

十字花科蔬菜萝卜硫素合成代谢相关基因及外源调控

毛舒香 王军伟 徐浩然 邹苗 黄英娟 柏艾梅 王圣泽 黄科* 吴秋云*

(湖南农业大学园艺园林学院, 长沙 410128)

摘要 萝卜硫苷是十字花科蔬菜中一种重要的次级代谢产物, 其水解产物萝卜硫素对人体有明显的抗氧化和防癌抗癌功效。在十字花科蔬菜中萝卜硫素的前体物质萝卜硫苷的合成阶段分为: 氨基酸侧链的延长、核心结构的形成、侧链的次级修饰; 萝卜硫苷经由黑芥子酶水解成萝卜硫素。该文综述了萝卜硫苷合成及调控相关基因(*BCAT*、*MAM*、*CYP79/CYP83*、*AOP*和*MYB*基因家族)的研究进展, 及外源物质如: NaCl、肥料(硫、氮、硒)、植物激素(茉莉酸甲酯、油菜素内酯、生长素)、氨基酸等对萝卜硫素合成代谢途径的影响, 为萝卜硫素合成代谢途径从基因表达方面进行深入研究奠定理论基础。

关键词 硫苷; 萝卜硫苷; 萝卜硫素; 基因; 外源物质

Anabolism Relative Genes and Allogenic Material Regulation of Sulforaphane in Cruciferous Vegetables

Mao Shuxiang, Wang Junwei, Xu Haoran, Zou Miao, Huang Yingjuan, Bai Aimei, Wang Shengze, Huang Ke*, Wu Qiuyun*

(College of Horticulture and Landscape Architecture, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract Glucosinolates are important sulfur-rich secondary metabolites in cruciferous vegetables, and the hydrolysate (sulforaphane) has important anticarcinogenic and health-promoting antioxidants biological role for human. This overview includes genes in glucosinolates biosynthetic pathway, i.e. side-chain elongation of precursor amino acids, formation of the core glucosinolate structure and side-chain decoration and in glucoraphanin degradation, such as: *BCAT*, *MAM*, *CYP79/CYP83*, *AOP* and *MYB* gene families, and incorporates allogenic material that to influence sulforaphane accumulation, e.g. NaCl, fertilization (S, N, Se), phytohormones (JA, BRs, IAA), amino acid and so on. This work was to lay theoretical foundation from gene expression of the pathway on sulforaphane biosynthesis and metabolism.

Keywords glucosinolates; glucoraphanin; sulforaphane; gene; allogenic material

萝卜硫素(1-异硫氰酸-4-甲磺酰基丁烷, sulforaphane, SF)是一种异硫氰酸盐, 由十字花科植物特有的次级代谢产物硫代葡萄糖苷(glucosinolates, GLS)经黑芥子酶(myrosinase enzyme)水解而来^[1-2]。萝卜硫素是迄今为止公认的在蔬菜中已知最强的抗

癌、防癌天然活性成分之一^[3], 能在癌症前期、中期、扩散期发挥极强的抗癌抑癌作用, 尤其对肝癌、乳腺癌、肺癌、食道癌、前列腺癌和胃癌具有较强的阻断作用。萝卜硫素在十字花科蔬菜中大量存在, 以甘蓝类蔬菜含量最高, 但其含量因基因型的差异

收稿日期: 2017-12-26

接受日期: 2018-04-18

国家自然科学基金(批准号: 31772325)、湖南省自然科学基金(批准号: 2017JJ2118)、湖南省教育厅重点项目(批准号: 16A093)、湖南省重点研发计划(批准号: 2016NK2185、2016WK2007)和农业部开放课题(批准号: IVF201702)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13973136794, E-mail: huangkeqy@hotmail.com; Tel: 13507402011, E-mail: qiuyunhk@hotmail.com

Received: December 26, 2017

Accepted: April 18, 2018

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31772325), the Hunan Natural Science Foundation (Grant No.2017JJ2118), the Key Projects of the Hunan Provincial Education Department (Grant No.16A093), the Key Research and Development Plan of Hunan Province (Grant No.2016NK2185, 2016WK2007) and the Open Subject of the Ministry of Agriculture (Grant No.IVF201702)

*Corresponding authors. Tel: +86-13973136794, E-mail: huangkeqy@hotmail.com; Tel: +86-13507402011, E-mail: qiuyunhk@hotmail.com

网络出版时间: 2018-07-16 10:58:24

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180716.1058.002.html>

而存在较大的差异^[2]。此外,萝卜硫素合成代谢还受诸多的外界环境条件影响,如外源信号物质、温度、光照、机械伤害、昆虫取食等^[4-5]。外源物质诱导是提高十字花科蔬菜中萝卜硫素含量的一种有效和简便的方法^[5],具有较高的利用前景和研究价值。本文在前人研究的基础上总结了萝卜硫素合成过程中的相关代谢基因和调控基因以及外源物质对萝卜硫素的调控作用,以期对十字花科蔬菜中萝卜硫素的代谢调控提供借鉴。

1 萝卜硫素合成相关基因研究进展

萝卜硫素在青花菜中最早被发现^[6],由脂肪族硫苷4-甲基亚磺酰丁基硫苷(glucoraphanin, RAA)降解而成的一种异硫氰酸盐。RAA又称萝卜硫苷,分子式为 $C_{12}H_{22}NO_{10}S_3$ (图1),相对分子质量为436.5。萝卜硫素在萝卜硫苷的降解产物中含量最高^[7]。萝卜硫素的合成代谢途径较为复杂。萝卜硫素的合成以甲硫氨酸为起始底物,后经历从氨基酸的延伸到醛肟的生成,再经过氧化、裂解和硫酸化等作用而形成最终的硫苷,此过程可概括为:硫苷R侧链延伸、硫苷核心结构合成、硫苷R侧链修饰(图2)。根据R侧链的不同,硫苷又分为脂肪族硫苷、芳香族硫苷和吲哚族硫苷^[8]。最后,当植物组织受到损伤时,

储存于液泡中的硫苷与储存在胞质中的黑芥子酶结合,脂肪族硫苷被水解生成萝卜硫素^[9]。

1.1 参与硫苷侧链延伸的基因

硫苷合成的前体氨基酸在合成核心结构之前,单个氨基酸需要通过一系列的缩合反应以延长氨基酸侧链。该过程由支链氨基酸转氨酶(branched-chain amino acid aminotransferase, BCAT)发生脱氨基作用,生成与之相应的含氧酸,随后进入一个由3个连续的酶催化并依次交替的循环中:由MAMs催化的缩合反应、IPMIs催化的异构化反应和由IPMDH催化的氧化脱羧作用。经过循环,将亚甲基基团($-CH_2-$)加在氨基酸的侧链上^[10-11]。

BCAT是包括了7个基因的基因家族,在硫苷侧链延长中起到脱氨基作用。酵母互补的实验中发现,BCAT4酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)突变体未能恢复BCAT缺陷^[12]。Schuster等^[13]证实了BCAT4能够在体外催化甲硫氨酸生成相应的含氧酸,对甲硫氨酸和其同源衍生物表现出很高的活性。但在BCAT4突变体中脂肪族硫苷的含量明显减少,仅为原来的一半,而游离的甲硫氨酸明显增加,这表明BCAT4催化了硫苷侧链延伸的脱氨基作用。同时,BCAT4的活性还受机械损伤及病虫取食等因素影响^[14]。此外,尹玲^[15]推测,BCAT4可能参与植物防御的调控反应。

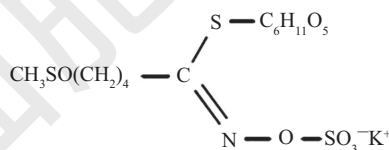


图1 萝卜硫苷的基本结构

Fig.1 The structure of glucoraphanin

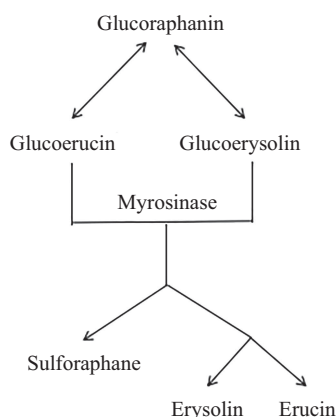


图2 萝卜硫素的生物合成途径(根据参考文献[15]修改)

Fig.2 The biosynthesis pathway of sulforaphane (modified from reference [15])

在*BCAT3*缺失突变体中, 有长链脂肪族硫苷积累, 而拟南芥中, 来源于缬氨酸和亮氨酸的长链脂肪族硫苷一般不积累, 且体外重组实验显示, *BCAT3*对亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸以及甲硫氨酸来源的含氧酸的转氨作用有很高的活性^[16]。但是, 目前*BCAT4*和*BCAT3*这两个基因在硫苷R侧链延伸中的脱氨基和转氨基作用方面需要进一步深入的研究。

甲硫烷基化苹果酸合成酶(methylthioalkylmalatesynthase, MAM)基因家族主要控制以甲硫氨酸为起源的脂肪族硫苷侧链延长^[17-18]。由于*MAM*基因功能在不同生态型植物中存在差异性, *MAMI*基因在拟南芥Columbia生态型的甲硫氨酸侧链延长的循环缩合反应中, 参与前两个循环, 且其编码生成的甲硫烷基化苹果酸合成酶, 能用于催化甲硫氨酸链中的1~2个亚甲基, 使单同源甲硫氨酸延长为双同源甲硫氨酸, 形成有3~4个碳侧链的脂肪族硫苷^[23]。而*MAMI*基因在拟南芥Landsberg erecta生态型中却没有此种催化活性^[17], 该发现解释了不同生态型之间硫代葡萄糖苷存在差异的原因。Kroymann等^[21]研究发现, 在拟南芥中, *MAM2*基因仅能在甲硫氨酸侧链延长的第一个缩合反应中起到催化作用, 而*MAM3*基因在其全部六个循环中都能催化。

*MAMI*和*MAM3*基因对外源MeJA处理响应强烈, 并且有相同变化趋势。在*MAMI*缺失的突变体中, *MAM3*对MeJA响应强烈, 并且呈现先升高后略微下降的趋势, 而在*MAM3*缺失突变体中, *MAMI*对MeJA的响应相对微弱, 且*MAMI*的表达量也较低。可能的原因是*MAMI*的底物范围窄、专一性高、效率高, 而*MAM3*的底物范围宽、专一性低、效率低。外源SA的处理, 在短期内会先抑制*MAMI*和*MAM3*, 一段时间后表现为促进作用^[26]。

1.2 参与硫苷核心结构合成的基因

硫苷核心结构合成的途径主要是将侧链延伸后的氨基酸经过一系列酶的催化反应合成硫苷的核心结构, 已经确定了中间产物有: 乙醛肟(aldoximes)、S-烷基硫代烷肟(S-alkylthiohydroximates)、N-羟基氨基酸(N-hydroxyaminoacids)、脱硫硫苷(desulfoglucosinolates)和硫代肟基酸(thiohydroximicacids)等。多功能酶细胞色素P450(CYP450)催化氨基酸转化为乙醛肟这一关键步骤的发现, 硫苷核心结构合成过程共包括5个步骤、13个酶参与^[3]。

第1步, 细胞色素P450(cytochrome P450)中的CYP79酶家族单加氧酶催化将前体氨基酸转变为乙醛肟^[23-24]。研究发现, 细胞色素P450的同族物CYP79家族中有7个有功能的同族体在拟南芥中被成功鉴定出来, 其中有5个得到确认, 它们能催化氨基酸形成乙醛肟-硫苷前体。然而CYP79家族中同族体对底物具有特异性, 其中CYP79A2的催化底物为苯丙氨酸以产生芳香族乙醛肟, CYP79B3和CYP79B2的催化底物为色氨酸以产生3-吲哚-乙醛肟(indole-3-acetaldoxime, IAOx), 而甲硫氨酸的衍生物由CYP79F1和CYP79F2催化, 合成脂肪族乙醛肟。在拟南芥CYP79A1超表达突变体的研究中, 羟苯甲基硫苷水平显著上升, 而野生型无此现象^[25]。CYP79A2基因在大肠杆菌中的表达能够积累苯丙基硫苷^[26]。有研究者认为, 超表达外源CYP79同族体, 或者下调、剔除和超表达内源CYP79同族体, 均能引起植物体内硫苷含量的变化^[25]。

目前, 相关研究表明, *CYP79B2*在硫苷合成和生长素合成的过程中起重要作用。宋傲男等^[27]同时在甘蓝型油菜高秆高硫苷品系(野生型)、矮秆高硫苷品系(突变体)、高秆低硫苷品系(突变体)中克隆了*CYP79B2*, 分析该基因在不同品系不同组织不同时期的表达量发现, *CYP79B2*基因的相对表达量在矮秆突变体中低于野生型, 且高硫苷品系高于低硫苷品系的表达量。他们的结果表明, 植株矮化和种子硫苷含量减少可以使甘蓝型油菜中CYP79B2家族基因表达量降低。在拟南芥中, *CYP79B2*、*CYP79B3*在地上组织中的表达量相对较低, 而根中的表达量较高并且明显受到低温、渗透胁迫、高盐和高温的抑制^[28]。

第2步, 乙醛肟被细胞色素P450中的CYP83家族酶催化形成氧化腈(nitrileoxide)或不稳定酸式硝基化合物(aci-nitrocompounds)。其中, 脂肪族的乙醛肟由CYP83A1催化, 而色氨酸和苯丙氨酸来源的乙醛肟由CYP83B1催化。随后被活化的氧化腈或硝基化合物在非酶促条件下自发的与硫醇(thiols)类的硫供体结合^[34], 形成S-烷基硫肟酸共轭物(S-alkylthiohydroximateconjugates)^[3]。

Weis等^[30]研究拟南芥CYP83A1缺失突变体和十字花科白粉菌时发现, 与野生型相比, 缺失CYP83A1基因导致拟南芥脂肪族硫苷显著减少的情况下, 对十字花科白粉菌的敏感性增强。该发现说明, 拟南

芥中由*CYP83A1*基因调控生成的脂肪族硫苷能在真菌的防御中起到积极作用。有研究发现, *CYP83A1*以其具有的代谢吡啶族乙醛肟, 在转入过表达*CYP83A1*基因的*CYP83B1*剔除的拟南芥突变体中, 使得敲除*CYP83B1*拟南芥突变体中能有吡啶族硫苷的合成, 说明*CYP83A1*功能上可以弥补*CYP83B1*基因的功能。在*CYP83A1*过量表达的转基因植株还显示出早花现象, 说明植物体中激素含量也相应增加, 预测*CYP83A1*基因与激素合成有关^[30]。

第3步, S-烷基硫脲酸共轭物被C-S裂解酶(C-S lyase)裂解, 形成三种物质, 氨、硫脲酸和丙酮酸。当前, C-S裂解酶SUR1在油菜、甘蓝和拟南芥等植物中得到了纯化^[31-32]。

第4步, 葡萄糖基转移酶(UDP-glucosyltransferase, UGT74B1)或葡萄糖基转移酶(S-glucosyltransferase, S-GT)催化硫氢脲与葡萄糖结合生成无硫硫苷。其中, 苯丙氨酸来源的硫氢脲由UGT74B1催化, 而甲硫氨酸来源的硫氢脲由UGT74C1催化^[33-34]。

第5步, 3'-磷酸腺苷-5'-磷酸硫酸(3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate, PAPS)参与脱硫硫苷磺酸基转移酶(desulfoglucosinolate sulfotransferase, AtST5a、AtST5b或AtST5c)催化脱硫硫苷的过程, 从而形成硫苷的基本结构^[35]。在拟南芥中, 目前已发现了SOT16、SOT17和SOT18等三种磺基转移酶。其中, SOT16负责催化色氨酸和苯丙氨酸来源的脱硫硫苷, 而SOT17和SOT18负责催化长链的脂肪族脱硫硫苷^[36]。

1.3 参与硫苷R侧链次级修饰的基因

硫苷的生物活性在一定程度上取决于其R侧链的结构, 将硫苷的R侧链进行不同的修饰, 可产生出结构和特性非常丰富的硫苷, 使得硫苷的降解产物具有丰富的物理化学性质^[37]。脂肪族硫苷的R侧链修饰主要包括氧化、羟基化、烯基化和苯甲酰化等^[23]。

硫苷的R侧链的修饰, 由AOP(2-oxoglutarate-dependent dioxygenases)基因家族参与完成。目前, 已经在拟南芥中, 用QTL定位技术发现了控制脂肪族硫苷侧链变异的四个基因位点, 为*GS-ELONG*、*GS-OX*、*GS-AOP*和*GS-OHP*^[38]。*GS-AOP*位点由*GS-ALK*和*GS-OHP*两个紧密连锁的位点组成^[10], 进一步精细定位发现了*GS-Null*位点。*GS-ALK*、*GS-OHP*、*GS-Null*分别调控烯基侧链, 羟烷基侧链和甲酰基侧链的合成。利用两种不同生态型的拟南芥重组自交系, 鉴定出*AOP1*、*AOP2*和*AOP3*三个基因^[19]。有研究发现, *AOP2*能够催化3-甲基亚磺酰丙基硫苷和4-甲基亚磺酰丁基硫苷形成相应的烯基硫苷, *AOP3*能够催化3-甲基亚磺酰丙基硫苷转化为3-羟基丙烷硫苷。*AOP1*被认为是*AOP2*和*AOP3*起源祖先基因, 其功能还需进一步鉴定^[15]。在杜海等^[28]的研究中, 脂肪族硫苷合成相关基因在营养组织中具有较高的表达量, 在种子组织中的表达量则相对较低。

1.4 参与萝卜硫苷降解的相关基因

当植物组织受到机械损伤后, 储存在植物细胞液泡中的硫苷和特定蛋白体中的硫代葡萄糖苷酶(通

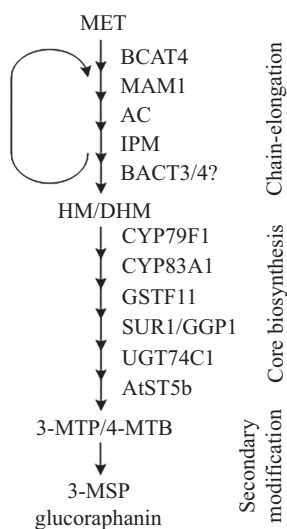


图3 萝卜硫苷的生物合成途径(根据参考文献[15]修改)

Fig.3 The biosynthesis pathway of glucoraphanin (modified from reference [15])

常称芥子酶, myrosinase, MY)相遇, 硫苷降解成大量的生物活性物质, 如异硫氰酸盐和腈等^[39]。在反应过程中, 硫苷首先水解成一种不稳定糖苷配基(硫代天冬氨酸异羟肟酸-O-磺酸盐)和一个葡萄糖分子, 不稳定糖苷配基依赖其结构、Fe离子浓度、pH值和表皮特异硫蛋白(epithospecifier proteins, ESP)重排而形成不同的产物。异硫氰酸盐, 在中性条件下(pH值为5~7范围内)由糖苷配基降解生成^[3]。黑芥子酶是一类同功酶, 在芸苔属植物中主要由MA、MB和MC基因家族编码内源硫代葡萄糖苷酶^[40]。Barth等^[41]的研究发现, 拟南芥中的硫代葡萄糖苷酶主要由TGG1、TGG2等TGG(beta-thioglucoside glucohydrolase)家族基因编码调控, 且生物活性受到pH值、温度和一些离子的影响。

2 萝卜硫素合成调控相关基因

由于萝卜硫素具有的独特生物学功能, 近年来大量关于萝卜硫素合成与调节基因的研究已经展开。研究结果显示, 萝卜硫素合成途径的四个阶段中BCAT、MAM、CYP79/CYP83、AOP基因家族决定萝卜硫素的基本结构, 而MYB基因家族为转录因子调控上述基因表达^[3]。

植物MYB转录因子最早在1987年被发现。随着对MYB基因研究的深入, 学者发现, 其普遍存在于植物中, 在转录调节中作为调节蛋白起着非常重要作用^[42]。MYB转录因子参与了对植物次生代谢、植物生长中的信号转导、植物细胞形态的建成和分化、生物和非生物胁迫的应答的调控等^[42]。

MYB是植物转录因子中最大的家族之一。在众多的MYB转录因子中, R2R3-MYB是转录因子数目最多的一类转录蛋白^[43]。R2R3-MYB的转录因子中, 调节硫苷代谢的主要是第12亚组的6个成员: MYB28、MYB29、MYB34、MYB51、MYB76、MYB122^[49], 其中, 脂肪族硫苷合成由MYB28、MYB29和MYB76调控, 吡咯族硫苷合成由MYB34、MYB51和MYB122调控。目前的研究结果显示, 这6个MYB调控因子均为正调控因子, 且这6个基因的过量表达可由外源激素施用或受伤诱导引起, 从而使植株体内脂肪族硫苷和吡咯族硫苷得到积累^[8]。MYB28基因在脂肪族硫苷合成中起着关键作用, 调控甲硫氨酸衍生成脂肪族硫苷的整条通路, MYB29基因还参与由茉莉酸甲酯介导的脂肪族硫苷合成^[19]。

Sønderby等^[45]的研究发现, MYB28、MYB29和MYB76基因的表达水平, 与其在缺失突变体中硫苷的累积水平不是十分耦合, 这表明, 硫苷调控因子对硫苷的积累可能不是简单的线性关系, 可能有着部分相似的硫苷累积的表型。Sønderby等^[45]推测, 在植物硫苷代谢过程中, 当一个或一类调控因子功能缺失后, 其他相似的调控因子则会被激活并弥补这种缺失, 以维持植物体内硫苷水平的动态平衡。

此外, 研究发现, 植物体内的MYB28受到外源施入糖水平的刺激, 诱导其表达量升高, 与其同源性最高的MYB29则负责响应茉莉酸甲酯来调控硫苷代谢, 但其表达受到水杨酸的抑制^[8]。

MYB34、MYB51和MYB122是调控吡咯族硫苷合成的转录因子, 在MYB34基因的超表达转基因植株中被发现, 叶片中吡咯族硫苷得到积累, 而叶片中几乎检测不到MYB34的表达, 这解释了硫代葡萄糖苷的分子运输机理。触摸或受伤能够诱导MYB51基因并过量表达, 吡咯族硫苷合成基因启动子也由MYB51激活表达, 该基因调控CYP79B2、CYP79B3、CYP83B1、UTG74B1等吡咯族硫苷合成相关基因的表达^[15]。MYB122单独过表达或功能突变对植物吡咯族硫苷的影响不显著, 而Frerigmann等^[46]发现, MYB122可以不依赖于MYB34和MYB51在植物体内单独作用。

有研究进一步发现, 吡咯族硫苷代谢途径上的吡咯-3-乙醛肟(IAOx)和一些吡咯族硫苷的衍生物, 是植物体内合成植保素(camalexin)、生长素以及一些色氨酸来源的代谢物的共同底物, MYB34和MYB51通过调控IAOx的流向可以调控这些代谢产物^[47-48]。

3 外源物质调控萝卜硫素

在前人的研究中, 外源信号物质能影响到萝卜硫素在十字花科蔬菜植株体内的积累, 下面从NaCl、植物激素、肥料、氨基酸四个方面论述其对萝卜硫素合成的影响。

NaCl能作用于硫苷合成和黑芥子酶系统, 从而对萝卜硫素合成产生影响。研究表明, NaCl能积累青花菜中的硫苷, Carmen等^[54]发现, 与40 mmol/L NaCl处理拟南芥相比, 80 mmol/L NaCl处理的芥兰叶片中硫苷含量明显偏高, 这和Zaghdoud等^[50]的实验结果一致。在生长4天和7天的青花菜苗中, NaCl

的施用反而降低了硫苷的含量,这可能与青花菜幼苗快速生长过程中 Na^+ 和 Cl^- 有效利用有关,且黑芥子酶在青花菜幼苗中的活性也会被高浓度 NaCl 抑制^[51]。有研究发现,在盐胁迫下甘蓝中的硫苷含量比在正常生长条件下要低^[52]。对于耐盐的小盐芥,较高的盐浓度能够提高黑芥子酶的活性和硫苷的生物合成^[29]。在十字花科植物中,硫苷含量和黑芥子酶的活性受植物本身耐盐性影响,而且也受到植物不同生长阶段的影响。

硫苷是植物体内S和N的次生代谢物,在植物生长过程中硫肥和氮肥的施用直接影响着萝卜硫苷的降解产物萝卜硫素的含量,在Schonhof等^[58]的研究中,施氮肥会引起青花菜中硫苷含量的下降而氮素的缺失会使青花菜植株中硫苷积累。但是在对油菜和印度芥菜的研究中,结果与青花菜相反。这说明,氮素的施用对不同品种的植物的响应度不同^[59-60]。S肥对多数十字花科蔬菜中硫苷的含量都有促进作用,而土壤中硫素的缺乏,会使植物体内硫苷含量减少,以满足其他需硫的生长代谢过程^[61]。在青花菜苗生长过程中增施 K_2SO_4 会增加硫苷的含量^[62]。硒有着与硫相同的代谢途径,能够影响植株对土壤中硫的吸收,以此引起植株生物合成和代谢的变化,尤其影响含硫化合物的合成,因此硫代谢和硒代谢引起了很多学者的关注。林俊城等^[63]认为,硒能降低青花菜中吲哚族硫苷、脂肪族硫苷含量以降低植物体内总硫苷含量,经过硒处理的萝卜硫素含量是未经硒处理萝卜硫素含量的15%,这表明,硒硫在植物代谢过程中有着竞争抑制的关系。

金属离子 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Fe^{2+} 由于能改变蛋白结构而影响黑芥子酶活性,不利于萝卜硫素的合成^[64]。

一些植物激素的刺激,能使植物体内萝卜硫素含量升高,如茉莉酸甲酯、油菜素内酯和生长素等。Liuann等^[53]的研究显示,250 $\mu\text{mol/L}$ 茉莉酸甲酯的施用能显著增加青花菜中吲哚族硫苷的含量,同时脂肪族硫苷含量变化不大。Van等^[54]在独立实验中获得了同样的实验结果,茉莉酸甲酯的施用使得吲哚族硫苷的含量提高了3至20倍。在油菜素内酯对拟南芥硫苷含量的影响中,硫苷水平呈下降趋势^[55],该结果与青花菜相同。由于吲哚族硫苷和生长素吲哚乙酸共同前体物质都是吲哚乙醛肟,所以生长素的施用能够显著提升青花菜中硫苷的水平,以吲哚族

硫苷更为显著^[56]。但生长素对硫苷含量的效应还受生长素的种类和浓度影响,0.1 mg/L吲哚乙酸能显著提高硫苷的含量,相同浓度的吲哚丁酸和萘乙酸则会降低硫苷水平^[57]。

氨基酸是萝卜硫素的最初合成前体,如甲硫氨酸,则萝卜硫素的含量也受外源施入的氨基酸影响。在翟志亭等^[65]的实验中,不同种类氨基酸喷施没有引起甘蓝叶片中硫苷的组分改变,而能显著影响总硫苷含量,甲硫氨酸和半胱氨酸喷施使萝卜硫素的含量积累。甲硫氨酸能提高7天苗龄青花菜芽的脂肪族硫苷,色氨酸则能使吲哚族硫苷增加近2倍,同时使萝卜硫素含量升高^[66]。

4 问题与展望

迄今为止,萝卜硫素是公认的抗癌活性最强的代谢物质,其合成代谢途径越来越引起人们的广泛关注。但在基因层面上,研究者在萝卜硫素的合成前体硫苷上的研究较多,且主要集中在模式植物拟南芥上。在对拟南芥的研究中,*MAM*家族基因不同生态型中的硫苷合成存在明显的差异,在十字花科蔬菜中,*MAM*家族基因对萝卜硫素的合成前体萝卜硫苷的影响还需开展深入的研究。*AOP*家族基因在植物不同器官中的表达量不同,控制催化4-甲基亚磺酰丁基硫苷形成相应的烯炔基硫苷的*AOP2*基因在茎和叶中的表达量大于花中的表达量^[28]。实验证明,十字花科蔬菜的花和种子中萝卜硫素的含量高于其他植物器官,这引发研究者对硫苷在植物体内运输机理的思考^[67]。3类硫苷在植物体类的比例受到外源物质的影响,而我们的目标物质脂肪族萝卜硫苷在外源物质的影响下将如何变化,还需要进一步研究。萝卜硫素的合成还受到黑芥子酶系统的作用,外源物质对编码和调控黑芥子酶生成的基因的影响、黑芥子酶在特定十字花蔬菜中的活性及酶解条件都会影响获得萝卜硫素的量。

综上所述,为得到高萝卜硫素含量的十字花科蔬菜,还需利用外源物质的刺激,结合现有的基因功能分析、转录组分析及代谢组分析等技术,逐步弄清萝卜硫素合成代谢过程中相关基因调控和转录的机理,从基因层面解释萝卜硫素在十字花科蔬菜中萝卜硫素含量变化的原因。本文综述了影响十字花科蔬菜萝卜硫素合成代谢相关基因及外源物质调控的影响,旨在获得高萝卜硫素蔬菜的生产方法,并且

通过对萝卜硫苷降解条件的调控, 提高萝卜硫苷水解过程中萝卜硫素的产量。

参考文献 (References)

- 1 周晨光, 朱毅, 罗云波. 十字花科蔬菜中萝卜硫素含量的影响因素. 食品工业科技(Zhou Chenguang, Zhu Yi, Luo Yunbo. Research advances in content variation of sulforaphane in brassicaceous vegetables. Science and Technology of Food Industry) 2013; 34(12): 371-5.
- 2 姚丹燕, 吴秋云, 李倩, 黄科. 萝卜硫素调控机制的研究进展. 园艺学报(Yao Danyan, Wu Qiuyun, Li Qian, Huang Ke. Research progress in regulatory mechanism of sulforaphane. Acta Horticulturae Sinica) 2014; 41(5): 1020-6.
- 3 高灿红, 董丽丽, 关晓弯, 赵良侠, 林俊城, 徐福乐, 等. 青花菜萝卜硫素合成相关基因BoCYP83A1的克隆与表达分析. 西北植物学报(Gao Canhong, Dong Lili, Guan Xiaowan, Zhao Liangxia, Lin Juncheng, Xu Fule, et al. Cloning and expression analysis of sulforaphane synthesis-related gene BoCYP83A1 in broccolil. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica) 2016; 36(7): 1302-7.
- 4 Bohinc T, Trdan S. Environmental factors affecting the glucosinolate content in Brassicaceae. J Food Agri Environ 2012; 10(2): 357-60.
- 5 Pérez-Balibrea S, Moreno DA, García-Viguera C. Genotypic effects on the phytochemical quality of seeds and sprouts from commercial broccoli cultivars. Food Chem 2011; 125(2): 348-54.
- 6 Zhang Y, Cho CG, Posner GH, Talalay P. Spectroscopic quantitation of organic isothiocyanates by cyclocondensation with vicinal dithiols. Anal Biochem 1992; 205(1): 100-7.
- 7 江敏. 萝卜硫苷的分离纯化工艺研究(硕士论文). 合肥工业大学(Jiang Min. Studies on technology of isolation and purification of gulcoraphanin. Hefei University of Technology), 2012.
- 8 张园园. 油菜和拟南芥中几个硫代葡萄糖苷合成及调控基因的功能分析(博士论文). 华中农业大学(Zhang Yuanyuan. Function annalysis of several genes involved in biosynthesis and regulation of glucosinolate in brassica napus Arabidopsis thaliana. Huazhong Agricultural University), 2015.
- 9 江定, 陈国菊, 雷建军, 曹必好, 陈长明. 硫代葡萄糖苷运输的生理生化及分子机理研究进展. 植物生理学报(Jiang Ding, Chen Guoju, Lei Jiangjun, Cao Bihao, Chen Changming. Advances in the physiological, biochemical and molecular mechanisms of glucosinolate transport. Plant Physiology Journal) 2017; 53(1): 29-37.
- 10 祝彪. 外源植物生长调节物质对小白菜硫代葡萄糖苷的影响及相关合成基因表达研究(博士论文). 浙江大学(Zhu Biao. Studies on the effects of plant growth regulators on glucosinolates and the expression of related genes in pakchoi. Zhejiang University) 2012.
- 11 Sønderby IE, Geu-Flores F, Halkier BA. Biosynthesis of glucosinolates-gene discovery and beyond. Trends Plant Sci 2010; 15(5): 283-90.
- 12 Diebold R, Schuster J, Däschner K, Binder S. The branched-chain amino acid transaminase gene family in Arabidopsis encodes plastid and mitochondrial proteins. Plant Physiol 2002; 129(2): 540-50.
- 13 Schuster J, Knill T, Reichelt M, Gershenzon J, Binder S. Branched-chain aminotransferase4 is part of the chain elongation pathway in the biosynthesis of methionine-derived glucosinolates in Arabidopsis. Plant Cell 2006; 18(10): 2664-79.
- 14 刘哲, 张秋萍, 苏小俊, 娄丽娜. 萝卜硫苷合成和调节相关基因研究进展. 江苏农业科学(Liu Zhe, Zhang Qiuping, Su Xiaojun, Lou Lina. Advances of the related genes in glucosinolates synthesis and regulation. Jiangsu Agricultural Sciences) 2015; 43(6): 168-70.
- 15 尹玲. 芥蓝萝卜硫苷生物合成主要基因表达特性及功能鉴定(博士论文). 华南农业大学(Yin Lin. Molecular cloning, expression pattern and characterization on glucoraphanin biosynthetic related genes in Chinese Kale-Brassica oleracea var. alboglabra Bailey. South China Agricultural University), 2016.
- 16 Knill T, Schuster J, Reichelt M, Gershenzon J, Binderet S. Arabidopsis branched-chain aminotransferase 3 functions in both amino acid and glucosinolate biosynthesis. Plant Physiol 2008; 146(3): 1028-39.
- 17 Kroymann J, Textor S, Tokuhisa JG, Falk KL, Bartram S, Gershenzon J, et al. A gene controlling variation in Arabidopsis glucosinolate composition is part of the methionine chain elongation pathway. Plant Physiol 2001; 127(3): 1077-88.
- 18 Textor S, de Kraker JW, Hause B, Gershenzon J, Tokuhisa JG. MAM3 catalyzes the formation of all aliphatic glucosinolate chain lengths in Arabidopsis. Plant Physiol 2007; 144(1): 60-71.
- 19 程坤, 杨丽梅, 方智远, 刘玉梅, 庄木, 张扬勇, 等. 十字花科植物中主要硫代葡萄糖苷合成与调节基因的研究进展. 中国蔬菜(Cheng Kun, Yang Limei, Fang Zhiyuan, Liu Yumei, Zhuang Mu, Zhang Yangyong, et al. Research progress on regulation and synthesis genes on glucosinolates biosynthesis in crucifer. China Vegetables) 2010; 1(12): 1-6.
- 20 李娟, 朱祝军. 植物中硫代葡萄糖苷生物代谢的分子机制. 中国细胞生物学学报(Li Juan, Zhu Zhujun. Molecular mechanisms of biological metabolism of glucosinolates in plant. Chinese Journal of Cell Biology) 2005; 27(5): 519-24.
- 21 Kroymann J, Donnerhacke S, Schnabelrauch D, Mitchell-Olds T. Evolutionary dynamics of an Arabidopsis insect resistance quantitative trait locus. Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100(24): 14587-92.
- 22 唐小燕. 拟南芥MAM1和MAM3基因对三种信号分子的响应(硕士论文). 东北林业大学(Tang Xiaoyan. Respons of MAM1 and MAM3 to the induction of three signaling molecules in Arabidopsis thaliana. Northeast Forestry University), 2011.
- 23 廖永翠. 白菜类作物硫代葡萄糖苷结构和含量的分析及QTL定位(硕士论文). 西南大学(Liao Yongcui. Analysis of structure and content of glucosinolates and QTL location in Brassica Rapa. Southwest University), 2011.
- 24 牟晓飞. 拟南芥芥子油苷对UV-B辐射的响应(硕士论文). 东北林业大学(Mu Xiaofei. Respons of glucosinolate in Arabidopsis thaliana to UV-B radiation. Northeast Forestry University), 2012.
- 25 宋廷宇. 藜菜品质分析及种质资源的亲缘关系研究(博士论文). 南京农业大学(Song Tingyu. Quality analysis and studies on relationship of genetic resources of TAI-TSAI. Nanjing Agricultural University), 2009.
- 26 Wittstock U, Halkier BA. Cytochrome P450 CYP79A2 from Arabidopsis thaliana L. Catalyzes the conversion of L-phenylalanine to phenylacetaldoxime in the biosynthesis of

- benzylglucosinolate. *J Biol Chem* 2000; 275(19): 14659-66.
- 27 宋傲男, 程文财, 刘彩霞, 赵云, 王茂林. 甘蓝型油菜 *BnCYP79B1* 基因的克隆与表达. 西北植物学报(Song Aonan, Cheng Wencai, Liu Caixia, Zhao Yun, Wang Maolin. Molecular cloning and expression analysis of *BnCYP79B1* gene from *Brassica napus* L. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*) 2013; 33(6): 1085-90.
 - 28 杜海, 冉凤, 刘静, 文婧, 马珊珊, 柯蕴倬, 等. 拟南芥硫苷生物合成相关基因的组织胁迫诱导表达谱的全基因组分析. 中国农业科学(Du Hai, Ran Feng, Liu Jing, Wen Jing, Ma Shanshan, Ke Yunzhuo, *et al.* Genome-wide expression analysis of glucosinolate biosynthetic genes in *Arabidopsis* across diverse tissues and stresses induction. *Chinese Agricultural Sciences*) 2016; 49(15): 2879-97.
 - 29 Pang QY, Guo J, Chen SX, Chen YZ, Zhang L, Fei MH, *et al.* Effect of salt treatment on the glucosinolate-myrosinase system in *Thellungiella salsuginea*. *Plant Soil* 2012; 355(1/2): 363-74.
 - 30 Weis C, Hildebrandt U, Hoffmann T, Hemetsberger C, Pfeilmeier S, König C, *et al.* *CYP83A1* is required for metabolic compatibility of *Arabidopsis* with the adapted powdery mildew fungus *Erysiphe cruciferarum*. *New Phytol* 2014; 202(4): 1310-9.
 - 31 Reichelt M, Brown PD, Schneider B, Oldham NJ, Stauber E, Tokuhisa J, *et al.* Benzoic acid glucosinolate esters and other glucosinolates from *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* 2002; 59(6): 663-71.
 - 32 Mikkelsen MD, Naur P, Halkier BA. *Arabidopsis* mutants in the C-S lyase of glucosinolate biosynthesis establish a critical role for indole-3-acetaldoxime in auxin homeostasis. *Plant J* 2004; 37(5): 770-7.
 - 33 Grubb CD, Zipp BJ, Ludwig-Müller J, Masuno MN, Molinski TF, Abel S. *Arabidopsis* glucosyltransferase *UGT74B1* functions in glucosinolate biosynthesis and auxin homeostasis. *Plant J* 2004; 40(6): 893-908.
 - 34 Kopycki J, Wieduwild E, Kohlschmidt J, Brandt W, Stepanova AN, Alonso JM, *et al.* Kinetic analysis of *Arabidopsis* glucosyltransferase *UGT74B1* illustrates a general mechanism by which enzymes can escape product inhibition. *Biochem J* 2013; 450(1): 37-46.
 - 35 阮颖, 周朴华, 刘春林. 植物硫代葡萄糖苷-黑芥子酶底物酶系统. 湖南农业大学学报(自科版)(Ruan Yin, Zhou Puhua, Liu Chunlin. Plant glucosinolate-myrosinase substrate-enzyme system. *Journal of Hunan Agricultural University-Natural Sciences*) 2007; 33(1): 18-23.
 - 36 Piotrowski M, Schemenewitz A, Lopukhina A, Müller A, Janowitz T, Weiler EW, *et al.* Desulfoglucosinolate sulfotransferases from *Arabidopsis thaliana* catalyze the final step in the biosynthesis of the glucosinolate core structure. *J Biol Chem* 2004; 279(49): 50717-25.
 - 37 Hopkins RJ, van Dam NM, van Loon JJ. Role of glucosinolates in insect-plant relationships and multitrophic interactions. *Annu Rev Entomol* 2009; 54(1): 57-83.
 - 38 Kliebenstein DJ, Kroymann J, Brown P, Figuth A, Pedersen D, Gershenzon J, *et al.* Genetic control of natural variation in *Arabidopsis* glucosinolate accumulation. *Plant Physiol* 2001; 126(2): 811-25.
 - 39 汪俏梅, 曹家树. 芥子油苷研究进展及其在蔬菜育种上的应用前景. 园艺学报(Wang Qiaomei, Cao Jiashu. Progress of studies on glucosinolates and its application on the of breeding vegetable crops. *Acta Horticulturae Sinica*) 2001; 28(S1): 669-75.
 - 40 谢丽雪, 黄科, 李宾, 黄志伟, 郑金贵. 芥蓝黑芥子酶基因的克隆与原核表达. 福建农林大学学报(自然版)(Xie Xueli, Huang Ke, Li Bing, Huang Zhiwei, Zheng Jingui. Cloning and prokaryotic expression of myrosinase gene from Chinese kale-*Brassica oleracea* L. var. *alboglabra* Bailey. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University-Natural Sciences*) 2008; 37(5): 501-5.
 - 41 Barth C, Jander G. *Arabidopsis* myrosinases TGG1 and TGG2 have redundant function in glucosinolate breakdown and insect defense. *Plant J* 2006; 46(4): 549-62.
 - 42 蒿连梅. 拟南芥转录因子 *MYB28* 和 *MYB51* 对芥子油苷代谢的调控作用(硕士论文). 东北农业大学(Hao Lianmei. The regulation of *MYB28* and *MYB51* transcription factor on glucosinolates metabolism in *Arabidopsis thaliana*. Northeast Agricultural University), 2013.
 - 43 Dubos C, Stracke R, Grotewold E, Weissshaar B, Martin C, Lepiniec L. *MYB* transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci* 2010; 15(10): 573-81.
 - 44 Gigolashvili T, Berger B, Flügge UI. Specific and coordinated control of indolic and aliphatic glucosinolate biosynthesis by R2R3-MYB transcription factors in *Arabidopsis thaliana*. *Phytochem Rev* 2009; 8(1): 3-13.
 - 45 Sønderby IE, Burrow M, Rowe HC, Kliebenstein DJ, Halkier BA. A complex interplay of three R2R3 MYB transcription factors determines the profile of aliphatic glucosinolates in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2010; 153(1): 348-63.
 - 46 Frerigmann H, Gigolashvili T. MYB34, MYB51, and MYB122 distinctly regulate indolic glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant* 2014; 7(5): 814-28.
 - 47 Malitsky S, Blum E, Less H, Venger I, Elbaz M, Morin S, *et al.* The transcript and metabolite networks affected by the two clades of *Arabidopsis* glucosinolate biosynthesis regulators. *Plant Physiol* 2008; 148(4): 2021-49.
 - 48 Zhao Y, Hull AK, Gupta NR, Goss KA, Alonso J, Ecker JR, *et al.* Trp-dependent auxin biosynthesis in *Arabidopsis*: involvement of cytochrome P450s *CYP79B2* and *CYP79B3*. *Genes Dev* 2002; 16(23): 3100-12.
 - 49 Lópezberenguer C, Martínez-Ballesta Mdel C, Moreno DA, Carvajal-M, García-Viguera C. Growing hardier crops for better health: Salinity tolerance and the nutritional value of broccoli. *J Agric Food Chem* 2009; 57(2): 572-78.
 - 50 Zaghoud C, Alcaraz-López C, Mota-Cadenas C, Martínez-Ballesta Mdel C, Moreno DA, Ferchichi A, *et al.* Differential responses of two broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *Italica*) cultivars to salinity and nutritional quality improvement. *ScientificWorldJournal* 2012; 2012(2): 291435.
 - 51 Guo L, Yang R, Wang Z, Guo Q, Gu Z. Effect of NaCl stress on health-promoting compounds and antioxidant activity in the sprouts of three broccoli cultivars. *Int J Food Sci Nutr* 2013; 65(4): 476-81.
 - 52 Khan MAM, Ulrichs C, Mewis I. Water stress alters aphid-induced glucosinolate response in *Brassica oleracea* var. *italica* differently. *Chemoecology* 2011; 21(4): 235-42.
 - 53 Liu AG, Juvik JA, Jeffery EH, Berman-Booty LD, Clinton SK, Erdman JW Jr. Enhancement of broccoli indole glucosinolates

- by methyl jasmonate treatment and effects on prostate carcinogenesis. *J Med Food* 2014; 17(11): 1177-82.
- 54 Van D, Leontien W, Ales S. Interactions between aboveground and belowground induction of glucosinolates in two wild Brassica species. *New Phytol* 2004; 161(3): 801-10.
- 55 Guo R, Qian H, Shen W, Liu L, Zhang M, Cai C, *et al.* BZR1 and BES1 participate in regulation of glucosinolate biosynthesis by brassinosteroids in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* 2013; 64(8): 2401-12.
- 56 Yan X, Chen S. Regulation of plant glucosinolate metabolism. *Planta* 2007; 226(6): 1343-52.
- 57 Kim HH, Kwon DY, Bae H, Kim SJ, Kim YB, Uddin MR, *et al.* Influence of auxins on glucosinolate biosynthesis in hairy root cultures of broccoli (*Brassica oleracea var. italica*). *Asian J Chem* 2013; 25(11): 6099-101.
- 58 Schonhof I, Blankenburg D, Müller S, Krumbein A. Sulfur and nitrogen supply influence growth, product appearance, and glucosinolate concentration of broccoli. *J Plant Nutr Soil Sci* 2007; 170(1): 65-72.
- 59 Zhao FJ, Evans EJ, Bilsborrow PE, Syers JK. Influence of sulphur and nitrogen on seed yield and quality of low glucosinolate oilseed rape (*Brassica napus L.*). *J Sci Food Agric* 1993; 63(1): 29-37.
- 60 Gerendas J, Podestat J, Stahl T, Kübler K, Brückner H, Mersch-Sundermann V, *et al.* Interactive effects of sulfur and nitrogen supply on the concentration of sinigrin and allyl isothiocyanate in indian mustard (*Brassica juncea L.*). *J Agric Food Chem* 2009; 57(9): 3837-44.
- 61 Falk KL, Tokuhisa JG, Gershenzon J. The effect of sulfur nutrition on plant glucosinolate content: physiology and molecular mechanisms. *Plant Biol (Stuttg)* 2007; 9(5): 573-81.
- 62 Pereira FM, Rosa E, Fahey JW, Stephenson KK, Carvalho R, Aires A. Influence of temperature and ontogeny on the levels of glucosinolates in broccoli (*Brassica oleracea Var. italica*) sprouts and their effect on the induction of mammalian phase 2 enzymes. *J Agric Food Chem* 2002; 50(21): 6239-44.
- 63 林俊城, 吴秋云, 高灿红, 黄科. 青花菜硫、硒代谢竞争及其对保健功能的影响研究进展. *中国细胞生物学学报* (Lin Juncheng, Wu Qiuyun, Gao Canhong, Huang Ke. The competition of sulfur and selenium and their effect on health care function in broccoli: A review. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2011; 33(4): 422-32.
- 64 Wu QY, Lin JC, Huang K, Liu MY. Characterization and expression analysis of myrosinase for sulforaphane synthesis in broccoli. *Int J Agric Biol* 2013; 15(1): 83-9.
- 65 翟志亭, 郭世荣, 刘伟. 氨基酸对甘蓝硫代葡萄糖苷的影响. *植物营养与肥料学报* (Zhai Zhiting, Guo Shirong, Liu Wei. The effects of amino acids on glucosinolates of cabbage. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*) 2009; 15(2): 447-52.
- 66 Pérez-Balibrea S, Moreno DA, García-Viguera C. Improving the phytochemical composition of broccoli sprouts by elicitation. *Food Chem* 2011; 129(1): 35-44.
- 67 姚雪琴, 谢祝捷, 李光庆, 邱海荣, 李媛. 青花菜不同器官中4-甲基亚磺酰丁基硫苷及萝卜硫素含量分析. *中国农业科学* (Yao Xueqin, Xie Zhujie, Li Qingguang, Qiu Hairong, Li Yuan. Analysis of glucoraphanin and sulforaphane contents in different organs of Broccoli. *Scientia Agricultura Sinica*) 2011; 44(4): 851-8.