

外源细胞分裂素 BA 对小白菜硫代葡萄糖苷含量的影响

胡克玲¹, 朱祝军²

(1. 安徽农业大学园艺学院, 合肥 230036; 2. 浙江农林大学农业与食品科学学院, 临安 311300)

摘要: 研究外源细胞分裂素 BA 对小白菜硫代葡萄糖苷 (硫苷) 含量的影响, 为提高小白菜硫苷含量提供参考。以不同浓度 (0, 0.2, 5 和 20 mg·L⁻¹) BA 进行处理, 分析其对小白菜生长和硫苷含量的影响。随 BA 浓度的增加, 小白菜鲜重有增加的趋势, 其中 5~20 mg·L⁻¹ BA 处理显著增加了小白菜地上部鲜重。与对照相比, 较高 BA 处理浓度 (20 mg·L⁻¹) 显著诱导了 5-甲基亚磺酰戊基硫苷、3-丁烯基硫苷、4-戊烯基硫苷和总硫苷的含量, 但在 0.2 mg·L⁻¹ BA 处理显著增加了 4-戊烯基硫苷和 2-苯乙基硫苷含量。5~20 mg·L⁻¹ BA 处理显著抑制了 1-甲氧基吲哚-3-甲基硫苷的含量, 但对其他吲哚族硫苷含量并没有引起显著的变化。不同种类硫苷对不同浓度的 BA 处理有不同的响应, 其中 20 mg·L⁻¹ BA 处理显著提高了小白菜总硫苷含量。

关键词: 小白菜; 硫苷; 生长; 细胞分裂素

中图分类号: S634.3

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2014)06-0960-05

Effects of BA on glucosinolate contents in pakchoi (*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* var. *communis*)

HU Keling¹, ZHU Zhujun²

(1. School of Horticulture, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;

2. School of Agricultural and Food Science, Zhejiang Agricultural and Forestry University, Lin'an, 311300)

Abstract: Effects of BA at 0, 0.2, 5, and 20 mg·L⁻¹ on growth and glucosinolate content of pakchoi (cv. Shanghaiqing) were studied. The weight of pakchoi shoots was increasing as the increasing concentration of exogenous BA. BA at 5-20 mg·L⁻¹ significantly increased the weight of pakchoi shoots. Compared to the control, the contents of glucoalyssin, gluconapin, glucobrassicinapin, and total glucosinolate were significantly increased when treated with 20 mg·L⁻¹ BA. BA at 0.2 mg·L⁻¹ also increased the contents of glucobrassicinapin and aromatic glucosinolate. However, 5-20 mg·L⁻¹ BA treatment significantly inhibited the synthesis of neoglucobrassicin, but no effect was observed on other indole glucosinolates. Different glucosinolates responded differently to different BA concentrations in which 20 mg·L⁻¹ BA treatment significantly increased the total glucosinolate content in pakchoi.

Key words: glucosinolate; pakchoi; growth; BA

硫代葡萄糖苷 (简称硫苷) 是一种主要分布于十字花科植物中的富含氮硫的次生代谢产物, 在抗癌等方面近年来引起了人们的关注^[1]。如何提高植物体内有益硫苷含量、改善硫苷组分已成为研究热点^[2]。根据侧链基团的氨基酸来源不同, 可将硫苷分为脂肪族、芳香族、吲哚族硫苷^[1]。硫苷的生物

合成是一个非常复杂的生理生化过程。植物生存环境如气候条件, 土壤肥力, 环境胁迫等也会通过对植物的生长产生影响甚至胁迫, 而间接或直接影响硫苷的代谢^[3-4]。

人们发现植物激素和硫苷存在非常复杂的相互作用^[5]。细胞分裂素 (CTK) 是促进植物细胞分裂

收稿日期: 2014-04-09

基金项目: 国家自然科学基金 (30871718), 浙江农林大学科研发展基金 (2008FR028) 和安徽省高等教育振兴计划项目 (2013zdjy057) 共同资助。

作者简介: 胡克玲, 博士, 讲师。E-mail: hu48562683@126.com

* 通信作者: 朱祝军, 博士, 教授。E-mail: zhujun.zhu@zafu.edu.cn

的激素, 在植物生长发育中起着重要的调节作用, CTK 与硫苷的合成也存在内在的联系。在拟南芥硫苷合成的核心途径中, 控制脂肪族硫苷合成的关键基因 *CYP79F1* 的突变体 SPS 导致细胞分裂素增加, *CYP79F1* 缺失突变体 SPS 具有较高的细胞分裂素水平, 表现出细胞分裂素过量累积的表型^[6], 研究推测 *CYP79F1* 缺失突变体主要破坏了细胞分裂素的平衡。但目前关于外源喷施 CTK 对硫苷的影响少见报道。因此, 本试验以小白菜‘上海青’为研究材料, 探索不同浓度 BA 处理对小白菜硫苷含量和组成的影响, 以期对相关研究提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料培养和试验设计

选用小白菜‘上海青’为试材。将小白菜种子播种于蛭石中, 待其生长至 2~3 片真叶时, 挑选生长一致的幼苗, 移栽到 10 L 的塑料箱中, 溶液培养。营养液成分为 ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$): 2.5 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 1.0 KH_2PO_4 , 4.0 KNO_3 , 1.0 MgSO_4 , 0.5 NH_4NO_3 , 10×10^{-3} H_3BO_3 , 0.1×10^{-3} H_2MoO_4 , 3.0×10^{-3} MnSO_4 , 2.0×10^{-3} ZnSO_4 , 0.8×10^{-3} CuSO_4 , 40.0×10^{-3} EDTA-Fe。培养期间每周更换 2 次营养液。白天温度 25~30℃, 夜间温度 15~18℃, 最大光照强度为 $600\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。

小白菜栽培 2 周后进行试验处理。所用试剂为 6-BA(Sigma 公司)。试验设置以下处理: 对照 (Control, 清水), 0.2, 5 和 20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (BA)。均匀喷洒小白菜叶面。每个处理重复 3 次。每个重复 6 株。处理 7 天后取样。整株采收, 用湿棉布包裹小白菜根部, 放进泡沫箱中, 迅速运回实验室。将地上部与根部分割, 测定地上部鲜重, 并用液氮迅速处理, 保存在超低温冰箱 (-80℃) 中, 然后在冷冻干燥机中干燥, 研磨, 在超低温冰箱中保存备用。

1.2 硫苷含量分析

参照胡克玲等^[7]、陈新娟等^[8]的方法。

1.3 统计分析

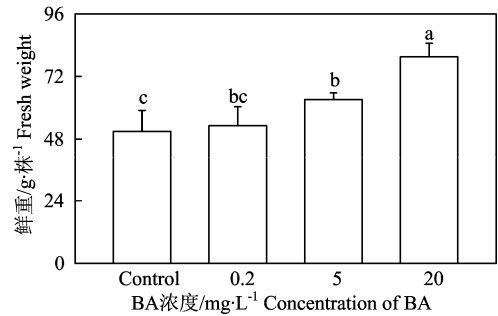
作图采用 Originlab 8.6 软件。数据采用 SAS 软件进行差异性分析。

2 结果与分析

2.1 BA 处理对小白菜生长的影响

如图 1 所示, 不同浓度 BA 处理对小白菜地上部鲜重有不同程度的影响。随 BA 处理浓度的增加, 小白菜地上部鲜重有逐渐增加的趋势, 10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA 处理显著增加了小白菜地上部鲜重,

分别比对照增加 24% 和 56%。



图中不同字母表示在 $P<0.05$ 水平有显著差异。下同
Different letters in same column indicate significant difference ($P<0.05$). The same below

图 1 BA 处理对小白菜地上部鲜重的影响

Figure 1 Effects of BA on plant fresh weight

2.2 BA 处理对小白菜地上部脂肪族硫苷含量影响

与对照相比, 较低浓度 (0.2 和 5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) BA 处理对 5-甲基亚磺酰戊基硫苷 (图 2A) 和 3-丁烯基硫苷 (图 2B) 含量没有显著影响, 而 20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA 处理显著增加了 5-甲基亚磺酰戊基硫苷含量 (增加 122%) 和 3-丁烯基硫苷含量 (增加 165%)。0.2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA 处理时 4-戊烯基硫苷 (图 2C) 含量达到最高值, 比对照增加了 136%; 然而随 BA 处理浓度增加, 4-戊烯基硫苷含量降低, 但均高于对照。不同浓度 BA 处理均增加了总脂肪族硫苷 (图 2D) 含量, 20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA 处理总脂肪族硫苷含量达到最高值, 比对照增加 148%。说明在较高浓度 BA 处理能显著提高小白菜脂肪族硫苷含量。

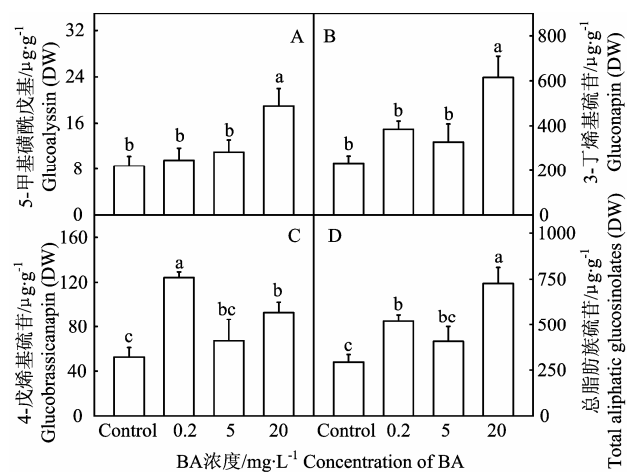


图 2 不同浓度 BA 处理对小白菜地上部脂肪族硫苷含量影响

Figure 2 Effects of BA on aliphatic glucosinolate contents in pakchoi shoots

2.3 BA 处理对小白菜地上部吲哚族硫苷含量影响

如图 3 所示, 随 BA 处理浓度增加, 显著抑制

了 1-甲氧基吲哚-3-甲基硫苷合成。与对照相比，5 与 20 mg·L⁻¹ BA 处理时，1-甲氧基吲哚-3-甲基硫苷含量分别减少了 38%和 48%。不同浓度 BA 处理对吲哚-3-甲基硫苷、4-甲氧基吲哚-3-甲基硫苷与总吲哚族硫苷含量并无显著的影响。由此说明在我们所设置的 BA 处理浓度并没有显著诱导吲哚族硫苷合成，在较高处理浓度下反而抑制了部分吲哚族硫苷合成。

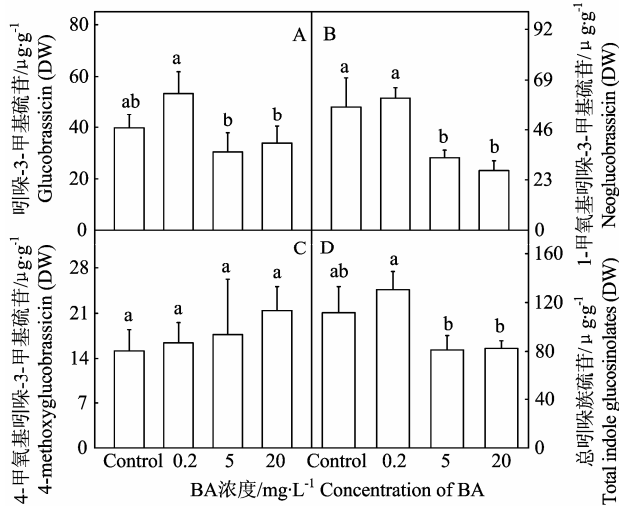


图 3 不同浓度 BA 处理对小白菜地上部吲哚族硫苷含量影响
Figure 3 Effects of BA on indole glucosinolate contents in pakchoi shoots

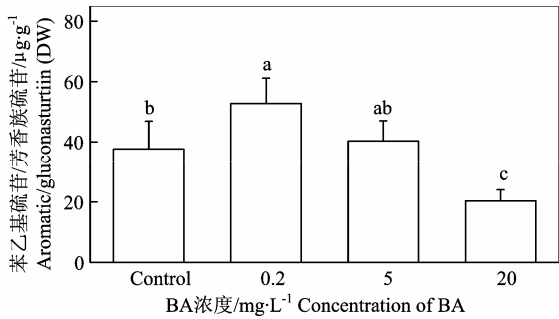


图 4 不同浓度 BA 处理对芳香族硫苷/2-苯乙基硫苷含量的影响
Figure 4 Effects of BA on aromatic/gluconasturtiin glucosinolate contents

2.4 BA 处理对小白菜地上部芳香族硫苷含量影响

如图 4 可知，在不同浓度 BA 处理下，芳香族 2-苯乙基硫苷含量呈先增加后降低的趋势。在 0.2 mg·L⁻¹ BA 处理时 2-苯乙基硫苷含量达到最高值，比对照增加 44%。随着 BA 处理浓度的不断增加，2-苯乙基硫苷含量不断降低，20 mg·L⁻¹ BA 处理显著降低了 2-苯乙基硫苷含量。可见在较低 (0.2

mg·L⁻¹) BA 处理浓度能显著诱导芳香族硫苷合成。

2.5 BA 处理对小白菜地上部总硫苷含量的影响

与对照相比，0.2 和 5 mg·L⁻¹ BA 处理对总硫苷 (图 5) 含量影响不大。但是，20 mg·L⁻¹ BA 处理使总硫苷含量显著增加，与对照相比增加了 88%。

2.6 BA 处理对小白菜地上部 3 类硫苷相对百分含量的影响

如图 6 所示，随 BA 浓度增加，总脂肪族硫苷在总硫苷中所占比例呈递增趋势，在 20 mg·L⁻¹ BA 处理时达到最大值，比对照增加 32%。然而总吲哚族硫苷相对百分含量随 BA 浓度增加呈递减趋势，且在 20 mg·L⁻¹ BA 处理时达到最低值，与对照相比减少 60%。较低浓度 (0.2 和 5 mg·L⁻¹ BA) 处理对芳香族硫苷相对百分含量没有显著影响，但 20 mg·L⁻¹ BA 处理使其显著降低，比对照减少 71%。

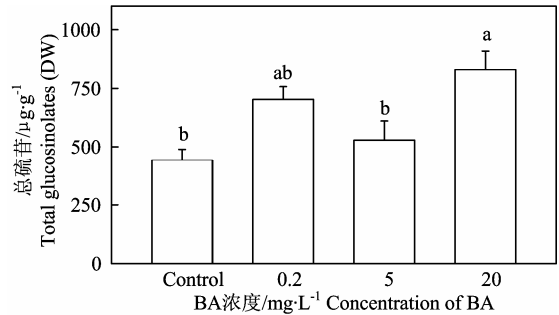


图 5 不同浓度 BA 处理对小白菜地上部总硫苷含量的影响
Figure 5 Effects of BA on total glucosinolates contents

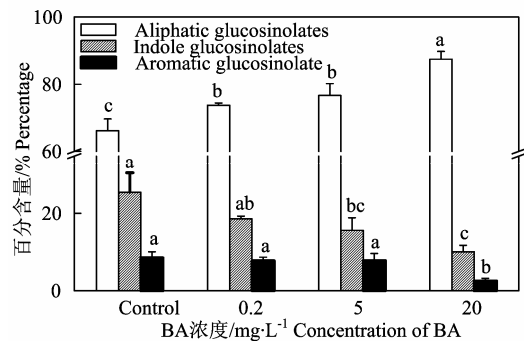


图 6 不同浓度 BA 处理对总脂肪族，总吲哚族，芳香族硫苷相对百分含量影响
Figure 6 Effects of BA on the percentage of aliphatic, indole and aromatic glucosinolates to total glucosinolates

2.7 BA 处理对小白菜地上部单个硫苷相对百分含量的影响

不同浓度 BA 处理，对 7 种单个硫苷相对百分含量有不同的影响 (表 1)。3-丁烯基硫苷是小白菜地上部最主要的硫苷。随 BA 浓度的增加，3-丁烯

基硫苷相对百分含量呈递增趋势, 在 20 mg·L⁻¹BA 处理时达到最高值, 比对照增加 41%。不同浓度 BA 处理下, 4-戊烯基硫苷相对百分含量呈先增加后降低的趋势, 在 0.2 mg·L⁻¹BA 处理时达到最大值, 与对照相比增加了 49%。BA 处理下吲哚-3-甲基硫苷相对百分含量呈递减趋势, 在 5 mg·L⁻¹和 20 mg·L⁻¹BA 处理时显著降低, 比对照分别减少了 35%和

54%。然而 4-甲氧基吲哚-3-甲基硫苷和 5-甲基亚磺酰戊基硫苷相对百分含量在各种浓度 BA 处理下均与对照差异不显著。不同浓度 BA 处理显著降低了 1-甲氧基吲哚-3-甲基硫苷相对百分含量, 与对照相比分别减少 33%、51%和 74%。另外, 2-苯乙基硫苷相对百分含量在 20 mg·L⁻¹BA 处理时显著降低。

表 1 不同浓度 BA 处理对小白菜地上部单个硫苷相对百分含量影响
Table 1 Effects of BA on the percentage of individual glucosinolates to total glucosinolate

BA/mg·L ⁻¹ treatment	5-甲基亚磺酰戊基硫苷 Glucoalyssin	3-丁烯基硫苷 Gluconapin	4-戊烯基硫苷 Glucobrassicinapin
对照Control	1.94±0.34 ^{ab}	52.30±2.29 ^c	11.88±1.29 ^b
0.2	1.37±0.33 ^b	54.62±1.08 ^{bc}	17.74 ±1.41 ^a
5	2.10±0.43 ^a	61.72±5.64 ^b	12.83 ±4.15 ^{ab}
20	2.28±0.16 ^a	73.83±4.38 ^a	11.35 ±2.25 ^b
吲哚-3-甲基硫苷 Glucobrassicin	4-甲氧基吲哚-3-甲基硫苷 4-methoxyglucobrassicin	1-甲氧基吲哚-3-甲基硫苷 Neoglucobrassicin	2-苯乙基硫苷 Gluconasturtiin
9.03±1.25 ^a	3.44±0.65 ^a	12.94±3.24 ^a	8.48±1.59 ^a
7.58±0.68 ^{ab}	2.33±0.30 ^a	8.65±0.43 ^b	7.72±0.92 ^a
5.87±1.87 ^{bc}	3.35±1.65 ^a	6.37±1.26 ^{bc}	7.76±1.85 ^a
4.15±1.13 ^c	2.58±0.40 ^a	3.32±0.77 ^c	2.50±0.70 ^b

注: (1) 数据表示为平均值±标准差 (n=3); (2) 同列中不同字母表示差异显著 (P<0.05)。

Note: (1) Data are the means ± standard deviation of three replicates; (2) Means denoted by different letters indicate significant difference between treatments at the 0.05 level.

3 讨论

硫苷的水解产物(异硫代氰酸盐、硫代氰酸盐、腈类等)具有多种生化活性, 不但在人类抗癌方面已得到公认, 而且改变植株体内硫苷的分布, 能够相应的增加植物的抵抗力, 在防治植物病害的侵染及昆虫的噬咬方面也具有一定的作用^[1,9-10]。本研究发现, 在较高 CTK 处理浓度下, 总硫苷含量显著提高。植物生长环境的改变(如温度、光照、外源激素处理等), 也均能促使植株体内硫苷积累^[11-12]。

脂肪族硫苷的水解产物具有易挥发并具有刺激性气味^[9], 通过本试验发现, 5-甲基亚磺酰戊基硫苷, 3-丁烯基硫苷含量和总脂肪族硫苷含量在较高浓度(20 mg·L⁻¹)BA 处理时显著增加, 但 4-戊烯基硫苷在 0.2 mg·L⁻¹BA 处理时就达到最大值, 但在较高浓度(5 和 20 mg·L⁻¹)BA 处理下 4-戊烯基硫苷含量下降, 但也高于对照水平。其中 3-丁烯基硫苷是小白菜地上部最主要的硫苷, 但 Mithen^[13]研究发现 3-丁烯基硫苷的水解产物影响蔬菜的口感。本研究需要较高浓度 BA 浓度才能提高 3-丁烯基硫苷的含量, 所以可以根据需要采取相应的措施。

研究表明吲哚-3-甲基硫苷的水解产物吲哚-3-

甲醇和 2-苯乙基硫苷水解产物苯乙基异硫脲酸酯的水解产物具有抗癌的作用^[14]。在小白菜经过鉴定含有这两种硫苷^[15]。在本试验条件下, 吲哚-3-甲基硫苷的含量并没有显著的变化, 但在较低 BA 处理浓度下, 显著提高了 2-苯乙基硫苷的含量, 所以从提高抗癌物质的角度出发, 应外源喷施较低浓度的 BA 以促进 2-苯乙基硫苷的合成。

Bodnaryk^[16]报道 CTK 处理对植株吲哚族硫苷含量并没有显著影响。本试验发现, 在 BA 处理下, 吲哚-3-甲基硫苷、4-甲氧基吲哚-3-甲基硫苷与总吲哚族硫苷含量无显著变化; 但在 BA5-20 mg·L⁻¹处理浓度下, 降低了 1-甲氧基吲哚-3-甲基硫苷含量。这可能因为 CTK 对吲哚族硫苷具有负向调控的作用。另外, 本实验室发现, ABA 对小白菜硫苷的调控也较为复杂^[17], 既有正向调控, 也有负向调控。这可能是由于脂肪族硫苷和吲哚族硫苷合成过程中可能存在此消彼长的规律^[18]。本试验中, 总脂肪族硫苷的相对百分含量呈递增趋势, 但总吲哚族硫苷的相对百分含量呈递减趋势。脂肪族硫苷和吲哚族硫苷在植株体内具有复杂的相关性, 但目前还没有证据表明两者的直接关系。过量表达控制脂肪族硫苷合成的基因 *HAG1/MYB28* 增加脂肪族硫苷含量

的同时减少了吲哚-3-甲基硫苷含量^[19]。*CYP79F1* 缺失突变体中脂肪族硫苷含量显著降低, 但吲哚族硫苷含量则增加了^[20-21]。试验发现脂肪族硫苷对CTK处理比吲哚族硫苷更加敏感。但有研究发现, 在一些外界因素下吲哚族硫苷可能显示更大的敏感性^[22-23]。这可能是采用的试验作物的不同, Hu等^[24]发现, 在盐胁迫下小白菜脂肪族硫苷也显示了较强的敏感性。

本研究表明, 适宜浓度的细胞分裂素显著增加了脂肪族硫苷和芳香族硫苷含量, 能够提高对人体健康有益的硫苷组分, 但在较高处理浓度反而抑制了吲哚族硫苷合成, 但细胞分裂素与硫苷合成的机理还有待进一步地深入研究。

参考文献:

- [1] Halkier B A, Gershenzon J. Biology and biochemistry of glucosinolates[J]. Annual Review of Plant Biology, 2006, 57: 303-333.
- [2] 蒋晓丽, 郭世荣, 何洪巨, 等. 甲硫氨酸和茉莉酸甲酯对芥蓝硫代葡萄糖苷的影响[J]. 华北农学报, 2009, 24(1): 31-35.
- [3] Yan X F, Chen S X. Regulation of plant glucosinolate metabolism[J]. Planta, 2007, 226: 1343-1352.
- [4] Hu K L, Zhu Z J, Zang Y X. Accumulation of glucosinolates and nutrients in Pakchoi (*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* var. *communis*) two cultivar plants exposed to sulfur deficiency [J]. Horticulture, Environment and Biotechnology, 2011, 52(2): 121-127.
- [5] Doughty K J, Kiddle G A, Pye B J, et al. Selective induction of glucosinolates in oilseed rape leaves with methyl jasmonate[J]. Phytochemistry, 1995, 38: 347-350.
- [6] Tantikanjana T, Mikkelsen M D, Hussain M, et al Functional analysis of the tandem-duplicated P450 genes *SPS/BUS/CYP79F1* and *CYP79F2* in glucosinolate biosynthesis and plant development by Ds transposition-generated double mutants[J]. Plant Physiology, 2004, 135: 840-848.
- [7] 胡克玲, 朱祝军. 萘乙酸对小白菜硫代葡萄糖苷的影响[J]. 植物生理学报, 2013, 49(11): 1221-1227.
- [8] 陈新娟, 朱祝军, 钱琼秋, 等. 硫苷的提取、分离和鉴定[J]. 中国食品学报, 2007, 7: 43-48.
- [9] Hopkins R J, Dam N M, Loon J J. Role of glucosinolates in insect-plant relationships and multitrophic interactions[J]. Annual Review of Entomology, 2009, 54: 57-83.
- [10] Mithofer A, Bolan W. Plant defense against herbivores: chemical aspects [J]. Annual Review Plant Biology, 2012, 63: 431-50.
- [11] Brader G, Mikkelsen M D, Halkier B A, et al. Altering glucosinolate profiles modulates disease resistance in plants[J]. The Plant Journal, 2006, 46: 758-767.
- [12] Schreiner M, Krumbein A, Mewis I, et al. Short-term and moderate UV-B radiation effects on secondary plant metabolism in different organs of nasturtium (*Tropaeolum majus* L.) [J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2009, 10: 93-96.
- [13] Mithen R. Leaf glucosinolate profiles and their relationship to pest and disease resistance in oilseed rape[J]. Euphytica, 1992, 63: 71-83.
- [14] Xiao D, Zeng Y, Choi S, et al. Caspase-dependent apoptosis induction by phenethyl isothiocyanate, a cruciferous vegetable-derived cancer chemopreventive agent, is mediated by bak and bax [J]. Clinical Cancer Research, 2005, 11: 2670-2679.
- [15] Hu K L, Zhu Z J, Zang Y X. Accumulation of glucosinolates and nutrients in pakchoi (*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* var. *communis*) two cultivar plants exposed to sulfur deficiency [J]. Horticulture, Environment and Biotechnology, 2011, 52(2): 121-127.
- [16] Bodnaryk R P. Potent effect of jasmonates on indole glucosinolates in oilseed rape and mustard[J]. Phytochemistry, 1994, 35: 301-305.
- [17] 胡克玲, 朱祝军. 不同浓度脱落酸对小白菜硫代葡萄糖苷含量的影响[J]. 华南农业大学学报, 2013, 34(3): 366-371.
- [18] Grubb C D, Abel S. Glucosinolate metabolism and its control[J]. Trends in Plant Science, 2006, 11(2): 89-100.
- [19] Gigolashvili T, Yatusevich R, Berger B, et al. The R2R3-Myb transcription factor HAG1/MYB28 is a regulator of methionine-derived glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*[J]. The Plant Journal, 2007, 51: 247-261.
- [20] Reintanz B, Lehnen M, Reichelt M, et al. Bus, a bushy *Arabidopsis CYP79F1* knockout mutant with abolished synthesis of short-chain aliphatic glucosinolates[J]. The Plant Cell, 2001, 13: 351-367.
- [21] Chen S, Glawischnig E, Jorgensen K, et al. *CYP79F1* and *CYP79F2* have distinct functions in the biosynthesis of aliphatic glucosinolates in *Arabidopsis*[J]. The Plant Journal, 2003, 33: 923-937.
- [22] Bennett R N, Wallsgrove R M. Secondary metabolites in plant defence mechanisms[J]. New Phytologist, 1994, 127: 617-633.
- [23] Kunkel B N, Brooks D M. Cross talk between signaling pathways in pathogen defense[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2002(5): 325-331.
- [24] Hu K L, Zhu Z J. Effects of different concentrations of sodium chloride on plant growth and glucosinolate content and composition in pakchoi [J]. African Journal of Biotechnology, 2010, 28 (9):4428-4433.