

植物芪类植保素研究进展*

胡小平^{1,2}, 孙 卉², 蔡文启², 杨之为¹

(1 西北农林科技大学 植物保护学院, 陕西 杨陵 712100; 2 中国科学院微生物研究所 植物生物技术开放实验室, 北京 100080)

[摘要] 评述了芪类植保素的研究状况, 重点介绍了芪类化合物的分布、种类、理化特性、芪类植保素的生物合成、芪合酶基因及其表达调控、芪合酶蛋白、芪合酶基因转化植物及其抗病性等方面的研究进展, 并讨论了存在的问题, 提出了今后的研究方向。

[关键词] 芪; 芪合酶; 植保素; 研究进展

[中图分类号] S432.1; Q789

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2003)01-0157-04

植保素是植物受病原菌侵染后产生的一类低分子质量的抗菌化合物, 在受灰葡萄孢 (*Botrytis cinerea*) 侵染的葡萄 (*Vitis vinifera*) 中就发现了一种这样的低分子质量抗菌化合物——白藜芦醇 (3, 4, 5-三羟基反式芪, *trans-resveratrol*, 以下简称 RL)。RL 是植物的次生代谢产物, 由芪合酶 (*resveratrol synthase*, 以下简称 RS) 催化底物丙二酰-CoA 和香豆酰-CoA 合成, 具有抑制植物病原真菌菌丝生长和孢子萌发等作用。当植物受病原菌侵染、紫外线照射和臭氧、创伤等刺激时, 受激部位的芪类化合物含量显著增加^[1,2]。研究表明^[3], 天然含 RS 基因的植物在遭受刺激时, 才能激发该基因转录并转译成 RS, 进而瞬时合成 RL。然而, 绝大多数植物含有 RS 作用底物, 却缺少 RS 基因。因此, 研究芪类化合物的性质、特点及提高植物抗病性的转 RS 基因对植物保护具有重要意义。本研究综述了近年来芪类植保素的研究现状, 以为其的深入研究提供参考。

1 芪类化合物的分布

芪类化合物主要分布在植物的薄壁组织内。目前已从豆科 (13 属)、桑科 (6 属)、龙脑香科 (4 属)、葡萄科 (4 属)、松科 (2 属)、蓼科 (2 属)、桃金娘科 (2 属)、使君子科 (2 属)、肉豆蔻科 (2 属)、莎草科 (2 属)、唇形科 (2 属)、漆树科、商陆科、虎耳草科、百合科、壳斗科、桦木科、大戟科、马鞭草科、伞形科、柏科、灵麻藤科、禾本科等 24 科 54 属植物中分离得

到^[4]。另外, 芪类化合物也分布在一些微生物如链霉菌属^[5]、酵母^[6]和细菌^[7]中。

羟基芪类是一种最基本的芪类化合物, 是目前研究最为深入的具有植保素性质的芪类化合物, 仅存于葡萄 (*Vitis vinifera*)、松树 (*Pinus sylvestris*)、花生 (*Arachis hypogaea*) 等少数植物中^[8]。

2 芪类化合物的种类、理化特性

芪类化合物从结构上可分为两类, 即简单芪类和聚合芪类。简单芪类含有 1 个芪类母核 (二苯乙烯), 在 3, 5 位取代基主要为羟基或甲氧基, 4 位取代基主要为异戊烯基 (图 1)^[8]。聚合芪包括芪与芪的聚合、芪与黄烷醇缩合而成的鞣质或苯骈呋喃型芪。

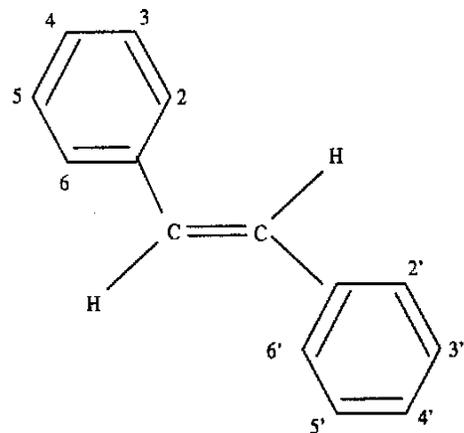


图 1 反式芪的基本结构

Fig 1 The structure of *trans*-stilbene

* [收稿日期] 2002-01-14

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (39570464)

[作者简介] 胡小平 (1971-), 男, 宁夏固原人, 讲师, 在读博士, 主要从事植物生态病理学及病害流行病学研究。

芪类化合物在室温下多为无色或浅红色固体, 熔点为 150~ 300 。易溶于乙醇、丙酮、氯仿、苯、醋酸等有机溶剂, 在水中溶解度较小。芪类化合物在紫外光下有很强的蓝荧光, 利用这一特性及其与多种生色(素)试剂如重氮化的硝基苯氨或重氮化的甲苯胺反应, 通过色谱可在植物组织内对其进行检测^[8]。

芪类化合物对真菌、细菌、昆虫等都有毒性, 其对子囊菌亚门和半知菌亚门近 26 种真菌具有抑菌活性, 主要表现为对菌丝生长或孢子萌发的抑制^[8]。芪的自由羟基基团与其抑菌活性密切相关, 因为羟基基团可以作为酶蛋白的结合位点, 也可作为解偶联剂。芪类分子的大小及几何构象与其和酶蛋白的结合能力有关, 生物测试结果表明^[8], 顺式结构的羟基芪比反式结构的抑菌活性大。顺式羟基芪分子结构是平面的, 而反式的结构是非平面的, 构型差异导致芪分子抑菌活性不同, 只有特定形状的芪分子在构型上与敏感真菌菌株的受体位点相吻合才能起到抑菌作用。羟基芪如果被甲基化或脱乙酰化后, 其生物活性丧失或明显降低, 如甲基赤松素(Pinosylvin Monomethyl ether, PSM E) 抑菌活性比赤松素(Pinosylvin, PS) 低等多^[8]。

3 芪类化合物的生物合成

芪类化合物最初发现于死亡或濒死的木本植物心材或树皮组织中, 在健康植物叶片和边材中芪类化合物则以糖苷或酯的形式少量存在。芪类化合物和其他次生代谢物质一样, 产生于活体薄壁组织中, 产生芪的类型和数量取决于植物基因及受刺激薄壁细胞的状态。

RS 是芪类化合物合成的关键酶, 它可以催化产生含二苯乙烯母核的芪类化合物基本分子, 再经修饰、聚合等作用形成不同的芪类化合物。根据 RS 作用底物的不同, 可将其分为两类: 一类是在松树中发现的, 以丙二酰-CoA 和肉桂酰-CoA 为底物, 生成赤松素(3, 5-二羟基芪), 这类 RS 称为赤松素合酶; 另一类以丙二酰-CoA 和香豆酰-CoA 为底物, 合成反式 3, 4, 5-三羟基芪, 这类酶称为 3, 4, 5-三羟基芪合酶, 存在于葡萄、花生等少数植物中^[8]。

4 RS 基因及其表达调控

绝大多数植物体内含有芪类化合物合成的前体分子, 却缺少 RS 基因。1988 年, Schrodler 等^[9]从诱导 RS 花生细胞悬浮培养物中提取 RNA, 并以此构建了 cDNA 文库, 从该文库中分离到两个克隆并进

行测序。序列分析表明, 这两个克隆分别编码 RS 基因的 5 端和 3 端, 预测其编码的蛋白约 42.7 ku, 与凝胶电泳分离到的 RS 大小基本一致。同时, 比较了 RS 基因和查耳酮合酶基因的序列, 发现二者编码区同源性极高, 内含子在这两个基因中的位置也相同, 但在查耳酮合酶高度保守区有一定数量的氨基酸与 RS 不同, 解释了两酶所作用的底物相同而产物不同的原因。2001 年, 腊平等^[10]应用 RT-PCR 方法, 从葡萄组织中克隆了两个 RS 基因的编码区, 并在大肠杆菌中能特异表达 42 ku 的蛋白质, 其分子质量与 RS 大小一致, 说明 RS 基因得到了成功的克隆。

1990 年, Hain 等^[11]成功地将一个来源于花生编码 RS 的基因与卡那霉素抗性基因连接, 转化烟草, 用紫外光刺激及疫霉菌侵染可促使 RS 基因迅速表达。通过对花生和转 RS 基因烟草悬浮培养物中 mRNA 合成的研究发现, RS 基因在二者中的表达动态相似, 在疫霉菌侵染处理 30 min 和紫外光刺激 10 min 后即可检测到 RS 的特异 mRNA, 2~ 8 h 后其 mRNA 累积量达最高值, 24 h 后 mRNA 累积停止。利用 RS 蛋白的专性抗体进行 ELISA 检测以及 HPLC 检测, 发现转基因烟草的根、茎、叶均有 RS 基因表达。

5 芪合酶蛋白

Schoppner 等^[12]于 1984 年建立了一种花生细胞悬浮体系, 诱导后从中提取总蛋白, 经硫酸铵多次分级沉淀、DEAE-纤维素柱层析、羟基磷灰石层析等方法首次纯化芪合酶蛋白。进一步研究表明, 在花生植株体内具有催化活性的 RS 是以 90 ku 的二聚体存在, 等电点为 4.8。经 SDS 变性处理后, 得到 45 ku 的亚单位。该酶对丙二酰-CoA 和香豆酰-CoA 具有高度专一性, 且 RS 对其底物的选择依赖于其芳香环的取代作用。

RS 与查耳酮合酶酶单位及其亚单位具有相同的分子质量, 而且作用底物也相同, 曾被认为是同一种酶, 或是查耳酮合酶经修饰后其副反应具有形成芪的能力。研究发现^[13], 它们的氨基酸序列同源性在 70%~ 74%, 在查耳酮合酶 270 个保守氨基酸中, 15.9% 的氨基酸是高度保守的。与 RS 相比, 这些氨基酸差异性较大, 且散落在 RS 基因的第一个外显子编码的氨基酸序列中。在查耳酮合酶基因的其他氨基酸中, 仅有 12 个氨基酸与 RS 的相同。可能正是这些差异造成了蛋白的不同空间结构和不同

的活性位点, 从而引起这两种酶的不同免疫原性和不同的反应类型及产物。

6 转RS基因植物及其抗病性

植物体内植保素的生物合成需要多种酶催化, 且比较复杂, 对于多数植保素来讲, 转入一个基因来合成植保素是远远不够的。但是RS基因例外, 转RS基因烟草中3, 4, 5-三羟基芪的合成和积累非常显著, 表现出对灰霉菌(*B. cinerea*)的抗性。这种抗性与3, 4, 5-三羟基芪在侵染位点的迅速积累有关。芪类化合物的生物合成专一性地需要RS存在, RS所作用的底物普遍存在于植物体内, 但绝大多数植物缺少RS基因。为了研究植保素生物合成基因在植物抗病性遗传改造工程中的作用, 许多人对RS基因进行了植物转化研究。

将来源于葡萄的RS基因分别转化于不同植物, 所获得的转基因烟草^[3, 10]对灰霉菌(*B. cinerea*)、转基因水稻^[14]对稻瘟菌(*Pyricularia oryzae*)、转基因大麦^[15]和小麦^[15-17]对白粉病菌(*Erysiphe graminis*)、转基因番茄^[18]对灰霉菌(*B. cinerea*)和早疫病菌(*A. lternaria solani*)的抗性均有一定程度的增强, 但同一植物的转基因植株间, 抗病性存在一定的差异。

7 问题和展望

羟基芪类植保素仅存在于葡萄、花生等少数几种植物的薄壁组织内, 与植物抗病性密切相关。一般植物体内虽然含有RS的底物, 但没有RS基因而不能合成RL。针对RS催化反应的底物普遍存在于植物体内的特点, 应用RS基因转化植物从而提高植物抗病性越来越受到重视。芪类化合物除了已知的抗真菌作用外, 近年来又发现一些芪类化合物有降

血脂、降血压、扩张毛细血管、改善微循环以及抑制血小板聚集和抗肿瘤等作用。因此, 在植物中组成型表达RS基因, 培育药、食兼用的转基因蔬果, 提高植物的抗病性方面均有很好的应用前景。但作为转RS基因植物还存在以下一些问题

首先, 在分析转RS基因植物的抗病功能时, 应考虑外源基因转化对植物本身的初生或次生代谢的影响, 因为植物本身代谢变化也可能影响植物与病原物的互作。

第二, 转基因植物与常规育种育成的品种从本质上讲是一样的, 都是在原有品种的基础上, 对其部分性状进行修饰, 或增加新性状或消除不良性状。植物基因工程将已知功能的外源基因转入植物体内, 理论上而言, 转RS基因植物的遗传特性及表型应该可以精确预测, 在应用上应该更加安全。但在转RS基因植物中有可能会出现一些在常规育种中不曾遇到的新组合、新性状, 这些新组合、新性状会不会影响人类健康和生态环境, 目前, 尚缺乏相应的知识和经验, 需要开展较为深入的相关研究。

第三, 外源基因导入植物后, 能否稳定地遗传给下一代, 涉及到转基因植株的遗传稳定性。从理论上讲, 转RS基因植株的外源基因与常规杂交导入的基因所遵循的遗传分离规律是相同的。但RS基因整合到植物基因组后, 经过减数分裂, 转化的RS基因会不会丢失; 或在细胞质基因组(叶绿体或线粒体)中整合后, RS基因在随后的细胞质分裂过程中会不会逐渐变弱或丢失。

第四, 外源基因受到各种因素的影响, 在转RS基因植株的当代或后代中会不会出现RS基因沉默, 而这种基因沉默可能发生在转录水平、转录后抑制水平或两个水平上同时发生, 这都需要进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] Langcake P, Pryce R J, Krause E, et al Disease resistance results from grapevines[J]. Specialia, 1977, 15(2): 151- 152
- [2] Langcake P, Cornford C A, Pryce R J. Identification of pterostilbene as a phytoalexin from *Vitis vinifera* leaves[J]. Phytochemistry, 1979, 18: 1025- 1027.
- [3] Hain R, Relf H, Krause E, et al Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant[J]. Nature, 1993, 361: 153 - 156
- [4] 斯建勇. 天然芪类化合物的研究概况[J]. 天然产物研究与开发, 1994, 6(4): 71- 79
- [5] Johnson B C, Polonsky J, Cohen P, et al Piloquinone: a new phenanthrene-O-quinone isolated from the mycelium of *Streptomyces pilosus* [J]. Nature, 1963, 199: 285
- [6] Meisinger M A P, Kuehl F A, Rickes E L, et al The structure of a new product from yeast: 2-(6-hydroxy-2-methoxy-3, 4-methylenedioxyphenyl)-benzofuran[J]. J Am Chem Soc, 1959, 81: 4979

- [7] Paul V J, Frautschy S, Fenical W, et al Antibiotics in microbial ecology: Isolation and structure assignment of several new antibacterial compounds from the insect-symbiotic *Bacteria xenorhabdus* spp[J]. J Chem Ecol, 1981, 7: 589- 597.
- [8] Hart H. Role of phyto stilbenes in decay and disease resistance[J]. Ann Rev Phytopathol, 1981, 19: 437- 458
- [9] Schroder G, Brown J W, Schroder J. Molecular analysis of resveratrol synthase cDNA, genomic clones and relationship with chalcone synthase[J]. Eur J Biochem, 1988, 172: 161- 169
- [10] 腊平, 蔡文启, 张玖春, 等. 转芪合酶基因植物中三羟基反式芪的功能[J]. 科学通报, 2001, 46(4): 326- 330
- [11] Hain R, Bieseler B, Kindl H, et al Expression of a stilbene synthase gene in *Nicotiana tabacum* results in synthesis of the phytoalexin resveratrol[J]. PLoS Biol, 1990, 15: 325- 335
- [12] Schoppner A, Kindl H. Purification and properties of a stilbene synthase from induced cell suspension cultures of peanut[J]. J Biol Chem, 1984, 259: 6806- 6811.
- [13] Ingham J L. 3, 4, 5-trihydroxystilbene as a phytoalexin from ground nuts (*A. hypogaea*) [J]. Phytochemistry, 1976, 15: 1791- 1793
- [14] Stark-brenzen P, Nelke B, Haenssler G, et al Transfer of a grapevine stilbene synthase gene to rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Plant Cell Report, 1997, 16: 668- 673
- [15] Leckband G, Lorz H. Transformation and expression of a stilbene synthase gene of *Vitis vinifera* L. in barley and wheat for increased fungal resistance[J]. Theor Appl Genetics, 1998, 96: 1004- 1012
- [16] 梁辉, 郑近, 段霞瑜, 等. 用基因枪法获得抗白粉病转芪合酶基因小麦[J]. 科学通报, 1999, 44(24): 2644- 2648
- [17] Fettig S, Hess D. Expression of a chimeric stilbene synthase gene in transgenic wheat lines[J]. Transgenic Research, 1999, 8: 179- 189
- [18] Thomzik J E, Stenzel K, Stocker 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

Progress of research on stilbene-type phytoalexin

HU Xiao-ping^{1,2}, Sun Hui², CAI Wen-qi², YANG Zhi-wei¹

(1 College of Plant Protection, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Plant Biotechnology Lab, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract: Publications were reviewed in this paper, and was emphasis put on progress of research on stilbenes concerning its distribution, types, physical and chemical characteristics, biosynthesis, gene expression and modulation, stilbene synthase, gene transformation in plants and resistance to diseases. The inadequate fields and the directions in research in the future were also discussed.

Key words: stilbene; stilbene synthase; phytoalexin; progress of research