

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2009.00418

大豆抗疫霉根腐病的蛋白组研究

邱红梅^{1,2} 刘春燕^{1,3,**} 张代军² 辛秀君² 王家麟³ 王晶³ 单彩云³
单大鹏³ 胡国华^{1,*} 陈庆山^{3,*}

¹ 黑龙江省农垦科研育种中心, 黑龙江哈尔滨 150090; ² 黑龙江省农垦总局红兴隆研究所, 黑龙江友谊 155811; ³ 东北农业大学大豆研究所, 黑龙江哈尔滨 150030

摘要: 利用双向电泳及 MALDI-TOF-MS 技术分析绥农 10 号真叶接种疫霉菌 1 号生理小种后的蛋白质组变化。在抗病品种绥农 10 号叶片中共获得 19 个差异表达蛋白点, 其中有 12 个上调表达, 6 个下调表达, 1 个特异表达(仅在接种后出现)。利用生物质谱分析 8 个上调表达点、1 个下调表达点和 1 个特异表达点, 最终鉴定得到 8 个有注释功能的蛋白, 根据功能可分为 4 类, 第 1 类为参与新陈代谢的蛋白, 包括二磷酸核酮糖羧化酶的大亚基及前体、琥珀酰-辅酶 A; 第 2 类为参与信号传导的蛋白, 包括激酶受体类蛋白、氧化还原酶和半胱氨酸氧化还原酶; 第 3 类为参与细胞内物质运输的蛋白, 包括衣壳蛋白的 zeta-3 亚基; 第 4 类为转录因子, 是参与茉莉酸介导的 F-box 蛋白。这些蛋白可为进一步研究大豆抗病机制奠定基础。

关键词: 大豆; 疫霉根腐病; 抗病相关蛋白; 2D; MALDI-TOF-MS

Proteome Analysis on Resistance to *Phytophthora* Root Rot in Soybean

QIU Hong-Mei^{1,2}, LIU Chun-Yan^{1,3,**}, ZHANG Dai-Jun², XIN Xiu-Jun², WANG Jia-Lin³, WANG Jing³, SHAN Cai-Yun³, SHAN Da-Peng³, HU Gu-Hua^{1,*}, and CHEN Qing-Shan^{3,*}

¹ Land Reclamation Research & Breeding Centre of Heilongjiang, Harbin 150090, China; ² Hongxinglong Research Institute of Heilongjiang Land Reclamation Bureau, Youyi 155811, China; ³ Soybean Research Institute, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China

Abstract: *Phytophthora* root rot caused by *Phytophthora sojae* is a serious soil-borne fungi disease endangering soybean production and bringing huge economic losses. The objective of this study was to survey and identify the proteins associated with resistance, using soybean cultivar Suinong 10 by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry technology. Nineteen differentially expressed proteins were obtained, of twelve which presented up-regulated, six were down-regulated, and one was special protein. Ten protein spots including eight with up-regulated expression, one with down-regulated expression, and one with specially expression were investigated by biological mass spectrometry. The results showed that eight functional proteins were identified, three of which involved in metabolism, consisting of the ribulose-1,5-phosphate carboxylase large subunit and its precursor, succinyl coenzyme A, three of which were related to signal transduction, encompassing kinase receptor like protein, oxidoreductase, and cysteamine ammonia acid oxidoreductase, one of which participated in transport of metabolites in cells, i.e. clothing zeta-3 protein subunits, one of which was concerned with the jasmonic acid-mediated resistance, including F-box protein. The results provide useful information for studying the molecular mechanism of resistance to *Phytophthora* root rot.

Keywords: Soybean; *Phytophthora* root rot; Resistance-related protein; 2D; MALDI-TOF-MS

大豆疫霉根腐病是世界性毁灭性病害之一, 给大豆生产带来巨大的经济损失。针对此病害已从多方面展开了研究, 目前已育成多个抗疫霉根腐病品种并收集大量抗病资源, 初步建立了大豆抗疫霉根

腐病的分子机制体系。已在抗疫霉根腐病基因, 疫霉菌无毒基因, 及大豆与疫霉菌互作关系三方面展开研究。分子机制的研究可指导抗病育种, 为抗病育种提供理论依据。

本研究由引进国际先进农业科学技术计划(948 计划)项目[2006-G1(A)], 国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(2006AA10Z1F4), 黑龙江省博士后科研启动基金项目(LHK-04014), 黑龙江省博士后资助项目(LRB06-126), 黑龙江省“十一五”科技攻关项目(GA06B101-2-6)资助。

* 通讯作者(Corresponding authors): 陈庆山, E-mail: qschen@neau.edu.cn, Tel: 0451-55191945; 胡国华, E-mail: Hugh757@vip.163.com, Tel: 0451-55199475

第一作者联系方式: E-mail: qhm2001-2005@163.com (邱红梅) **共同第一作者

Received(收稿日期): 2008-06-17; Accepted(接受日期): 2008-10-22.

目前已在9个位点鉴定了16个抗疫霉根腐病基因,抗病位点为 *Rps1*、*Rps2*、*Rps3*、*Rps4*、*Rps5*、*Rps6*、*Rps7*、*Rps8*、*RpsYB30*, 抗疫霉根腐病基因为 *Rps1a*、*Rps1b*、*Rps1c*、*Rps1d*、*Rps1e*、*Rps1k*、*Rps2*、*Rps3a*、*Rps3b*、*Rps3c*、*Rps4*、*Rps5*、*Rps6*、*Rps7*、*Rps8* 和 *RpsYB30*^[1-3]。2005年 Bhattacharyya 克隆到4个抗病基因,即 *Rps1k-1*、*Rps1k-2*、*Rps1k-3* 和 *Rps1k-4*, 经转基因验证具有抗疫霉根腐病功能^[4]。抗病基因对应的无毒基因,在疫霉菌中已发现12个,即 *Avr-1a*、*Avr-1b*、*Avr-1c*、*Avr-1d*、*Avr-1k*、*Avr-2*、*Avr-3a*、*Avr-3b*、*Avr-3c*、*Avr-4*、*Avr-5* 和 *Avr-6*^[5]。2004年 Shan 等^[6]用图位克隆的方法获得了 *Avr1b-1* 基因,其编码小疏水分泌蛋白,此分泌蛋白可激发具有 *Rps1b* 基因的寄主防御系统。大豆抗疫霉菌为寄主性抗病,大豆与疫霉菌有亲和与不亲和两种相互作用关系^[7],亲和则感病,不亲和则为抗病。当大豆受非亲和性疫霉菌感染后,侵染部位迅速死亡,使疫霉菌不能获取养分,同时又诱导周围细胞合成抑制其生长的物质,从而限制其侵染。

大豆抗疫霉菌的分子机制是复杂的,在抗病基因与无毒基因互作、抗病信号传递、防御反应等过程中都需要有多种蛋白参与,其中有大部分蛋白在抗病过程中是差异表达的,如 PR-1a 上调表达,β-1,3 葡聚糖内切酶(PR-2)上调表达,查耳酮还原酶和异黄酮合成酶上调表达^[8-9],这些蛋白均直接参与抗病反应,只是在寄主性抗病途径所在的位置不同。本研究将这一类直接参与寄主性抗病反应,且由疫霉菌侵染后诱导差异表达的蛋白视为抗病相关蛋白,并利用双向电泳与 MALDI-TOF-MS 分析技术分离、鉴定抗疫霉根腐病相关蛋白。

1 材料与方法

1.1 材料与种植

选用大豆品种绥农10号,含抗疫霉根腐病基因 *Rps1a* 和 *Rps2*。种子播前先将装满灭菌土的营养钵置塑料盒中,盒中加水,利用毛细管作用,使钵中的土壤吸足水分,然后取出营养钵备用。播种10钵,13粒/钵点播,播后用无菌土覆盖。置25℃培养箱培养3d,出苗后转移至温室,选择Vc期长势一致的幼苗用于接种。

病原菌为大豆疫霉菌1号生理小种,黑龙江地区流行的生理小种。无菌操作下,挑取少量菌丝体接种于PDA培养基,25℃无光条件下培养10d,即

可接种。

1.2 接种与取样

在每日25℃、16h光照及18℃、8h黑暗的交替条件下培养大豆幼苗,在Vc期的大豆幼苗下胚轴划长1cm、深为1mm的伤口,接种长为1.2cm、宽为1.5mm的疫霉菌1号生理小种的菌丝条,接种20株,对照20株只划伤口,不接种,喷雾保湿。接种后的植株先在保湿箱中,暗培养12h,然后转入25℃、16h光照及18℃、8h黑暗条件下继续培养。分别在接种诱导12、24、36和48h后取样,每次都分别在接种与对照的5株大豆上取下第1对真叶放于冻存管,液氮速冻后于-80℃保存^[10]。

1.3 蛋白质制备及定量

利用10%TCA丙酮法从真叶中提取的蛋白质;以1mg mL⁻¹标准浓度的牛血清白蛋白为对照,采用Bradford法在UV-2550pc紫外/可见分光光度计上测定蛋白质浓度。

1.4 双向电泳及图谱分析

取疫霉菌诱导处理和对照的真叶定量可溶蛋白质。将样品分别设3次重复进行双向电泳(上样量为1200μg)。利用24cm pH4~7的IEF干胶条进行单向电泳,利用12.5%的SDS-PAGE进行第二向电泳,用胶体考马斯亮蓝染料染色。利用ImageMaste 2D Platinum 6.0软件分析找出差异表达的蛋白质。

1.5 MALDI-TOF-MS 分析

从制备胶上切下已经鉴定有差异的蛋白点,经过胶内酶切后,在Autoflex MALDI-TOF-MS质谱仪上进行MALDI-TOF-MS分析。先将溶于0.1%TFA的5mg mL⁻¹α-胍基-4-羟基肉桂酸和50%ACN按2:1体积混匀,配成饱和和基质溶液,取1μL肽段溶液与4μL基质溶液混匀,将1μL混合液点到MALDI靶板上,室温干燥后送入离子源进行测定。分析时先用已知的标准肽段作内标,利用flexAnalysis2.0软件标注肽指纹图谱(PMF)数值。

1.6 目标蛋白的鉴定

将分析后的肽段质量数据输入Excel表,选择范围为800~4000Da,删除角蛋白肽谱峰(含±0.5Da)和胰酶自切峰值,标注较高的峰值。整理后的数据用于数据库查询。利用MASCOT程序进行数据库(NCBhr, SwissProt, MSDB)检索。选择物种为拟南芥或植物,并假定肽段值为monoisotopic和[M+H]⁺。根据分值、E值、序列覆盖度、匹配肽段峰值强弱、实验等电点和相对分子质量等因素分析检索结果。

2 结果与分析

将染色后的凝胶进行扫描。图 1 显示蛋白质的提取和分离效果都很好, 蛋白点分布较均匀。

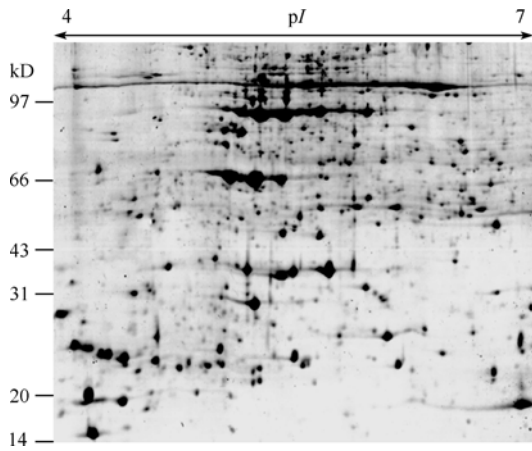


图 1 蛋白质分离结果

Fig. 1 Results of protein separation with 2D electrophoresis

分析发现, 在疫霉菌处理的 3 次重复胶上分别检测到 1 022、1 034、1 095 个蛋白点, 在对照的 3 次重复胶上分别检测到 995、1 009、1 020 个蛋白点。疫霉菌处理过的凝胶上平均有 1 050 个蛋白点, 对照胶上平均有 1 008 个蛋白点。说明接种诱导后总蛋白的数量较未接种前多, 这可能与抗病应答系统启动有关。

利用软件对凝胶进行比较分析, 首先分别对疫霉菌诱导的和对照的 3 次重复凝胶进行点与点的匹

配, 分别以点最多的胶为参考胶, 将匹配结果保存便于以后的分析。然后进行疫霉菌诱导的凝胶和对照凝胶之间点与点的匹配。以疫霉菌处理的胶为参考胶, 因为其上蛋白点较对照多。处理凝胶和对照凝胶匹配的相关系数均值为 0.92, 说明匹配效果好, 可以继续进行分析。将处理胶与对照胶对应匹配蛋白点的 Vol% 值(胶内单个蛋白点的容量与胶内蛋白点的总容量的比值)进行求熵运算, 比值大于 3.5 且蛋白点轮廓清晰的即为在疫霉菌接种诱导后差异表达的蛋白点。经过分析找到 19 个差异表达的蛋白点(图 2)。图 2 左侧为疫霉菌接种诱导的凝胶, 右侧为对照凝胶。蛋白点 10 只出现在左侧, 而右侧没有。其他的蛋白点有上调表达的也有下调表达的。

Vol% 值的平均值(图 3)显示, 蛋白点 1、2、3、4、5、6、7、8、11、12、13、15 上调表达, 蛋白点 9、14、16、17、18、19 下调表达, 蛋白点 10 只在处理凝胶上出现, 为特异表达。由此可知疫霉菌诱导处理后疫农 10 号中有 12 个蛋白点上调表达, 6 个蛋白点下调表达, 1 个蛋白点特异表达, 上调表达的蛋白点较下调表达的蛋白点多。

对 8 个上调表达的蛋白点(蛋白点 1、2、3、4、5、6、7 和 8)、1 个下调表达的蛋白点(蛋白点 9)和特异表达的蛋白点 10 利用胰蛋白酶进行胶内酶切, 酶切产物纯化后在 Autoflex MALDI-TOF-MS 质谱仪上进行 MALDI-TOF-MS 分析。将分析后的数据利用 MASCOT 程序进行数据库(NCBhr, SwissProt,

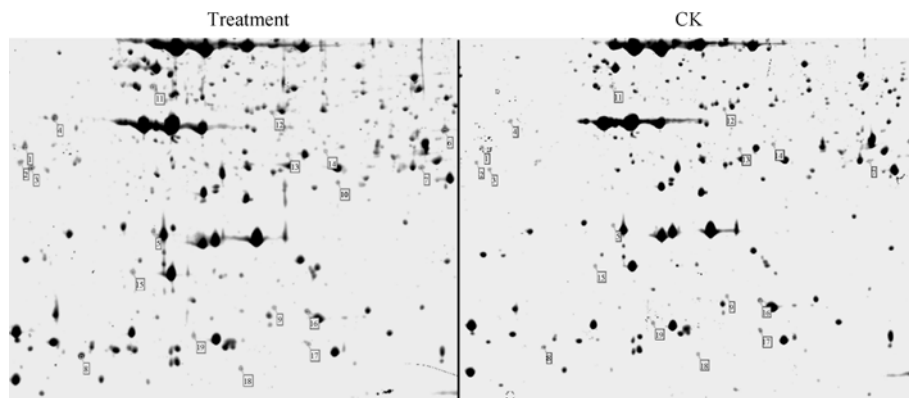


图 2 疫霉菌诱导后的差异蛋白点

Fig. 2 Differentially expressed protein spots induced by *Phytophthora soja*

胶图中有标签的蛋白点为差异表达蛋白, 共有 19 个; 处理、对照凝胶中序号相同的蛋白点在胶中的位置相同为同一蛋白点, 胶间蛋白点的强度或面积是不同的, 表明表达量发生变化; 在处理凝胶的右上方存在蛋白点 10, 而在对照凝胶的相同位置不存在此点, 说明此点在疫霉菌诱导下特异表达。

Nineteen protein spots labeled by numbers are differentially expressed. Protein spots with the same number in treatment and CK are the same spots if they share the same place in gel. Different intensity and area show change of expressing quantity. There is spot 10 on the upper right in the treatment Gel, but no spot in the same place in CK Gel. It shows that the spot is specific expression induced by *Phytophthora soja*.

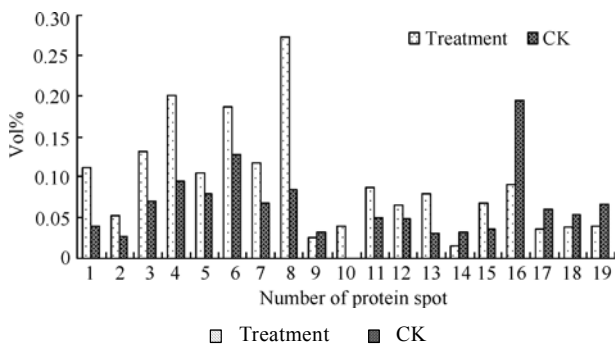


图 3 蛋白点差异表达情况

Fig. 3 Differential expression of protein spots

当处理柱高于对照柱时为上调表达蛋白点,
反之则为下调表达蛋白点。

It was up-regulated expression protein spots when the Vol% of the treatment was higher than that of the CK, otherwise it was the down-regulated expression protein spots.

MSDB)检索。结果表明蛋白点 1、2 在数据库(NCBhr, SwissProt, MSDB)中找不到匹配的结果, 只得到 8 个蛋白点(蛋白点 3、4、5、6、7、8、9 和 10)的注释信息(表 1)。

蛋白点 3 为 F-box 蛋白, 具有 LRR (Leucine-Rich Repeat)结构域及 FBD (F Box Domain)保守结构域, 据研究发现 FBD 有转录因子的功能, 参与茉莉酸介导抗病防御反应(非致病性根际细菌诱导产生

系统抗性)^[11]。蛋白点 4 为激酶受体类蛋白, 参与抗逆与抗病的信号传递途径^[12]。蛋白点 5 为衣被蛋白的 zeta-3 亚基, 是组成 COPI 衣被小泡的一种蛋白, COPI 衣被小泡负责回收、转运内质网逃逸蛋白 (escaped proteins)返回内质网; COPI 还可以介导高尔基体不同区域间的蛋白质运输^[13]。蛋白点 6 为二磷酸核酮糖羧化酶的大亚基前体, 蛋白点 7 为二磷酸核酮糖羧化酶的大亚基, 在植物中核酮糖二磷酸羧化酶是最重要的羧化酶, 它可以羧化核酮糖二磷酸, 在卡尔文循环中是二氧化碳固定的第一步^[14]。蛋白点 8 为氧化还原酶, 属于抗氧化蛋白质超家族, 广泛存在于原核生物和真核生物中, 参与多种细胞活动的信号转导。蛋白点 9 为半胱氨酸氧化还原酶, 在 N-端具有保守的半胱氨酸(Cys)残基也属于抗氧化蛋白超家族。蛋白点 10 为琥珀酰-辅酶 A, 参与三羧酸循环。

8 个蛋白点根据功能可被分为 4 类, 蛋白点 6、7 和 10 是第 1 类, 为参与新陈代谢的蛋白; 蛋白点 4、8 和 9 是第 2 类, 为参与信号传导的蛋白; 蛋白点 5 是第 3 类为参与细胞内物质运输的蛋白; 蛋白点 3 是第 4 类, 为转录因子。

表 1 MADI-TOF 质谱鉴定的蛋白质
Table 1 Identified proteins by MALDI-TOF

编号 No. of spot	登录号 Accession No.	鉴定蛋白 Protein identification	物种 Species	实验值 Experiment data (M_r/pI)	理论值 Theory data (M_r/pI)	覆盖率 Coverage rate(%)
3	Q9FNJ5	F-box/ LRR-repeat protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	52/5.2	49/4.8	17
4	AA072667	Kinase interacting protein	<i>Oryza sativa</i>	62/5.0	59/5.2	18
5	gi 125528317	Coatomer subunit zeta-3	<i>Oryza sativa</i>	33/5.2	34/6.0	25
6	P270066	RubisCO precursor	<i>Glycine max</i>	58/6.5	53/6.0	36
7	Q8MD78	RubisCO large chain	Corpse flower	50/6.3	53/6.3	29
8	Q7F8S5	Peroxiredoxin-2E-2	<i>Oryza sativa</i>	22/5.3	23/6.2	40
9	A2SZW8	1-Cys peroxiredoxin PER1	<i>Zea mays</i>	24/5.5	25/6.3	31
10	Q6K9N6	Succinyl-CoA ligase	<i>Oryza sativa</i>	46/5.8	45/5.9	18

M_r 为相对分子量, 单位 kD。 M_r is relative molecular mass(kD).

3 讨论

大豆植株与疫霉菌的互作是在一系列复杂的信号网络调控下实现的, 疫霉菌的侵染可引起寄主在局部产生抗性反应。首先是大豆被侵染的部位与疫霉菌的识别, 继而引发抗病信号传递, 诱导防卫基因差异表达, 最终导致侵染部位的过敏反应坏死 (hypersensitive reaction, HR)^[15]。疫霉菌侵入细胞后, 其葡聚糖激发子(wall glucan elicitor, WGE), 被细

胞中的 β -1,3 葡聚糖内切酶(PR-2)降解为细胞壁葡聚糖激发子的片段(WGE fragment)^[16], 寄主可识别葡聚糖激发子的片段, 产生使 β -1,3 葡聚糖内切酶 (PR-2)上调表达的信号, 当寄主含有 *Rps1* 或 *Rps2* 基因时, 查耳酮还原酶(chalcone reductase, CHR)和异黄酮合酶(isoflavone synthase, IFS)均上调表达, 使大豆素的含量增多, 进而产生 HR; 但对于含有 *Rps3* 或 *Rps7* 基因的寄主, PR-1a 上调表达, 产生不依赖异黄酮合成的局部抗性^[17]。大豆植株在局部产生抗性反

应这一过程是复杂的,通过微阵列芯片(microarray)分析,鉴定到多个蛋白上调表达,如编码植保素合成的酶基因、病程相关蛋白基因,且这些基因的表达峰值出现在疫霉菌接种后的 24 h;同时鉴定得到数个下调表达的蛋白,如脂氧合酶和过氧化物酶基因^[18]。

本研究鉴定得到 12 个上调表达的蛋白点,6 个下调表达的蛋白点,1 个特异表达的蛋白点。上调表达表明在疫霉菌诱导下,部分蛋白表达量增多,可能是一些合成植保素的酶,如查耳酮还原酶和异黄酮合成酶,其下游产物大豆素是一种植保素,防御疫霉菌侵入;还可能是病程相关蛋白(pathogenesis-related proteins),如上述的 PR-1a 与 PR-2;还鉴定到参与新陈代谢的酶、参与物质运输的蛋白及氧化还原酶均上调表达。下调表达表明在疫霉菌侵入后,一些抑制抗病蛋白活性的蛋白表达量降低,如在拟南芥中的 RIN4 蛋白^[19],在大豆中也应存在;或者一些参与信号传递的蛋白,如蛋白点 9 (半胱氨酸氧化还原酶),通过表达量的下调进而产生质子流、产生信号;或者是一些氧化酶、脂氧合酶,他们不直接参与抗病反应,可能是抗病反应的间接结果。特异表达说明蛋白点表达量上发生质的变化,但本研究中得到蛋白点 10 为琥珀酰-辅酶 A,其参与三羧酸循环,在疫霉菌接种前也会存在,只是在总蛋白中的含量较低,在凝胶中检测不到,而在接种后强上调表达,使其在总蛋白中的含量达到凝胶可检水平,由此可知凝胶中表明特异表达的蛋白点未必特异表达,但其表达量一定发生变化,可以为研究提供参考信息。在三羧酸循环中 α -酮戊二酸氧化脱羧生成琥珀酰辅酶 A,属不可逆的 α -氧化脱羧反应,是三羧酸循环的调节点,接下来琥珀酰辅酶 A 转变成琥珀酸,这是三羧酸循环中唯一直接生成高能磷酸键化合物的反应。由此可知疫霉菌的侵入,使大豆植株的能量代谢途径增强,使能量迅速积累抵御病原菌的侵染。本实验鉴定得到 3 个可能参与抗病信号的传递蛋白点,即蛋白点 4、蛋白点 8、蛋白点 9,均在接种疫霉菌后筛选得到,可能为抗疫霉根腐病相关蛋白,但还需进一步实验验证。

综上所述可知在大豆病原菌胁迫下寄主可产生抗病防御反应,并诱导多个抗病相关蛋白表达,在此过程中寄主会产生一系列生理生化变化,积极响应抗病防御反应为其提供能量和有机物质。疫霉菌诱导的寄主抗病反应不是唯一的抗病应答反应,但却是

抗病途径不可少的。深入了解抗病反应机制可以为抗病育种提供理论依据。

4 结论

得到 19 个差异表达蛋白点,其中 12 个上调表达,6 个下调表达,1 个特异表达。经鉴定的 8 个功能蛋白质分别为 F-box 蛋白、激酶受体类蛋白、衣被蛋白的 zeta-3 亚基、二磷酸核酮糖羧化酶的大亚基前体、二磷酸核酮糖羧化酶的大亚基、氧化还原酶、半胱氨酸氧化还原酶、琥珀酰-辅酶 A。经过文献检索,笔者认为蛋白点 4 (激酶受体类蛋白)、蛋白点 8 (氧化还原酶)、蛋白点 9 (半胱氨酸氧化还原酶)为疫霉菌诱导表达的抗疫霉根腐病相关蛋白。

References

- [1] Burnham K D, Dorrance A E, Francis D M, Fioritto R J, Martin S K St. *Rps8* a new locus in soybean for resistance to *Phytophthora sojae*. *Crop Sci*, 2003, 43: 101–105
- [2] Sandhu D, Gao H Y, Cianzio S, Bhattacharyya M K. Deletion of a disease resistance nucleotide-binding-site leucine-rich-repeat-like sequence is associated with the loss of the phytophthora resistance gene *Rps4* in soybean. *Genetics*, 2004, 168: 2157–2167
- [3] Zhu Z-D(朱振东), Huo Y-L(霍云龙), Wang X-M(王晓鸣), Huang J-B(黄俊斌), Wu X-F(武小菲). Molecular identification of a novel phytophthora resistance gene in soybean. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2007, 33(1): 154–157(in Chinese with English abstract)
- [4] Gao H Y, Narayanan N N, Ellison L, Bhattacharyya M K. Two classes of highly similar coiled coil-nucleotide-binding leucine-rich-repeat genes isolated from the *Rps1-K* locus encode phytophthora resistance in soybean. *Mol Plant Microbe Interact*, 2005, 10: 1035–1045
- [5] Whisson S C, Drent H A, Maclean D J, Irwin J A. *Phytophthora sojae* avirulence genes, RAPD, and RFLP markers used to construct a detailed genetic linkage map. *Mol Plant Microbe Interact*, 1995, 8: 988–995
- [6] Shan W, Cao M, Leung D, Tyler B M. The *Avr1b* locus of *Phytophthora sojae* encodes an elicitor and a regulator required for avirulence on soybean plants carrying resistance gene *Rps1b*. *Mol Plant-Microbe Interact*, 2004, 17: 394–403
- [7] Ward E W B, Cahill D M, Bhattacharyya M K. Early cytological differences between compatible and incompatible interactions of soybeans with *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. *Physiol Mol Plant Pathol*, 1989, 4: 267–283
- [8] Graham M Y, Weidner J, Wheeler K, Pelowm J, Graham T L. Induced expression of pathogenesis-related protein genes in soybean by wounding and the *Phytophthora sojae* cell wall glucan elicitor. *Physiol Mol Plant Pathol*, 2003, 63: 141–149
- [9] Morris P F. Identification and accumulation of isoflavonoids and isoflavone glucosides in soybean leaves and hypocotyls in resis-

- tance responses to *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. *Physiol Mol Plant Pathol*, 1991, 39: 229–244
- [10] Sun G-Z(孙果忠). Molecular mechanism of non-host resistance to *Phytophthora sojae*. PhD Dissertation of Chinese Academy of Agricultural Science, 2007(in Chinese with English abstract)
- [11] Kim H S, Delaney T P. Arabidopsis SON1 is an F-box protein that regulates a novel induced defense response independent of both salicylic acid and systemic acquired resistance. *Plant Cell*, 2002, 14: 1469–1482
- [12] Kenjiro S, Toshihiko H, Toru K, Takashi I, Tomoyuki Y. Interaction of N-acetylglutamate kinase with a PII-like protein in rice. *Plant Cell Physiol*, 2004, 45: 1768–1778
- [13] David J S, Nathalie L M, Alessandra P, Rainer P, Jean-Pierre P. COPI-coated ER-to-golgi transport complexes segregate from COPII in close proximity to ER exit sites. *J Cell Sci*, 2000, 113: 2177–2185
- [14] Portis A R. Rubisco activase-Rubisco's catalytic chaperone. *Photosynth Res*, 2003, 75: 11–27
- [15] Kamoun S, Huitema E, Vleeshouwers V G A A. Resistance to oomycetes: A general role for the hypersensitive response? *Trends Plant Sci*, 1999, 4: 196–200
- [16] Takeuchi Y. Immunological evidence that beta-1,3-endoglucanase is the major elicitor-releasing factor in soybean. *Annu Phytopathol Soc Jpn*, 1990, 56: 523–531
- [17] Graham M Y, Weidner J, Wheeler K, Pelow M J, Graham T L. Induced expression of pathogenesis-related protein genes in soybean by wounding and the *Phytophthora sojae* cell wall glucan elicitor. *Physiol Mol Plant Pathol*, 2003, 63: 141–149
- [18] Moy P, Qutob D, Chapman B P, Atkinson L, Gijzen M. Patterns of gene expression upon infection of soybean plants by *Phytophthora sojae*. *Mol Plant Microbe Interact*, 2004, 17: 1051–1062
- [19] Belkhadir Y, Nimchuk Z, Hubert D A, Mackey D, Dangl J L. Arabidopsis RIN4 negatively regulates disease resistance mediated by RPS2 and RPM1 downstream or independent of the NDR1 signal modulator and is not required for the virulence functions of bacterial type III effectors AvrRpt2 or AvrRpm1. *Plant Cell*, 2004, 16: 2822–2835