

刘 哲,张秋萍,苏小俊,等. 萝卜硫苷合成和调节相关基因研究进展[J]. 江苏农业科学,2015,43(6):168-170.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.06.055

萝卜硫苷合成和调节相关基因研究进展

刘 哲¹, 张秋萍², 苏小俊¹, 娄丽娜¹

(1. 江苏省农业科学院蔬菜研究所, 江苏南京 210014; 2. 江苏省江阴市农业技术推广中心, 江苏江阴 214431)

摘要:硫代葡萄糖苷(glucosinolates, 简称硫苷)是十字花科蔬菜中一类重要的含硫阴离子的亲水性次生代谢产物,硫苷及其降解产物在植物品质、风味、抗虫、抗癌和保健等方面具有重要作用。对萝卜中硫苷的功能、硫苷合成和调控相关基因等进行了综述,以期通过基因改良工程或表达调控手段培育高硫苷含量的萝卜新品种提供理论参考。

关键词:萝卜;硫苷;合成基因;调控基因;综述

中图分类号:S631.101 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)06-0168-03

萝卜(*Raphanus sativus* L.)是一种重要的十字花科根菜类作物,具有较高的营养价值,在中国乃至世界都有广泛种植。硫代葡萄糖苷(glucosinolates, GS)简称硫苷,是一种含氮、硫阴离子的次生代谢物质,主要存在于十字花科蔬菜中。硫苷及其降解产物在植物的生长发育、营养保健、提高植物抗性、改善营养品质和风味形成等方面起着重要作用^[1]。此外,它还具有作为生物农药的潜力^[2]。根据 R 基团来源氨基酸的不同,可以将硫苷分为 3 类:(1)脂肪族硫苷(aliphatic),侧链主要来源于甲硫氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸;(2)芳香族硫苷(aromatic),侧链主要来源于酪氨酸和苯丙氨酸;(3)吲哚族硫苷(indolyl),侧链主要来源于色氨酸^[3]。

1 硫苷的主要功能

1.1 重要的风味物质

十字花科植物具有不同的风味,如甘蓝类中的苦味及白菜类中的清鲜味都是由硫苷降解产物异硫氰酸酯引起的。不同硫苷降解的异硫氰酸盐所形成的风味不同。白菜类的清鲜味和萝卜的辛辣味分别是由 3-丁烯基硫苷和 4-甲硫基-3-丁烯基硫苷及其降解产物引起的^[4-5]。1-甲氧基-3-吲哚甲基硫苷(neoglucobrassicin)和 2-丙烯基硫苷(sinigrin)是

花椰菜中苦味的主要来源^[6]。

1.2 参与植物防御

硫苷及其降解产物在植物防御昆虫、病原菌的侵染和食植昆虫的寄主植物定位等方面起着重要的作用,它是植物防御体系中的一个重要组成部分。研究表明,硫苷的降解产物异硫氰酸盐对多种有害生物有灭杀作用,如细菌、真菌、线虫和昆虫等^[7]。将野生萝卜作为绿肥施入土壤,并配合施入比常规用量更低浓度的除草剂,能够有效控制杂草^[8]。硫苷不仅在防御昆虫和病原菌上起重要作用,它还是植物抵御逆境胁迫的一个重要组成部分,如硫苷参与植物应对水分胁迫、元素胁迫、温度胁迫等各种环境胁迫^[7,9]。植物在受到病虫害及各种环境胁迫时,通过不同防御机制的信号网络进行防御,如茉莉酸(jasmonic acid, JA)、乙烯(ethylene, ET)、水杨酸(salicylic acid, SA)信号途径^[10],三者协同并且通过调节次生代谢产物芥子油苷等的生物合成增强防御能力。

1.3 抗癌作用

许多动物和人体试验研究表明,食用十字花科蔬菜可有效抑制肿瘤细胞的形成,从而降低癌症的发生率^[11-12]。研究表明,脂肪族硫苷 4-甲基亚磺酰基硫苷的降解产物具有较强的抗癌特性。硫苷通过诱导谷胱甘肽转移酶(glutathione-S-transferases, GST)和 UDP-葡萄糖醛基转移酶等解毒酶以及抑制细胞色素 P450 1A1 等不同途径来抑制肿瘤细胞的形成,达到抗癌功效^[13]。

2 萝卜硫苷合成调控关键基因

硫苷的生物合成过程大致分为 3 步,即氨基酸侧链的延长、核心结构的形成和侧链的二次修饰^[14]。整个过程受到合成基因、侧链修饰基因、转录因子等基因共同调控^[15-16]。通过体内标记等技术对模式植物拟南芥的深入研究,对硫苷的

收稿日期:2015-02-20

基金项目:“十二五”农村领域国家科技计划(编号:2012BAD02B01);江苏省科技支撑计划(编号:BE2013429);江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(12)5043]。

作者简介:刘 哲,男,硕士,主要从事十字花科和瓜类蔬菜遗传育种研究。

通信作者:苏小俊,研究员。E-mail: xiaojunsu@yahoo.com。

1 次采收;播种后 18~20 d,按每 2 行间去边上 1 行的原则,使留下的行距为 15 cm,进行第 2 次采收;在播种后 28~32 d,进行第 3 次采收。

2.5 病虫害防治

如出现病虫害应选择符合无公害蔬菜生产的农药进行防治。严禁使用剧毒高残留农药和禁用农药。

参考文献:

- [1] 娄丽娜,苏小俊,王 辉,等. 苏秀 1 号叶用萝卜[J]. 长江蔬菜, 2014(1):17
- [2] 汤高扬,周树华. 叶用萝卜——叶太郎[J]. 当代农业,1997(6):16.

合成途径有了进一步的了解。研究显示,硫苷的生物合成均源于氨基酸。苯丙氨酸、甲硫氨酸和色氨酸分别是芳香族硫苷、脂肪族硫苷和吲哚族硫苷的合成前体。

2.1 氨基酸侧链延长相关基因研究

氨基酸侧链的延长起始于 BCAT (branched-chain amino acid amino-transferase, 氨基酸氨基酶) 催化的转氨基反应, 蛋氨酸和它的衍生物通过转氨基作用形成 2-含氧酸, 紧接着 2-含氧酸在 MAM (methylthioalkylmalate synthase, 甲硫烷基化苹果酸合成酶) 的作用下与乙酰辅酶 A 发生缩合, 经催化后形成 2-苹果酸衍生物, 然后通过异构化、氧化脱羧作用形成碳链延长的 2-含氧酸, 这个新形成的 2-含氧酸可以产生相应的氨基酸, 进一步经过更多的转氨作用、异构化、氧化脱羧作用等循环继续进行侧链延长形成更长的链。在模式植物拟南芥研究中发现, BCATs 是一个包含 7 个基因的基因家族, 并对其中的 6 个基因进行了研究^[17]。研究发现 *BCAT4* 对蛋氨酸和其链延长的同源衍生物以及它们相对应的 2-含氧酸表现出很高的活性^[18], 这说明 *BCAT4* 很可能参与蛋氨酸侧链延长反应。*BCAT4* 的 T-DNA 突变体 *bcat4-1* 和 *bcat4-2* 植株中, Met-GSL 含量降为原来的一半, 与此同时突变体植株里积累了大量硫-甲基甲硫基丁氨酸和蛋氨酸, 这进一步证明了 *BCAT4* 可以催化其侧链的延长反应; 研究还发现, *BCAT4* 的转录水平还受到机械损伤、病虫取食以及组织损伤等的诱导, 主要在毗邻 S 细胞、韧皮部等部位表达, 而 S 细胞是十字花科植物储存硫苷的主要部位^[19]。所以 *BCAT4* 很可能参与植物防御的调控反应^[20-21]。

MAM (methylthioalkylmalate synthase, 甲硫烷基化苹果酸合成酶) 基因家族主要催化蛋氨酸起源的脂肪族硫苷侧链延伸反应。其中甲硫氨酸侧链延长前 2 个循环中的缩合反应由 *MAM1* 基因负责, *MAM1* 基因编码甲硫烷基化苹果酸合成酶, 它能够催化甲硫氨酸链的 1~2 个亚甲基从单同源甲硫氨酸转化为双同源甲硫氨酸, 从而形成带有 3~4 个碳侧链的脂肪族硫苷^[22]。另外, 在拟南芥 2 个生态型 Cvi × Ler 群体中, 通过 QTL 图谱鉴定出的 *MAM3* 基因能催化甲硫氨酸侧链延伸的全部 6 个循环并使得甲硫氨酸生成短侧链和长侧链^[21]。

目前关于萝卜中硫苷侧链延长相关基因研究的报道较少。Zou 等利用 SNP 分子标记鉴定出的 3 个基因 *RsMAM3*、*RsIPMDH1*、*RsBCAT4* 的功能可能与萝卜中 4MTB-GSL 的生物合成有关^[23]。潘艳采用电子克隆法, 从萝卜肉质根中分离得到 *RsBCAT4* 基因组 DNA 和 cDNA 序列, 并应用半定量及荧光定量 PCR 技术对萝卜 *RsBCAT4* 基因进行表达特性分析, 结果显示膨大期及膨大盛期根部表达量低, *RsBCAT4* 基因在 WO、MeJA 胁迫处理后表达量均明显增加^[24]。

2.2 硫苷核心结构形成相关基因研究

硫苷核心结构的合成过程是所有硫苷合成的共同部分。拟南芥中, 这一途径共分为 5 个步骤: (1) CYP79 家族中的 CYP450 (cytochrome P450) 催化前体氨基酸转化为乙醛肟; (2) 在 CYP83 家族的 CYP450 氧化下乙醛肟进一步形成硝基化合物或腈氧化物, 立即与硫醇化合物反应生成 S-烷基硫脲酸共轭物^[25-27]; (3) S-烷基硫脲酸共轭物进一步被 C-S 裂解酶 (C-S lyase) 转化为硫脲酸 (thiohydroximates)、丙酮酸 (pyruvate) 和氨 (ammonia); (4) 硫脲酸在 UGT74B1 (UDP-

glucosyl transferase 74B1, 葡萄糖基转移酶) 作用下形成脱硫硫苷; (5) 糖质化的硫苷最后在 AtST5b_c (desulfoglucosinolate sulfotransferase, 脱硫硫苷磺基转移酶) 的催化作用下脱硫硫苷形成硫苷^[28-29]。

潘艳从萝卜肉质根中分离获得 *RsCYP79F1*、*RsCYP83A1* 基因 DNA、cDNA 和启动子序列, 在线启动子预测工具分析表明: *RsCYP79F1* 基因的表达可能受脱落酸、赤霉素和光等非生物胁迫的调控; *RsCYP83A1* 基因的表达可能受温度、氧气和光等非生物胁迫的调控^[24]。*RsSUR1*、*RsSOT18* 基因的 DNA 和 cDNA 序列在萝卜中也被分离出来, 其功能有待进一步研究。

2.3 葡萄糖配基侧链次级修饰相关基因研究

硫苷合成过程中的最后一步: 硫苷侧链的次级修饰, 通过羟化、甲基化、氧化和去饱和等作用, 形成不同的次级侧链修饰, 从而导致了硫苷种类较为丰富^[28-29]。在硫苷的次级修饰中要受到基因位点 AOP (2, -oxoglutarate-dependent dioxygenases) 基因家族 (*GS-ALK*, *GS-OHP* 和 *GS-Null*) 的调控。其中 *GS-ALK* 调控烯烃侧链的产生, *GS-OHP* 控制羟烷基侧链的合成, *GS-Null* 控制甲酰基侧链的形成。研究者利用拟南芥自交重组株系的图谱定位, 对紧密连接的 *GS-ALK* 和 *GS-OHP* 位点图谱鉴定出 2 个候选基因 *AOP2* 和 *AOP3*, 这些基因都编码 2-含氧戊二酸加氧酶。其中, *AOP2* 起主要作用, 它能催化 3-甲基亚磺酰丙基和 4-甲基亚磺酰丁基硫苷转化为相应的烯基硫苷, *AOP3* 能催化形成羟烷基硫苷。*AOP1* 被认为是 *AOP2* 和 *AOP3* 起源的祖先基因, 其功能还有待进一步鉴定^[30]。

王辉等借助生物信息分析技术, 在普通萝卜预测到 2 个 *FMO_{GS-OX}* 旁系同源候选基因 (*RsFMO_{GS-Oxa}* 和 *RsFMO_{GS-Oxab}*)^[31]。

2.4 硫苷合成调控相关转录因子研究

硫苷的一系列合成和降解反应中, 编码基因及催化反应的各种酶主要由转录因子调控。其中主要是 R2R3-MYB 中 12 亚家族中的 MYB28、MYB29、MYB76、MYB51、MYB34 和 MYB122 等 6 个成员^[14]。其中 MYB28、MYB29 和 MYB76 主要调控脂肪族硫苷生物合成中的参与基因, 包括 *AtST5b*、*AtST5c*、*MAM1*、*MAM3*、*CYP79F1*、*CYP79F2*、*CYP83A1* 等, 但不能调控包括 *CYP79B2*、*CYP79B3* 等吲哚族硫苷生物合成。MYB51、MYB34 和 MYB122 则主要调控吲哚和芳香族硫代葡萄糖苷生物合成中的参与基因^[16,32]。

Schweizer 等研究发现, 参与茉莉酸调节相关防御反应, 具有螺旋-环-螺旋基本结构的 MYC2、MYC3 和 MYC4 三重突变体中硫苷生物合成相关基因表达明显降低, 但已知调控硫苷合成的 MYB 转录因子表达量没有改变, 这说明 MYC2/MYC3/MYC4 是直接转录激活硫苷合成相关基因所必需的^[33]。染色质免疫沉淀分析显示 MYC2/MYC3/MYC4 与 GS 合成相关的 MYBs 有直接的相互作用, 这种特殊的 MYC-MYB 相互作用在调节硫苷合成中起着重要的作用。

3 展望

萝卜是重要的十字花科作物, 营养丰富, 栽培面积大, 深受人们喜爱。萝卜中关于硫苷的研究多集中于含量和种类

上,对硫苷合成和调控基因的研究较少。如果能深入研究硫苷合成过程中各个阶段的相关基因,找出控制硫苷合成的关键基因,将为通过基因改良工程或表达调控手段培育高硫苷含量的萝卜新品种提供理论基础。

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] Grubb C D, Abel S. Glucosinolate metabolism and its control [J]. Trends in Plant Science, 2006, 11 (2): 89–100.
- [3] Sønderby I E, Geu – Flores F, Halkier B A. Biosynthesis of glucosinolates – gene discovery and beyond [J]. Trends in Plant Science, 2010, 15 (5): 283–290.
- [4] 黄界颖, 马友华. 油菜硫甙特征功能及其测定方法 [J]. 植物生理学通讯, 2003, 39 (5): 496–500.
- [5] 徐东辉. 白菜类作物硫代葡萄糖苷及一些主要代谢组分的遗传分析 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2007.
- [6] 李 鲜, 陈昆松, 张明方, 等. 十字花科植物中硫代葡萄糖苷的研究进展 [J]. 园艺学报, 2006, 33 (3): 675–679.
- [7] Agerbirk M, de Vos M, Kim J H, et al. Indole glucosinolate breakdown and its biological effects [J]. Phytochemistry Review, 2009, 8: 101–120.
- [8] Malik M S, Norsworthy J K, Culpepper A S, et al. Use of wild radish (*Raphanus raphanistrum*) and rye cover crops for weed suppression in sweet corn [J]. Weed Science, 2008, 56 (4): 588–595.
- [9] Wang Y, Pan Y, Liu Z, et al. De novo transcriptome sequencing of radish (*Raphanus sativus* L.) and analysis of major genes involved in glucosinolate metabolism [J]. BMC Genomics, 2013, 14: 836.
- [10] Xu W, Yan S C. The function of jasmonic acid in induced plant defence [J]. Acta Ecologica Sinica, 2005, 25: 2074–2082.
- [11] Angeloni C, Leoncini E, Malaguti M, et al. Modulation of phase II enzymes by sulforaphane: implications for its cardioprotective potential [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57 (12): 5615–5622.
- [12] Brader G, Mikkelsen M D, Halkier B A, et al. Altering glucosinolate profiles modulates disease resistance in plants [J]. The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology, 2006, 46 (5): 758–767.
- [13] Talalay P, Fahey J W. Phytochemicals from cruciferous plants protect against cancer by modulating carcinogen metabolism [J]. J Nutr, 2001, 131: 3027–3033.
- [14] Gigolashvili T, Yatushevich R, Rollwitz I, et al. The plastidic bile acid transporter 5 is required for the biosynthesis of methionine – derived glucosinolates in *Arabidopsis thaliana* [J]. The Plant Cell, 2009, 21 (6): 1813–1829.
- [15] 李 娟, 朱祝军. 植物中硫代葡萄糖苷生物代谢的分子机制 [J]. 细胞生物学杂志, 2005, 27 (5): 519–524.
- [16] Hirai M Y, Sugiyama K, Sawada Y, et al. Omics – based identification of *Arabidopsis* Myb transcription factors regulating aliphatic glucosinolate biosynthesis [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007, 104: 6478–6483.
- [17] Diebold R, Schuster J, D? schner K, et al. The branched – chain amino acid transaminase gene family in *Arabidopsis* encodes plastid and mitochondrial proteins [J]. Plant Physiology, 2002, 129 (2): 540–550.
- [18] Schuster J, Knill T, Reichelt M, et al. Branched – chain aminotransferase 4 is part of the chain elongation pathway in the biosynthesis of methionine – derived glucosinolates in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 2006, 18 (10): 2664–2679.
- [19] Korolevao A, Davies A, Deeken R, et al. Identification of a new glucosinolate rich cell type in *Arabidopsis* flower stalk [J]. Plant Physiology, 2000, 124 (2): 599–608.
- [20] Kroymann J, Textor S, Tokuhisa J G, et al. A gene controlling variation in *Arabidopsis* glucosinolate composition is part of the methionine chain elongation pathway [J]. Plant Physiology, 2001, 127 (3): 1077–1088.
- [21] Textor S, de Kraker J W, Hause B, et al. MAM3 catalyzes the formation of all aliphatic glucosinolate chain lengths in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology, 2007, 144 (1): 60–71.
- [22] Chen Y Z, Yan X F, Chen S X. Bioinformatic analysis of molecular network of glucosinolate biosynthesis [J]. Computational Biology and Chemistry, 2011, 35 (1): 10–18.
- [23] Zou Z W, Ishida M, Li F, et al. QTL analysis using SNP markers developed by next – generation sequencing for identification of candidate genes controlling 4 – methylthio – 3 – butenyl glucosinolate contents in Roots of radish, *Raphanus sativus* L. [J]. PLoS One, 2013, 8 (1): e53541.
- [24] 潘 艳. 萝卜硫苷合成代谢关键基因克隆与表达特征分析 [D]. 南京: 南京农业大学, 2013.
- [25] 钟海秀, 陈亚州, 阎秀峰. 植物芥子油苷代谢及其转移 [J]. 生物技术通报, 2007 (3): 44–48.
- [26] Hull A K, Vij R, Celenza J L. *Arabidopsis* cytochrome P450s that catalyze the first step of tryptophan – dependent indole – 3 – acetic acid biosynthesis [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97 (5): 2379–2384.
- [27] Zang Y X, Kim J H, Park Y D, et al. Metabolic engineering of aliphatic glucosinolates in Chinese cabbage plants expressing *Arabidopsis* MAM1, CYP79F1, and CYP83A1 [J]. BMB Reports, 2008, 41 (6): 472–478.
- [28] 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 [J]. 园艺学报, 2001, 28 (增刊 1): 669–675.
- [29] Bednarek P, Pifilewska – Bednarek M, Alefsvato – Schneider B, et al. A glucosinolate metabolism pathway in living plant cells mediates Broad – Spectrum antifungal defense [J]. Science, 2009, 323: 101–106.
- [30] Kliebenstein D J, Lambrix V M, Reichelt M, et al. Gene duplication in the diversification of secondary metabolism: tandem 2 – oxoglutarate – dependent dioxygenases control glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 2001, 13 (3): 681–693.
- [31] 王 辉, 郭 军, 梅 焱, 等. 萝卜硫苷生物合成相关基因 *RsF-MO_{GS-ox}* 的预测及分析 [J]. 江西农业学报, 2014, 26 (1): 25–27, 31.
- [32] Gigolashvili T, Yatushevich 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 (2): 247–261.
- [33] Schweizer F, Fernández – Calvo P, Zander M, et al. *Arabidopsis* basic helix – loop – helix transcription factors MYC2, MYC3, and MYC4 regulate glucosinolate biosynthesis, insect performance, and feeding behavior [J]. The Plant Cell, 2013, 25 (8): 3117–3132.