

## 达草灭对橙色大白菜愈伤组织中类胡萝卜素含量的影响

张华敏, 武云霞, 张鲁刚\*, 张亚丽

西北农林科技大学园艺学院, 农业部西北园艺植物种质资源与遗传改良重点开放实验室, 陕西杨凌 712100

**摘要:** 依据橙色大白菜的愈伤组织呈现橙色, 而普通大白菜的愈伤组织呈现浅黄色这一现象, 以橙色大白菜‘金冠1号’和普通大白菜‘秦白2号’培养的愈伤组织为材料, 在培养基中添加 $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的八氢番茄红素脱氢酶抑制剂达草灭分别处理5、10、20和40 d。用HPLC法测定处理后的愈伤组织中各种类胡萝卜素含量的结果表明: ‘秦白2号’愈伤组织中以 $\beta$ -胡萝卜素为主, ‘金冠1号’愈伤组织中的类胡萝卜以番茄红素和 $\beta$ -胡萝卜素为主, 且类胡萝卜素总含量比‘秦白2号’高出10.4倍; 随着达草灭处理时间的延长, 愈伤组织的颜色逐渐变白, 其中番茄红素和 $\beta$ -胡萝卜素的含量逐渐下降, 而八氢番茄红素的含量则逐渐升高, 至处理40 d时, 两品种的愈伤组织中积累的八氢番茄红素差异不明显。据此, 推论橙色大白菜中类胡萝卜素的积累并不是由于类胡萝卜素生物合成能力的提高引起的。

**关键词:** 橙色大白菜; 达草灭; 愈伤组织; 类胡萝卜素; 高效液相色谱

## Effects of Norflurazon on Carotenoid Content in Orange-heading Chinese Cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*) Calli

ZHANG Hua-Min, WU Yun-Xia, ZHANG Lu-Gang\*, ZHANG Ya-Li

Key Laboratory of Northwest Horticultural Plant Germplasm and Genetic Improvement, Ministry of Agriculture, College of Horticulture, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China

**Abstract:** According to the phenomenon that the calli derived from ‘Qinbai 2’ seedlings showed a light yellow color and the calli derived from ‘Jinguan 1’ exhibited orange yellow, the calli from ‘Qinbai 2’ and ‘Jinguan 1’ were treated for 5 d, 10 d, 20 d and 40 d with  $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  norflurazon, an effective inhibitor of phytoene desaturase. The carotenoid content of treated calli were measured by High Pressure Liquid Chromatography (HPLC). The results showed that  $\beta$ -carotene was the main component of carotenoid in the calli derived from ‘Qinbai 2’, lycopene and  $\beta$ -carotene were the main components of carotenoid in the calli derived from ‘Jinguan 1’. The total carotenoid content in ‘Jinguan 1’ was 10.4 times more than that in ‘Qinbai 2’. With the treatment of norflurazon, the growing calli became white and the contents of lycopene and  $\beta$ -carotene were decreased but phytoene content increased. After the treatment of norflurazon for 40 d, there was no obvious difference of phytoene accumulation between the ‘Qinbai 2’ and ‘Jinguan 1’ calli. These results suggested that carotenoid accumulation in the orange-heading Chinese cabbage didn’t result from an increased capacity of carotenoid biosynthesis.

**Key words:** orange-heading Chinese cabbage; norflurazon; calli; carotenoid; HPLC

大白菜叶球颜色育种日益受到白菜育种者的重视, 迄今已育成的有‘金冠1号’(张鲁刚等2005)、“金冠2号”(张鲁刚等2007)、“北京桔红2号”(余阳俊等2005)、“红抗1号”和“红抗2号”(苏学军和徐茂俊2005)等多个彩色大白菜品种。彩色大白菜是由于叶球中积累类胡萝卜素才呈现出各种颜色的, 但其积累类胡萝卜素的机制还未见报道。

类胡萝卜素是自然界中广泛存在的天然色素。到目前为止, 已经鉴定的类胡萝卜素分子共有600多种, 除了八氢番茄红素和六氢番茄红素等几

种类胡萝卜素无色之外, 绝大多数类胡萝卜素呈黄色、橙色或红色, 是许多花、果实和胡萝卜根呈现各种颜色的原因(Bartley 和 Scolnik 1995)。在植物中, 类胡萝卜素起着多种作用, 它们是光合系统的主要成分, 可以辅助光能的吸收和保护光合器官

收稿 2009-01-05 修定 2009-02-12

资助 国家“863”计划(2006AA100108-4-7)、国家科技支撑计划(2006BAD01A7-1-03)和陕西省“13115”工程(2007ZDKG-05)。

\* 通讯作者(E-mail: lugangzh@163.com; Tel: 029-87082131)。

不受光氧化的损坏(Niyogi 1999; Demmig-Adams和Adams 2002), 它们还是植物激素脱落酸(abscisic acid, ABA) (Schwartz等1997)和果实、花朵中挥发性芳香复合物(Bouvier等2003; Simkin等2004)生物合成的前体。在人和动物体内, 类胡萝卜素是合成维生素A的前体, 并在防癌抗癌、预防心血管疾病和增强免疫力等方面起作用(Mayne 1996; Giovannucci 1999)。

植物类胡萝卜素主要分布于叶绿体和有色体膜中, 包括胡萝卜素和叶黄素两大类。类胡萝卜素生物合成的第一个关键步骤是2分子的牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸缩合形成八氢番茄红素, 然后在一系列的去饱和和异构化作用下八氢番茄红素转变成番茄红素。番茄红素环化生成 $\alpha$ 和 $\beta$ -胡萝卜素。接下来, 这些胡萝卜素通过羟基化、环氧化或酮基化而氧化形成黄色色素, 包括从 $\alpha$ -胡萝卜素而来的叶黄素, 从 $\beta$ -胡萝卜素而来的玉米黄质、紫黄质和新黄质(Cunningham和Gantt 1998; Hirschberg 2001; Fraser和Bramley 2004)。

达草灭是一种除草剂, 其作用机制是与类胡萝卜素生物合成途径中的关键酶——八氢番茄红素脱氢酶竞争辅因子从而抑制其活性(Breitenbach等2001)。用达草灭处理植株能促使植株叶片白化, 由于不能进行光合作用, 最终导致被处理植株死亡。达草灭专一抑制八氢番茄红素脱氢酶的活性, 并不影响底物八氢番茄红素的合成。本文采用愈伤组织作为材料, 在含有达草灭的培养基上培养, 检测处理时间不同的愈伤组织中类胡萝卜素含量变化, 以此研究橙色大白菜类胡萝卜素的积累与体内类胡萝卜素生物合成能力的关系。

## 材料与方 法

大白菜(*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*)品种为橙色大白菜‘金冠1号’和普通大白菜‘秦白2号’, 种子由本校园艺学院大白菜研究室提供。

达草灭购自ChemService公司, 番茄红素与叶黄素(>95%)标准品购自上海融禾医药科技发展有限公司,  $\beta$ -胡萝卜素标准品购自Sigma公司。流动相乙腈、乙酸乙酯为国产色谱纯, 丙酮、乙醇、石油醚(30~60 °C沸程)、二丁基羟基甲苯(BHT)、三乙胺、石英砂、无水硫酸钠等均为国产分析纯。类胡萝卜素含量的检测使用岛津

2010AH型高效液相色谱仪、旋转蒸发仪、KQ-500DE型数控超声波清洗器和烘箱等仪器。

建立愈伤组织培养体系时, 挑选饱满的橙色大白菜‘金冠1号’和普通大白菜‘秦白2号’种子, 在超净工作台上用70%乙醇浸泡1 min, 然后用10%的次氯酸钠溶液浸泡30 min, 最后用无菌水冲洗5次, 接种在不含任何激素的MS培养基上, 每个培养瓶接种20粒种子。置于温度为24 °C、光照为16 h·d<sup>-1</sup>和光照强度为32  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 的条件下培养。取5 d苗龄的无菌苗子叶及下胚轴作为外植体, 接种到MS+5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+1 mg·L<sup>-1</sup> NAA+0.2 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D的诱导培养基上, 培养基中附加蔗糖30 g·L<sup>-1</sup>, 琼脂7.0 mg·L<sup>-1</sup>, pH调至5.8~6.0。采用100 mL三角瓶, 每瓶装培养基25~30 mL。下胚轴切成5 mm长, 子叶则以带柄子叶接种, 每瓶接5块外植体, 培养条件为温度24 °C, 光照16 h·d<sup>-1</sup>, 光照强度32  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。每隔20 d继代一次, 每瓶接3~4块愈伤组织。

愈伤组织的处理参考Li等(2006)的方法, 并有改动。将继代2次的愈伤组织切成大小相近的组织块, 放在浓度高达0.1 mmol·L<sup>-1</sup>达草灭的培养基上。分别处理5、10、20和40 d后, 取出愈伤组织并放在-80 °C的冰箱中备用。

愈伤组织中类胡萝卜素的提取以丙酮:乙醇(V/V, 1:1)的混合溶剂作为提取剂, 准确称取2 g愈伤组织, 先加少量的提取剂研磨, 再加30 mL提取剂避光低温浸提20 min, 过滤, 再以石油醚反复萃取提取液至无色, 收集合并石油醚相, 于真旋转蒸发仪中低温浓缩至干, 最后用2 mL乙酸乙酯溶解, 0.45  $\mu\text{m}$ 一次性滤膜过滤后用于HPLC测定。色谱条件为反相C<sub>18</sub>柱(4.6 mm×150 mm), 流动相A为乙腈、水和三乙胺(V/V/V, 9:1:0.01), 流动相B为乙酸乙酯。洗脱条件为二元线性梯度洗脱: 在前30 min内, 流动相B由0增为100%, 随后, 流动相B保持100%; 进样量为20  $\mu\text{L}$ ; 流速为0.5 mL·min<sup>-1</sup>; 柱温为25 °C; 检测波长为450 nm和287 nm。

制作标准曲线时精密称量叶黄素、番茄红素和 $\beta$ -胡萝卜素各1.00 mg, 用乙酸乙酯溶解并定容至10 mL, 然后分别取0.2 mL叶黄素溶液、1.25 mL番茄红素溶液和1 mL  $\beta$ -胡萝卜素溶液, 稀释100倍, 配制成0.2 mg·L<sup>-1</sup>的叶黄素标准品溶液、1.25 mg·L<sup>-1</sup>的番茄红素标准品溶液和1 mg·L<sup>-1</sup>的 $\beta$ -

胡萝卜素标准品溶液, 过滤后上机测定, 进样量分别为 2、5、10、20 和 40  $\mu\text{L}$ , 根据峰面积制作标准曲线, 得到峰面积  $X$  与类胡萝卜素含量  $Y$  ( $\mu\text{g}$ ) 之间的回归方程。叶黄素标准曲线的回归方程是:  $Y=6\times 10^{-6}X-0.0055$ ,  $R^2=0.9991$ ; 番茄红素标准曲线的回归方程是:  $Y=4\times 10^{-6}X+0.0221$ ,  $R^2=0.9999$ ;  $\beta$ -胡萝卜素标准曲线的回归方程是:  $Y=2\times 10^{-6}X+0.0077$ ,  $R^2=1$ 。

## 实验结果

### 1 ‘秦白2号’与‘金冠1号’愈伤组织的外观差异

从图1可以看出‘秦白2号’的愈伤组织呈浅黄色, ‘金冠1号’的愈伤组织呈橙色, 与‘金冠1号’成熟期内叶的颜色相似, 二者之间存在明显的差异, 表明橙色大白菜的橙色性状在愈伤组织中也同样表现出来。在愈伤组织状态观察愈伤组织的颜色就能区分橙色大白菜与普通大白菜, 据此认为, 在达草灭处理下, 从培养过程中愈伤组织色泽的变化, 可以研究类胡萝卜素的积累机制。

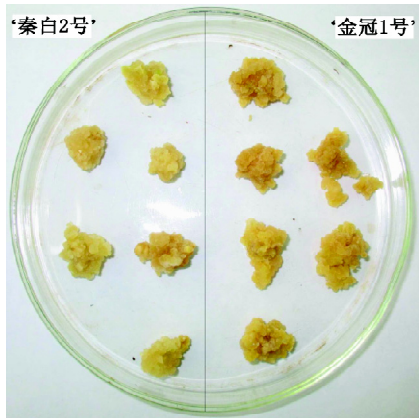


图1 ‘秦白2号’与‘金冠1号’的愈伤组织

Fig.1 Calli derived from ‘Qinbai 2’ and ‘Jinguan 1’ seedlings

### 2 ‘秦白2号’与‘金冠1号’愈伤组织中类胡萝卜素含量和成分的比较

HPLC分析显示, ‘秦白2号’愈伤组织中的类胡萝卜素以 $\beta$ -胡萝卜素为主(图2-a); ‘金冠1号’愈伤组织中的类胡萝卜素以 $\beta$ -胡萝卜素和番茄红素为主(图2-b)。并且后者的愈伤组织中 $\beta$ -胡萝卜素和番茄红素的总含量比前者高10.4倍, 这与外观上的观察结果是一致的。据此认为, ‘金冠1号’愈伤组织可能正是由于积累较多的番茄红素和 $\beta$ -

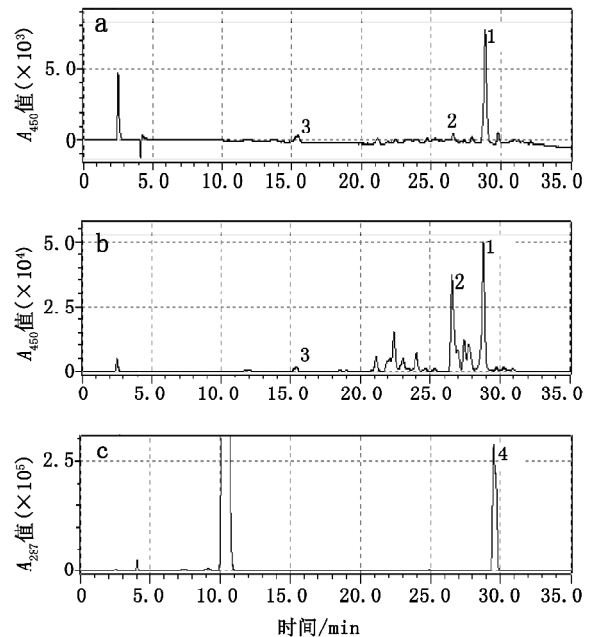


图2 大白菜‘秦白2号’和‘金冠1号’愈伤组织的高效液相色谱

Fig.2 High performance liquid chromatography of calli derived from ‘Qinbai 2’ and ‘Jinguan 1’ seedlings

a和b为分别为‘秦白2号’和‘金冠1号’愈伤组织类胡萝卜素含量的色谱图; c为‘金冠1号’愈伤组织用达草灭处理20 d后八氢番茄红素含量的色谱图。峰1为 $\beta$ -胡萝卜素; 峰2为番茄红素; 峰3为叶黄素; 峰4为八氢番茄红素。

胡萝卜素才呈现出橙色的。经达草灭处理后, 由于类胡萝卜素的生物合成途径受阻, ‘金冠1号’和‘秦白2号’愈伤组织中都能够积累八氢番茄红素(图2-c, ‘秦白2号’与‘金冠1号’的峰形是一样的, 只有峰面积的差异, 未提供图)。

### 3 达草灭对大白菜愈伤组织中类胡萝卜素含量的影响

在培养基中加入达草灭后, 随着处理时间的延长, ‘秦白2号’与‘金冠1号’的愈伤组织的颜色逐渐变浅, 处理40 d后, 都呈现白色, 两者在外观上没有差异。HPLC分析, 随着达草灭处理时间的延长, ‘秦白2号’与‘金冠1号’的愈伤组织中 $\beta$ -胡萝卜素和番茄红素的含量逐渐降低, 而八氢番茄红素的含量逐渐增加, 其中处理5、10和20 d时, ‘金冠1号’的愈伤组织中积累八氢番茄红素的量低于‘秦白2号’, 而处理40 d的‘金冠1号’积累八氢番茄红素的量比‘秦白2号’稍高, 但差异不显著(图3)。这些结果表明‘金冠1号’的愈伤组织在合成八氢番茄红素的能力上比‘秦白2号’愈伤

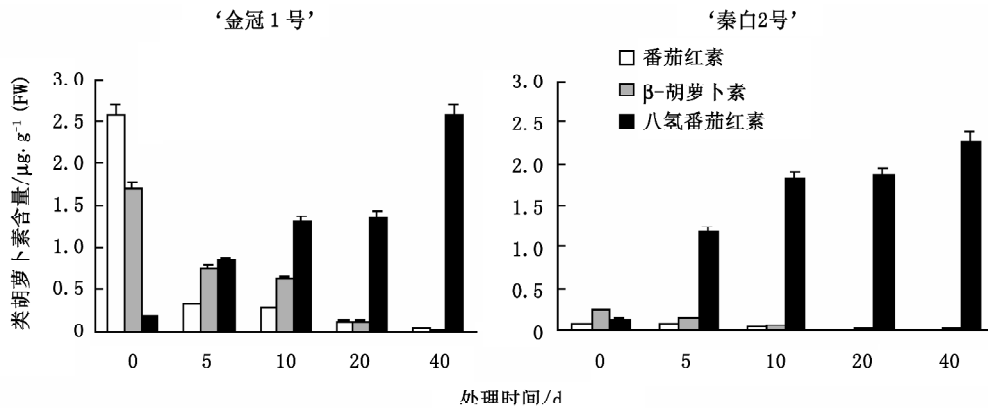


图3 达草灭处理后‘金冠1号’与‘秦白2号’愈伤组织类胡萝卜含量变化

Fig.3 Changes in carotenoid contents in calli of ‘Qinbai 2’ and ‘Jinguan 1’ treated with norflurazon

由于缺少八氢番茄红素的标准品, 样品中八氢番茄红素的相对含量是根据番茄红素的含量计算的。

组织并没有显著提高。

## 讨 论

类胡萝卜素生物合成涉及很多的酶, 已经证实, 有多种化合物可抵制合成途径中的各种反应, 迄今研究最为透彻的作用位点是八氢番茄红素脱氢酶 (Breitenbach 等 2001)。达草灭是八氢番茄红素脱氢酶的专一抑制剂, 是一种商品化的除草剂。达草灭抑制类胡萝卜素的生物合成反应, 在植物中导致八氢番茄红素的积累。用达草灭直接处理植株, 会使植株白化死亡, 因此本文用愈伤组织为材料, 愈伤组织在加有达草灭的培养基中生长依然良好。为了确保彻底的抑制八氢番茄红素脱氢酶的活性, 本文使用达草灭的浓度高达  $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

前人的研究表明彩色大白菜中类胡萝卜素的含量比普通大白菜明显高出许多(张鲁刚等 2005, 2007; 苏学军和徐茂俊 2005)。本文与前人的研究结果一致, 且进一步确定橙色大白菜中积累的类胡萝卜素以番茄红素和  $\beta$ -胡萝卜素为主。另外, 本文结果还显示, 经达草灭处理 40 d 后, 橙色大白菜和普通大白菜愈伤组织中积累的八氢番茄红素含量差异不显著, 这与 Li 等(2006)在花椰菜 *Or* 突变体中的研究是一致的。八氢番茄红素是类胡萝卜素生物合成途径中合成的第一个类胡萝卜素分子, 是所有下游类胡萝卜素合成的底物, 与普通大白菜相比, 橙色大白菜合成八氢番茄红素的能力提高不显著, 表明橙色大白菜中积累类胡萝卜素并不是由于类胡萝卜素的生物合成能力提高引起的, 而可能与下游

相关类胡萝卜合成酶基因的差异表达有关, 或者是其他未知途径引起的。花椰菜 *Or* 突变体中  $\beta$ -胡萝卜素的积累机制已经研究清楚, 它是由于 *Or* 基因的功能是促进前质体和其他无色质体向有色体分化, 从而在花球细胞中形成 1~2 个大的有色体积累  $\beta$ -胡萝卜素 (Lu 等 2006)。橙色大白菜积累类胡萝卜素的机制是否与花椰菜 *Or* 突变体一致, 还有待进一步的研究。

## 参考文献

- 苏学军, 徐茂俊(2005). 彩色大白菜新品种红抗 1、2 号的选育. 中国瓜菜, (4): 25~27
- 余阳俊, 陈广, 徐家炳, 张凤兰, 孙继志, 赵岫云, 张德双(2005). 早中熟桔红心大白菜新品种‘北京桔红 2 号’. 园艺学报, 32 (2): 372
- 张鲁刚, 惠麦侠, 张明科(2005). 彩色大白菜新品种‘金冠 1 号’的选育. 北方园艺, (4): 67~68
- 张鲁刚, 惠麦侠, 张明科(2007). 彩色大白菜新品种‘金冠 2 号’的选育. 西北农业学报, 16 (1): 204~206
- Bartley GE, Scolnik PA (1995). Plant carotenoid: pigments for photoprotection, visual attraction, and human health. *Plant Cell*, 7: 1027~1038
- Bouvier F, Suire C, Mutterer J, Camara B (2003). Oxidative remodeling of chromoplast carotenoids: identification of the carotenoid dioxygenase *CsCCD* and *CsZCD* genes involved in crocus secondary metabolite biogenesis. *Plant Cell*, 15: 47~62
- Breitenbach J, Zhu C, Sandmann G (2001). Bleaching herbicide norflurazon inhibits phytoene desaturase by competition with the cofactors. *J Agr Food Chem*, 49 (11): 5270~5272
- Cunningham FX, Gantt E (1998). Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 49: 557~587
- Demmig-Adams B, Adams WW (2002). Antioxidants in photosynthesis and human nutrition. *Science*, 298: 2149~2153

- Fraser PD, Bramley PM (2004). The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Prog Lipid Res*, 43 (3): 228~265
- Giovannucci E (1999). Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: review of the epidemiologic literature. *J Natl Cancer Inst*, 91 (4): 317~331
- Hirschberg J (2001). Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Curr Opin Plant Biol*, 4 (3): 210~218
- Li L, Lu S, Cosman KM, Earle ED, O'Neill J (2006).  $\beta$ -Carotene accumulation induced by the cauliflower *Or* gene is not due to an increased capacity of biosynthesis. *Phytochemistry*, 67: 1177~1184
- Lu S, Van EJ, Zhou X, Lopez AB, O'Halloran DM, Cosman KM, Conlin BJ, Paolillo DJ, Garvin DF, Vrebalov J et al (2006). The cauliflower *Or* gene encodes a DnaJ cysteine-rich domain-containing protein that mediates high levels of  $\beta$ -carotene accumulation. *Plant Cell*, 18: 3594~3605
- Mayne ST (1996). Beta-carotene, carotenoids, and disease prevention in humans. *FASEB J*, 10: 690~701
- Niyogi KK (1999). Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 50: 333~359
- Schwartz SH, Tan BC, Gage DA, Zeevaart-Jan AD, McCarty DR (1997). Specific oxidative cleavage of carotenoids by VP14 of maize. *Science*, 276: 1872~1874
- Simkin AJ, Schwartz SH, Auldridge M, Taylor MG, Klee HJ (2004). The tomato *carotenoid cleavage dioxygenase 1* genes contribute to the formation of the flavor volatiles  $\beta$ -ionone, pseudoionone, and geranylacetone. *Plant J*, 40 (6): 882~892