

外源茉莉酸对大豆异黄酮的影响^{*}

乞永艳¹ Arnaud Bovy² 唐益雄³

(1. 中国农业科学院研究生院, 北京 100081; 2. Plant Research International, P. O. Box 16, 6700 AA, Wageningen, The Netherlands; 3. 中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081)

摘要 摘下生长 8 天的大豆子叶, 在不同浓度茉莉酸溶液中浸泡一定时间, 用甲醇提取大豆异黄酮, 经高压液相色谱(HPLC)测定, 研究子叶表面伤口、浸泡时间以及茉莉酸浓度对大豆异黄酮的影响。结果显示: 在对照组(0.1%乙醇), 子叶表面的伤口不影响异黄酮的分配比例; 而用茉莉酸浸泡组, 健康子叶中几乎不存在游离型的大豆甾元和染料木黄酮; 丙二酰大豆甾和丙二酰染料木甾所占比例随着浸泡时间的延长而下降, 大豆甾元和染料木黄酮所占比例随浸泡时间的延长而增加, 大豆甾和染料木甾所占比例不随浸泡时间而变化; 20 μ M 茉莉酸溶液浸泡的子叶中异黄酮总量最低。

关键词 大豆; 子叶; 茉莉酸; 异黄酮

中图分类号 S565.1 文献标识码 A 文章编号 1000-9841(2006)01-0087-04

大豆(*Glycine max* [L.] Merr)异黄酮是大豆体内积累的一类次生代谢物, 人们关注较多的主要有 12 种, 包括 3 种游离型的甾元和 9 种结合型的糖甾^[1], 主要分布在大豆种子的子叶和胚轴中, 其种类和含量受很多因素影响, 除与大豆品种、储存时间、地理环境等因素影响外^[2~4], 还受多种激发子的影响, 不同激发子对异黄酮形成的影响不同^[5~7]。与以往常用的生物或非生物激发子不同, 茉莉酸(Jasmonic acid, JA)是一类高效的植物内源性激素, 在植物中广泛存在并具有广谱的生理效应, 调控许多基因的表达^[8,9]。研究表明 JA 不仅调控着植物生长发育过程中基因表达, 如种子的萌发和生长、贮藏蛋白的积累、花与果实的发育等^[10~12]; 还调控着与植物自身防御系统有关的基因表达, 如对真菌感染、病虫害入侵、机械损伤及逆境胁迫等^[13~16]。外源茉莉酸刺激是研究茉莉酸作用的常用方法之一, 本研究采用茉莉酸浸泡的方法研究了茉莉酸对生长 8 天的大豆子叶中异黄酮的影响。

1 材料和方法

1.1 试验材料

选用中黄 13(中作 975)大豆, 由中国农业科学院作物育种栽培研究所提供。大豆甾元(Daidzein - D)、大豆甾(Daidzin - DI)、丙二酰大豆甾(6'' - O - malonyldaidzin, MGD)、染料木黄酮(genistein - G)、染料木甾(genistin - GI)、丙二酰染料木甾(6'' - O - malonylgenistin, MGG)、大豆黄素(glycitein - GL)、7, 4' - 二羟基 - 6 - 甲氧基异黄酮 - 7 - 葡萄糖苷(glycitin - GLY)标准品购自美国 LC Laboratories (165 New Boston Street, Woburn MA 01801), 标准品溶解在二甲基亚砜(DMSO)中; 茉莉酸标样购自美国 Sigma 公司, 溶解在 0.1%乙醇中; Glycinol, Glyceollins 标准品为 Ebel, J. 教授(Department of Bioorganic Chemistry, Max Planck Institute for Chemical Ecology, Germany)惠赠, 其它试剂均为色谱纯。

1.2 试验方法

1.2.1 植物材料的准备

精选的大豆种子用 0.75% NaClO 消毒处理 10min, 清水冲洗 3 遍, 播种在灭菌的湿润蛭石上, 于组培间中发芽并生长 8 天(25 $^{\circ}$ C, 每日 16h 光照)。

* 收稿日期: 2005-04-28

基金项目: 荷兰瓦赫宁根大学“交叉研究和教育基金”项目, The Interdisciplinary Research and Education Fund (IN REF) (Established By the board of Wageningen University, the Netherlands)

作者简介: 乞永艳(1970-), 女, 博士研究生, 研究方向: 生物活性物质及其应用, E-mail: piaoliang-hao@163.com; Tel: 010-82111099, 13911879594; Fax: 010-88871902

切下健康子叶, 进行以下试验, 每组重复 2 次, 测定结果取平均值; 将大豆子叶分别浸泡在 0.1% 乙醇(对照)、 $10\mu\text{M}$ 、 $20\mu\text{M}$ 、 $40\mu\text{M}$ 、 $50\mu\text{M}$ JA 溶液中, 每一浓度设 H (Healthy, 完整健康子叶) 和 W (Wounded, 子叶表面有 $2\times 2\text{mm}$ 的伤口) 2 组, 25°C 黑暗中保温 24h、48h、72h 后分别取样, 迅速放入液氮冷冻, -70°C 储存, 备用。

1.2.2 异黄酮的提取

将 1.2.1 中获得的植物材料在液氮中充分研磨, 按照 0.1g 鲜重加入 1mL 色谱纯甲醇的比例提取, 密闭、避光超声波振荡 15min。8000 rpm 离心 10min, 吸取上清液, 经 $0.45\mu\text{m}$ 微孔膜过滤, 转移至 1mL 色谱专用小瓶中封口, 4°C 保存待测。

1.2.3 异黄酮的测定

HPLC 系统(high pressure liquid chromatography, 高压液相色谱)采用 Waters 600 Controller; Waters 2695 Separations Module; Pharmacia LKB HPLC column Oven 2155, Waters TM 996 型光电二极管系统检测器(Photodiode Array Detector), Millennium 32 数据处理软件。柱子为 luna 3 $\mu\text{C}18$ (2) ($150' 4.60\text{mm}$) (美国 Phenomenex 公司); 柱温: 40°C ; 采用二元流动相, A 液为 0.1% 三氟乙酸, B 液为 100% 乙腈, 流速为 $1\text{mL}/\text{min}$ 。梯度洗脱: 20min 内 A 由 95% 降至 75%, 随后 20min 内 A 由 75% 降至 10%, 持续 7min, 最后 7min 内 A 由 10% 升至 95%, 运行时间为 54min, 扫描波长: $240\sim 600\text{nm}$, 检测波长: 280nm , 进样量 $10\mu\text{L}$ 。样品根据标准品的保留时间定性, 根据标准峰面积定量。

2 试验结果

2.1 子叶表面伤口对异黄酮成分的影响

在 HPLC 谱图上可以检测到 6 种大豆异黄酮, 其保留时间分别为: DI, 14.046min; GI, 17.860min; MGD, 18.813min; MGG, 22.194min; D, 23.895min; G, 26.903min。未检测到 Glycitin、Glycitein、Glycinol 及其异戊烯化的产物 Glyceollins。H 组和 W 组的结果对比显示: 在所测定的几种浓度下, 通常子叶表面伤口的存在与否并不影响所测几种异黄酮的比例, 85% 以上以结合型糖甙 DI、GI、MGD、MGG 形式存在, 且 DI:GI、MGD:MGG 约为 1:1; 游离型的 D+G 所占比例较低。多数情况下, 未酰基化的 DI+GI 所占比例高于丙二酰基化的 MGD+MGG, 而对于 $10\mu\text{M}$ 、 $20\mu\text{M}$ 和 $40\mu\text{M}$ 茉莉

酸处理的 W 组, 丙二酰化的 MGD+MGG 高于 DI+GI。但是, 在 $10\mu\text{M}$ 和 $40\mu\text{M}$ 茉莉酸处理的 W 组中, DI 所占比例明显低于 H 组。

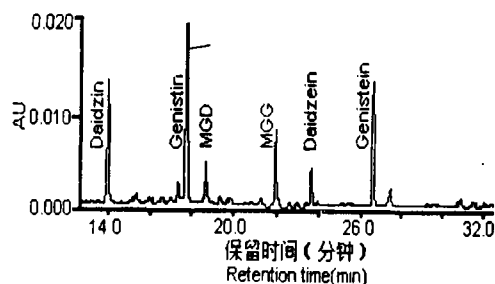


图1 $50\mu\text{M}$ 茉莉酸(W 组) 浸泡大豆子叶 (保温 48 小时) 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC Profiles of cotyledons (wound surface) soaked in $50\mu\text{M}$ JA and incubated in the dark for 48h

2.2 浸泡时间对大豆中异黄酮成分的影响

在 W 组, 用 $20\mu\text{M}$ JA (图 2-B) 浸泡的样品中 DI、GI、MGD、MGG 的比例并不随浸泡时间的延长而改变; D 和 G 所占比例很小。对照组 (图 2-A) 和 $50\mu\text{M}$ JA、 $10\mu\text{M}$ JA、 $40\mu\text{M}$ JA 处理组 6 种异黄酮的变化趋势相似: DI、GI 的变化与 $20\mu\text{M}$ JA 处理组相同, 所占比例基本不变; MGD、MGG 随浸泡时间的延长而逐渐下降, 而游离型的 D、G 所占比例则随着浸泡时间的延长而逐渐上升, 表明丙二酰化的异黄酮糖甙逐渐脱去丙二酰化的糖基水解成为游离的 D、G。有报道认为在大豆加工过程中, 不同的加工方法对大豆异黄酮含量和成分影响很大, 浸泡和加热会使丙二酰异黄酮糖甙减少, 而相应的乙酰化异黄酮和游离甙元增加^[1]。本研究结果表明大豆子叶用 0.1% 乙醇或一定浓度的茉莉酸浸泡后异黄酮的种类也会发生改变, 丙二酰异黄酮糖甙减少, 游离型异黄酮增加。

2.3 茉莉酸浓度对大豆异黄酮成分及含量的影响

$20\mu\text{M}$ JA 处理的子叶中异黄酮分配比例与其它处理明显的不同是在 DI 与 GI 的比例约为 1:10, 即未酰基化的异黄酮糖甙以 GI 为主, 而在其它处理中, DI 与 GI 的比例基本为 1:1~2。

H 组和 W 组试验结果相似 (图 3), $20\mu\text{M}$ JA 处理的子叶中异黄酮总量 (以 D、G、DI、GI、MGD、MGG 总和计) 最低, 为 $695\mu\text{g}/\text{g}$ 鲜重; $40\mu\text{M}$ JA 处理的子叶中异黄酮总量最高, 为 $996\mu\text{g}/\text{g}$ 鲜重。0.1% 乙醇、 $50\mu\text{M}$ JA 浸泡的样品中, 异黄酮总含量差别不大, 且在 72h 内基本恒定; $20\mu\text{M}$ JA、 $40\mu\text{M}$ JA、 $10\mu\text{M}$ JA 处理的样品中异黄酮总量在 48h 时达

到最高, 之后则下降。

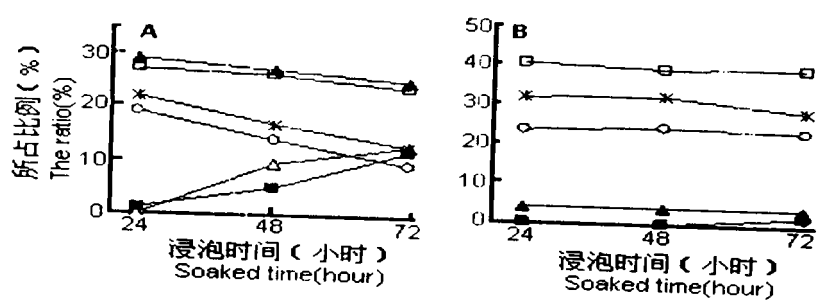


图 2 浸泡时间对大豆异黄酮的影响
A: 0 1% 乙醇(对照); B: 20 μ M 茉莉酸
Fig 2 The soaked time effect on the isoflavonoids
A: 0 1% ethanol(the control); B: 20 μ M JA
 \triangle daidzein \blacksquare genistein \blacktriangle daidzin \square genistin * MGD \circ MGG

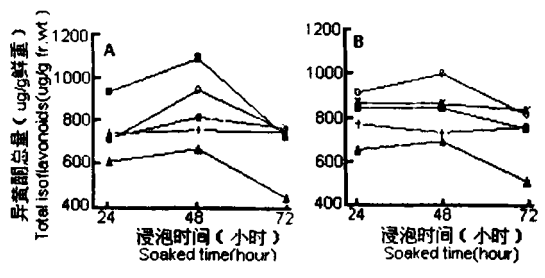


图 3 茉莉酸浓度对大豆异黄酮的影响
A: 健康子叶组; B: 表面有伤口组
Fig 3 Effect of the con of JA on the soybean Isoflavonoids
A: health cotyledons; B: wounded cotyledons
+ 0 1% Ethanol \blacksquare 10 μ M JA \triangle 20 μ M JA
 \square 40 μ M JA * 50 μ M JA

3 结论与讨论

通过以上试验表明: 不同于其他激发子^[5,6], 茉莉酸浸泡大豆子叶中未检测到异戊烯黄酮 Glyceollins 和其前体 Glycinol, 也未检测到 Glycitin 和 Glycitein, 只检测到了 6 种大豆异黄酮: Daidzein、Genistein、Daidzin、Genistin、MGD 和 MGG。对于对照样品子叶表面的伤口不影响异黄酮的分布, 但是对于茉莉酸处理组, 异黄酮的分配比例与所用茉莉酸的浓度有关, 其中 20 μ M 浸泡的子叶中 G1 所占比例显著高于其它处理。

茉莉酸溶液浓度不仅影响大豆异黄酮的比例分配, 对异黄酮总量也有一定影响。50 μ M 茉莉酸处理组异黄酮总量与对照组相近, 且在试验的 72h 内

含量基本不变。20 μ M 茉莉酸处理组所形成的异黄酮总量最低, 同时总含量随浸泡时间延长下降也较其它浓度快。

无论是对照还是用不同浓度茉莉酸处理的子叶中丙二酰化的异黄酮糖甙 (MGD、MGG) 所占比例随着浸泡时间的延长 (72h 内) 而下降, 而游离型的 D、G 所占比例随浸泡时间的延长而增加, 但是未被酰基化的结合型糖甙 DI、GI 所占比例却不随浸泡时间的延长而改变。这表明丙二酰化的异黄酮糖甙比未被酰基化的糖甙更易水解掉糖基而形成游离型的异黄酮。这一性质对于我们在大豆产品加工过程中如何更好地保留住某类 (种) 特异性的异黄酮具有一定的指导意义。

通常情况下, 激发子的刺激会不同程度地诱导大豆中异戊烯化异黄酮 Glyceollins 的形成^[5,7], 但是在本试验条件下并未检测到 Glyceollins, 一方面可能是由于外源茉莉酸的刺激不足以激活或诱导 Glyceollins 的生物合成; 另一方面可能是本研究所采用的处理子叶的方法 (浸泡法) 影响到茉莉酸作用的充分发挥; 或有可能茉莉酸刺激形成的 Glyceollins 又随即降解成其他物质; 还有可能是形成的 Glyceollins 或 Glycinol 以及其它种类的大豆异黄酮留在了浸泡的溶液中, 而我们没有对浸泡子叶后的溶液进行检测, 以上这些情况都有待于今后进一步研究确证。本试验初步研究了茉莉酸对大豆异黄酮的影响, 作为植物体内信号分子的茉莉酸与大豆异黄酮形成关系的研究在植物抗病、高效生物活性物质形成等方面具有一定的理论和实践意义。

参 考 文 献

- 1 崔洪斌主编. 大豆生物活性物质研究应用进展(论文集)[C]. 华文书出版社. 2001, 88-93
- 2 孙君明, 丁安林. 地理环境对大豆种子中异黄酮积累的影响趋势[J]. 大豆科学, 1997, 16(4): 298-303
- 3 孙君明, 丁安林, 常汝镇, 等. 中国大豆异黄酮含量的初步分析[J]. 中国粮油学报, 1995, 10(4): 51-54
- 4 孙君明, 韩粉霞, 丁安林. 储存温度与时间对大豆籽粒中异黄酮含量的影响[J]. 大豆科学, 2004, 23(4): 245-248
- 5 Hahn, M. G., Bonhoff, A., Grisebach, H. Quantitative localization of the phytoalexin glyceollin I in relation to fungal hyphae in soybean roots infected with *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* [J]. Plant Physiology, 1985, 77: 591-601.
- 6 Lyne R. L., Mulheirn L. J. Minopterocarpinoids of soybean[J]. Tetrahedron Letters, 1978: 3127-3128
- 7 Moesta P., Grisebach H. Effects of biotic and abiotic elicitors on phytoalexin metabolism in soybean[J]. Nature, 1980, 286: 710-711.
- 8 Gross D., Parthier B. Novel natural substances acting in plant growth regulation[J]. Journal of Plant Growth Regulation, 1994, 13: 93-114
- 9 Greelman R. A., Mullet J. E. Jasmonic acid distribution and action in plants: Regulation during development and response to biotic and abiotic stress[C]. Proceedings National Academy Sciences U. S. A., 1995, 92: 4114-4119
- 10 Semblner G., Parthier B. The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonates[J]. Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology, 1993, 44: 569-589
- 11 Berger S., Bell E., Sadka A., Mullet J. E., *Arabidopsis thaliana* Atvsp is homologous to soybean VspA and VspB, genes encoding vegetative storage protein acid phosphatases and is regulated similarly by methyl jasmonic, wound, sugar, light and phosphate[J]. Plant Molecular Biology, 1995, 27: 933-942
- 12 吴劲松, 种康. 茉莉酸作用的分子生物学研究[J]. 植物学通报, 2002, 19(2): 164-170
- 13 Botalla M. A., Yi Xu, Prabha T. N., et al. Differential expression of soybean cysteine proteinase inhibitor genes during development and in response to wounding and methyl jasmonate[J]. Plant Physiology, 1996, 112: 1201-1210
- 14 Hildman T., Ebneth M., Pena Cortés H., et al. General roles of abscisic and jasmonic acids in gene activation as a result of mechanical wounding[J]. The plant Cell, 1992(4): 1157-1170
- 15 Mason H. S., Mullet J. E. Expression of two soybean vegetative storage protein genes during development and in response to water deficit, wound, and jasmonic acid[J]. The plant cell, 1990, 2: 569-579
- 16 Xu Yi, Chang Linda Pi Fang, Liu Dong, et al., Plant defense genes are synergistically induced by ethylene and methyl jasmonate[J]. The Plant Cell, 1994(6): 1077-1085

EFFECTS OF EXOGENOUS JASMONIC ACID ON ISOFLAVONOIDS

IN *Glycine max* [L.] Merri.Qi Yongyan¹ Arnaud Bovy² Tang Yixiong³

(1. Graduate School of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing, 100081; 2. Plant Research International, P. O. Box 16, 6700 AA, Wageningen, The Netherlands; 3. Biotechnology Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing, 100081)

Abstract A series of experiments were designed to study the relationship between the isoflavonoids and the cotyledon wounded surfaces, the concentrations of jasmonic acid (JA) and the soaked time. 8-day-old soybean (*Glycine max* [L.] Merri) cotyledons were soaked into jasmonic acid solutions. Isoflavonoids were extracted by methanol and detected by high pressure liquid chromatography (HPLC). The results showed that there was no effect the surface wound on the isoflavonoids. The ratio of the 6''-O-malonyl daidzin (MGD) and 6''-O-malonylgenistin (MGG) decreased and the ratio of daidzein and genistein increased, while the ratio of daidzin and genistein kept stable during 72 hours soaked period. The total amount of isoflavonoids in 20 μ M JA treated samples was the lowest and decreased most quickly among the 5 concentrations used.

Key words *Glycine max* [L.] Merri; Cotyledons; Jasmonic acid; Isoflavonoids