

硫苷生物合成过程中硫来源的研究进展

何超超, 祝彪, 杨静, 朱祝军

(浙江农林大学 农业与食品科学学院 浙江省农产品品质改良技术研究重点实验室, 浙江 杭州 311300)

摘要: 硫苷是十字花科 *Cruciferae* 植物中一类富含氮硫的次生代谢物, 硫苷合成途径, 特别是硫与硫苷合成关系的研究取得了很大进展。从硫苷核心结构形成过程中还原硫供体来源、活化硫酸盐来源以及半胱氨酸(Cys)、谷胱甘肽(GSH)和高能硫供体 3'磷酸腺苷 5'磷酸硫酸(PAPS)等初生硫代谢产物与硫苷合成间的关系等方面对硫苷合成过程中硫来源的研究进展进行了综述, 提出 GSH 等初生硫代谢调控因子、氮硫等营养元素之间的平衡以及葡萄糖等信号分子对硫苷生物合成的调控机制将成为新的研究热点, 以期为硫苷的生物合成调控研究提供理论依据。参 42

关键词: 植物学; 硫苷; 生物合成; 谷胱甘肽(GSH); 高能硫供体 3'磷酸腺苷 5'磷酸硫酸(PAPS); 初生硫代谢; 综述

中图分类号: S601; Q556

文献标志码: A

文章编号: 2095-0756(2018)01-0167-07

Advances of research on sulfur source in the biosynthesis of glucosinolates

HE Chaochao, ZHU Biao, YANG Jing, ZHU Zhujun

(Key Laboratory for Quality Improvement of Agricultural Products of Zhejiang Province, School of Agriculture and Food Science, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China)

Abstract: Glucosinolates are nitrogen-and sulfur-containing secondary metabolites that mainly found in the Brassicaceae plants. In recent years, the study which involves the biosynthesis of glucosinolates, especially its relationship with sulfur has made some new progress. The research attempted to review the research progresses on the sources of reduced sulfur and active sulfate in the formation of the core glucosinolate structure. The paper also discussed the link between primary sulfur metabolites including Cys, GSH, PAPS and glucosinolate biosynthesis, as well as the relevant research in the future, so as to lay the foundation for the further study. [Ch, 42 ref.]

Key words: botany; glucosinolates; biosynthesis; GSH; PAPS; primary sulfur metabolism; review

硫代葡萄糖苷(glucosinolates, GS), 简称硫苷, 又称芥子油苷, 是植物中一类富含氮硫的阴离子次生代谢物质, 主要存在于十字花科 *Cruciferae*, 尤其是芸薹属 *Brassica* 植物中, 如白菜 *Brassica rapa* ssp. *pekinensis*, 甘蓝 *Brassica oleracea*, 油菜 *Brassica napus*, 芥菜 *Brassica juncea*, 芜菁 *Brassica rapa*, 拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 等^[1]。自从 BUSSY^[2]于 1839 年从芥菜子中首次发现硫苷后, 硫苷的种类以及降解产物逐渐被人所认识。目前, 鉴定出结构的硫苷已经超过 132 种^[3]。所有硫苷都有一个共同的化学结构: 一般由 β -D-硫葡萄糖基、硫化脞基团以及来源于氨基酸的侧链 R 基团组成。根据氨基酸侧链 R 基团的不同, 可将硫苷分为 3 类: 脂肪族硫苷(侧链主要来源于甲硫氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸或异亮氨酸), 吲哚族硫苷(侧链主要来源于色氨酸)和芳香族硫苷(侧链主要来源于苯丙氨酸或酪氨酸)^[1,4]。硫苷本身性质比较稳定, 并不具备生物活性, 主要存在于植物细胞的液泡中, 而硫代葡萄糖苷酶(又称黑芥子酶)则位于特定的蛋白体中, 只有当植物组织破碎时(如病虫害侵袭或机械损伤), 两者得以接触,

收稿日期: 2017-02-20; 修回日期: 2017-03-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31501748, 31201620, 31572115)

作者简介: 何超超, 从事蔬菜营养品质与安全研究。E-mail: hechaochao1993@163.com。通信作者: 祝彪, 副教授, 博士, 从事蔬菜安全生产与品质调控研究。E-mail: billzhu@zafu.edu.cn

硫苷在黑芥子酶的作用下水解产生异硫氰酸盐、硫氰酸脂、腈类等生物活性物质^[4]。这些水解产物具有重要的生物学功能,不仅是十字花科蔬菜独特风味物质的主要来源,而且在抵御昆虫取食^[5-7]、病原菌侵染^[8]以及各种非生物胁迫^[9](如水分、温度、光照、盐胁迫)等植物防卫反应中也发挥了重要作用,更重要的是它对人体而言具有预防结肠癌、乳腺癌、肺癌等癌症发生的作用^[10-11]。经过数十年的研究,硫苷的生物合成途径及其调节基因在模式植物拟南芥中已经基本阐明^[12-14]。硫苷的生物合成过程主要包括以下3个阶段:氨基酸侧链的延长,核心结构的形成和侧链的次级修饰^[12]。在硫苷核心结构形成过程中,硝基化合物或氧化脒在谷胱甘肽硫转移酶(glutathione-S-transferase, GST)的作用下与硫供体(半胱氨酸或谷胱甘肽)结合,形成S-烷基硫代氧脒;以及脱硫硫苷在磺基转移酶(sulfotransferase, SOT)的催化下,与高能硫供体3'磷酸腺苷5'磷酸硫酸(3'-phospho-adenosine-5'-phosphosulfate, PAPS)结合,在N末端生成一个 SO_4^{2-} ,从而形成基本的硫苷结构。这2步反应都需要硫供体,也使得最终的硫苷中含有大量的硫元素且被运送到种子中储存起来,用于应对缺硫胁迫,保证植物体内的硫平衡^[15]。笔者总结了近年来硫苷生物合成过程中硫来源的研究进展,并在此基础上分析了初生硫代谢与硫苷合成的关系,希望进一步完善硫苷的代谢网络,为日后研究硫的初生与次生代谢途径间的相互作用提供理论指导。

1 硫苷合成过程中的还原硫供体

1.1 半胱氨酸(Cys)作为还原硫供体

半胱氨酸(cysteine, Cys)是硫营养代谢的枢纽,植物吸收的无机硫经过一系列还原和同化反应进入有机骨架,形成Cys;植物以Cys为前体,合成众多具有重要生物学功能的含硫化合物;因此,Cys在细胞内的积累量很低,但通量很高^[16]。一直以来,Cys被认为是硫苷合成过程中的还原硫供体,在GST或者GST类似功能酶的催化下与硝基化合物或者氧化脒结合形成S-烷基硫代氧脒。同位素标记的体内试验表明:半胱氨酸比甲硫氨酸等硫醇类物质更易参与到硫苷的合成过程;但是,体外试验表明:硫醇类物质都易与硝基化合物结合^[17]。而最近的研究表明,谷胱甘肽也可以为硫苷的合成提供还原硫。

1.2 谷胱甘肽(GSH)作为还原硫供体

谷胱甘肽(glutathione, GSH),是由谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸组成的三肽化合物,是植物体内广泛存在的生物活性物质,其活性位点为半胱氨酸的巯基^[18-19]。巯基的存在使其具有很强的还原能力;此外,谷氨酸与半胱氨酸之间存在1个不多见的 γ -肽键能够保护GSH不被许多肽酶水解^[18]。GSH特殊的化学结构使其具有重要的生物学功能。它在还原硫的储存和转运,酶活性的调节,清除活性氧,抵抗各种逆境胁迫(重金属、干旱胁迫、盐胁迫、病菌侵染)等方面都具有重要作用^[20-26]。最近的研究表明:GSH也可以作为还原硫供体与硝基化合物或者氧化脒结合,直接参与硫苷的生物合成过程。

首次指出GSH参与硫苷合成的试验来自于对*pad2*突变体的分析,此突变体缺失 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶(γ -Glu-Cys synthetase, GSH1)^[27],即GSH合成的关键酶,突变体的GSH含量只有野生型的20%,同时Cys含量上升了5倍,但是与野生型相比硫苷的含量却没有显著变化;而经过24h的昆虫(夜蛾Noctuidae)诱导,突变体的吲哚-3-甲基硫代葡萄糖苷和4-甲基亚磺酰丁基硫代葡萄糖苷的含量只有野生型的50%^[17,28],这就说明GSH与硫苷的合成存在一定的关系,但是由于GSH功能的复杂性,具体关系在此研究中并未阐明。

GEUFLORES等^[29]利用基因工程手段在烟草*Nicotiana tabacum*中首次证明了GSH可以为硫苷合成提供还原硫。当苯甲基硫代葡萄糖苷(benzylglucosinolate, BGLS)合成基因(*CYP79A2*, *CYP83B1*, *SUR1*, *UGT74B1*, *SOT16*)在烟草叶片中共表达时,产生低含量的BGLS,但同时积累了GSH与硝基化合物的共轭物(S-[(Z)-phenylacetohydroximoyl]-L-glutathione, GS-B)^[29]。这是因为C-S裂解酶(C-S lyase, SUR1)不能催化谷氨酸与半胱氨酸之间的 γ -谷酰基的水解。这就意味着存在一个酶对 γ -谷酰基具有水解作用。然而,有类似功能酶的 γ -谷酰基转肽酶家族(GGT家族)定位于非原质体或者是液泡,而硫苷的合成定位于细胞质,这就排除了GGT酶在硫苷合成中的作用^[30]。另外,在大肠埃希菌*Escherichia coli*中也发现了具有类似功能的酶,此酶含有一个 γ -谷酰基转移酶结构域^[30]。而当含有同型结构域的 γ -谷酰基水解酶(γ -glutamyl peptidase, GGP)重组体在上述烟草叶片中共表达时,GS-B的积累下降,BGLS的含量上升(大约5倍),这就证明了非GGT家族的 γ -谷酰基水解酶的存在^[29]。此外,体外试验也证明

了 GGP1 可以催化 γ -谷酰基的水解。

以上在不合成硫苷的植物(烟草)中证明了 GSH 为硫苷的合成提供硫, 并且证明了 GGP1 对 γ -谷酰基的水解作用, 但还需要证明在含有硫苷的植物中也存在这种机制。GEUFLORES 等^[31]又以模式植物拟南芥的 GGP1 和 GGP3 的双突变体为研究对象, 研究表明此突变体的硫苷含量显著下降, 并且积累了 10 种 GSH 与硝基化合物的共轭物; 同时亚细胞定位表明, GGP1 和 GGP3 定位于细胞质, 这与硫苷合成的相关酶系相一致, 这就为 GSH 可以作为硫苷合成过程中的还原硫供体提供了更为明确和直接的证据, 而且也进一步证明 GGP 对 γ -谷酰基的水解作用。然而, GGP1 和 GGP3 的双突变体中仍然含有大量的硫苷, 这说明可能还存在其他的 γ -谷酰基水解酶, 有待于进一步研究和确认^[30]。

2 高能硫供体 3'磷酸腺苷 5'磷酸硫酸(PAPS)为硫苷合成提供了活化硫酸盐

高能硫供体 3'磷酸腺苷 5'磷酸硫酸(PAPS)是活化硫酸盐在细胞内的积累形式, 也是磺基转移酶(SOT)作用的底物^[32]。在硫苷核心结构合成的最后一步, PAPS 在 SOT 的作用下将硫酸根(SO_4^{2-})转移至脱硫硫苷的羟基, 形成基本的硫苷结构^[33]。目前, 在拟南芥中发现磺基转移酶家族共有 18 个成员, 根据编码序列的同源性可分成 7 个亚家族, 主要功能是催化硫苷、黄酮、植物磺胺素等次生代谢物的硫酸化反应^[34]。其中, SOT16, SOT17 和 SOT18 主要负责硫苷的硫酸化反应, 表达水平受到组织器官、生长阶段以及光照条件等的影响, 且具有不同的底物专一性, SOT16 主要催化吲哚族和芳香族硫苷的硫酸化反应, 而 SOT17 和 SOT18 对长链的脂肪族脱硫硫苷具有更高的亲和性^[34-35]。

PAPS 是植物吸收的 SO_4^{2-} 在腺苷三磷酸(adenosine triphosphate, ATP)的参与下由 ATP 硫酸化酶(ATP sulfurylase, ATPS)和 APS 激酶(APS kinase, APK)催化合成。目前, 在拟南芥中发现 APK 家族共有 4 个成员, 而只有 *apk1apk2* 双突变体的硫苷含量显著减少, 同时积累了大量的脱硫硫苷^[34,36-37]。且亚细胞定位表明: 硫苷的合成定位于细胞质(SOT16, SOT17 和 SOT18 均位于细胞质), 而 APK 基因家族中只有 APK3 位于细胞质, APK1, APK2 和 APK4 均位于叶绿体^[34,37]。这说明存在一个转运机制将 PAPS 从叶绿体转运至细胞质以供硫苷的合成。近来的研究证实了 PAPS 转运蛋白(PAPS transporter, PAPST1)可以顺着浓度梯度将 PAPS 跨膜转运至细胞质^[37]。

进一步的研究表明: PAPS 脱去硫酸根后的产物 3', 5'磷酸腺苷(3', 5'-phosphoadenosine, PAP)具有细胞毒性(抑制 RNA 酶对畸形 RNA 的分解作用), 而 PAPST1 可以顺着浓度梯度将 PAP 转运至叶绿体, 在叶绿体中存在 PAP 磷酸酶(PAP phosphatase, FRY1)催化 PAP 降解形成腺苷酸(adenosine monophosphate, AMP)^[37]。因此, 在 PAPST1 顺浓度梯度跨膜转运机制的基础上, PAPS 的合成与利用以及 PAP 的降解相互作用, 共同调控硫苷的生物合成途径。缺失 PAPST1 的拟南芥突变体硫苷含量也显著减少且积累了脱硫硫苷, 但是积累程度不及 *apk1apk2* 双突变体, 说明可能还存在其他的 PAPS 转运体, 还有待于进一步研究确认。同时这也说明了 SOT 催化的脱硫硫苷的硫酸化作用不仅受到低浓度 PAPS 的抑制, 而且当 PAPS/PAP 的转运机制失调时, 此反应也受到抑制^[37]。

3 初生硫代谢与硫苷合成的关系

植物根部吸收的硫酸盐, 在多种硫酸盐转运蛋白的协同作用下, 通过木质部和韧皮部, 最终进入叶绿体或质体被 ATPS 活化形成 5'腺苷磷酸硫酸(adenosine 5'-phosphosulfate, APS)^[16,38-39]。APS 在能量上是不稳定的, 可以被 APS 还原酶(APS reductase, APR)还原形成 SO_3^{2-} , 进入硫的初生代谢途径, 形成半胱氨酸、谷胱甘肽、甲硫氨酸等含硫化合物, 并进一步为硫苷等次生代谢物的合成提供原料; 也可以在 APK 的作用下磷酸化形成 PAPS, PAPS 进入次生代谢途径, 为硫苷等次生代谢物的合成提供活化硫酸盐^[34,37]。因此, 硫苷的合成与硫代谢间有着密切的关系。

3.1 初生硫代谢为硫苷的合成提供原料

初生硫代谢为硫苷的合成提供了前体氨基酸(甲硫氨酸, Met), 还原硫供体(Cys 和 GSH)以及活化硫酸盐(PAPS), 而硫苷的合成受植物体内硫营养水平的调控。研究表明: 增施硫肥能够显著提高植物体内硫苷的积累^[40]; 而在缺硫条件下, 拟南芥的硫苷合成基因的表达下调, 黑芥子酶编码基因的表达上调, 说明植物一方面通过减少硫苷的合成以降低次生代谢对硫的利用, 另一方面增加其降解以提高硫从

次生代谢向初生代谢的转化,以缓解缺硫胁迫,保证植物正常的生长发育^[41]。HUSEBY等^[42]研究表明:光照条件下,硫酸盐转运蛋白、APR等初生硫代谢基因表达上调,同时硫苷合成基因的表达也上调,硫苷含量上升。此外,Met是合成脂肪族硫苷的前体氨基酸,而与吲哚族和芳香族硫苷相比,脂肪族硫苷对环境供硫水平的反应更为灵敏^[41]。

3.2 初生硫代谢与硫苷合成的调控机制

初生硫代谢与硫苷合成的调控机制错综复杂,受到APK和APR等硫代谢关键基因,MYB等硫苷合成转录因子以及细胞内的氧化还原水平等多方面的影响。

在硫代谢途径中,APS可以在APK的作用下,与ATP反应形成PAPS,PAPS为硫苷的合成提供活化硫酸盐;或者在APR的作用下,进入硫的还原和同化途径^[16,39],因此,APS成为硫初生与次生代谢途径的分支点,APK和APR则成为重要的调控因子。MUGFORD等^[36]研究表明,*apk1apk2*拟南芥突变体的硫苷含量只有野生型的15%,微阵列分析显示硫苷合成基因(*UGT74B1*,*CYP83B1*,*SUR1*,*SOT16*,*SOT18*)的转录水平上调,脱硫硫苷积累;PAPS合成受阻导致初生硫代谢途径上调,Cys和GSH的含量显著上升,但是APS含量下降,APR活性没有明显的变化;而硫酸盐转运基因以及ATPS(*ATPS1*和*ATPS3*)表达的上调可能是受到PAPS不足的诱导^[34]。在APK过量表达的材料中,硫苷含量并没有显著变化(尽管*MAM3*和*SOT17*的转录水平上调),但是APR活性受诱导,进入初生硫代谢的通量上升^[34,37]。APR是硫还原同化途径的重要调控因子,并受Cys和GSH的反馈抑制,即缺硫会导致APR的活性显著升高;而当Cys或者GSH浓度高时,APR的活性就会受到抑制,这也体现了硫代谢途径受需求驱动的特点^[16,39]。

MYB是一类转录因子,能在转录水平上通过调节与其相关的基因的表达来调控硫苷的合成^[12]。其中,*MYB28*,*MYB29*和*MYB76*能够调控脂肪族硫苷的合成,*MYB34*,*MYB51*和*MYB122*能够调控吲哚族硫苷的合成^[12]。研究表明:MYB也可以直接调控ATPS和APR等初生硫代谢基因^[39]。MYB的过量表达导致*ATPS1*和*ATPS3*的转录水平上调,硫初生代谢途径受诱导,GSH含量上升;而缺失MYB的突变体中,APR的转录水平下调^[34]。

此外,初生硫代谢与硫苷的合成还受到细胞内氧化还原水平的调节。研究表明:APR受氧化应激的诱导,而APK在还原产物含量高时活性更高。当植物处于胁迫状态时,活性氧的产生导致APR活性上升,而APK活性受抑制,硫的初生代谢途径上调^[34,37]。因此,当细胞处于氧化状态时,硫进入初生代谢的通量提高,而当细胞处于还原状态时,硫更倾向于进入硫苷合成等次生代谢途径。

4 小结与展望

硫苷是十字花科植物一类富含氮硫的次生代谢物,因硫苷作为十字花科蔬菜风味物质的来源被人们认识已久,而且硫苷及其降解产物因在植物防御以及降低人体癌症发生率方面的重要生物学功效而受到越来越广泛的关注。到目前为止,硫苷的生物合成过程及其调控基因在模式植物拟南芥中已经基本阐明。硫苷作为植物体内有机硫的重要储存形式,其合成过程也伴随着硫的还原和同化,且硫还原同化途径产物Cys和GSH是硫苷合成过程中的还原硫供体,PAPS则为硫苷的合成提供了活化硫酸盐,因此硫苷的合成与硫的还原和同化途径(初生硫代谢途径)间有着密切的联系。但是硫的初生代谢与硫苷的合成受到APK和APR等硫代谢关键基因,MYB等硫苷合成转录因子以及细胞内的氧化还原水平等多方面的影响,其调控机制错综复杂,还存在许多悬而未决的问题,比如硫营养信号转导、硫与氮等其他营养元素之间的协调、葡萄糖等植物激素之间的信号交流对硫苷合成的生物调控,这都有待于进一步研究,以明确硫的初生代谢与次生代谢途径间的相互作用。此外,以GSH作为硫苷合成的还原硫供体时,是否还存在羧肽酶的水解作用还不明确,尚需进一步探究;GGP的具体作用机制仍处于推论阶段,仍需进一步研究;GSH的动态平衡对硫苷合成的调控作用也是人们关注的问题,也有可能成为新的研究热点。随着科学研究的不断深入,在未来可以利用遗传学、蛋白组学、代谢组学、基因工程等手段人为操纵硫苷的生物合成,这对提高作物对病虫害的抗性、作物的抗癌活性以及新品种的选育和改良具有十分重要的意义。

5 参考文献

- [1] 廖永翠, 宋明, 王辉, 等. 大白菜中硫代葡萄糖苷的鉴定及含量分析[J]. 园艺学报, 2011, **38**(5): 963 – 969.
LIAO Yongcui, SONG Ming, WANG Hui, *et al.* Glucosinolate profile and accumulation in *Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis* [J]. *Acta Horti Sin.*, 2011, **38**(5): 963 – 969.
- [2] BUSSY A. Note sur la formation de l'huile essentielle de moutarde [J]. *J Pharm Chim*, 1840, **26**(39): 815 – 817.
- [3] 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[D]. 杭州: 浙江大学, 2012.
ZHU Biao. *Studies on the Effects of Plant Growth Regulators on Glucosinolates and the Expression of Related Genes in Pakchoi* [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2012.
- [4] 袁高峰, 陈思学, 汪俏梅. 芥子油苷及其代谢产物的生物学效应研究与应用[J]. 核农学报, 2009, **23**(4): 664 – 668.
YUAN Gaofeng, CHEN Sixue, WANG Qiaomei. Biological functions and application of glucosinolates and their degradation products [J]. *J Nucl Agric Sci*, 2009, **23**(4): 664 – 668.
- [5] 刘梦洋, 卢银, 韩文素, 等. 大白菜抗小菜蛾突变体硫甙含量及相关基因的表达分析[J]. 农业生物技术学报, 2015, **23**(3): 320 – 328.
LIU Mengyang, LU Yin, HAN Wensu, *et al.* Glucosinolate content and expression of related genes in Chinese cabbage (*Brassica campestris* sub. *pekinensis*) mutants resistance to diamondback moth (*Plutella xylostella* L.) [J]. *J Agric Biotechnol*, 2015, **23**(3): 320 – 328.
- [6] LIU Tongjin, ZHANG Xiaohui, YANG Haohui, *et al.* Aromatic glucosinolate biosynthesis pathway in *Barbarea vulgaris* and its response to *Plutella xylostella* infestation [J]. *Front Plant Sci*, 2016, **7**(1): 83. doi: 10.3389/fpls. 2016. 00083.
- [7] KOS M, HOUSHYANI B, WIETSMA R, *et al.* Effects of glucosinolates on a generalist and specialist leaf-chewing herbivore and an associated parasitoid [J]. *Phytochemistry*, 2012, **77**(1): 162 – 170.
- [8] BUXDORF K, YAFFE H, BARDA O, *et al.* The effects of glucosinolates and their breakdown products on necrotrophic fungi [J]. *PLoS One*, 2013, **8**(8): e70771. doi:10.1371/journal.pone.0070771.
- [9] MARTINEZBALL M D, MORENO D A, CARVAJAL M. The physiological importance of glucosinolates on plant response to abiotic stress in *Brassica* [J]. *Int J Mol Sci*, 2013, **14**(6): 11607 – 11625.
- [10] LIPPMANN D, LEHMANN C, FLORIAN S, *et al.* Glucosinolates from pak choi and broccoli induce enzymes and inhibit inflammation and colon cancer differently [J]. *Food Funct*, 2014, **5**(6): 1073 – 1081
- [11] DINKOVA-KOSTOVA A T, KOSTOV R V. Glucosinolates and isothiocyanates in health and disease [J]. *Trends Mol Med*, 2012, **18**(6): 337 – 347.
- [12] 程坤, 杨丽梅, 方智远, 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[J]. 中国蔬菜, 2010(12): 1 – 6.
CHENG Kun, YANG Limei, FANG Zhiyuan, *et al.* Research progress on regulation and synthesis genes on glucosinolates biosynthesis in crucifer [J]. *China Veg*, 2010(12): 1 – 6.
- [13] GRUBB C D, ABEL S. Glucosinolate metabolism and its control [J]. *Trends Plant Sci*, 2006, **11**(2): 89 – 100.
- [14] ZANG Yunxiang, KIM H U, KIM J A, *et al.* Genome-wide identification of glucosinolate synthesis genes in *Brassica rapa* [J]. *FEBS J*, 2009, **276**(13): 3559 – 3574.
- [15] 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[D]. 武汉: 华中农业大学, 2015.
ZHANG Yuanyuan. *Function Analyses of Several Genes Involved in Biosynthesis and Regulation of Glucosinolate in Brassica napus and Arabidopsis thaliana* [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2015.
- [16] 吴宇, 高蕾, 曹民杰, 等. 植物硫营养代谢、调控与生物学功能[J]. 植物学通报, 2007, **24**(6): 735 – 761.
WU Yu, GAO Lei, CAO Minjie, *et al.* Plant sulfur metabolism, regulation, and biological functions [J]. *Chin Bull Bot*, 2007, **24**(6): 735 – 761.
- [17] SØNDERBY I E, GEUFLORES F, HALKIER B A. Biosynthesis of glucosinolates—gene discovery and beyond [J]. *Trends Plant Sci*, 2010, **15**(5): 283 – 290.
- [18] 段喜华, 唐中华, 郭晓瑞. 植物谷胱甘肽的生物合成及其生物学功能[J]. 植物研究, 2010, **30**(1): 98 – 105.
DUAN Xihua, TANG Zhonghua, GUO Xiaorui. Biosynthesis and function of glutathione in plant [J]. *Bull Bot Res*,

- 2010, **30**(1): 98 – 105.
- [19] 闫慧芳, 毛培胜, 夏方山. 植物抗氧化剂谷胱甘肽研究进展[J]. 草地学报, 2013, **21**(3): 428 – 434.
YAN Huifang, MAO Peisheng, XIA Fangshan. Research progress in plant antioxidant glutathione (review) [J]. *Acta Agrest Sin*, 2013, **21**(3): 428 – 434.
- [20] 单长卷, 代海芳. 外源谷胱甘肽对干旱胁迫下玉米幼苗叶片生理特性的影响[J]. 灌溉排水学报, 2016, **35**(1): 59 – 62.
SHAN Changjuan, DAI Haifang. Effect of exogenous glutathione on leaf physiological properties of maize seedlings under drought stress [J]. *J Irrig Drain*, 2016, **35**(1): 59 – 62.
- [21] SHANKAR V, THEKKEETIL V, SHARMA G, *et al.* Alleviation of heavy metal stress in *Spilanthes calva* L. (antimalarial herb) by exogenous application of glutathione [J]. *In Vitro Cell Develop Biol-Plant*, 2012, **48**(1): 113 – 119.
- [22] WU Zhichao, ZHAO Xiaohu, SUN Xuecheng, *et al.* Antioxidant enzyme systems and the ascorbate-glutathione cycle as contributing factors to cadmium accumulation and tolerance in two oilseed rape cultivars (*Brassica napus* L.) under moderate cadmium stress [J]. *Chemosphere*, 2015, **138**: 526 – 536.
- [23] JOZEF CZAK M, KEUNEN E, SCHAT H, *et al.* Differential response of *Arabidopsis* leaves and roots to cadmium: glutathione-related chelating capacity vs antioxidant capacity [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2014, **83**: 1 – 9.
- [24] MOSTOFA M G, SERAJ Z I, FUJITA M. Exogenous sodium nitroprusside and glutathione alleviate copper toxicity by reducing copper uptake and oxidative damage in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings [J]. *Protoplasma*, 2014, **251**(6): 1373 – 1386.
- [25] NAHAR K, HASANUZZA M, ALAM M M, *et al.* Roles of exogenous glutathione in antioxidant defense system and methylglyoxal detoxification during salt stress in mung bean [J]. *Biol Plant*, 2015, **59**(4): 745 – 756.
- [26] BOURANIS D L, CHORIANOPOULOU S N, NOCITO F F, *et al.* The crucial role of sulfur in a phytoremediation process lessons from the poaceae species as phytoremediators: a review [G]// KATSIFARAKIS K L, THEODOSSIOU N, CHRISTODOULATOS C, *et al.* *Protection and Restoration of the Environment XI*. Thessaloniki: [n. s.], 2012: 634 – 643.
- [27] COBBETT C S, MAY M J, HOWDEN R, *et al.* The glutathione-deficient, cadmium-sensitive mutant, cad2-1, of *Arabidopsis thaliana* is deficient in γ -glutamylcysteine synthetase [J]. *Plant J Cell Mol Biol*, 1998, **16**(1): 73 – 78.
- [28] SCHLAEPI K, BODENHAUSEN N, BUCHALA A, *et al.* The glutathione-deficient mutant pad2-1 accumulates lower amounts of glucosinolates and is more susceptible to the insect herbivore *Spodoptera littoralis* [J]. *Plant J Cell Mol Biol*, 2008, **55**(5): 774 – 786.
- [29] GEUFLORES F, NIELSEN M T, NAFISI M, *et al.* Glucosinolate engineering identifies a γ -glutamyl peptidase [J]. *Nat Chem Biol*, 2009, **5**(8): 575 – 577.
- [30] BEDNAREK P. Sulfur-containing secondary metabolites from *Arabidopsis thaliana* and other Brassicaceae with function in plant immunity [J]. *Chem Biol Chem*, 2012, **13**(13): 1846 – 1859.
- [31] GEUFLORES F, MOLDRUP M E, BÖTTCHER C, *et al.* Cytosolic γ -glutamyl peptidases process glutathione conjugates in the biosynthesis of glucosinolates and camalexin in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2011, **23**(6): 2456 – 2469.
- [32] 李国强, 朱云集, 沈学善. 植物硫素同化途径及其调控[J]. 植物生理学通讯, 2005, **41**(6): 699 – 704.
LI Guoqiang, ZHU Yunji, SHEN Xueshan. Plant sulphur assimilation pathways and its regulation [J]. *Plant Physiol Commun*, 2005, **41**(6): 699 – 704.
- [33] PIOTROWSKI M, SCHEMENEWITZ A, LOPUKHINA A, *et al.* Desulfoglucosinolate sulfotransferases from *Arabidopsis thaliana* catalyze the final step in the biosynthesis of the glucosinolate core structure [J]. *J Biol Chem*, 2004, **279**(49): 50717 – 50725.
- [34] MUGFORD S G, LEE B R, KOPRIVOVA A, *et al.* Control of sulfur partitioning between primary and secondary metabolism [J]. *Plant J Cell Mol Biol*, 2011, **65**(1): 96 – 105.
- [35] KLIEN M, REICHELT M, GERSHENZON J, *et al.* The three desulfoglucosinolate sulfotransferase proteins in *Arabidopsis* have different substrate specificities and are differentially expressed [J]. *FEBS J*, 2006, **273**(1): 122 – 136.
- [36] MUGFORD S G, YOSHIMOTO N, REICHELT M, *et al.* Disruption of adenosine-5'-phosphosulfate kinase in *Arabidopsis* reduces levels of sulfated secondary metabolites [J]. *Plant Cell*, 2009, **21**(3): 910 – 927.
- [37] BOHRER A S, KOPRIVA S, TAKAHASHI H. Plastid-cytosol partitioning and integration of metabolic pathways for

- APS/PAPS biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Front Plant Sci*, 2015, **5**: 751. doi: 10.3389/fpls.2014.00751.
- [38] CALDERWOOD A, MORRIS R J, KOPRIVA S. Predictive sulfur metabolism: a field in flux [J]. *Front Plant Sci*, 2014, **5**: 646. doi: org/10.3389/fpls.2014.00646.
- [39] 孟赐福, 姜培坤, 曹志洪, 等. 植物体内硫的运输与同化的研究进展[J]. 浙江农业学报, 2011, **23**(2): 427 – 432.
MENG Cifu, JIANG Peikun, CAO Zhihong, *et al.* Recent progress on transport assimilation of sulfur in plants [J]. *Acta Agric Zhejiang*, 2011, **23**(2): 427 – 432.
- [40] 苗慧莹. 葡萄糖和植物激素协同调控十字花科植物中芥子油苷生物合成的机制研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2015.
MIAO Huiying. *Glucose and Plant Hormones Synergetically Modulate Glucosinolates Biosynthesis in Crucifera Plants* [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2015
- [41] 朱凤羽, 陈亚州, 阎秀峰. 植物芥子油苷代谢与硫营养[J]. 植物生理学通讯, 2007, **43**(6): 1189 – 1194.
ZHU Fengyu, CHEN Yazhou, YAN Xiufeng. Plant glucosinolate metabolism and sulfur nutrition [J]. *Plant Physiol Commun*, 2007, **43**(6): 1189 – 1194.
- [42] HUSEBY S, KOPRIVOVA A, LEE B R, *et al.* Diurnal and light regulation of sulphur assimilation and glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis* [J]. *J Exp Bot*, 2013, **64**(4): 1039 – 1048.