

油菜愈伤组织中烯丙基硫苷的积累和某些外源碳氮化合物对其含量的影响

吴媛媛^{1,2}, 马绍英^{1,2}, 李胜^{1,2,*}, 张真^{1,2}, 刘媛^{1,2}, 张青松^{1,2}

¹甘肃农业大学生命科学技术学院植物细胞工程研究室, 兰州 730070; ²兰州汇通生物科技有限公司, 兰州 730000

摘要: 油菜愈伤组织在培养中生长34 d的增殖量最大, 增殖倍数为7.08倍, 烯丙基硫苷的含量在第6天最高; 外源L-缬氨酸明显促进烯丙基硫苷的积累, 其浓度为2和4 mmol·L⁻¹时烯丙基硫苷含量分别达到98.5和97.40 mg·g⁻¹ (DW); 蔗糖最有利于油菜愈伤组织的生长和其中烯丙基硫苷的积累, 浓度以30 g·L⁻¹的蔗糖为最佳。

关键词: 油菜; 烯丙基硫苷; 前体物质; 糖源; 愈伤组织

Accumulation of Sinigrin in *Brassica campestris* L. Callus and Effects of Some Exogenous Carbon and Nitrogen Containing Compounds on Its Contents

WU Yuan-Yuan^{1,2}, MA Shao-Ying^{1,2}, LI Sheng^{1,2,*}, ZHANG Zhen^{1,2}, LIU Yuan^{1,2}, ZHANG Qing-Song^{1,2}

¹Laboratory for Plant Tissue Culture, College of Life Science & Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China; ²Lanzhou Huitong Biological Science & Technology Ltd., Lanzhou 730000, China

Abstract: It was studied by callus culture to accumulation dynamics of sinigrin in rape (*Brassica campestris*) callus and effects of some exogenous carbon and nitrogen containing compounds on sinigrin contents. The extreme proliferation multiples of callus was 7.08 in the 34th day of culture. The sinigrin content reached to 109.04 mg·g⁻¹ (DW) in the highest at the 6th day. When the addition concentrations of L-valine were 2 mmol·L⁻¹ and 4 mmol·L⁻¹, the sinigrin contents of rape callus were 98.5 and 97.40 mg·g⁻¹ (DW), respectively, which were promoted obviously. Sucrose was the optimal carbon source for rape callus multiplication and sinigrin accumulation with the best addition concentration of 30 g·L⁻¹.

Key words: *Brassica campestris*; sinigrin; precursors; carbon source; callus

烯丙基硫苷(sinigrin)是植物体内由氨基酸衍生而来的一种亲水性的次生代谢产物, 是十字花科植物的风味成分(Grubb 和 Abel 2006), 其降解产物中的烯丙基异硫氰酸酯有抗癌和抗肿瘤的作用, 并广泛用作食品添加剂和食品抗菌剂(翟建华等2008)。随着对天然药物需求的不断增加, 硫苷及其降解产物的研究开发和利用引起了人们的广泛关注(Nafisi 等2006)。植物中已发现的硫苷有120多种, 但对单一硫苷合成代谢的研究尚鲜有报道(Wielanek 和 Urbanek 1999)。为此, 本文研究了油菜愈伤组织培养过程中烯丙基硫苷的积累以及不同糖源和氨基酸对其含量的影响, 并对烯丙基硫苷的生物合成途径进行了初步探讨。

材料与方 法

以油菜(*Brassica campestris* L.)品种‘陇油5号’种子胚诱导并于继代培养基1 (MS+0.5 mg·L⁻¹ 2,4-D+4.0 mg·L⁻¹ 6-BA+30 g·L⁻¹ 蔗糖+5 g·L⁻¹ 琼脂)上继代6个月的愈伤组织为实验材料。愈伤组织转接

于增殖培养基2 (MS+0.5 mg·L⁻¹ 2,4-D+3.0 mg·L⁻¹ 6-BA+30 g·L⁻¹ 蔗糖+5 g·L⁻¹ 琼脂)上, 每瓶接种生长旺盛且大小一致的5块愈伤组织, 于10~15 μmol·m⁻²·s⁻¹光照和温度(25±2) °C的条件下培养, 每隔2 d随机选取5瓶测定愈伤组织的增殖量、干重和烯丙基硫苷含量, 直至接种后第42天为止。实验重复3次。

在增殖培养基2中分别添加L-丙氨酸(Ala)、L-亮氨酸(Leu)、L-异亮氨酸(Ile)、DL-蛋氨酸(Met)、L-缬氨酸(Val)5种氨基酸, 每种氨基酸的浓度分别设0.1、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、6.0 mmol·L⁻¹, 以不添加氨基酸的为对照。愈伤组织接种于上述培养基上, 每种处理10瓶, 重复3次。培养至第35天时, 测定愈伤组织的增殖量、干重和烯丙基硫苷含量。培养条件同上。

收稿 2009-08-19 修定 2009-09-27

* 通讯作者(E-mail: lish@gsau.edu.cn; Tel: 0931-7631547)。

在去除蔗糖的增殖培养基2中分别添加葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、乳糖、白砂糖5种糖源, 每种糖的浓度分别设10、20、30、40、50、60 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。愈伤组织接种于上述培养基上, 每种处理10瓶, 重复3次。培养到第35天时, 测定愈伤组织的增殖量、干重和烯丙基硫苷含量。培养条件同上。

愈伤组织的生长按下式计算愈伤组织增殖倍数: 接种量($\text{g}\cdot\text{瓶}^{-1}$)=接种后瓶重-接种前瓶重; 收获量($\text{g}\cdot\text{瓶}^{-1}$)=收获前瓶重-收获后瓶重; 增殖倍数=收获量/接种量。

愈伤组织于恒温烘箱($60\text{ }^{\circ}\text{C}$)中烘干, 研成粉末, 称取0.5 g, 加入10 mL 70%甲醇, 于 $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴中浸提30 min, 浸提3次, 合并上清液。加入占总体积1/50的 $0.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{Pb}(\text{Ac})_2\text{-Ba}(\text{Ac})_2$ 溶液, $6440\times\text{g}$ 离心10 min, 取上清液并以1:1体积加入氯仿萃取。如此重复操作3次, 将上层萃取液于 $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 旋转蒸发至近干, 加甲醇定容至25 mL, 分别过0.45和 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜, 置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下保存, 供色谱检测用(何洪巨等2002; Bartlet等1999)。

HPLC检测条件为: 高效液相色谱仪Agilent 1100; 色谱柱为YWG-C18 ($250\text{ mm}\times 4.6\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$); 流动相为甲醇:(水+ $0.005\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl)=9:91 (V/V); 柱温 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$; 检测波长227 nm; 进样量为 $20\text{ }\mu\text{L}$ 。采用外标法进行定量测定(吴谋成等1995)。以峰面积(x)为横坐标, 烯丙基硫苷含量(y)为纵坐标建立峰面积与烯丙基硫苷含量的线性回归方程为 $y=15.45x-1723.45$ ($R^2=0.9991$), 单位为 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW)。

结果与讨论

1 油菜愈伤组织生长期间的增殖量及烯丙基硫苷含量的变化

油菜愈伤组织生长期间的增殖量变化趋势基本上符合S型生长曲线, 愈伤组织在接种后2~12 d的生长很少, 鲜重无明显增加; 12~34 d生长进入旺盛时期, 生长增殖呈直线上升, 第34天的鲜重最大, 增殖倍数为7.08倍; 34 d以后随着时间的延长生长速度下降, 第42天的增殖速率比34 d的下降24.2% (图1)。培养后期, 培养基中糖含量减少而不足以维持细胞生长。

生长期间油菜愈伤组织的烯丙基硫苷含量在

整体上呈先上升后下降的趋势, 愈伤组织接入初期的合成速率快, 第6天达到最高值, 为 $109.04\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW); 第6~42天的含量呈逐渐下降趋势, 第42天降到 $45.53\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW) (图2)。由此可见, 细胞生长期间的次生代谢产物合成过程并不是匀速进行的, 在油菜愈伤组织中的烯丙基硫苷合成速率呈先快后慢的变化过程。此外, 次生代谢物产量受愈伤组织的增殖量和含量共同影响, 油菜愈伤组织中烯丙基硫苷产量呈先增后减的变化趋势, 36 d的产量最高, 为 $51.96\text{ mg}\cdot\text{瓶}^{-1}$ (DW), 随后急剧下降。据此可以认为34~36 d为烯丙基硫苷的最佳收获期。

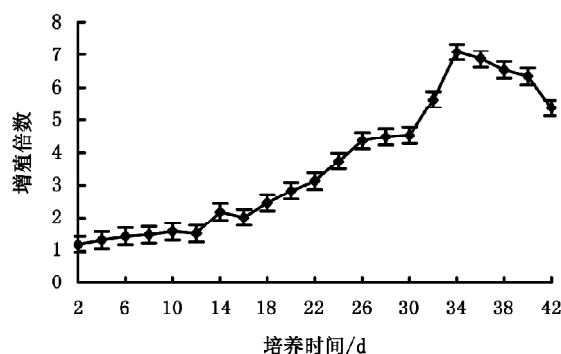


图1 不同收获时间的愈伤组织增殖量的变化
Fig.1 Changes in callus multiplication in different callus growth periods

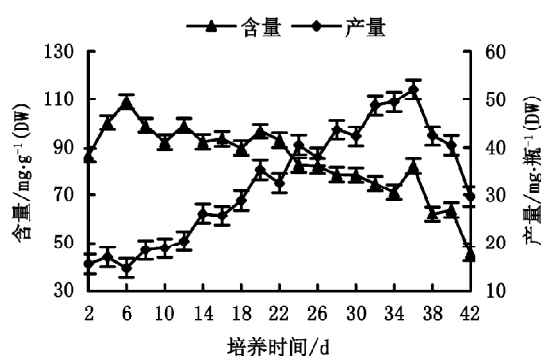


图2 不同收获时间的愈伤组织中烯丙基硫苷含量及产量的变化
Fig.2 Changes in sinigrin contents and output in different callus growth periods

2 氨基酸对油菜愈伤组织增殖量和烯丙基硫苷含量的影响

添加L-缬氨酸和L-亮氨酸对油菜愈伤组织增殖量有一定的抑制作用, 并且随着添加物浓度的增

加其抑制作用也明显增强; L-异亮氨酸和DL-蛋氨酸对愈伤组织的增殖有一定的促进作用, L-异亮氨酸的浓度为 $4.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时的愈伤组织增殖倍数达到6.97倍, 添加 $6.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ DL-蛋氨酸的愈伤组织增殖倍数为6.86倍; L-丙氨酸在整体上对愈伤组织的增殖并无明显的促进作用(图3)。

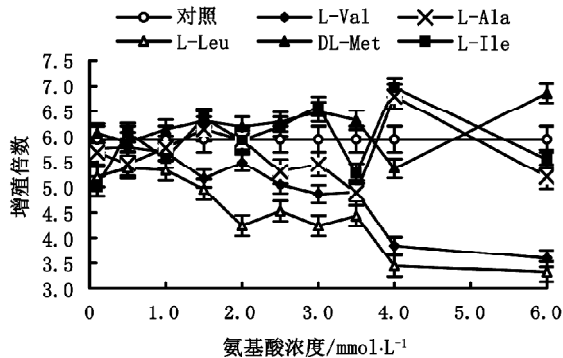


图3 不同氨基酸对愈伤组织增殖量的影响

Fig.3 Effects of different amino acids on callus multiplication

添加L-缬氨酸对愈伤组织中烯丙基硫苷含量有明显的促进作用, 整体上呈双峰曲线, 在 2.0 和 $4.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时含量分别高达 98.5 和 $97.40 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW), 比不加氨基酸的值高23%和21% (图4)。L-缬氨酸属于脂肪烃侧链氨基酸, 其结构中的侧链为三碳直链基团, 和烯丙基硫苷的侧链碳的个数相符, 由此可以初步判断烯丙基硫苷的侧链来源于L-缬氨酸, 至于L-缬氨酸的侧链是如何转化成烯丙基硫苷R基团的还需更深入研究。在培养体系中加入前体化合物将有利于终端产物的合成, 但高浓度外源前体的加入又会抑制植物细胞的生长, 最终影响次生代谢物的产量, 因此就许多前体而言, 存在一个前体的最佳添加浓度(杨广兴等2007; 张真等2008)。本文中的前体L-缬氨酸在浓度为 2.0 和 $4.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时其烯丙基硫苷含量较高, 超过 $4.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的添加浓度烯丙基硫苷的合成反而受到抑制。

添加其他4种氨基酸的愈伤组织中烯丙基硫苷含量在整体上比不加氨基酸的低, 仅在添加 $3.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ L-异亮氨酸时, 其含量为 $88.8 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW), 略高于不加氨基酸的值(图4)。有研究表明, DL-蛋氨酸可为油菜根系直接吸收利用, 而且对植株中硫苷合成积累有一定的促进作用(王庆仁等1999), 但本文中添加DL-蛋氨酸并未显著提高烯丙基硫

苷的含量, 这可能是由于基本培养基已经为硫苷的合成提供了足够的硫。

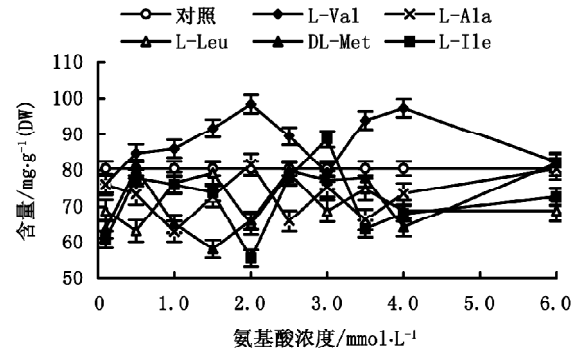


图4 不同氨基酸对愈伤组织中烯丙基硫苷含量的影响

Fig.4 Effects of different amino acids on sinigrin contents in callus

添加L-缬氨酸对烯丙基硫苷产量有明显促进作用, 其中添加 $2.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ L-缬氨酸的烯丙基硫苷产量达到 $270.10 \text{ mg}\cdot\text{瓶}^{-1}$ (DW), 比不加氨基酸的高27%。由于添加DL-蛋氨酸有利于愈伤组织的增殖, 其对烯丙基硫苷产量也有一定的促进作用, 其中浓度为 $3.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的DL-蛋氨酸其产量为 $264.46 \text{ mg}\cdot\text{瓶}^{-1}$ (DW); L-异亮氨酸、L-丙氨酸和L-亮氨酸对烯丙基硫苷产量无明显促进作用(图5)。

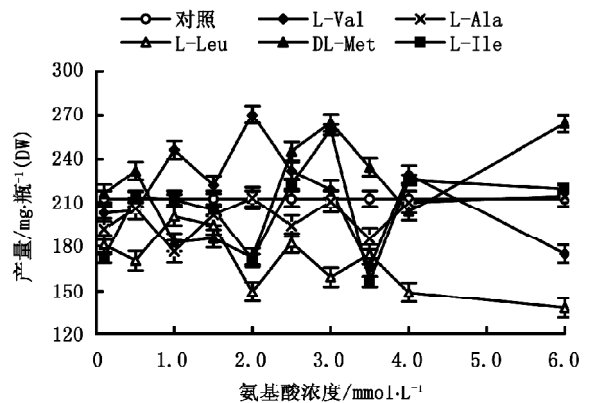


图5 不同氨基酸对愈伤组织中烯丙基硫苷产量的影响

Fig.5 Effects of different amino acids on sinigrin output in callus

3 糖源对油菜愈伤组织的增殖量和烯丙基硫苷含量的影响

添加 $10\sim 30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的葡萄糖、蔗糖、麦芽糖和白砂糖时, 油菜愈伤组织鲜重均呈增长趋势, 在

30 g·L⁻¹时达到最大值,其增殖倍数分别为7.33、8.41、8.14、7.90倍,随着添加物浓度的增加愈伤组织增殖量下降,添加物浓度为60 g·L⁻¹时降到最低值。在4种糖中,蔗糖比其他3种糖更适于油菜愈伤组织的增殖(图6)。添加乳糖的愈伤组织全部褐化,说明油菜愈伤组织不适合添加乳糖。

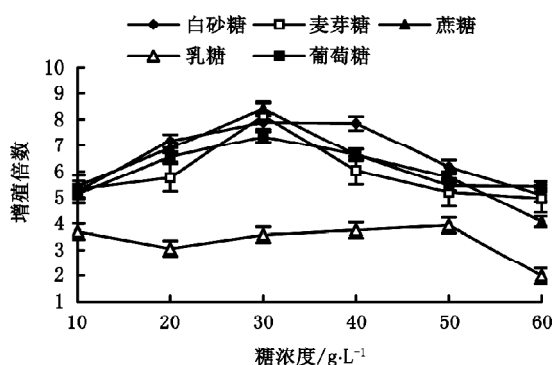


图6 不同糖源对愈伤组织增殖量的影响

Fig.6 Effects of different carbon sources on callus multiplication

愈伤组织中烯丙基硫苷含量对不同糖源的添加也有响应,葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、白砂糖4种糖的浓度为10 g·L⁻¹时的烯丙基硫苷含量最高,分别为127.82、130.56、118.48、113.33 mg·g⁻¹ (DW),随着添加物浓度的增加,烯丙基硫苷含量呈递减趋势。蔗糖和白砂糖的变化趋势相似。添加乳糖的虽然其愈伤组织中的烯丙基硫苷含量在整体上略高于其他糖源,但其愈伤组织全部褐化(图7)。

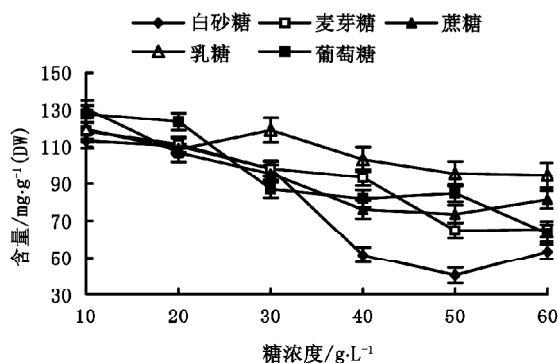


图7 不同糖源对愈伤组织中烯丙基硫苷含量的影响

Fig.7 Effects of different carbon sources on sinigrin contents in callus

在细胞增殖量和烯丙基硫苷含量的影响下,蔗糖、麦芽糖和白砂糖对油菜愈伤组织中烯丙基硫

苷产量的影响均呈先升后降的趋势,它们的浓度为30 g·L⁻¹时的产量最大,分别为230.43、221.06和222.45 mg·瓶⁻¹ (DW);添加葡萄糖比前3种糖的产量低,其在20 g·L⁻¹时的产量最大。乳糖不利于愈伤组织的生长,全部褐化,因此其产量也最低(图8)。

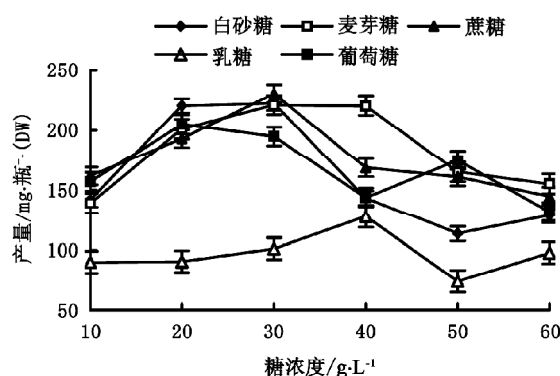


图8 不同糖源对愈伤组织中烯丙基硫苷产量的影响

Fig.8 Effects of different carbon sources on sinigrin output in callus

低浓度糖较利于烯丙基硫苷的积累,而较高浓度的糖利于细胞的生长,但糖浓度过高可能会引起细胞外渗透压过大,以致细胞膜的通透性失调,最终导致细胞生长受阻。30 g·L⁻¹的蔗糖既可满足细胞生长的需求,又较有利于烯丙基硫苷的积累,由此可见,细胞次生代谢物产量的高低应该从愈伤组织的增殖量和烯丙基硫苷含量两方面加以综合评价,蔗糖是油菜愈伤组织增殖和烯丙基硫苷积累的最佳糖源,其最适浓度为30 g·L⁻¹。在烯丙基硫苷合成中,初级代谢和次级代谢是两个互相竞争的过程,硫苷作为一类与植物抗逆性相关的次生代谢物,在适当的胁迫环境下,细胞中参与次级代谢的物质增加,烯丙基硫苷含量也随之升高。所以本文结果中低浓度糖的烯丙基硫苷含量之所以高于高浓度糖的,可能与上述原因有关。

参考文献

- 何洪巨, 陈杭, Schniteler WH (2002). 芸薹属蔬菜中硫代葡萄糖苷鉴定与含量分析. 中国农业科学, 35 (2): 192~197
- 王庆仁, 林葆, 李继云(1999). 含硫硒化合物在油菜中的积累及其对硫苷水平的影响. 生态学报, 19 (4): 546~550
- 吴谋成, 况成尘, 黄伟(1995). 用液相制备色谱从菜籽中分离、纯化、制备硫代葡萄糖苷. 色谱, 13 (1): 4~7
- 杨广兴, 李胜, 李唯, 张真, 李婷, 王新宇, 杨德龙, 王彦军(2007).

- 几种外源含氮化合物对草麻黄愈伤组织增殖和麻黄碱含量的影响. 植物生理学通讯, 43 (1): 49~52
- 翟建华, 王蓓, 刘向欣, 曹小妹(2008). 异硫氰酸烯丙酯的常用制法及其主要功效. 中国调味品, 4 (4): 20~24
- 张真, 李胜, 李唯, 刘媛, 吴兵, 张青松, 李婷(2008). 不同光质光对葡萄愈伤组织增殖和白藜芦醇含量的影响. 植物生理学通讯, 44 (1): 106~108
- Bartlet E, Kiddle G, Williams I, Wallsgrove R (1999). Wound-induced increases in the glucosinolate content of oilseed rape and their effect on subsequent herbivory by a crucifer specialist. Entomol Exp Appl, 91: 163~167
- Grubb CD, Abel S (2006). Glucosinolate metabolism and its control. Trends Plant Sci, 11 (2): 89~100
- Nafisi M, Sonderby IE, Hansen BG, Geu-Flores F, Nour-Eldin HH, Norholm MHH, Jensen NB, Li J, Halkier BA (2006). Cytochromes P450 in the biosynthesis of glucosinolates and indole alkaloids. Phytochem Rev, 5: 331~346
- Wielanek M, Urbanek H (1999). Glucotropaeolin and myrosinase production in hairy root cultures of *Tropaeolum majus*. Plant Cell Tiss Org Cul, 57: 39~45