

十字花科蔬菜硫代葡萄糖苷合成相关转录因子调控研究进展

王军伟, 黄 科, 黄英娟, 毛舒香, 柏艾梅, 刘明月, 吴秋云*

(湖南农业大学园艺园林学院, 长沙 410128)

摘 要: 硫代葡萄糖苷是十字花科植物中重要的次生代谢产物, 其衍生产物和降解产物在植物防卫反应、特殊风味形成和人体防癌抗癌等方面具有特殊作用。硫苷的合成代谢可以概括为: 氨基酸侧链的延伸、核心结构的合成及 R 侧链的修饰, 涉及 BCATs、MAMs、CYP79s、CYP83s 和 AOPs 等多个基因家族。综述了硫苷合成过程中几种重要的转录因子, 其中 MYB 转录因子家族 12 亚族的 MYB28、MYB29、MYB76、MYB34、MYB51 和 MYB122 对十字花科植物硫苷合成起主要的调控作用, MYB28 和 MYB34 分别为调控脂肪族硫苷和吲哚族硫苷的主效基因。bHLH 类转录因子 MYC2、MYC3 和 MYC4 通过作用于 MYB 类转录因子对硫苷合成起调控作用, WRKY 类转录因子 WRKY18 和 WRKY40 协同 CYP81F2 负调控吲哚族硫苷的合成。此外, 还介绍了上述几种转录因子在外源生物或非生物刺激后的响应, 及参与调控硫苷合成的作用机理。通过对调控硫苷合成的转录因子的研究, 可进一步丰富硫苷合成的调控网路, 为高含量硫苷的十字花科蔬菜作物的分子育种、优质栽培、病虫害生物防治提供新思路和新方法。

关键词: 十字花科; 硫代葡萄糖苷; 转录因子; 次生代谢; 转录调控

中图分类号: S 63

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2019) 09-1752-13

The Research Progress of Transcription Factors Regulating Glucosinolates Biosynthesis in Cruciferous Vegetables

WANG Junwei, HUANG Ke, HUANG Yingjuan, MAO Shuxiang, BAI Aimei, LIU Mingyue, and WU Qiuyun*

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

Abstract: Glucosinolates are important secondary metabolites in cruciferous plants, and their derivatives and degradation productions play a special function in plant defense reaction, formation of special flavor and cancer resistance. The glucosinolate biosynthesis is complex, including side chain elongation of amino acids, formation of the core glucosinolate structure and secondary modifications of the amino acid side chain, involving BCATs, MAMs, CYP79s, CYP83s, AOPs and other gene families. With gradual revelation of metabolic mechanism of glucosinolate, the transcriptional regulation model has become a hot topic in metabolic mechanism research. In this paper, three important transcription factors

收稿日期: 2019-08-06; **修回日期:** 2019-08-28

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31772325, 31902023); 湖南省自然科学基金项目 (2018JJ3217); 湖南省科技计划项目 (2018NK2022); 农业部园艺作物生物学与种质创制综合性重点实验室开放基金项目 (IVF201702); 湖南农业大学校青年基金项目 (17QN33)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: qiuyunhk@hotmail.com)

involved in glucosinolate metabolism were summarized, among which MYB transcription factors (MYB28, MYB29, MYB76, MYB34, MYB51, and MYB122) played major regulatory roles in glucosinolates biosynthesis. And MYB28 and MYB34 are the major genes on regulating aliphatic and indole glucosinolates biosynthesis, respectively. bHLH transcription factors (MYC2, MYC3 and MYC4) have regulating function on glucosinolate biosynthesis by conjunction with MYB transcription factors. WRKY transcription factors (WRKY18 and WRKY40) synergize with *CYP81F2* to negatively regulate the biosynthesis of indole glucosinolates. In addition, the response of transcription factors to exogenous abiotic or biotic stimulation, and the regulation mechanism on glucosinolate biosynthesis are briefly introduced in this paper. The research on transcription factors can further enrich regulatory mechanism of glucosinolate biosynthesis and provide new idea and method for molecular breeding, high-quality cultivation, biological control of cruciferous vegetable crops with high glucosinolate content.

Keywords: Cruciferae; glucosinolate; transcription factor; secondary metabolism; transcriptional regulation

硫代葡萄糖苷（简称硫苷，Glucosinolates, GSLs）又称芥子油苷，是十字花科植物中的一大类次生代谢产物，目前已发现约 120 余种，其中部分种类是构成十字花科蔬菜独特风味的重要成分（Fahey et al., 2001; Yu et al., 2001）。硫苷的生物合成前体物质包括甲硫氨酸、色氨酸、苯丙氨酸和亮氨酸等氨基酸，经延伸途径形成不同长度的侧链；根据侧链衍生来源的不同，硫苷可分为脂肪族硫苷、芳香族硫苷和吲哚族硫苷（Fahey et al., 2001），硫苷的结构通式如图 1。目前的研究发现，硫苷及水解产物具有较强的防癌抗癌活性（Valgimigli & Iori, 2009; Dinkova-Kostova & Kostov, 2012; Huang et al., 2016），同时对植食性昆虫和病原菌起到一定的防御作用（Wittstock et al., 2003）。硫苷的合成代谢调控网络较为复杂，通过对调控硫苷合成的转录因子的研究，可进一步丰富硫苷合成的调控机制，为高硫苷含量的十字花科蔬菜作物的品种改良和优质栽培提供理论依据。

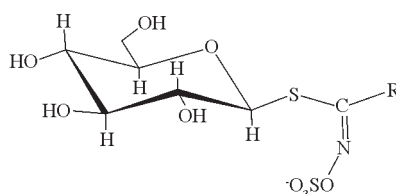


图 1 硫代葡萄糖苷的结构通式

Fig. 1 The general structure of glucosinolates

转录因子（Transcription factor, TF）也称反式作用因子，是直接或间接与基因启动子区域中顺式作用元件发生特异性相互作用，并对基因转录的起始进行调控的一类蛋白质，包含 DNA 结合区、转录调控区、寡聚化位点区和核定位信号。目前的研究表明，MYB 类转录因子参与了植物次生代谢、细胞形态建成与分化、信号转导以及胁迫应答等生理活动，其中 R2R3-MYB 转录因子是十字花科植物硫苷合成中的主效因子（Hirai et al., 2007; Burow et al., 2010; Ambawat et al., 2013）；bHLH 类转录因子（Basic Helix-Loop-Helix）可与 MYB 类转录因子组成蛋白复合体，对十字花科植物吲哚族硫苷的合成发挥重要调控作用（Zimmermann et al., 2004; Feller et al., 2006; Butelli et al., 2008）；WRKY 类转录因子可以协同硫苷合成关键基因调控吲哚族硫苷的生物合成（Schön et al., 2013）。

本文综述了对十字花科植物硫苷合成起主要的调控作用的 3 类转录因子 (R2R3-MYB 类、bHLH 类和 WRKY 类), 详细介绍了其在外源生物或非生物刺激后的响应, 及参与调控硫苷合成的作用机理; 并结合十字花科蔬菜作物功能成分和病虫害两个重要问题, 探讨了通过转录因子调控提高其功能成分含量和抗病虫性的可行性和重要性, 以期对蔬菜作物的品种改良、优质栽培和高抗病虫性提供新思路和方法。

1 硫苷的生物合成过程

硫苷的合成代谢途径较为复杂, 目前的研究结果显示硫苷的合成途径可以概括为: R 侧链的延伸、核心结构的合成和 R 侧链的修饰, 涉及 BCATs、MAMs、CYP79s、CYP83s 和 AOPs 等多个基因家族 (Sønderby et al., 2010b)。在 R 侧链的延伸阶段, 前体氨基酸经支链氨基酸转氨酶 (Branched-chain amino acid amino-transferase, BCAT) 发生脱氨基作用, 生成与之相应的含氧酸, 后经甲硫烷基化苹果酸合成酶 (Methylthioalkyl-malatesynthase, MAM) 催化的缩合反应、异丙基苹果酸异构酶 (Isopropylmalate isomerase, IPMIs) 催化的异构化反应和异丙基苹果酸脱氢酶 (Isopropylmalate dehydrogenase, IPM-DH) 催化的氧化脱羧作用组成的循环反应, 将亚甲基基团 ($-\text{CH}_2-$) 依次加在氨基酸的侧链上 (Sønderby et al., 2010b)。在该阶段, *BCAT4*、*MAM1*、*MAM2* 和 *MAM3* 为关键酶基因, 其中 *MAM1* 在甲硫氨酸侧链延伸的缩合反应的前两个循环起作用 (Kroymann et al., 2001; 廖永翠, 2011), *MAM2* 仅作用于第 1 个循环, 而 *MAM3* 能作用于全部 6 个循环 (Field et al., 2004; Textor et al., 2007, 毛舒香 等, 2018)。

硫苷核心结构的合成主要涉及 CYP79s 和 CYP83s 基因家族, 其中细胞色素 P450 (Cytochrome P450) 中的 CYP79 酶家族单加氧酶催化前体氨基酸生成乙醛肟 (Hull et al., 2000), 后经 CYP83s 家族酶催化形成氧化腈或不稳定酸式硝基化合物 (Grubb & Abel, 2006)。CYP79s 和 CYP83s 家族中同族体均具有底物特异性, 其中 CYP79F1 和 CYP79F2 催化甲硫氨酸衍生成脂肪族乙醛肟 (Hansen et al., 2001; Chen et al., 2003), 随后经 CYP83A1 催化生成氧化腈或硝基化合物 (Hemm et al., 2003); CYP79B2 和 CYP79B3 催化色氨酸生成 3-吡啶-乙醛肟 (Hull et al., 2000; Mikkelsen et al., 2000), 后经 CYP83B1 催化生成氧化腈或硝基化合物 (Bak et al., 2001); CYP79A2 催化苯丙氨酸生成芳香族乙醛肟。此外, 硫苷核心结构的合成还涉及 *SUR1*、*UGT74B1*、*UGT74C1*、*SOT16*、*SOT17* 和 *SOT18* 等基因 (Piotrowski et al., 2004; Grubb et al., 2010; Mikkelsen et al., 2010)。

硫苷结构和降解产物的丰富性取决于 R 侧链的修饰 (Hopkins et al., 2009), 该阶段主要由 AOP (2-oxoglutarate-dependent dioxygenases) 参与完成 (Kliebenstein et al., 2001)。目前的研究显示, 在脂肪族硫苷 R 侧链修饰过程中, 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 (萝卜硫苷) 形成相应的烯炔基硫苷, 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* 起源的祖先基因, 其功能还需进一步鉴定 (Hirai, 2009; 程坤 等, 2010)。

2 MYB 类转录因子对硫苷合成的调控作用

MYB 是高等植物中数量最多的转录因子之一, 参与了次生代谢、细胞形态建成与分化、信号转导以及胁迫应答的调控 (Ambawat et al., 2013), 其蛋白结构上最主要的特点是 N 端含有高度保

守的 DNA 结合结构域。MYB 转录因子结构域中大约含有 51 ~ 52 个氨基酸, 其中含有 3 个规则排列的色氨酸残基把其余的残基均匀分开, 使 MYB 的 DNA 结合结构域形成螺旋 - 转角 - 螺旋(HTH)空间结构。根据重复序列的不同, MYB 转录因子家族可分为 4R-MYB、3R-MYB (R1R2R3-MYB)、R2R3-MYB 和 MYB-related 等 4 种类型, 分别包含 4 个、3 个、2 个和 1 个重复序列 (Katiyar et al., 2012)。已有研究证明, R2R3-MYB 类转录因子对脂肪族和吲哚族硫苷的生物合成具有重要的调控作用 (Burow et al., 2010; Gigolashvili et al., 2010; Sønderby et al., 2010a)。在拟南芥中有 6 个 R2R3-MYB 基因 (*AtMYB28*、*AtMYB29*、*AtMYB34*、*AtMYB51*、*AtMYB76* 和 *AtMYB122*) 参与调控硫苷的生物合成, 其中 *AtMYB28*、*AtMYB29* 和 *AtMYB76* 调控脂肪族硫苷的生物合成, *AtMYB28* 为主效基因 (Gigolashvili et al., 2008), *AtMYB34*、*AtMYB51* 和 *AtMYB122* 调控吲哚族硫苷的生物合成, 其中 *AtMYB34* 为主效基因 (Frerigmann et al., 2014)。

2.1 MYB 类转录因子对脂肪族硫苷合成的调控

在拟南芥中, 过量表达 MYB 转录因子基因 *AtMYB28*、*AtMYB29*、*AtMYB76* 均可诱导硫苷合成关键基因的上调表达, 进而促进脂肪族硫苷积累 (Gigolashvili et al., 2009)。其中, *MYB28* 是脂肪族硫苷合成转录中的关键性调控因子, 其正调控脂肪族硫苷合成, 在 *myb28* 单敲除拟南芥突变体中, 长链和短链脂肪族硫苷含量显著下降 (Hirai et al., 2007)。在 *myb29* 单敲除突变体中, 短链和总脂肪族硫苷含量下降至野生型的 50% 左右, 而长链脂肪族硫苷无明显变化, 这表明 *AtMYB29* 转录因子主要调控短链脂肪族硫苷的合成 (Sønderby et al., 2010a)。*AtMYB76* 对脂肪族硫苷合成的调节作用较弱, 在 *myb76* 单敲除突变体中, *AtMYB76* 的缺失并未影响到脂肪族硫苷的合成, 各类硫苷含量均无明显变化 (Sønderby et al., 2010a), 而在 *myb28* 和 *myb29* 双敲除突变体中, *AtMYB76* 调控硫苷的作用加强, 这表明 *AtMYB76* 可以不依赖 *AtMYB28* 和 *AtMYB29*, 具有独立调控脂肪族硫苷合成的功能 (Sønderby et al., 2010a), 同时还暗示了植物在进化过程中, 通过基因冗余和功能重叠以提高适应能力。此外, *MYB76* 在决定叶片内的脂肪族硫苷空间分布方面起着重要作用, 表明 *MYB76* 在运输调控中的潜在作用 (Kim et al., 2013)。

在拟南芥脂肪族硫苷合成过程中, 过量表达 *AtMYB28*、*AtMYB29*、*AtMYB76* 均可诱导脂肪族硫苷合成关键酶基因 *MAM1*、*MAM3*、*CYP79F1*、*CYP79F2*、*CYP83A1*、*C-S lyase* 和 *AtST5b* 的上调表达 (图 2, A), 同时存在诱导特异性。如: *AtMYB28* 和 *AtMYB29* 过表达对 *CYP79F2* 和硫转移酶基因的上调表达幅度明显高于 *AtMYB76*, 进一步表明 *AtMYB76* 对脂肪族硫苷的调控仅起辅助作用 (Sønderby et al., 2007; Gigolashvili et al., 2008)。此外, *AtMYB28* 和 *AtMYB76* 可诱导 *BCAT4* 上调表达, 而 *AtMYB29* 的过表达并未引起该基因的上调表达, 但相反的是, *AtMYB29* 的过表达可诱导 *UTG74C1* 和 *AtST5c* 上调表达, 而 *AtMYB28* 和 *AtMYB76* 并未引起该基因表达量的显著变化 (图 2, A) (Gigolashvili et al., 2009)。

2.2 MYB 类转录因子对吲哚族硫苷合成的调控

研究表明 *MYB34*、*MYB51*、*MYB122* 转录因子基因与吲哚族硫苷的合成密切相关 (Celenza et al., 2005; Gigolashvili et al., 2010)。大量的基因功能验证试验表明, 在拟南芥中过表达 *AtMYB34*、*AtMYB51*、*AtMYB122* 均引起吲哚族硫苷含量显著升高, 而缺失突变体则表现为硫苷含量显著降低。进一步分析显示, 在硫苷合成过程中, *AtMYB34* 和 *AtMYB51* 均能调控吲哚 - 3 - 乙腈 (Indole-3-acetonitrile) 和吲哚 - 3 - 甲醛 (Indole-3-carboxaldehyde) 合成途径中关键基因的上调表达 (Malitsky et al., 2008), 通过调控硫同化, 进而促进硫苷积累 (Malitsky et al., 2008; Yatusovich et al., 2010)。

然而在 *MYB34*、*MYB51*、*MYB122* 调控吲哚族硫苷合成过程中, 三者存在较大的功能特异性。通过对拟南芥进行基因单敲除、双敲除、三敲除, 缺失突变体显示 *AtMYB34* 主要调节拟南芥根中吲哚族硫苷的合成, *AtMYB51* 主要调节芽和叶中吲哚族硫苷的生物合成, 而 *AtMYB122* 需依赖 *AtMYB51* 对吲哚族硫苷合成起调控作用。

此外, *MYB34*、*MYB51*、*MYB122* 对吲哚族硫苷组分变化有一定的调控差异性。*AtMYB34* 正向调控拟南芥中色氨酸的生物合成 (Bender & Fink, 1998), 过表达 *AtMYB34* 可诱导邻氨基苯甲酶合成酶基因 *ASAI* (Anthranilate synthase) 的上调表达, 同时造成吲哚-3-甲基硫苷 (I3M) 大量积累 (Celenza et al., 2005; Gigolashvili et al., 2010), 而 *myb34* 缺失突变体中 I3M 含量显著下降 (Celenza et al., 2005)。*AtMYB51* 过量表达同样造成 I3M 含量的显著升高, 同时还造成 4-甲氧基-吲哚-3-甲基硫苷 (4MI3M) 和 1-甲氧基-吲哚-3-甲基硫苷 (1MI3M) 含量的升高, 而 *AtMYB122* 与 *AtMYB34* 类似, 过量表达后仅造成 I3M 含量的显著升高。

在拟南芥吲哚族硫苷合成过程中, 过量表达 *AtMYB34*、*AtMYB51*、*AtMYB122* 均诱导吲哚族硫苷合成关键基因 *TSB1*、*CYP79B2*、*CYP79B3* 和 *CYP83B1* 上调表达 (图 2, C) (Bender & Fink, 1998; Celenza et al., 2005)。不同的是, *MYB34* 和 *MYB122* 可诱导 *ASAI* 上调表达, 而 *MYB51* 的过表达并未引起该基因上调表达 (图 2)。*AtMYB34*、*AtMYB51*、*AtMYB122* 调控吲哚族硫苷组分的差异还表现在, *UGT74B1* 和 *AtST5a* 编码的蛋白酶催化 I3M 合成的最后两步反应 (Frerigmann & Gigolashvili, 2009), 二者均因 *MYB51* 的过表达而上调表达, 但对 *MYB34* 和 *MYB122* 的过表达无明显响应 (图 2, C) (Gigolashvili et al., 2009)。

2.3 MYB 类转录因子对硫苷合成调控中外源刺激的应答

目前研究显示, 植物体内、硫苷合成可响应外界环境变化和外源刺激, 如损伤 (Wounding)、茉莉酸甲酯 (MeJA)、水杨酸 (SA)、脱落酸 (ABA)、乙烯 (ET) 以及蔗糖 (Glucose) 等, 其调控途径可概括为: MYB 类转录因子响应外源刺激后, 进一步诱导或抑制 *BCAT4*、*MAMI*、*MAM3* 等硫苷合成关键基因的表达水平, 实现硫苷合成的正向或负向调控 (图 2) (Frerigmann & Gigolashvili, 2009; Gigolashvili et al., 2009; Wu et al., 2019)。给予植物外源 MeJA 刺激后, *MYB28* 和 *MYB76* 表达上调数倍, 诱导下游基因表达上调以促进脂肪族硫苷合成, 而 *MYB29* 表达上调幅度不大, 这表明 *MYB29* 可能在响应 MeJA 调控硫苷合成中占次要地位 (Gigolashvili et al., 2009)。外源 MeJA 也可调控吲哚族硫苷合成, 不同的是, MeJA 需与茉莉酸信号物质 MYC2 结合后, 正调控 *MYB34* 和负调控 *MYB51* (图 2, B) (Dombrecht et al., 2007)。外界损伤刺激后, 植物 *MYB28*、*MYB29*、*MYB76* 和 *MYB51* 均显著迅速上调表达, 其中 *MYB76* 表达量上调 50 余倍, 这表明 *MYB76* 在响应损伤刺激后的硫苷合成中发挥重要作用 (Gigolashvili et al., 2008, 2010)。如图 2 所示, *MYB34* 和 *MYB122* 可响应外源 ABA 刺激, *MYB51* 可响应外源 SA、ET 以及病原菌刺激, 正调控吲哚族硫苷合成代谢, 以提高植物应对外源胁迫和病原菌的防御反应 (Agerbirk et al., 2009; Schlaeppli et al., 2010)。此外, 一些蛋白也共同参与硫苷合成的调控, 如 *AtDof1.1* (OBP2) 和钙调蛋白结合蛋白 IQD1 能够诱导 *MYB51* 上调表达, 通过诱导下游基因高表达以促进吲哚族硫苷积累 (Skirycz et al., 2006; Levy et al., 2010)。硫亏缺可通过 *SLIM1* 激活硫苷分解代谢酶活性, 同时抑制 *MYB28* 和 *MYB34* 的表达水平 (Maruyama-Nakashita et al., 2010)。目前的研究还发现, 脂肪族硫苷和吲哚族硫苷的合成存在竞争效应, 当植物受到物理刺激时, 会短暂的诱导 *MYB51* 表达, 提高吲哚族硫苷含量以参与植物对病原菌的防御反应 (Agerbirk et al., 2009; Schlaeppli et al., 2010), 同时通过抑制 *CYP79F1* 和 *CYP79F2* 的表达以降低脂肪族硫苷合成 (李晶 等, 2013), 而 *MYB28* 过表达促进脂肪族硫苷积累的同时, 抑

制了吲哚族硫苷的合成, 并导致水杨酸途径的增强和茉莉酸途径的减弱 (蒿连梅, 2013)。

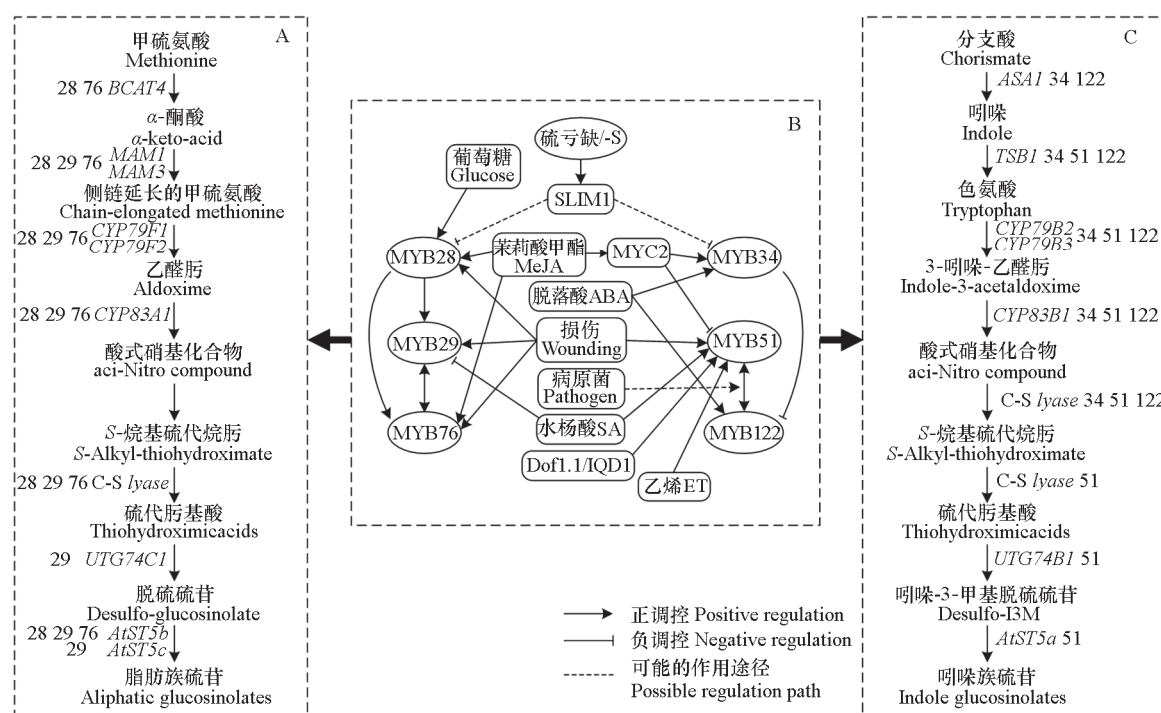


图 2 硫苷合成途径中 MYB 转录因子调控网络

A: 脂肪族硫苷合成中 MYB 转录因子调控, 图中基因旁 28、29、76 表示该基因受 MYB28、MYB29、MYB76 转录因子调控;

B: MYB 转录因子受外源刺激响应, C: 吲哚族硫苷合成中 MYB 转录因子调控,

图中基因旁 34、51、122 表示该基因受 MYB34、MYB51、MYB122 转录因子调控。

Fig. 2 Regulatory network in glucosinolate biosynthetic pathways with MYB transcription factors

A: Aliphatic glucosinolate biosynthetic regulatory by MYB28, MYB29 and MYB76, and 28, 29 and 76 represent that the gene expression was up-regulatory by induced by MYB28, MYB29, MYB76; B: the response of MYBs after exogenous stimulus; C: Indole glucosinolate biosynthetic regulatory by MYB34, MYB51 and MYB122, and 34, 51 and 122 represent that the gene expression was up-regulatory by induced by MYB34, MYB51, MYB122.

2.4 MYB 类转录因子对蔬菜作物硫苷合成的调控

目前, 在 MYB 转录因子调控蔬菜作物硫苷合成方面的研究较少, 主要集中于芸薹属蔬菜作物 MYB28 和 MYB29 的同源克隆、序列比对和功能验证。陆俊杏等 (2017) 采用生物信息学方法, 鉴定了甘蓝型油菜 (*Brassica napus*)、白菜 (*B. rapa*)、甘蓝 (*B. oleracea*)、芥菜型油菜 (*B. juncea*)、黑芥 (*B. nigra*) 5 个芸薹属蔬菜作物的 MYB28, 通过序列比对分别鉴定出 5、3、3、4 和 2 个 MYB28 同源基因, 开放阅读框 (ORF) 长度接近, 均含有 3 个外显子和 2 个内含子。进一步分析发现芸薹属蔬菜作物 MYB28 位点的进化符合禹氏三角理论, 种间的同源性存在高于种内同源性的现象, 可能的原因是属的基本种内部三倍化后, 为了满足功能的分化, MYB28 序列也出现了分化, 造成基本种种内 MYB28 的同源性不高。

Augustine 等 (2013) 在芥菜 (AABB 型) 中鉴定了 4 个 MYB28 的同源基因, 分别命名为 *BjuMYB28-1*、*BjuMYB28-2*、*BjuMYB28-3*、*BjuMYB28-4*, 其中 *BjuMYB28-1* 和 *BjuMYB28-2* 起源于 B 基因组, *BjuMYB28-3*、*BjuMYB28-4* 起源于 A 基因组, 基因序列比对发现 *BjuMYB28-2* 与拟南芥

AtMYB28 同源性最高 (83.1%)。将芥菜 4 个 *BjuMYB28* 分别在拟南芥植株中过表达, 结果显示脂肪族硫苷含量均显著升高, 证实 4 个基因均具有调控脂肪族硫苷合成的功能, 表明芥菜在进化过程中可通过基因冗余的方式提高脂肪族硫苷合成的调控能力。Seo 等 (2016) 在甘蓝中鉴定了 3 个 *MYB28* 的同源基因, 分别命名为 *BrMYB28.1*、*BrMYB28.2* 和 *BrMYB28.3*, 基因序列比对发现 *BrMYB28* 与拟南芥 *AtMYB28* 同源性在 81%~87% 之间, 进化树分析显示 *BrMYB28.1* 和 *BrMYB28.3* 亲缘关系较近, *BrMYB28.2* 和 *AtMYB28* 亲缘关系较近, qRT-PCR 数据显示 3 个基因表达具有较高的组织特异性。在甘蓝植株中过表达上述 3 个同源基因发现, *BrMYB28.1* 过表达植株总硫苷含量上升幅度最大, 且脂肪族、吲哚族、芳香族硫苷的含量均显著上升。但与拟南芥硫苷生物合成转录调控机制不同的是, 过表达 *BrMYB28* 引起硫苷合成关键基因 *BrAOP2* 表达量的显著下调和 *BrGSL-OH* 的显著上调, 表明 *MYB28* 对硫苷生物合成的调控机理可能因植物不同而存在差异。

Yin 等 (2017) 在芥蓝中克隆了 *MYB28* 的同源基因, 命名为 *BoaMYB28*, 基因序列比对发现 *BoaMYB28* 与拟南芥 *AtMYB28* 同源性达 84%。在拟南芥中分别过表达和沉默 *BoaMYB28*, 结果显示过表达植株中长链和短链脂肪族硫苷含量显著升高, 而沉默植株中均显著下降, 表明 *BoaMYB28* 在芥菜脂肪族硫苷合成过程中发挥重要的调控功能。进一步研究还发现, 在 *BoaMYB28* 过表达植株中, 硫苷合成关键基因 *MAM1*、*MAM3*、*CYP79F1*、*CYP79F2*、*CYP83A1*、*5T5B* 和 *5T5C* 均显著上调表达, 表明 *BoaMYB28* 通过诱导上述基因的上调表达实现脂肪族硫苷的合成调控。赵帅 (2016) 通过同源克隆的方法, 克隆出了青花菜中脂肪族硫苷合成调控转录因子 *MYB28* 的 2 个同源基因 (*BoMYB28-1*、*BoMYB28-2*) 和 *MYB29* 的 2 个同源基因 (*BoMYB29-1*、*BoMYB29-2*), 基因序列比对发现 *BoMYB28* 和 *BoMYB29* 分别与拟南芥 *AtMYB28* 和 *AtMYB29* 保持较高的同源性。分别在拟南芥中过表达上述 4 个基因, 在 *BoMYB28-1* 和 *BoMYB28-2* 过表达植株中, 短链脂肪族硫苷的含量显著增加, 而长链脂肪族硫苷的含量变化不显著; 在 *BoMYB29-1* 和 *BoMYB29-2* 过表达植株中, 短链和长链脂肪族硫苷含量均显著增加, 这暗示 *BoMYB28* 和 *BoMYB29* 在青花菜脂肪族硫苷合成过程中具有同样的调控功能。

在蔬菜作物通过诱导硫苷合成应答外界生物刺激方面, 马永华 (2018) 发现 ‘黑油筒’ 白菜经甜菜夜蛾取食后, 植株硫苷含量增加, 随着取食时间的延长呈上升趋势, 同时发现 *BrMYB28* 和硫苷合成关键基因 (*BCAT4*、*MAM1*、*CYP83A1* 等) 表达量均显著增加, 表明 ‘黑油筒’ 白菜 *BrMYB28* 可响应外界生物刺激诱导下游基因上调表达, 促进硫苷合成以提高防御能力。

3 bHLH 转录因子对硫苷合成的调控作用

bHLH 转录因子具有 bHLH 结构域, 该结构域包含 50~60 个氨基酸, 其中有一个长度为 10~15 个氨基酸的碱性氨基酸区和 1 个大约 40 个氨基酸的 α -螺旋-环- α -螺旋区 (HLH 区), 碱性氨基酸位于 bHLH 结构段的 N-端, 具有 DNA 识别和结合位点 (Ma et al., 1994)。最早开展 bHLH 转录因子的研究多以动物为试材, 近几年在植物中的报道明显增多, 从模式作物拟南芥到经济作物水稻, 均有 bHLH 转录因子的报道, 苔藓和藻类中更多的 bHLH 转录因子也被相继发现, 植物中 bHLH 转录因子家族可划分为 32 个亚族 (Carretero et al., 2010)。

bHLH 转录因子 (*MYC2*、*MYC3*、*MYC4* 等) 在十字花科植物吲哚族硫苷的合成过程中, 通过与 *MYB* 类转录因子组成蛋白复合体发挥重要的调控功能 (Zimmermann et al., 2004; Feller et al., 2006; Butelli et al., 2008)。目前的研究显示, bHLH 类转录因子 *myc2myc3myc4* 三缺失突变体与野

生型相比, 硫苷合成过程中关键酶基因 *BCAT4*、*BAT5*、*MAM1*、*CYP79B3*、*CYP79F1*、*GSTF11*、*SUR1*、*UGT74B1* 和 *FMO-GSOX3* 的表达量显著下调, 且总硫苷含量仅为野生型的 1%。进一步研究发现, MYC2/MYC3/MYC4 转录因子是通过调控 MYB 类转录因子转录活性, 从而间接调控硫苷合成过程中关键酶基因的上调表达以促进硫苷积累 (Schweizer et al., 2013)。其中, MYC2 和 MYC4 与 MYB28、MYB29、MYB34、MYB122 互作性较强, 而与 MYB51、MYB76 互作性较弱, MYC3 与上述 MYB 类转录因子互作性均较强 (Schweizer et al., 2013)。此外, Frerigmann 等 (2014) 通过酵母双杂交筛选试验, 证实了 bHLH05 与 MYB51 共同调控拟南芥中的吲哚族硫苷合成, 同时发现 bHLH04、bHLH05、bHLH06/MYC2 还与其他 R2R3-MYBs 转录因子共同调控硫苷的合成。

在十字花科植物进化过程中, 通过增强硫苷合成以适应各种生物胁迫和非生物胁迫环境的研究已多有报道 (Howe & Jander, 2008; Erb et al., 2011)。研究显示, 硫苷合成可响应由茉莉酸和脱落酸信号途径介导的外源刺激, 其中 MYC2 转录因子是该过程中重要的调控元件。报道显示, 拟南芥中 MYC2 可调控诸如硫苷等植物防卫物质的合成以提高自身耐性和抗性 (Kazan & Manners, 2013)。类似地, 采用叶食性昆虫采食植物叶片, 发现该过程可诱导 MYC2 反应, 同时诱导茉莉酸响应基因——营养贮藏蛋白基因 *VSP2* 上调表达 (Verhage et al., 2011), 该结果进一步表明 MYC2 在响应外源生物胁迫并诱导硫苷合成以提高防御能力上的重要功能 (Pozo et al., 2010)。

陈君杰 (2017) 发现, 雪里蕻经甜菜夜蛾取食后, 植株总硫苷显著增加, 其中吲哚族硫苷增加 239.4%; 转录组测序分析结果显示茉莉酸 (JA) 合成和代谢途径与硫苷合成途径存在大量的差异基因, 其中 JA 感应基因 (*JAZ9*)、JA 合成基因 (*MYC2*、*AOC3*)、硫苷合成基因 (*BCAT4*、*CYP83A1*、*CYP83B1*、*AOP2* 等) 均显著上调表达, 表明害虫取食可诱导植物硫苷介导的防御体系, 其中 MYC 在响应害虫刺激在诱导硫苷合成过程中发挥重要作用。

4 WRKY 转录因子对硫苷合成的调控作用

WRKY 类转录因子是一类含有高度保守的 WRKY 域的锌指蛋白, 该蛋白保守域由约 60 个氨基酸残基组成, 靠近氨基 (N) 末端的 7 个保守氨基酸残基 WRKYGQK, 被视为 WRKY 结构域的核心序列, 其变异往往导致 DNA 的结合活性减弱甚至丧失 (Maeo et al., 2001), 羧基末端的锌指类似结构 (Zinc finger like motif) 在植物的进化中可能起到重要的作用 (Xie et al., 2005; Zhang & Wang, 2005)。报道显示, WRKY18 和 WRKY40 在调控病原抗性方面具有重要作用。与野生型相比, 拟南芥 *wrky18wrky40* 双缺失突变体表现出较强的奥隆特高氏白粉菌 (*Golovinomyces orontii*) 抗性。进一步分析发现, 缺失突变体在奥隆特高氏白粉菌病原侵染 12 h 后, 硫苷合成关键基因 *CYP81F2* 显著上调, 侵染 24 h 后, 4MI3G 含量显著高于野生型, 侵染 72 h 后, 4MI3G 含量高于野生型约 25%, 这些数据表明 WRKY18 和 WRKY40 通过协同 *CYP81F2* 负调控 4MI3G 的合成, 以提高对奥隆特高氏白粉菌病原的防卫能力 (Schön et al., 2013)。然而, 十字花科蔬菜作物中尚未发现 WRKY 类转录因子介导硫苷防御体系的报道。

5 展望

随着硫苷及代谢产物生物学功能的逐步揭示, 硫苷合成调控已成为十字花科植物次生代谢和逆境响应方面的研究热点问题之一。在硫苷合成转录调控层面, 越来越多的关键酶基因和转录因子得

以鉴定和验证, 这为应用生物技术手段解决高硫苷含量的作物育种问题开辟了崭新的思路, 同时为外源调控硫苷的积累奠定了理论基础。然而硫苷合成过程十分复杂, 除响应机械损伤、干旱、温度、光照、激素、化学物质等非生物因素外, 还响应病原菌侵染、昆虫取食等生物因素, 其合成过程必然是一个受遗传位点、发育进程、转录、翻译以及合成产物等多层次的复杂调控网络。目前的研究多为外界刺激物诱导后的硫苷含量变化以及转录层面的调控机理, 而转录因子在响应外源刺激过程中, 上游具体的作用元件和调控模式需要进一步的研究。此外, 转录因子与下游靶基因结合是否有其他互作蛋白的共同作用, 在外界刺激中断或消失后, 高含量的硫苷如何反馈调控硫苷的生物合成, 这些问题的阐明更利于揭示复杂的硫苷合成调控网络。

与拟南芥不同的是, 十字花科蔬菜作物中已鉴定的 *MYB28* 和 *MYB29* 均存在多拷贝的现象。通过这种基因冗余, 蔬菜作物在经逆境胁迫时可以快速诱导硫苷的合成, 通过高含量和多组分的硫苷以提高防御能力。十字花科蔬菜作物富含多种生物活性物质, 其中短链脂肪族硫苷的降解产物具有较高的生物活性, 如萝卜硫苷的水解产物——萝卜硫素在防癌抗癌方面发挥积极作用, 其合成调控已成为热点问题。研究 *MYB28*、*MYB29* 和 *MYB76* 对蔬菜作物食用器官中萝卜硫苷的合成调控, 可为高萝卜硫素的十字花科蔬菜作物的分子育种和优质栽培提供理论依据。此外, 大量的试验证实了吲哚族硫苷在植物防卫反应上起到的重要作用, 其合成调控也多从转录因子介导 JA、SA、乙烯和 ABA 等信号途径开展研究, 目前尚无法明确作物的硫苷防御体系与昆虫取食或病原菌侵染之间的互作机制。即作物如何感知昆虫取食或病原菌侵染刺激, 感知后通过哪种途径作用于硫苷合成, 刺激消失后如何反馈调控硫苷合成。这种互作机制的阐明, 不仅可丰富硫苷合成调控网络, 还可为蔬菜作物病虫害的生物防治提供新的思路和方法。

综上所述, 硫苷及降解产物不仅产生大量的生物活性物质, 还可提高植物的自身防卫能力。硫苷的转录因子在十字花科蔬菜作物品质和特殊风味形成以及防御反应中发挥重要调控作用。通过对调控硫苷合成的 3 类转录因子 (*MYB* 类、*bHLH* 类、*WRKY* 类) 的研究, 阐明转录因子的外源刺激应答机制和诱导硫苷合成的调控机制, 进一步丰富硫苷合成的调控网络, 为高硫苷含量的十字花科蔬菜作物的分子育种、优质栽培、病虫害生物防治提供理论基础。然而, 与拟南芥不同的是, 十字花科蔬菜作物硫苷合成的调控网络更为复杂, 需要大量的工作从转录因子上游和下游探索其调控机理。

References

- Agerbirk N, Vos M D, Kim J H, Jander G. 2009. Indole glucosinolate breakdown and its biological effects. *Phytochemistry Reviews Proceedings of the Phytochemical Society of Europe*, 8: 101 - 120.
- Ambawat S, Sharma P, Yadav N R, Yadav R C. 2013. MYB transcription factor genes as regulators for plant responses: an overview. *Physiology & Molecular Biology of Plants*, 19 (3): 307 - 321.
- Augustine R, Majee M, Gershenzon J, Bisht N C. 2013. Four genes encoding MYB28, a major transcriptional regulator of the aliphatic glucosinolate pathway, are differentially expressed in the allopolyploid *Brassica juncea*. *Journal of Experimental Botany*, 64 (16): 4907 - 4921.
- Bak S, Tax F E, Feldmann K A, Galbraith D W, Feyereisen R. 2001. CYP83B1, a cytochrome P450 at the metabolic branch point in auxin and indole glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 13: 101 - 111.
- Bender J, Fink G R. 1998. A Myb homologue, ATR1, activates tryptophan gene expression in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95 (10): 5655 - 5660.
- Burow M, Halkier B A, Kliebenstein D J. 2010. Regulatory networks of glucosinolates shape *Arabidopsis thaliana* fitness. *Current Opinion in Plant Biology*, 13: 347 - 352.

- Butelli E, Titta L, Giorgio M, Mock H-P, Matros A, Peterek S, Schijlen E G W M, Hall R D, Bovy, A G, Luo J, Martin C. 2008. Enrichment of tomato fruit with health-promoting anthocyanins by expression of select transcription factors. *Nature Biotechnology*, 26 (11): 1301 – 1308.
- Carretero Paulet L, Galstyan A, Roig-Villanova I, Martínez-García J F, Bilbao-Castro, J R, Robertson D L. 2010. Genome-wide classification and evolutionary analysis of the bHLH family of transcription factors in *Arabidopsis*, poplar, rice, moss, and algae. *Plant Physiology*, 153 (3): 1398 – 1412.
- Celenza J L, Quiel J A, Smolen G A, Merrikk H, Silvestro A R, Normanly J, Bender J. 2005. The *Arabidopsis* ATR1 Myb transcription factor controls indolic glucosinolate homeostasis. *Plant Physiology*, 137: 253 – 262.
- Chen S, Glawischnig E, Jørgensen K, Naur P, Jørgensen B, Olsen C E, Hansen C H, Rasmussen H, Pickett J A, Halkier B A. 2003. CYP79F1 and CYP79F2 have distinct functions in the biosynthesis of aliphatic glucosinolates in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 33: 923 – 937.
- Chen Jun-jie. 2017. Changes in glucosinolate concentrations and differentially expressed genes in response to *Spodoptera exigua* (Hübner) in *Brassica juncea* [M. D. Dissertation] . Hangzhou: Zhejiang A & F University. (in Chinese)
- 陈君杰. 2017. 甜菜夜蛾取食后雪里蕻硫苷变化和差异表达基因的研究[硕士论文]. 杭州: 浙江农林大学.
- Cheng Kun, Yang Li-mei, Fang Zhi-yuan, Liu Yu-mei, Zhuang Mu, Zhang Yang-yong, Sun Pei-tian. 2010. Research progress on regulation and synthesis genes on glucosinolates biosynthesis in crucifer. *China Vegetables*, (12): 1 – 6. (in Chinese)
- 程 坤, 杨丽梅, 方智远, 刘玉梅, 庄 木, 张扬勇, 孙培田. 2010. 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*, (12): 1 – 6.
- Dinkova-Kostova A T, Kostov R V. 2012. Glucosinolates and isothiocyanates in health and disease. *Trends in Molecular Medicine*, 18 (6): 337 – 347.
- Dombrecht B, Xue G P, Sprague S J, Kirkegaard J A, Ross J J, Reid J B, Fitt G P, Sewelam N, Schenk, P M, Manners J M, Kazan K. 2007. MYC2 differentially modulates diverse jasmonate-dependent functions in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 19 (7): 2225 – 2245.
- Erb M, Kollner T G, Degenhardt J, Zwahlen C, Hibbard B E, Turlings T C J. 2011. The role of abscisic acid and water stress in root herbivore-induced leaf resistance. *New Phytologist*, 189: 308 – 320.
- Fahey J W, Zalcmann A T, Talalay P. 2001. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry*, 56: 5 – 51.
- Feller A, Hernandez J M, Grotewold E. 2006. An ACT-like domain participates in the dimerization of several plant basic-helix-loop-helix transcription factors. *Journal of Biological Chemistry*, 281 (39): 28964 – 28974.
- Field B, Cardon G, Traka M, Botterman J, Vancanneyt G, Mithen R. 2004. Glucosinolate and amino acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 135: 828 – 839.
- Frerigmann H, Berger B, Gigolashvili T. 2014. bHLH05 is an interaction partner of MYB51 and a novel regulator of glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 166: 349 – 369.
- Frerigmann H, Gigolashvili T. 2009. MYB34, MYB51, and MYB122 distinctly regulate indolic glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular plant*, 7 (5): 814 – 828.
- Gigolashvili T, Engqvist M, Yatusovich R, Müller C, Flügge U I. 2008. HAG2/MYB76 and HAG3/MYB29 exert a specific and coordinated control on the regulation of aliphatic glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*, 177 (3): 627 – 642.
- Gigolashvili T, Berger B, Flügge U I. 2009. Specific and coordinated control of indolic and aliphatic glucosinolate biosynthesis by R2R3-MYB transcription factors in *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry Reviews*, 8: 3 – 13.
- Gigolashvili T, Berger B, Mock H P, Müller C, Weisshaar B, Flügge U-I. 2010. The transcription factor HIG1/MYB51 regulates indolic glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 50 (5): 886 – 901.
- Grubb C D, Abel S. 2006. Glucosinolate metabolism and its control. *Trends in Plant Science*, 11 (2): 89 – 100.
- Grubb C D, Zipp B J, Ludwig-Müller J, Masuno M N, Molinski T F, Abel S. 2010. *Arabidopsis* glucosyltransferase UGT74B1 functions in glucosinolate biosynthesis and auxin homeostasis. *Plant Journal*, 40 (6): 893 – 908.
- Hansen C H, Wittstock U, Olsen C E, Hicki A J, Pickett J A, Halkier B A. 2001. Cytochrome P450 CYP79F1 from *Arabidopsis* catalyzes the conversion of dihomomethionine and trihomomethionine to the corresponding aldoximes in the biosynthesis of aliphatic glucosinolates. The

- Journal of Biological Chemistry, 276 (14): 11078 - 11085.
- Hemm M R, Ruegger M O, Chapple C. 2003. The *Arabidopsis* *ref2* mutant is defective in the gene encoding CYP83A1 and shows both phenylpropanoid and glucosinolate phenotypes. *Plant Cell*, 15: 179 - 194.
- Hirai M Y. 2009. A robust omics-based approach for the identification of glucosinolate biosynthetic genes. *Phytochemistry Reviews*, 8: 15 - 23.
- Hirai M Y, Sugiyama K, Sawada Y, Tohge T, Obayashi T, Suzuki A, Araki R, Sakurai N, Suzuki H, Aoki K. 2007. Omics-based identification of *Arabidopsis* Myb transcription factors regulating aliphatic glucosinolate biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104 (15): 6478 - 6483.
- Huang K, Lin J C, Wu Q Y, Yan J Y, Liu M Y, Zhang S, Xiao W J. 2016. Changes in sulforaphane and selenocysteine methyltransferase transcript levels in broccoli treated with sodium selenite. *Plant Mol Biol Rep*, 34: 807 - 814.
- Hull A K, Vij R, Celenza J L. 2000. *Arabidopsis* cytochrome P450s that catalyze the first step of tryptophan-dependent indole-3-acetic acid biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97 (5): 2379 - 2384.
- Hopkins R J, van Dam N M, van Loon J J A. 2009. Role of glucosinolates in insect-plant relationships and multitrophic interactions. *Annual Review of Entomology*, 54: 57 - 83.
- Howe G A, Jander G. 2008. Plant immunity to insect herbivores. *Annual Review of Plant Biology*, 59: 41 - 66.
- Hao Lian-mei. 2013. The regulation of MYB28 and MYB51 transcription factor on glucosinolates metabolism in *Arabidopsis thaliana* [M. D. Dissertation]. Harbin: Northeast Agricultural University. (in Chinese)
- 蒿连梅. 2013. 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]. 哈尔滨: 东北农业大学.
- Katiyar A, Smita S, Lenka S K, Rajwanshi R, Chinnusamy V, Bansal K C. 2012. Genome-wide classification and expression analysis of MYB transcription factor families in rice and *Arabidopsis*. *BMC Genomics*, 13: 544 - 562.
- Kazan K, Manners J M. 2013. MYC2: The master in action. *Molecular Plant*, 6 (3): 686 - 703.
- Kim Y B, Li X, Kim S J, Kim H H, Lee J, Kim H, Park S U. 2013. MYB transcription factors regulate glucosinolate biosynthesis in different organs of Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*). *Molecules*, 18 (7): 8682 - 8695.
- Kliebenstein D J, Kroymann J, Brown P, Figuth A, Pedersen D, Gershenzon J, Mitchell-Olds T. 2001. Genetic control of natural variation in *Arabidopsis* glucosinolate accumulation. *Plant Physiology*, 126: 811 - 825.
- Kroymann J, Textor S, Tokuhisa J G, Falk K L, Bartram S, Gershenzon J, Mitchell-Olds T. 2001. A gene controlling variation in *Arabidopsis* glucosinolate composition is part of the methionine chain elongation pathway. *Plant Physiology*, 127: 1077 - 1088.
- Levy M, Wang Q M, Kaspi R, Parrella M P, Abel S. 2010. *Arabidopsis* IQD1, a novel calmodulin-binding nuclear protein, stimulates glucosinolate accumulation and plant defense. *Plant Journal*, 43: 79 - 96.
- Li Jing, Hao Lian-mei, Wang Hong-bo. 2013. Regulation of MYB51 transcription factor on glucosinolates metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Northeast Agricultural University*, 44 (10): 155 - 160. (in Chinese)
- 李 晶, 蒿连梅, 王洪波. 2013. 拟南芥 MYB51 转录因子对芥子油苷代谢的调控作用. *东北农业大学学报*, 44 (10): 155 - 160.
- Liao Yong-cui. 2011. Analysis of structure and content of glucosinolates and QTL location in *Brassica rapa* [M. D. Dissertation]. Chongqing: Southwest University. (in Chinese)
- 廖永翠. 2011. 白菜类作物硫代葡萄糖甙结构和含量的分析及 QTL 定位 [硕士论文]. 重庆: 西南大学.
- Lu Jun-xing, Bai Hui-yang, Zhang Tao. 2017. Molecular evolution of MYB28 gene family in *Brassica* species (*B. napus*, *B. rapa*, *B. oleracea*, *B. juncea*, *B. nigra*). *Molecular Plant Breeding*, 15 (2): 393 - 403. (in Chinese)
- 陆俊杏, 白辉扬, 张 涛. 2017. 芸薹属物种 (*B. napus*, *B. rapa*, *B. oleracea*, *B. juncea*, *B. nigra*) MYB28 家族的分子进化. *分子植物育种*, 15 (2): 393 - 403.
- Ma P C M, Rould M A, Weintraub H, Pabo C O. 1994. Crystal structure of MyoD bHLH domain-DNA complex: perspectives on DNA recognition and implications for transcriptional activation. *Cell*, 77 (3): 451 - 459.
- Ma Yong-hua. 2018. Interaction of spodoptera exigua and cabbage glucosinolates and preliminary function study of *Bra008132* gene [M. D. Dissertation]. Linan: Zhejiang A & F University. (in Chinese)
- 马永华. 2018. 甜菜夜蛾与小白菜硫苷的相互影响及 *Bra008132* 基因的初步功能研究 [硕士论文]. 临安: 浙江农林大学.

- Mao K, Hayashi S, Kojima-Suzuki H, Morikami A, Nakamura K. 2001. Role of conserved residues of the WRKY domain in the DNA-binding of tobacco WRKY family proteins. *Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan*, 65 (11): 2428 – 2436.
- Malitsky S, Blum E, Less H, Venger I, Elbaz M, Morin S, Eshed Y, Aharoni A. 2008. The transcript and metabolite networks affected by the two clades of *Arabidopsis* glucosinolate biosynthesis regulators. *Plant Physiology*, 148 (4): 2021 – 2049.
- Mao Shu-xiang, Wang Jun-wei, Xu Hao-ran, Zou Miao, Huang Ying-juan, Bai Ai-mei, Wang Sheng-ze, Huang Ke, Wu Qiu-yun. 2018. Anabolism relative genes and allogenic material regulation of sulforaphane in Cruciferous vegetables. *Chinese Journal of Cell Biology*, 40 (8): 1415 – 1423. (in Chinese)
- 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. 2018. 十字花科蔬菜萝卜硫素合成代谢相关基因及外源调控. *中国细胞生物学学报*, 40 (8): 1415 – 1423.
- Maruyama-Nakashita A, Nakamura Y, Watanabe-Takahashi A, Inoue E, Yamaya T, Takahashi H. 2010. Identification of a novel cis-acting element conferring sulfur deficiency response in *Arabidopsis* roots. *Plant Journal*, 42 (3): 305 – 314.
- Mikkelsen M D, Hansen C H, Wittstock U, Halkier B A. 2000. Cytochrome P450 CYP79B2 from *Arabidopsis* catalyzes the conversion of tryptophan to indole-3-acetaldoxime, a precursor of indole glucosinolates and indole-3-acetic acid. *Journal of Biological Chemistry*, 275 (43): 33712 – 33717.
- Mikkelsen M D, Naur P, Halkier B A. 2010. *Arabidopsis* mutants in the C-S lyase of glucosinolate biosynthesis establish a critical role for indole-3-acetaldoxime in auxin homeostasis. *Plant Journal*, 37 (5): 770 – 777.
- Piotrowski M, Schemenewitz A, Lopukhina A, Müller A, Janowitz T, Weiler E W, Oecking C. 2004. Desulfoglucosinolate sulfotransferases from *Arabidopsis thaliana* catalyze the final step in the biosynthesis of the glucosinolate core structure. *Journal of Biological Chemistry*, 279 (49): 50717 – 50725.
- Pozo M J, Van Der Ent S, Van Loon L C, Pieterse C M J. 2010. Transcription factor MYC2 is involved in priming for enhanced defense during rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*, 180 (2): 511 – 523.
- Schlaeppli K, Abou Mansour E, Buchala A, Mauch F. 2010. Disease resistance of *Arabidopsis* to *Phytophthora* Brassicae is established by the sequential action of indole glucosinolates and camalexin. *Plant Journal*, 62 (9): 840 – 851.
- Schön M, Töller Armin, Diezel C, Roth C, Westphal L, Wiermer M, Somssich I E. 2013. Analyses of wrky18 wrky40 plants reveal critical roles of SA/EDS1 signaling and indole-glucosinolate biosynthesis for *Golovinomyces orontii* resistance and a loss-of resistance towards *Pseudomonas syringae* pv. tomato AvrRPS4. *Molecular Plant Microbe Interact*, 26 (7): 758 – 767.
- Schweizer F, Fernández Calvo P, Zander M, Diez-Diaz M, Fonseca S, Glauser G, Lewsey M G, Ecker J R, Solano R, Reymond P. 2013. *Arabidopsis* basic helix-loop-helix transcription factors MYC2, MYC3, and MYC4 regulate glucosinolate biosynthesis, insect performance, and feeding behavior. *Plant Cell*, 25 (8): 3117 – 3132.
- Seo M S, Jin M, Chun J H, Kim S J, Park B S, Shon S H, Kim J S. 2016. Functional analysis of three *BrMYB28* transcription factors controlling the biosynthesis of glucosinolates in *Brassica rapa*. *Plant Molecular Biology*, 90 (4): 503 – 516.
- Skirycz A, Reichelt M, Burow M, Birkemeyer C, Rolcik J, Kopka J, Zanor M I, Gershenzon J, Strnad M, Szopa J, Mueller-Roeber B, Witt I. 2006. DOF transcription factor AtDof1.1 (OBP2) is part of a regulatory network controlling glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 47: 10 – 24.
- Sønderby I E, Burow M, Rowe H C, Kliebenstein D J, Halkier B A. 2010a. A complex interplay of three R2R3 MYB transcription factors determines the profile of aliphatic glucosinolates in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 153: 348 – 363.
- Sønderby I E, Geu-Flores F, Halkier B A. 2010b. Biosynthesis of glucosinolates-gene discovery and beyond. *Trends in Plant Science*, 15 (5): 283 – 290.
- Sønderby I E, Hansen B G, Bjarnholt N, Ticconi C, Halkier B A, Kliebenstein D J. 2007. A systems biology approach identifies a R2R3 MYB gene subfamily with distinct and overlapping functions in regulation of aliphatic glucosinolates. *PLoS ONE*, 2 (12): 1 – 16.
- Textor S, de Kraker J W, Hause B, Gershenzon J, James G T. 2007. MAM3 catalyzes the formation of all aliphatic glucosinolate chain lengths in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 144: 60 – 71.
- Valgimigli L, Iori R. 2009. Antioxidant and pro-oxidant capacities of ITCs. *Environmental & Molecular Mutagenesis*, 50: 222 – 237.

- Verhage A, Vlaardingerbroek I, Raaymakers C, van Dam N M, Dicke M, Van Wees S C M, Pieterse C M J. 2011. Rewiring of the jasmonate signaling pathway in *Arabidopsis* during insect herbivory. *Frontiers in Plant Science*, 2 (12): 1085 – 1091.
- Wittstock U, Kliebenstein D J, Lambrix V, Reichelt M, Gershenzon J. 2003. Chapter five glucosinolate hydrolysis and its impact on generalist and specialist insect herbivores. *Recent Advances in Phytochemistry*, 37 (3): 101 – 125.
- Wu Q Y, Wang J W, Mao S X, Xu H R, Wu Q, Liang M T, Yuan Y M, Liu M Y, Huang K. 2019. Comparative transcriptome analyses of genes involved in sulforaphane metabolism at different treatment in Chinese kale using full-length transcriptome sequencing. *BMC Genomics*, 20: 377 – 349.
- Xie Z, Zhang Z L, Zou X L, Huang J, Ruas P, Thompson D, Shen Q J. 2005. Annotations and functional analyses of the rice WRKY gene superfamily reveal positive and negative regulators of abscisic acid signaling in aleurone cells. *Plant Physiology*, 137: 176 – 189.
- Yatusevich R, Mugford S G, Matthewman C, Gigolashvili T, Frerigmann H, Delaney S, Koprivova A, Flügge U I, Kopriva S. 2010. Genes of primary sulfate assimilation are part of the glucosinolate biosynthetic network in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal for Cell & Molecular Biology*, 62: 1 – 11.
- Yin L, Chen H C, Cao B H, Lei J J, Chen G J. 2017. Molecular characterization of MYB28 involved in aliphatic glucosinolate biosynthesis in Chinese kale (*Brassica oleracea* var. *alboglabra* Bailey). *Frontiers in Plant Science*, 8: 1083 – 1092.
- Yu E Y, Pickering I J, George G N, Prince R C. 2001. In situ observation of the generation of isothiocyanates from sinigrin in horseradish and wasabi. *BBA-General Subjects*, 1527 (3): 156 – 160.
- Zhao Shuai. 2016. Cloning and primary functional analysis of MYB28 and MYB29 gene in broccoli [M. D. Dissertation]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University. (in Chinese)
- 赵 帅. 2016. 青花菜 MYB28、MYB29 基因克隆与功能分析 [硕士论文]. 福州: 福建农林大学.
- Zhang Y J, Wang L J. 2005. The WRKY transcription factor superfamily: its origin in eukaryotes and expansion in plants. *BMC Evolutionary Biology*, 5: 1 – 12.
- Zimmermann I, Heim M, Weisshaar B. 2004. Comprehensive identification of *Arabidopsis thaliana* MYB transcription factors interacting with R/B-like BHLH proteins. *Plant Journal*, 40: 22 – 34.