

葡萄白藜芦醇合酶基因转化水稻的研究

刘聃璐 林拥军

华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室/华中农业大学国家植物基因研究中心(武汉), 武汉 430070

摘要 将来源于 2 个葡萄品种的白藜芦醇合酶基因以组成型表达的强启动子 Ubiquitin 驱动, 并利用农杆菌介导的遗传转化引入粳稻品种中花 11 中。通过对单拷贝转基因家系基因表达量及白藜芦醇目标物的检测, 发现大多数转基因家系的外源基因可稳定表达, 但检测到的最终产物不是白藜芦醇, 而是白藜芦醇苷(亦称云杉新苷), 最高检出量达到了 10.26 $\mu\text{g/g}$, 是野生型对照的 1 000 倍, 推测这是在生成白藜芦醇的基础上, 水稻内源的糖基转移酶作用的结果。虽然经抗病检测发现转基因植株并没有对稻瘟病菌表现出明显抗性, 但是高含量的云杉新苷转基因家系可以作为提升水稻潜在营养价值的材料进行使用。

关键词 白藜芦醇; 云杉新苷; 白藜芦醇合酶基因; 水稻

中图分类号 S 511; Q 785 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2014)02-0008-07

植物抗毒素^[1] (phytoalexins) 是植物受到外界病原菌侵染后产生并积累的一类具有抗菌活性的小分子物质, 白藜芦醇(resveratrol, Res) 便是其中之一, 它多存在于葡萄及花生中。其在自然状态下的含量很低, 但当植物受到病原菌侵染或 UV 照射后可被诱导产生并大量富集^[2]。从结构上看, 白藜芦醇又被称为 3, 4', 5-三羟基-反式-对二苯乙烯(trans-3, 4', -5-trihydroxystilbene), 属于多酚类化合物, 难溶于水。Res 具有顺、反 2 种结构, 反式异构体的生物活性强于顺式^[3]。

白藜芦醇及其衍生物被证实有多重营养和保健价值。在人体心血管方面, Res 可通过消除自由基及螯合作用来抑制低密度脂蛋白(LDL)的氧化, 从而达到预防动脉硬化和冠心病的效果^[4]。在抗肿瘤方面, Res 可抑制环氧合酶(COX)及过氧化氢酶的活性^[5], 同时参与诱导细胞凋亡过程。2006 年, Joseph 等^[6] 研究表明 Res 能将处于高热量饮食状态的中年小鼠的生理机能改变为正常饮食状态下的生理机能, 从而维持身体的健康状态、延长小鼠寿命。说明 Res 类小分子物质是提高哺乳动物健康水平的潜在资源。

白藜芦醇合酶(RS)是白藜芦醇合成途径中唯一特异且必不可少的关键酶, 它以 4-香豆酰辅酶 A

和丙二酰辅酶 A 为底物合成白藜芦醇^[7-9]。由于目前尚未鉴定出任何调控 Res 生物合成路径的转录因子^[10], 并且自然界中几乎所有高等植物都有合成 Res 前体物质的能力, 理论上只需通过基因工程手段将单个 RS 基因导入受体植物, 就能使其获得合成 Res 的能力。自 1993 年以来, 人们先后将不同来源的 RS 基因转化到烟草^[11]、西红柿^[12]、水稻^[13]、大麦和小麦^[14-15]、猕猴桃^[16]、苜蓿^[17]、葡萄^[18]、苹果^[19]及木瓜^[20]中。研究证明 RS 基因在上述转化操作中能稳定整合并表达, 除猕猴桃以外, 其余的遗传转化均能改善植株的抗病能力。这些研究表明 RS 基因具有在非本体植物中表达并提高受体植物抗病的潜力, 但针对不同的菌株和转化受体可能产生截然不同的结果。与此同时, Res 对多种细菌和真菌的作用效果和机制尚不明确, 因此, 对于不同的应用目的, 进行不同的转化尝试是可行且有意义的。

水稻是重要的粮食作物, 其抗病能力一直是科研人员关注的焦点。稻瘟病是水稻三大病害之首, 因其复杂的变异性, 常常使具有小种专化性的 R 基因在几年后失效。Res 作为一种植物抗毒素类的天然抗菌物质, 是一类区别于传统抗病途径的新群体, 具有广谱抗性的潜能。同时 Res 还具有预防心血管疾病、抗老化、抗肿瘤等保健功效。本研究通过转

收稿日期: 2013-05-26

基金项目: 国家“863”计划项目(2012AA10A303)

刘聃璐, 硕士研究生, 研究方向: 水稻基因工程. E-mail: ldldinah@webmail.hzau.edu.cn

通信作者: 林拥军, 博士, 教授, 研究方向: 水稻基因工程. E-mail: yongjunlin@mail.hzau.edu.cn

基因方法在水稻中引入白藜芦醇合酶基因,以期获得对真菌病害特别是稻瘟病具有抗性的水稻资源,开拓水稻抗病的新渠道,同时提高水稻潜在的营养和保健价值。

1 材料与方法

1.1 试验材料

大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株 TOP10 和根癌农杆菌菌株 EHA105,为华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室保存和提供。

基因表达载体 1300NU 是以 pCAMBIA1300 为骨架、在多克隆位点添加 Ubiquitin 启动子及 Nos 终止子而来,由笔者所在实验室改造和保存。转化受体为水稻粳稻品种中花 11(ZH11)。

2 个白藜芦醇合酶基因 M 和 VJ 由中国科学院武汉植物研究所李绍华教授提供。

1.2 白藜芦醇合酶基因超表达载体构建

通过序列分析,选取合适的酶切位点 *Bam*H I / *Sac* I,经过回收纯化将 M、VJ 基因序列直接连入 1300NU。最后将酶切检测正确的阳性克隆经测序确证,转化入农杆菌菌株 EHA105,在 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷冻保存待用。相应载体命名为 pM、pVJ。

1.3 农杆菌介导的遗传转化及 PCR 检测

以粳稻 ZH11 成熟种子诱导产生的胚性愈伤组织作为受体,用含 pM 和 pVJ 根癌农杆菌的悬浮培养基浸泡侵染,共培养 2 d 后用 50 mg/L 的潮霉素筛选 2 代得到抗性愈伤。抗性愈伤经分化、生根后获得转化苗。载体转化所得的植株分别命名为 M、VJ。

取适量转基因植株的幼嫩叶片,抽提其基因组 DNA。PCR 检测引物详见表 1。

反应程序: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min;变性 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 45 s,退火 $58\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s,延伸 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 90 s,32 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 7 min。

扩增产物用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳,经 EB 染色,紫外分析仪观察、检测。

1.4 转基因植株的 Southern blot 检测及拷贝数鉴定

大量抽提植物叶片 DNA,总 DNA 8 μg 上样,用 *Hind*III 酶切,于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反应 20~24 h。待酶切完全后,利用凝胶电泳将不同大小的 DNA 片段分开,凝胶选用 1% TAE,电泳条件为 30 V、24 h,之后将 DNA 转入尼龙膜上并固定。针对潮霉素基因 (*hpt*) 内部序列设计探针,所用引物见表 1。Southern blot 检测使用 DIG High Prime DNA La-

beling and Detection Starter Kit II 试剂盒,购自 Roche 公司。

1.5 稻瘟病菌株培养及单拷贝植株活体接病检测

本研究所用的稻瘟病菌株为 91-17-2,属于中国北方粳稻区致病小种,能使 ZH11 高度感病。理论上植物抗毒素不具小种专业化性,故用此菌株代表稻瘟病菌株进行抗病性检测。将经鉴定的水稻单拷贝 T_0 代及 T_1 代种子浸种催芽后,播种于小红桶,每桶代表 1 个家系,植株数不少于 30,待其生长至 4 叶 1 心期时进行接病检测。

稻瘟病菌株采用番茄燕麦培养基培养,经活化、扩繁、产孢后,采用喷雾法接种于水稻植株。孢子浓度维持在 $1\times 10^5\sim 5\times 10^5$ 个/mL 范围,接种后先黑暗处理 36~48 h,再光暗交替处理 5~7 d。1 周左右调查发病情况,依据 IRRI (<http://www.knowledgebank.irri.org/extension/crop-damage-diseases/leaf-blast-bl.html>) 制定的 0~9 级分级标准 (Rice Standard Evaluation System/ Leaf Blast),评估发病叶片的病级。按公式:病情指数 = $\sum(\text{各级病叶数} \times \text{对应叶片的病级}) \times 100 / (\text{总调查株数} \times 9)$ 计算病情指数 (disease index),并进行抗感的判定,disease index 在 0~5 范围内为高抗,5~15 为抗病,15~30 为中抗,30~45 为中感,45~60 为感病,大于 60 为高感。

1.6 白藜芦醇合酶基因表达量检测

对于接病的转基因植株,以小红桶为单位,取混合叶片的 RNA 样,进行 RT-PCR 检测。RNA 抽提采用 TRIzol Reagent (上海生工),反转录采用 MLV 反转录酶 (Invitrogen 公司),内参选用 *GAPDH* 基因,基因引物同本文“1.3”,序列见表 1。

1.7 HPLC-MS 分析白藜芦醇产物

以小红桶为单位,取每个单拷贝家系接病 7 d 后的叶片混合样。将新鲜叶片在液氮中研磨后,加入 10 mL 80% 甲醇于室温避光轻柔震荡过夜,离心去除沉淀,将上清液用氮吹仪吹干后,复溶于 2 mL 纯甲醇中,0.22 μm 有机相微孔滤膜过滤后存于样品瓶避光待用。

采用高效液相色谱-质谱联用法进行检测,高效液相色谱仪为 Waters2695,配备的二极管阵列检测器为 Waters2696;质谱仪为 API5000 (A&B 公司)。反式白藜芦醇 (Res) 和反式云杉新苷 (piceid) 标准品购于 SIGMA 公司,产品编号为 R5010、15721。

表 1 PCR 检测引物序列
Table 1 Primer sequences for PCR

目的基因 Gene	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence	产物长度/bp Product length
M	M-F	5'-TTC AGG GTC ACT AAG AGC G-3'	1 365
	M-R	5'-CTG GTC CAA AAC CGA ATA AT-3'	
VJ	VJ-F	5'-CAC TTG TGC ACA CTG AGT T-3'	1 557
	VJ-R	5'-CCT GGT CCA AAA CCG AAT-3'	
Hpt	Hpt-F	5'-AGA ATC TCG TGC TTT CAG CTT CGA-3'	720
	Hpt-R	5'-TCA AGA CCA ATG CGG AGC ATA TAC-3'	
GAPDH	GAPDH-F	5'-CTG CAA CTC AGA AGA CCG TTG-3'	329
	GAPDH-R	5'-CCT GTT GTC ACC CTG GAA GTC-3'	

色谱条件: C18 色谱柱, 柱温为室温, 流动相是水与乙腈, 其配比随进样时间呈线性变化(表 2), 流速 1 mL/min, 检测波长 304 nm, 进样量 20 μ L。每个家系的测定均进行 3 次重复。

质谱条件: 离子源为负 ESI 源, 雾化气(GS1) 60 kPa; 辅助气(GS2) 55 kPa。检测前先对标准品用 2 对子母离子对做定性试验, 母离子/子离子: 389.3/227.3, 389.3/185.3, 选择其中信号高的 389.3/227.3 作为定量离子对。流动相为水与乙腈($V_{\text{水}}:V_{\text{乙腈}}=70:30$), 样品均用流动相进行稀释, 进样量 10 μ L。每个家系的测定进行 3 次重复。

表 2 高效液相色谱流动相配比

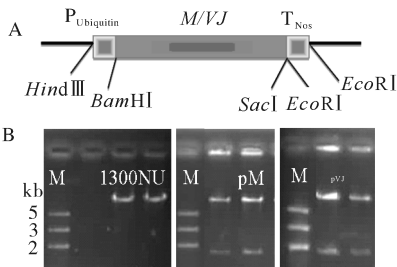
Table 2 The gradient cycle of HPLC mobile phase

时间/min Time	水/% Water	乙腈/% Acetonitrile
0.00	80	20
10.00	40	60
14.00	80	20
18.00	80	20

2 结果与分析

2.1 白藜芦醇合酶基因超表达载体的获得

pM、pVJ 载体结构及酶切检测结果见图 1, 结果显示载体大小与空载体的大小一致, 目标片段大



A: 基因载体结构示意图 Vector structure of pM and pVJ;
B: BamHI/SacI 双酶切检测 (9 kb+1.8 kb) Result of BamHI/SacI digestion (9 kb+1.8 kb); M: Marker DL 5 000.

图 1 pM、pVJ 载体构建

Fig. 1 Identification of the pM and pVJ plasmid

小与理论结果吻合, 说明表达载体构建成功。

2.2 农杆菌介导的遗传转化及转基因植株检测

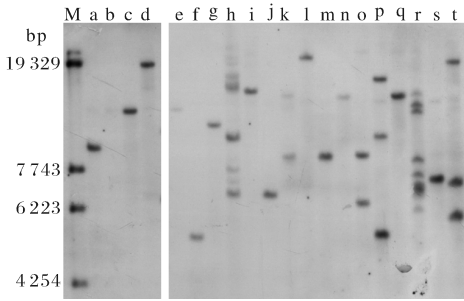
试验结果显示, 本研究有 75% (再生植株 4 株中有 3 株检测为阳性) 的转基因植株 M 及 77.8% (再生植株 27 株中有 21 株检测为阳性) 的转基因植株 VJ, 凝胶电泳结果呈现出与预期大小相符的目标基因条带, 而转基因阴性对照 ZH11 和空白对照 ddH₂O 中未出现目标条带, 证明目标基因已经整合进入了植物基因组。

2.3 转基因植株的 Southern blot 检测及拷贝数鉴定

为了进一步确证外源基因的稳定整合, 同时检测其拷贝数, 我们对每个转基因家系进行了 2 次 Southern blot 验证。第 1 次验证后, 少量多拷贝家系被剔除, 图 2 显示的是第 2 次验证的结果。结果显示, 转基因家系阳性植株对应泳道呈现出 1 至 9 条个数不等的条带, 证明这些家系中外源基因确实整合到了水稻基因组中, 且插入的位点和个数是随机的。考虑到外源基因的遗传稳定性和一致性, 我们选择单拷贝家系进行以下的试验。

2.4 稻瘟病菌接种病检测结果

将上述单拷贝 T₀ 代及部分 T₁ 代转基因家系的种子发芽后进行抗病检测。其中 T₀ 代种子发育的 T₁ 代转化苗经 DNA 抽提及 PCR 检测后已剔除阴性分离后代, T₁ 代种子为筛选出的纯合单拷贝稳定株系。分别于 2012 年 3 月、4 月、7 月进行 3 次独立接病试验, 结果见表 3。在每次试验中, 均可挑选出抗病能力得以改善的家系, 但综合 3 次结果, 无法得出一致的结论。此外, 野生型对照 ZH11 的表现也非常不稳定, 在第 2 次接病试验中甚至呈中抗水平。因此, 转基因家系的抗病能力是否得到改善, 目前还无法得出肯定结论。



M: λ -EcoT14 I digest DNA Marker; 泳道 a-d: M 转基因家系; 泳道 e-t: VJ 转基因家系; 泳道 b 与 e 为各自家系的转基因阴性对照; 泳道 a, c, d, f, g, i, j, l, m, n, q 为单拷贝家系, 对应的家系号为 M1, M3, M4, VJ2, VJ3, VJ5, VJ6, VJ10, VJ11, VJ13, VJ18. M: λ -EcoT14 I digest DNA Marker; Lane a-d: M family; Lane e-t: VJ family; Lane b and e serve as the negative transformed control of M and VJ family respectively; Lane a, c, d, f, g, i, j, l, m, n, q, corresponding to M1, M3, M4, VJ2, VJ3, VJ5, VJ6, VJ10, VJ11, VJ13, VJ18, represent the single-copy gene families.

图 2 M, VJ 转基因家系 Southern blot 分析 (*Hind*III 酶切)

Fig. 2 Southern blot assay of the M, VJ families (digested by *Hind*III)

2.5 白藜芦醇合酶基因表达量检测

为了找出转基因水稻抗病表现不佳的原因, 我们对接病家系的植株进行了表达量检测(图3), 结

果显示除 VJ10 外, 其余转基因家系基因表达量与内参 *GAPDH* 的表达水平基本相当, 说明转基因植株抗病表现微弱并不是基因不表达造成的。此外, 各家系外源基因的表达水平在接病前后差异不大, 说明组成型表达启动子 Ubiquitin 作用效果稳定, 外源基因的表达并没有受到外界环境及病菌的影响和诱导。理论上植株的抗病能力与基因的表达量应该相对应, 但本试验中各家系的表达量并没有与其抗病性对应。

2.6 白藜芦醇产物测定

根据前人的经验, 我们将目标物锁定为白藜芦醇和云杉新苷。首先利用 HPLC 对转基因植株进行定量分析, 检测结果见图 4。

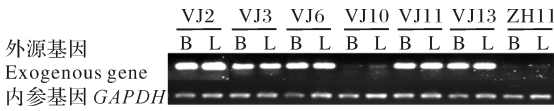
图 4A 中, 峰 1 表示云杉新苷(piceid), 出峰时间约 6 min, 峰 2 为白藜芦醇(Res), 出峰时间约 8.5 min。根据标准品出峰时间判断, 野生型 ZH11 样品中没有对应白藜芦醇的峰形, 但在转基因家系中同样也没有。由此我们可以基本确定转基因植株中没有积累白藜芦醇。而 6 min 左右 ZH11 出峰较多, 故无法确定转基因样品中对应时间显现的是杂峰还是云杉新苷。于是我们进一步采用质谱分析, 对云杉新苷的含量进行测定, 所得结果见图 5。

表 3 稻瘟病接病结果

Table 3 Result of blast resistant test of transgenic plants

2012-03			2012-04			2012-07		
家系 Transgenic family	病情指数 Disease index	类型 ¹⁾ Resistant type	家系 Transgenic family	病情指数 Disease index	类型 ²⁾ Resistant type	家系 Transgenic family	病情指数 Disease index	类型 ³⁾ Resistant type
ZH11	73.7	高感	ZH11	28.9	中抗	ZH11-1	64.9	高感
						ZH11-2	65.8	高感
VJ2	48.7	感病	VJ2	26.6	中抗	VJ2	70.8	高感
VJ10	45.8	感病	VJ10	30.7	中感	VJ10	53.1	感病
VJ11	60.1	高感	VJ11	27.8	中抗	VJ11	64.4	高感
			VJ13	34.2	中感	VJ13	49.9	感病
VJ27	56.8	感病	VJ27	33.5	中感	VJ27	68.7	高感
M1	58.1	感病				M1	52.0	感病
VJ5	61.8	高感	VJ3	36.2	中感			
M3	40.6	中感	VJ6	33.8	中感			

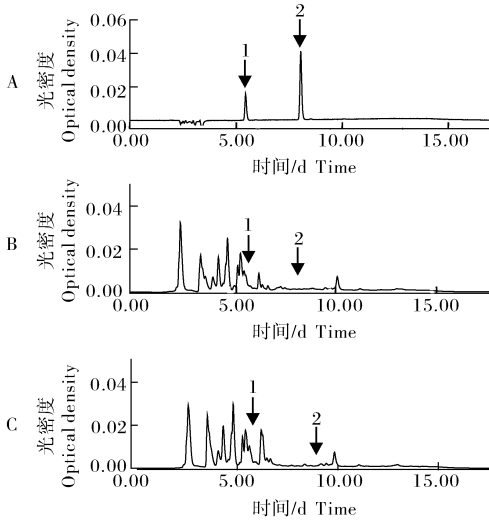
1)高感 High susceptible; 感病 Susceptible; 中感 Middle susceptible; 2)中感 Middle susceptible; 中抗 Middle resistant; 3)高感 High susceptible; 感病 Susceptible.



B: 接病前 7 d 样品; L: 接病后 7 d 样品 B: Samples of 7 days before inoculation; L: Samples of 7 days after inoculation.

图 3 转基因家系 VJ 基因 RT-PCR 结果

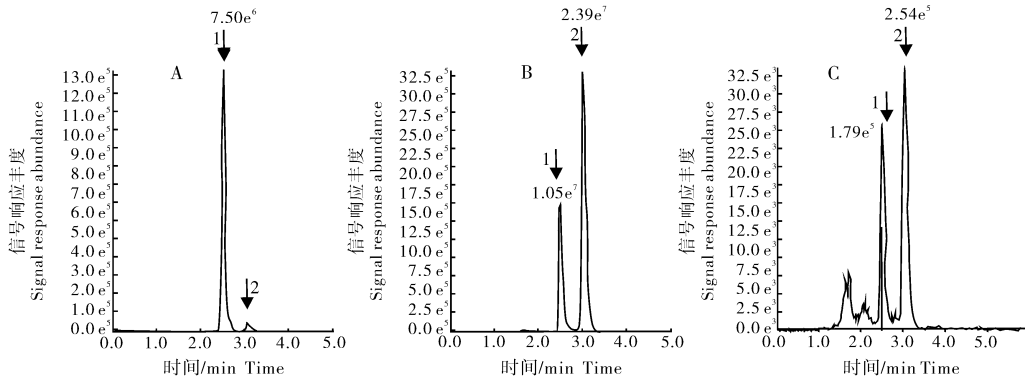
Fig. 3 RT-PCR analysis of VJ gene in transgenic plants



A: 500 µg/L 反式 Res 与 piceid 标准品峰图 Fig. of 500 µg/L trans-resveratrol and trans-piceid standard samples; B: 转基因家系样品峰图 Fig. of transgenic rice samples; C: 野生型对照 ZH11 样品峰图 Fig. of wild type control ZH11 samples; 峰 1: 反式云杉新苷标准品峰形, 出峰时间约 6 min; 峰 2: 反式白藜芦醇标准品峰形, 出峰时间约 8.5 min. Peak 1: Trans-piceid standard sample, retention time is about 6 min; Peak 2: Trans-resveratrol standard sample, retention time is about 8.5 min.

图 4 转基因产物 HPLC 测定结果

Fig. 4 HPLC analysis of transgenic rice



A: 30 µg/L 反式云杉新苷标准品峰图 Fig. of 30 µg/L trans-piceid standard samples; B: 转基因家系样品峰图 Fig. of transgenic rice samples; C: 野生型对照 ZH11 样品峰图 Fig. of wild type control ZH11 samples; 峰 1: 反式云杉新苷标准品峰形, 出峰时间约 2.5 min Peak 1: Trans-piceid standard sample, retention time is about 2.5 min; 峰 2: 未知峰, 推测为顺式云杉新苷, 出峰时间约 3.1 min Peak 2: Unknown peak, it was suspected as cis-piceid, retention time is about 3.1 min; 数字代表相应峰面积 Red numbers represent the area of corresponding peaks.

图 5 转基因产物质谱测定结果

Fig. 5 LC-MS analysis of transgenic rice

不同于 HPLC 的是, 质谱中只有满足定量离子对 389.3/227.3 条件的信号才会被提出, 即只有母体相对分子质量为 390.3 (云杉新苷相对分子质量), 子离子相对分子质量为 228.3 (去掉糖苷基团后子离子的相对分子质量) 的物质才会出峰。所以图 5A 中显示的 2 个峰说明标准品中含有 2 类云杉新苷, 而它们出峰时间不同, 说明这 2 类物质的极性有差异。于是我们推断主峰 1 为标准品反式云杉新苷, 出峰时间约为 2.5 min, 而小峰 2 为其顺式同分异构体, 出峰时间约为 3.1 min。顺式异构体出峰时间略晚于反式, 这点也与前人的研究结果吻合。产生这一现象的可能原因是整个试验过程中无法做到完全避光, 而在 UV 照射下, 反式云杉新苷可以转化为顺式。有意思的现象是, 在转基因植株样品中, 峰 2 的含量明显高于峰 1, 甚至可以达到峰 1 的 2~3 倍 (图 5B)。但由于缺少顺式云杉新苷标准品, 我们无法将这一推测予以验证, 故在转基因家系中只针对反式云杉新苷进行定量计算, 结果见表 4。由图 5A 可知标准品中峰 2 的含量很少, 故计算中将其忽略不计。虽然阴性对照 ZH11 中也出现了峰 1 和峰 2, 但含量极少, 仅为转基因植株样品的 1/100 甚至 1/1 000, 亦可忽略。

由表 4 可知, 7 个转基因家系中, M1 家系的反式云杉新苷含量最高, 达到了 10.26 µg/g, 同时 VJ11 和 VJ13 家系中反式云杉新苷在每克新鲜叶片中也达到了微克级。但是, 高含量的云杉新苷却没有增强转基因植株的抗性, 说明云杉新苷本身对稻瘟病菌可能没有抑制效果。

表 4 转基因家系反式云杉新苷含量

Table 4 Content of trans-piceid in transgenic families

转基因家系 Transgenic family	反式云杉新苷含量 Content of trans-piceid
VJ2	0.68±0.01
VJ3	0.38±0.07
VJ10	0.17±0.01
VJ11	1.23±0.04
VJ13	1.88±0.13
VJ27	0.03±0.01
M1	10.26±0.62
ZH11-1	0.05±0.00
ZH11-2	0.02±0.01

3 讨 论

我们推测,本研究中转基因水稻抗病效果不显著的原因有 2 个。其一,转基因水稻中没有产生足够多的云杉新苷以抵御稻瘟病菌的侵染。在有抗病效果的转化事件中,植物抗毒素的含量都达到了较高的水平。烟草中 Res 含量达到 400 $\mu\text{g/g}$,表现出对灰霉病菌的抗性^[11];木瓜中云杉新苷的最高含量达到 50 $\mu\text{g/g}$,表现出对棕榈疫霉的抗性^[20];苜蓿中云杉新苷的最高含量也达到了 20 $\mu\text{g/g}$ ^[17]。本研究中云杉新苷最高检出量为 10 $\mu\text{g/g}$,可能还没达到抗病水平。其二,稻瘟病菌可能对云杉新苷有抵抗能力。真菌菌株存在较致密的渗透性屏障,而云杉新苷本身亲水性强,渗入疏水性细胞膜的能力弱,于是可能被隔绝在菌体外,造成抗病效果不佳。

自然情况下,葡萄被真菌侵染后,不仅能诱导自身 RS 基因的表达,也能促进 Res 合成路径中的上游基因 PAL 的表达^[21]。因此,若能使 Res 合成途径中的相关酶在转基因植株中共同表达,便能在一定程度上提高二苯乙烯物质的含量,从而可能提高白藜芦醇在转基因植株中的含量,增强转基因植株抗病能力。从另一个角度出发,我们可以再导入 1 个外源的糖基水解酶基因,使其在云杉新苷富集处特异性表达,将糖苷基团水解。或者从蛋白水平降低水稻内源糖基转移酶活性,抑或是通过 RNAi 的方法抑制糖基转移酶基因表达,以此来减少转基因植株中的糖苷化效应,使其能维持富集抗病能力强的白藜芦醇。

除此之外,对于检测到的转基因产物是云杉新苷而非白藜芦醇,我们推测这是水稻内源糖苷转移酶的作用结果。换句话说,本试验中 RS 基因稳定表达并且应该产生了白藜芦醇,只是白藜芦醇在此

非特异性糖苷转移酶的作用下迅速转变为云杉新苷。若质谱检测中,未知的峰 2 确实为顺式云杉新苷,那么 RS 基因表达产物在叶片中的含量将远不止 10 $\mu\text{g/g}$ 。

虽然本研究获得的转基因植株没有对稻瘟病菌表现出明显抗性,但高含量的云杉新苷仍具有提升水稻营养效用的潜在价值。现代药理学研究表明,云杉新苷具有保护肝细胞、降血脂及抗脂质过氧化等作用^[22]。此外,饮食过程中,云杉新苷极有可能在消化系统中转化为白藜芦醇发挥效用。如果我们使用胚乳特异性启动子驱动 RS 基因表达,还有可能进一步增加云杉新苷在水稻胚乳中的含量,从而直接对人体产生有益的保健作用。

参 考 文 献

- [1] MÜLLER K, BÖRGER H. Experimentelle Untersuchungen über die Phytophthora-Resistenz der Kartoffel[J]. Arb Biol Reichsanst Land Forstwirtsch Berlin-Dahlem, 1940, 23: 189-231.
- [2] JEANDET P, BESSIS R, GAUTHERON B. The production of resveratrol (3,4',5-trihydroxystilbene) by grape berries in different developmental stages[J]. American Journal of Enology and Viticulture, 1991, 42: 41-46.
- [3] JEANDET P, DOUILLET-BREUIL A C, BESSIS R, et al. Phytoalexins from the Vitaceae: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50: 2731-2741.
- [4] TEGUO P W, FAUCONNEAU B, DEFFIEUX G, et al. Isolation, identification, and antioxidant activity of three stilbene glucosides newly extracted from *Vitis vinifera* cell cultures [J]. Journal of Natural Products, 1998, 61: 655-657.
- [5] SUBBARAMAIAH K, MICHALUART P, CHUNG W J, et al. Resveratrol inhibits the expression of cyclooxygenase-2 in human mammary and oral epithelial cells[J]. Pharmaceutical Biology, 1998, 36: 35-43.
- [6] BAUR J A, PEARSON K J, PRICE N L, et al. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet[J]. Nature, 2006, 444: 337-342.
- [7] SCHÖPPNER A, KINDL H. Purification and properties of a stilbene synthase from induced cell suspension cultures of peanut [J]. Journal of Biological Chemistry, 1984, 259: 6806-6811.
- [8] LANZ T, TROPF S, MARNER F, et al. The role of cysteines in polyketide synthases: site-directed mutagenesis of resveratrol and chalcone synthases, two key enzymes in different plant-specific pathways[J]. Journal of Biological Chemistry, 1991, 266: 9971-9976.

- [9] SCHRÖDER G, SCHRÖDER J. A single change of histidine to glutamine alters the substrate preference of a stilbene synthase [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1992, 267: 20558-20560.
- [10] CHONG J, POUTARAUD A, HUGUENEY P. Metabolism and roles of stilbenes in plants [J]. *Plant Science*, 2009, 177: 143-155.
- [11] HAIN R, REIF H J, KRAUSE E, et al. Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant [J]. *Nature*, 1993, 361: 153-156.
- [12] THOMZIK J, STENZEL K, STÖCKER R, et al. Synthesis of a grapevine phytoalexin in transgenic tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.) conditions resistance against *Phytophthora infestans* [J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 1997, 51: 265-278.
- [13] STARK-LORENZEN P, NELKE B, HÄNBLER G, et al. Transfer of a grapevine stilbene synthase gene to rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Plant Cell Reports*, 1997, 16: 668-673.
- [14] FETTIG S, HESS D. Expression of a chimeric stilbene synthase gene in transgenic wheat lines [J]. *Transgenic Research*, 1999, 8: 179-189.
- [15] LECKBAND G, LÖRZ H. Transformation and expression of a stilbene synthase gene of *Vitis vinifera* L. in barley and wheat for increased fungal resistance [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1998, 96: 1004-1012.
- [16] KOBAYASHI S, DING C, NAKAMURA Y, et al. Kiwifruits (*Actinidia deliciosa*) transformed with a *Vitis* stilbene synthase gene produce piceid (resveratrol-glucoside) [J]. *Plant Cell Reports*, 2000, 19: 1904-1910.
- [17] HIPSKIND J D, PAIVA N L. Constitutive accumulation of a resveratrol-glucoside in transgenic alfalfa increases resistance to *Phoma medicaginis* [J]. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 2000, 13: 551-562.
- [18] COUTOS-THÉVENOT P, POINSSOT B, BONOMELLI A, et al. In vitro tolerance to *Botrytis cinerea* of grapevine 41B rootstock in transgenic plants expressing the stilbene synthase *Vst1* gene under the control of a pathogen-inducible PR 10 promoter [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2001, 52: 901-910.
- [19] SZANKOWSKI I, BRIVIBA K, FLESCHHUT J, et al. Transformation of apple (*Malus domestica* Borkh.) with the stilbene synthase gene from grapevine (*Vitis vinifera* L.) and a PGIP gene from kiwi (*Actinidia deliciosa*) [J]. *Plant Cell Reports*, 2003, 22: 141-149.
- [20] ZHU Y J, AGBAYANI R, JACKSON M C, et al. Expression of the grapevine stilbene synthase gene *VST1* in papaya provides increased resistance against diseases caused by *Phytophthora palmivora* [J]. *Planta*, 2004, 220: 241-250.
- [21] FRITZEMEIER K H, ROLFS C H, PFAU J, et al. Action of ultraviolet-C on stilbene formation in callus of *Arachis hypogaea* [J]. *Planta*, 1983, 159: 25-29.
- [22] 高守红, 杨少麟, 范国荣. 虎杖苷的研究进展 [J]. *药学实践杂志*, 2005, 23(3): 145-147.

Transforming rice (*Oryza sativa* L.) with a *Vitis* stilbene synthase gene

LIU Dan-lu LIN Yong-jun

National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement/National Center of Plant Gene Research (Wuhan), Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract Two resveratrol synthase genes from different *Vitis* spp. were isolated and replaced under the control of Ubiquitin promoter, respectively. The vectors were then introduced into japonica rice cultivar ZhongHua 11 through *Agrobacterium*-mediated gene transformation. Analyses of Southern blot and RT-PCR confirmed that the introduced genes were expressed stably in most of different single-copy gene transformants. Based on the HPLC-MS analysis, a major resveratrol derivative, piceid (resveratrol-glucoside) was detected in the leaves of the single-copy gene transformants with the highest content of 10.26 $\mu\text{g/g}$ fresh weight, 1 000-fold more than that of the wild type control. Results indicated that resveratrol produced by the exogenously integrated gene might be metabolized into piceid by the endogenous glycosyltransferase. Although these transformants did not show significant resistance towards *Magnaporthe grisea*, they may have some beneficial effects on human health with the high content of piceid.

Key words resveratrol (Res); piceid; resveratrol synthase (RS) gene; rice

(责任编辑:张志钰)