菜豆素 III 这两种异黄酮植保素。

(3) 黄酮醇 (flavonols)。该类化合物 C₃ 位置上是羟基, C₄ 位置上是羰基, 例如, 植保素 4',5,7-三羟黄酮醇 (kaempferol)、3',4',3,5,7-五羟黄酮 (quercetin)、funanodihydrokaempferol 等属于黄酮醇化合物。

(4) 黄烷类 (flavan) 植保素。水仙中的 7-羟基黄烷。

(5) 花色素苷 (anthocyanins) 和花色素 (anthocyanidin)。该类化合物是黄酮基本骨架中的 B 环不同位置经过羟基化和甲基化而成, 花青素苷则由花青素 C₃ 处羟基、C₅ 处羟基或 C₇ 处羟基进行糖苷化反应而成。在花青素中也已发现植保素, 例如, 高粱的芦素苷和甘蔗及高粱上均发现的 luteolinidin 属于花青素类植保素。

2. 芪 (stilbene) 类植保素

该类植保素的基本骨架是由 2C 桥连接的两个芳香环 (C₆C₂C₆), 其中的两个 C 桥之间含有烯键。芪类化合物是由苯丙烷代谢途径中反香豆酸-CoA 和两个丙二酰-CoA 在芪合酶催化作用下合成。目前, 已在豆科、葡萄科、松科和禾本科等 5 种以上不同科的植物中分离、鉴定出葡萄糖素、白藜芦醇、赤松素和 piceatannol 等芪类植保素。

3. 联苯类植保素

该类植保素具有两个苯环构成的基本结构, 已发现的植保素中 auclearin, 2'-methoxyaucuparin, 4'-methoxyaucuparin, raphiolepsin, dihydroinosylvin, demethylbatatasin IV、batatasin IV、dihydroinosylvin、红门南醇、山羊醇和无距兰醇等属于联苯类植保素。

4. 香豆素类植保素

包括羟基-或呋喃香豆素等, 是分布在菊科、大戟科、芸香科和伞形科植物中人们所熟知的重要植保素, 一般为香豆酸内酯。如香豆素、6-甲氧基异香豆素、补骨脂素 (psoralen)、花椒毒素 (xanthotoxin)、bergapten、scopoletin、ayapin、seselin 和 scoparone 等。

5. 简单多酚类植保素

已发现柑橘的黄木灵、辐射松的苯甲酸等简单多酚类植保素, 此外, 还在地榆中发现了苯乙酮类植保素 (2',6'-二羟基-4'-甲氧基-苯乙酮)。

6. 邻氨基苯甲酸类植保素

麝香石竹的 diathalexins 和 dianthramides、燕麦中的 Avenalumin I、avenalumin II 和 avenalumin III 等属于邻氨基苯甲酸类植保素。

7. 苯丙呋喃类植保素

Cotonaster lactea 中的 α -或 β -contonefuran、*Eriobotrya japonica* 中的 eribofuran、*Mespilus germanica* 中的 α -Contonefuran 及 *Pyrus communis* 中的 α -、 β -和 γ -Pyrufuran 等都属于苯丙呋喃类植保素。

8. 其他多酚类植保素

已从决明 (*Cassia obtusifolia*) 中分离到一种结构独特的植保素, 属于色 (原) 酮; 从百合科 *Lilium maximowiczii* 中发现的植保素 yurenolide 属于 benzodioxin-2-one 类植保素。

(二) 萜类植保素



萜类是由 5 碳结构单位 ($-\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}-\text{CH}_2-$) 构成的, 英文名称有 isoprenoid、terpenoids 或 terpenes。其中 terpenes 是指不含 O, 仅由 C 和 H 构成的碳氢化合物。萜类植保素主要有倍半萜植保素、二萜植保素和三萜植保素三大类。其中倍半萜是由 3 个异戊二烯单位构成, 二萜是由 4 个异戊二烯单位构成。

1. 倍半萜植保素

倍半萜植保素主要分布在茄科植物、锦葵科的棉花、旋花科的甘薯等中。例如, 辣椒、烟草、马铃薯、番茄、天仙子等茄科植物中的日齐素、粘霉酮、茄香根酮、块茎防疫素、罗宾姆素、茅苍术醇 (hinesol)、草根香酮 (vetivone), 甘薯中的黑疤霉酮、黑疤霉醇, 棉花中的棉子酚、半棉子酚、异半棉子酚等均为倍半萜植保素或呋喃倍半萜植保素。

倍半萜内酯中存在多种具有生物活性的次生代谢物, 例如, 一些倍半萜内酯对 *Bacillus subtilis* 和 *Staphylococcus aureus* 等格兰阳性细菌具有抗性, 一些倍半萜内酯具有抗肿瘤活性, 还有一些倍半萜内酯具有他感作用活性。在倍半萜内酯中也发现多种植保素。例如, 从鞘冠菊中发现的 costunolide, 从莴苣和 *Taraxacum officinale* 中发现的 lettucein A, 从莴苣叶片中发现的 cichoralxin 都是倍半萜内酯植保素。

2. 二萜植保素

已在水稻中分离、鉴定的二萜植保素有水稻素 (A-F)、Momilactone (A-B) 和 Phytocassane (A-E) 等, 在蓖麻中发现的二萜植保素有蓖麻素和红豆杉的紫杉醇也具有一定的植保素属性。

3. 三萜类植保素

草莓在炭疽病原菌的侵染作用下, 可合成 euscaphic acid, tormentic acid 和 myrianthic acid 等三萜类植保素; 在猕猴桃中也发现病原菌侵染诱导作用下可合成猕猴桃酸等三萜类植保素。

(三) 生物碱植保素

生物碱是含氮的芳香族化合物, 一般氮分布在其中的杂环上。在多数情况下氮呈碱性, 因此, 大多数生物碱呈碱性。已在罂粟中发现生物碱植保素血根碱, 从诱发因子处理的罂粟的培养细胞中分离到 sanguinarine, 该植保素是一种橙色化合物, 在 10^{-5}M 的浓度下具有显著的杀菌活性。

已从十字花科植物中分离、鉴定出至少 16 种吲哚类生物碱植保素。这些植保素除了都具有含氮的芳香环外, 还都含有吲哚环及硫元素。十字花科植物是目前发现的惟一合成含硫植保素的植物, 但是十字花科植物也能在诱发因子作用下合成不含硫的植保素。例如, 甲基-1-甲氧基-吲哚-3-羧酸就是一种不含硫的植保素。在真菌侵染作用下, 十字花科植物能合成足够量的吲哚类植保素并具有较强的杀菌活性, 这类植保素大多数在 100ppm 的浓度下就表现出较强的杀菌活性。

(四) 炔类植保素

已发现的乙炔类植保素有红花中的红花醇 (safynol) 和脱氢红花醇 (dehydrosafynol)、鞘冠菊中的几丁质醇 (mycosinol)、蚕豆中的蚕豆酮酸 (wyerone acid)、番茄和胡萝卜中的人参二醇 (faltarindiol) 及人参醇 (faltarinol)、番茄中的顺式-十四碳-6-烯-1,3-二炔-5,8-二元醇等。

(五) 脂肪酸类植保素

花生甲基亚麻酸、13-hydroxyoctadecadiene-9,11-methyloate、9-hydroxyoctadecadiene-10,12-methyloate、1,2,3(2-acetyloxy)tricarboxylic propanic acid 等属于脂肪酸类植保素。

(六) cyclic dione 类植保素

已在感病的洋葱球茎中发现 5-Hexylcyclopenta-1,3-dione 和 5-octylcyclopenta-1,3-dione 两种 cyclic dione 植保素。

(七) 蒽醌类植保素

第一种被发现的蒽醌类植保素是金鸡纳树 (*Cinchona ledgerianum*) 的紫红素 (1,2,4-三羟蒽醌)。

(八) 其他植保素

除了上述各种主要类型植保素外, 还有其他一些类型的植保素, 如十大功劳中的小碱 (berberin)、桑树中的桑素 (moracin A、moracin B) 和欧洲防风中的花椒毒素 (xanthotoxin)。

随着植保素研究的深入, 还将会有新的类型的植保素不断被发现。

二、几种主要植物中的植保素

迄今, 已在豆科、茄科、菊科、藜科、锦葵科、伞形科、旋花科、兰科、葡萄科、蔷薇科、禾本科和葫芦科等至少 30 个科以上的植物上进行了植保素的生物检测、分离、鉴定等工作。其中研究最多的是豆科植物, 已对至少 600 种以上的豆科植物开展了植保素的相关研究, 大多数豆科植物在病原菌侵染或人工接种后合成一种至数种植保素。但对其他植物开展的研究较少。从目前积累的研究结果来看, 开花植物在病原菌侵染或接种后普遍能合成植保素。研究表明, 多数情况下同一科植物往往合成同一类植保素, 即植物间合成植保素结构的相似性一定程度上反映了植物间的亲缘关系。

(一) 禾本科

禾本科作物中, 已在水稻、玉米、燕麦、高粱和甘蔗等作物中发现在病原菌的诱发作用下合成了植保素, 包括 (1) Pimarane 型二萜植保素—水稻素 (oryzaalexin) A、水稻素 B、水稻素 C、水稻素 D、水稻素 E 和水稻素 F。它们的相对构型分别为 3-hydroxy-7-oxo-sandaracopimaradiene、3-oxo-7-hydroxy-sandaracopimaradione、3, 7-dioxo-sandaracopimaradiene、3, 7-dihydroxy-sandaracopimaradiene、isopimar-8 (14), 15-dien-3- β -18-diol。这些植保素均具有 (+) -sandaracopimaradine 的分子构架。除此以外, 在水稻中也发现具有 (+) -sandaracopimaradine 分子构架的植保素 phytocassane A、植保素 phytocassane B、植保素 phytocassane C、植保素 phytocassane D、植保素 phytocassane E; (2) Stemarane 型二萜植保素水稻素 S (oryzaalexin S); (3) 内酯型二萜植保素, 主要有 momilactone A 和 momilactone B 两种; (4) flavanone 黄烷醇型植保素, 迄今已分离并鉴定的该类水稻植保素有樱花素 (sakuranetin) 和柚皮素 (naringenin)。此外, 最近还有研究发现, 水稻在病原菌感染或其他逆境作用下合成生物碱植保素 (范军、彭友良等, 1996)。

在燕麦、高粱、甘蔗等禾本科作物中检测鉴定出多酚类植保素。例如, 在感染禾冠柄锈菌的燕麦上发现了 avenalumin I、avenalumin II、avenalumin III 3 种邻氨基苯甲酸类植保素; 在甘蔗上已发现芪类植保素有 piceatannol, 花青素类植保素有木犀草黄素苷 (luteolinidin); 从病原菌侵染的高粱叶片中已分离到芹素苷 (apigeninidin)、apigeninidin 5-caffeylarabinoside 和木犀草黄素苷等花青素类植保素; 从 *Avena sativa* 叶片中发现白藜芦醇植保素。此外, 在小麦中还发现了邻氨基苯甲酸糖苷植保素。在玉米上发现了 maysin 植保素对黄曲霉具有抗性。

(二) 豆科

豆科植物上植保素分布最多, 已在各种豆科植物中鉴定出黄酮、异黄酮、芪、香豆素、多炔和脂肪酸等多种类型植保素, 其中分布最多的是异黄酮类植保素。大豆中已发现大豆素 I -