

硫苷介导的白菜抵御甜菜夜蛾幼虫取食胁迫的分子机制

郝娇娇, 马永华, 陆彦池, 许丽爱, 朱祝军, 郁有健

(浙江农林大学 园艺科学学院 浙江省山区农业高效绿色协同生产创新中心/农业农村部亚热带果品蔬菜质量安全控制重点实验室, 浙江 杭州 311300)

摘要: 【目的】探究甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 幼虫取食对白菜 *Brassica campestris* ssp. *chinensis* 硫代葡萄糖苷质量摩尔浓度及组分的影响, 初步明确硫苷介导的白菜抵御甜菜夜蛾幼虫取食胁迫的分子机制。【方法】使用高效液相色谱法检测甜菜夜蛾幼虫取食对白菜硫苷质量摩尔浓度和组分的影响, 实时荧光定量聚合酶链式反应 (RT-qPCR) 分析硫苷代谢关键基因表达模式的变化, 谷胱甘肽硫转移酶试剂盒检测取食白菜后甜菜夜蛾幼虫体内谷胱甘肽硫转移酶活性的变化。

【结果】白菜中 8 种硫苷组分在甜菜夜蛾幼虫取食后显著增加 ($P < 0.05$), 其中吲哚族的 4-羟基吲哚-3-甲基硫苷 (4OH)、1-甲氧基-3-吲哚基甲基硫苷 (NEO)、3-吲哚基甲基 (GBC) 和脂肪族的 4-戊烯基硫苷 (GBN) 对甜菜夜蛾幼虫取食反应最为强烈; RT-qPCR 结果显示: 甜菜夜蛾幼虫取食后, 白菜脂肪族硫苷合成相关基因 *BcBCAT4*、*BcMAM1* 的显著上调可能与脂肪族硫苷的增加有关 ($P < 0.05$), 而 *BcSOT16* 的上调与 4OH、NEO、GBC 呈正相关; 取食后, 甜菜夜蛾幼虫体内谷胱甘肽硫转移酶活性显著增强 ($P < 0.05$), 并呈现与总硫苷和吲哚族硫苷质量摩尔浓度变化规律的一致性。【结论】甜菜夜蛾幼虫的取食能诱导白菜硫苷的合成, 而硫苷质量摩尔浓度的升高会诱导幼虫体内谷胱甘肽硫转移酶活性的增强。甜菜夜蛾幼虫取食胁迫下, 白菜 *BcSOT16*、*BcBCAT4*、*BcMAM1* 等硫苷合成关键基因被激活, 4OH、NEO、GBC 和 GBN 显著增加, 从而更好地抵御甜菜夜蛾幼虫取食胁迫。图 2 表 3 参 43

关键词: 硫代葡萄糖苷; 白菜; 甜菜夜蛾; 基因表达; 谷胱甘肽硫转移酶

中图分类号: S603

文献标志码: A

文章编号: 2095-0756(2023)01-0081-08

Molecular mechanism of glucosinolate-mediated *Brassica campestris* ssp. *chinensis* against feeding stress of *Spodoptera exigua* larvae

HAO Jiaojiao, MA Yonghua, LU Yanchi, XU Li'ai, ZHU Zhujun, YU Youjian

(Innovation Center of Agricultural Efficient and Green Collaborative Production of Zhejiang Province/Key Laboratory of Quality and Safety Control for Subtropical Fruit and Vegetable, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, College of Horticulture Science, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China)

Abstract: [Objective] With an investigation of the effects of *Spodoptera exigua* larvae feeding on the content and components of glucosinolates (GSLs) in *Brassica campestris* ssp. *chinensis*, this study is aimed to figure out the initial molecular mechanism of GSL-mediated resistance to the feeding stress of *S. exigua* larvae in *B. campestris* ssp. *chinensis*. [Method] The effect of larvae feeding on the content and components of GSLs in *B. campestris* ssp. *chinensis* ‘Meiduheyoutong’ was determined with the application of high performance liquid chromatography before an analysis was conducted of the expression patterns of key genes related to GSLs metabolism using real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR), after which the activity of glutathione S-transferase (GSTs) in larvae after eating *B. campestris* ssp. *chinensis* was detected by

收稿日期: 2022-02-23; 修回日期: 2022-09-05

基金项目: 国家自然科学基金面上资助项目 (32072557, 31572115); 浙江省自然科学基金重点资助项目 (LZ14C150001)

作者简介: 郝娇娇 (ORCID: 0000-0001-5049-799x), 从事园艺作物栽培生理与品质调控研究。E-mail: 2407605896@qq.com。通信作者: 朱祝军 (ORCID: 0000-0001-8551-7751), 教授, 从事园艺作物栽培生理与品质调控研究。E-mail: zhuzj@zafu.edu.cn

GSTs kit. [Result] (1) Of the eight GSLs that enjoyed a significant increase in *B. campestris* ssp. *chinensis* after *S. exigua* larvae's feeding, 4-hydroxy-glucobrassicin (4OH), 1-methoxy-glucobrassicin (NEO), glucobrassicin (GBC) and glucobrassicinapin (GBN) were the four important GSLs responsive to the feeding; (2) The significant up-regulation of aliphatic GSL synthesis-related genes *BcBCAT4* and *BcMAM1* in *B. campestris* ssp. *chinensis* might be related to the increase of aliphatic GSLs, and the up-regulation of *BcSOT16* was positively correlated with 4OH, NEO and GBC after feeding by *S. exigua* larvae; (3) After feeding, the activity of GSTs in the larvae of *S. exigua* was significantly enhanced ($P < 0.05$), and showed a consistency with the changes of the total GSLs and indole GSLs. [Conclusion] Feeding by *S. exigua* larvae can induce the synthesis of GSLs in *B. campestris* ssp. *chinensis*, and the increase of GSLs can induce the enhancement of GSTs activity in larvae. Under the feeding stress of *S. exigua* larvae, the activation of key GSLs synthesis genes such as *BcSOT16*, *BcBCAT4* and *BcMAM1* in *B. campestris* ssp. *chinensis* may promote the increase of 4OH, NEO, GBC and GBN which will help better resist *S. exigua* larvae feeding stress. [Ch, 2 fig. 3 tab. 43 ref.]

Key words: glucosinolates; *Brassica campestris* ssp. *chinensis*; *Spodoptera exigua*; gene expression; glutathione S-transferase

白菜 *Brassica campestris* ssp. *chinensis* 是十字花科 Brassicaceae 芸薹属 *Brassica* 2年生草本植物, 因成熟周期短、适应力强、营养价值高等特点, 在中国农业生产中占据重要地位^[1]。硫代葡萄糖苷简称硫苷, 是十字花科植物中的一类含硫、氮次生代谢产物, 基于衍生氨基酸的差异可分为脂肪族、吲哚族和芳香族三大类^[2-3]。硫苷的生物合成可分为侧链延伸、核心结构形成和侧链修饰等3步, 涉及大量的基因、酶和转录调节因子^[4]。已有研究表明: 硫苷不仅在抗癌^[5]、十字花科植物特殊风味的产生^[6-7]及硫元素的调节^[8]中发挥着重要的作用, 而且是十字花科植物抵御生物胁迫的主要防御物质^[9-10]。研究表明: 硫苷可以有效影响害虫的生长发育及产卵^[11], 但不同类型的硫苷对不同种群植食性昆虫抗性不同^[12-13]。如甘蓝夜蛾 *Mamestra brassicae* 幼虫在取食脂肪族和吲哚族硫苷含量较高的植物后生长缓慢, 取食吲哚族硫苷含量较高的植物后发育时间也会延长^[14]。作为一种防御相关植物次生代谢产物, 硫苷存在于植物的整个生命周期中^[15-16], 植食性昆虫的取食会使其含量显著提高^[17-18], 硫苷含量的改变被证明与害虫胁迫下硫苷的合成、转运及降解相关基因的激活相关^[19]。MEWIS等^[20]发现拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 受桃蚜 *Myzus persicae*、甘蓝蚜 *Brevicoryne brassicae* 和甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 幼虫取食后, 脂肪族硫苷含量显著增加, *AtMAM1* 和 *AtCYP79F1* 基因转录水平也显著上调。此前, KOORNNEEF等^[21]发现特定硫苷生物合成基因的存在或缺失可以赋予某些植物特殊的抗性, 如拟南芥 Ler 生态型 *AtMAM2* 的存在, 使得其对甜菜夜蛾幼虫的抗性高于缺乏 *AtMAM2* 的拟南芥 Col 生态型。同样, 蚜虫侵袭会使拟南芥吲哚族硫苷含量增加3倍^[22], PFALZ等^[23]通过数量性状基因位点 (QTL) 定位结合转录组分析, 发现吲哚族硫苷合成相关基因 *AtCYP81F2* 的表达有助于拟南芥抵抗桃蚜, 但不能抵御小菜蛾 *Plutella xylostella*、欧洲粉蝶 *Pieris brassicae*、粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni*、甜菜夜蛾等鳞翅目 Lepidopteran 害虫。在进化过程中, 昆虫为应对植物硫苷-黑介子酶防御系统的防御作用, 也形成了以解毒酶——细胞色素 P450s 和谷胱甘肽硫转移酶 (GSTs) 等为基础的适应性机制^[24-25]。

本研究以白菜为研究对象, 通过高效液相色谱法 (HPLC) 和实时荧光定量聚合酶链式反应 (RT-qPCR), 探究白菜硫苷质量摩尔浓度及组分在甜菜夜蛾幼虫取食胁迫下的变化与潜在的分子调控机制, 并通过检测取食前后甜菜夜蛾幼虫体内解毒酶活性的变化, 探究白菜硫苷质量摩尔浓度的提高对幼虫体内解毒酶活性的影响, 以期对白菜等十字花科作物应对害虫胁迫抗性的提高、品质和产量的改良提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究所用白菜品种为‘美都黑油筒’ *B. campestris* ssp. *chinensis* ‘Meiduheiyoutong’, 培养条件为

光照 (28 ℃/14 h, 30 000 lx) 与黑暗 (26 ℃/10 h) 循环。挑选长势一致的“八叶一心”时期白菜的第 5、6 片真叶进行接虫处理。研究所用甜菜夜蛾 3 龄幼虫由浙江农林大学植物保护课题组提供, 接虫前将甜菜夜蛾 3 龄幼虫饥饿处理 4 h, 每片叶接虫 1 头。

1.2 取样方法

剪取白菜叶片, 去除大叶脉, 于液氮中冷冻后放入-80 ℃冰箱中保存备用 (接虫叶片在取样前用酒精棉将接虫叶片上的排泄物擦拭干净)。将取食后 1、24、48 和 72 h 的甜菜夜蛾幼虫放置在冰上冻僵, 用解剖针取其中肠, 保存在-20 ℃冰箱中备用。

1.3 硫苷的提取及 HPLC 检测

参考 KRUMBEIN 等^[26] 经过 ZHU 等^[27] 修改的方法提取硫苷。称 0.25 g 样品粉末, 加入 75 ℃预热的体积分数为 70% 甲醇溶液 4 mL, 同时加入 200 μL 5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 2-丙基硫苷作为内标, 混匀后放在 75 ℃水浴锅中水浴 10 min, 间隔震荡; 6 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min 收集上清液, 剩余沉淀则继续加入 2 次 3 mL 75 ℃预热的体积分数为 70% 的甲醇提取、涡旋、离心, 将 3 次收集的上清液合并倒入 10 mL 容量瓶中定容; 滤纸进行粗过滤, 取 5 mL 过滤液装载到 DEAE Sephadex A25 固相萃取柱, 待滤液全部流完后, 加 6 mL 纯净水清洗柱子, 再加入 250 μL 硫酸酯酶, 30 ℃反应 12 h, 5 mL 纯净水洗脱, 洗脱液用 0.45 mm 滤膜过滤后在-20 ℃下保存。HPLC 分析进样量 20 μL , C-18 反相柱柱温 30 ℃, 流动相为超纯水和乙腈, 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 0~45 min 内乙腈质量浓度线性梯度 0%~20%, 检测波长为 229 nm。

1.4 硫苷合成相关基因的定量分析

1.4.1 总 RNA 的提取及 cDNA 的获得 采用 Trizol 法提取白菜总 RNA, 提取过程中防止 RNase 污染。具体步骤为: 取 0.2 g 植物组织材料快速研磨至粉末状, 迅速将其移入装有 1 mL 预冷 Trizol 的离心管中, 间隔震荡。4 ℃ 12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取 1 mL 上清液, 加入 200 μL 预冷氯仿, 振荡混匀, 冰上静置 3 min; 4 ℃ 12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取 500 μL 上清液, 加入 100 μL 预冷氯仿, 振荡混匀, 冰上静置 3 min; 4 ℃ 12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取 400 μL 上清液至新的离心管, 加入等体积预冷的异丙醇, 颠倒混匀, -20 ℃冰箱中静置 30 min。4 ℃ 12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 弃上清液, 加入 1 mL 预冷的体积分数为 75% 乙醇; 4 ℃ 13 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 弃上清液, 加入 20 μL 预冷的体积分数为 0.1% 的无核酸酶水溶解沉淀, -20 ℃保存备用。用 NanoDrop 2000 检测 RNA 样品的浓度后, 用质量浓度为 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 样品的质量。cDNA 第 1 链的合成参照 Takara 公司的反转录试剂盒 (Prime ScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser) 的说明书进行。

1.4.2 实时荧光定量聚合酶链式反应 (RT-qPCR) 分析 以反转录获得的 cDNA 为模板, 引物由 Primer 5 软件设计, 以白菜 *BcUBC10* 基因^[28] 作为内参, 基因的定量引物见表 1。荧光定量 PCR 扩增体系为: 2 $\times$ SYBR Premix Ex-TaqTM 10 μL , 10 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ cDNA 1 μL , 上下游引物各 0.3 μL , 无核酸酶双蒸水 (RNase free ddH₂O) 补足至 15 μL 。反应循环条件: 95 ℃预变性 30 s, 95 ℃变性 5 s, 60 ℃复性 34 s, 共 40 个循环, 每份 3 次重复。用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算其相对表达量^[29], 琼脂糖凝胶电泳检测反应产物。

表 1 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR) 表达分析引物序列

Table 1 Primer sequences for RT-qPCR analysis		
基因名称	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')
<i>BcMAM1</i>	CCAGAGTACATACCGCACAA	AGAGGACACCGGAAAACCAA
<i>BcCYP83A1</i>	AGTTCTCCTCTTCTCTCTCT	CCATTGTTTGACTTCCTATC
<i>BcCYP83B1</i>	ACACTTCCTCTTTTCGTCTCT	CATCGTTTGTGCCCCCTTCA
<i>BcMYB28</i>	GAGAATTTGCATTCCCTTGC	TGGTGTCCCATCTTTGTTGG
<i>BcSOT16</i>	GGGTTATGGGTTTAGTGCTG	CTCCAACCTTCCCTTTCTTA
<i>BcUBC10</i>	GGGTCCTACAGACAGTCCTTAC	ATGGAACACCTTCGTCTCTAAA
<i>BcAPK2</i>	CAACACCGTCTGGGATCTGC	AACCGACATCGACACCTGGA
<i>BcSUR1</i>	GGCGTTATCTACATGCTGTTTCG	CAGGTGCGGAAGCAAGGGTA
<i>BcAOP2</i>	TGGATTGACCAAAGGAAA	AGATAGATCACTGGAAGTTG
<i>BcBCA74</i>	AAGCAACTCGACTCAAACACT	CGATAAAACCCGAATCCTAAT

1.5 GSTs 活性测定

根据 GSTs 试剂盒说明书（南京建成生物有限公司）进行。

1.6 数据处理

采用 Excel 2020 进行数据整理与分析，所有数据均是至少 3 次生物学重复的平均值±标准误；采用 SPSS 22.0 进行差异显著性分析， $P<0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 甜菜夜蛾幼虫取食对白菜硫苷质量摩尔浓度的影响

在白菜中共检测到 8 种硫苷组分 (表 2)，其中：脂肪族 3 种、吲哚族 4 种、芳香族 1 种。如表 3 所示：甜菜夜蛾幼虫取食不同时间点 (1、24、48、72 h) 白菜硫苷质量摩尔浓度呈显著增加趋势 ($P<0.05$)，取食 1 和 48 h 时增幅最大，72 h 达峰值 ($2.03 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$)，是对照的 1.8 倍；吲哚族和脂肪族硫苷占总硫苷比例最高。甜菜夜蛾幼虫取食后两者显著增加 ($P<0.05$)，并分别在取食 48 和 72 h 时达到峰值，是对照的 1.6 和 2.4 倍；取食 1 和 24 h 时芳香族硫苷质量摩尔浓度也呈显著 ($P<0.05$) 上升趋势。这一结果表明甜菜夜蛾幼虫的取食能够诱导白菜硫苷的合成，其中吲哚族硫苷变化最为剧烈，说明吲哚族硫苷可能在抵御鳞翅目昆虫甜菜夜蛾幼虫取食过程中发挥重要的作用。3-吲哚基甲基硫苷 (GBC) 和 1-甲氧基吲哚-3-甲基硫苷 (NEO) 在甜菜夜蛾幼虫取食后不断增加，在取食 72 h 时达峰值，分别是对照的 4.7 和 4.9 倍；而 4-戊烯基硫苷 (GBN)、4-羟基吲哚-3-甲基硫苷 (4OH)、2-羟基-3-丁烯基硫苷 (PRO) 和 4-甲氧基吲哚-3-甲基硫苷 (4ME) 则呈先增后减趋势，其中 GBN 对甜菜夜蛾幼虫取食的响应最为强烈，48 h 达峰值，是对照的 1.9 倍；3-丁烯基硫苷 (GNA) 和 2-苯乙基硫苷 (NAS) 变化不明显，仅在初始时间点有所增加。

表 2 白菜硫苷组分

Table 2 Components of glucosinolate in *B. campestris* ssp. *chinensis*

化合物名称	缩写	所属类别	分子量	保留时间/min
2-羟基-3-丁烯基硫苷progoitrin	PRO	脂肪族	388	7.790
3-丁烯基硫苷gluconapin	GNA	脂肪族	372	14.480
4-羟基吲哚-3-甲基硫苷4-OH-glucobrassicin	4OH	吲哚族	463	17.067
4-戊烯基硫苷glucobrassicinapin	GBN	脂肪族	386	22.087
3-吲哚基甲基硫苷glucobrassicin	GBC	吲哚族	447	26.753
2-苯乙基硫苷gluconasturtiin	NAS	芳香族	422	31.497
4-甲氧基-3-吲哚基甲基硫苷4-methoxy-glucobrassicin	4ME	吲哚族	477	32.433
1-甲氧基-3-吲哚基甲基硫苷1-methoxy-glucobrassicin	NEO	吲哚族	477	40.793

表 3 甜菜夜蛾幼虫取食对白菜硫苷质量摩尔浓度的影响

Table 3 Effects of feeding on the content of glucosinolate in *B. campestris* ssp. *chinensis* by *S. exigua* larvae

类型	化合物缩写	硫苷质量摩尔浓度/($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$)				
		0 (ck)	1	24	48	72 h
脂肪族	GNA	0.154±0.010 b	0.174±0.005 b	0.220±0.003 c	0.132±0.003 a	0.132±0.002 a
	PRO	0.152±0.003 a	0.150±0.002 a	0.176±0.001 b	0.182±0.002 c	0.179±0.001 bc
	GBN	0.434±0.032 a	0.466±0.009 a	0.550±0.018 b	0.819±0.004 c	0.781±0.001 c
	总脂肪族	0.724±0.009 a	0.792±0.001 b	0.959±0.008 c	1.132±0.002 e	1.116±0.004 d
吲哚族	4OH	0.157±0.012 a	0.177±0.003 b	0.222±0.004 c	0.257±0.006 d	0.234±0.004 c
	GBC	0.044±0.013 a	0.062±0.000 b	0.105±0.003 c	0.130±0.001 d	0.209±0.005 e
	4ME	0.089±0.026 a	0.69±0.000 a	0.140±0.003 b	0.154±0.002 b	0.135±0.000 b
	NEO	0.054±0.011 a	0.067±0.001 b	0.092±0.001 c	0.162±0.003 d	0.263±0.001 e
	总吲哚族	0.351±0.001 a	0.375±0.001 b	0.565±0.005 c	0.703±0.010 d	0.840±0.008 e
芳香族	NAS	0.096±0.004 ab	0.109±0.002 c	0.142±0.001 d	0.086±0.001 a	0.101±0.002 bc
	总硫苷	1.154±0.003 a	1.277±0.002 b	1.664±0.014 c	1.921±0.011 d	2.032±0.014 e

说明：同行不同小写字母表示同一指标不同时间差异显著($P<0.05$)

2.2 甜菜夜蛾幼虫取食对白菜硫苷合成相关基因表达的影响

通过 RT-qPCR 对甜菜夜蛾幼虫取食后白菜硫苷合成相关基因表达情况进行分析。结果 (图 1) 表明：甜菜夜蛾幼虫取食后，脂肪族硫苷合成相关基因 *BcBCAT4*、*BcMAM1*、*BcCYP83A1*、*BcMYB28*、*BcSUR1* 的表达量表现出相同的规律，即取食 1 h 其表达量显著上调 ($P < 0.05$)，48 h 基因表达水平达到最高，而白菜吲哚族硫苷合成相关基因 *BcCYP83B1* 表现出相反的变化趋势；脂肪族硫苷合成相关基因 *BcAOP2* 和吲哚族硫苷合成相关基因 *BcSOT16* 随取食时间的延长表达量逐渐增加，72 h 达最高，分别是对照的 4.2 和 3.7 倍。此外，硫苷合成过程中的直接硫供体谷胱甘肽 (GSH) 合成相关基因 *BcAPK2* 转录水平呈显著增加趋势，72 h 时比对照增加了 4.7 倍。

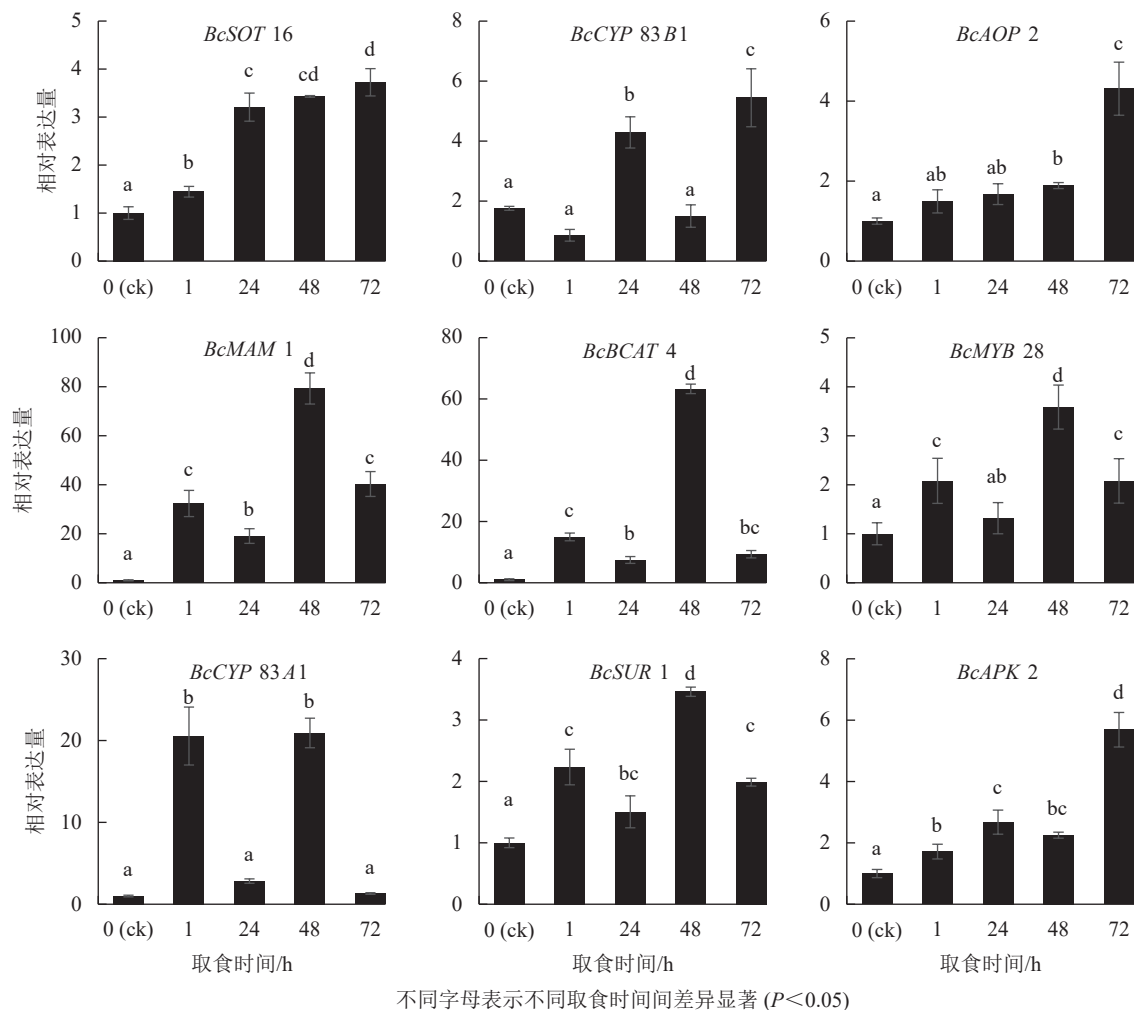


图 1 甜菜夜蛾幼虫取食对白菜硫苷代谢关键基因表达模式的影响

Figure 1 Effects of *S. exigua* larvae feeding on expression patterns of key genes related to glucosinolates metabolism in *B. campestris* ssp. *chinensis*

2.3 甜菜夜蛾幼虫体内 GSTs 活性的变化

由图 2 表明：甜菜夜蛾幼虫取食后，幼虫体内 GSTs 活性产生显著变化，取食 1 h 时酶活性增强不显著 ($P > 0.05$)，但在随后的时间点酶活性显著增强 ($P < 0.05$)，24 h 增幅最为剧烈，72 h 达峰值，为 $63.6 \mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ，比对照升高了 1.5 倍。可见，白菜硫苷质量摩尔浓度的增加诱导了甜菜夜蛾幼虫体内解毒酶 GSTs 活性的提高。

3 讨论

已有研究发现：不同拟南芥群体硫苷的种类和含量有所差异，而这种差异影响着拟南芥对不同种群植食性昆虫的抗性^[30-33]，如甘蓝夜蛾和菜青虫 *Pieris rapae* 在取食脂肪族和吲哚族硫苷含量较高的植株时，生长缓慢，取食吲哚族硫苷含量较高的植株时，发育时间也会增加^[34]。随后，在研究拟南芥脂肪族

硫苷的抗虫机制中,发现 GS-Elong、GS-AOP、TGGs 等位点与脂肪族硫苷的抗虫性相关^[35-38]。SONTOWSKI 等^[19]发现:拟南芥被甜菜夜蛾幼虫取食后,GS-Elong 位点硫苷合成相关基因 *AtMAM1*、*AtMAM2*、*AtMAM3* 转录水平显著增加,同时相关脂肪族硫苷含量也显著上升,说明脂肪族硫苷参与了拟南芥对甜菜夜蛾幼虫的防御反应。本研究发现:白菜被甜菜夜蛾幼虫取食后,脂肪族硫苷 GS-Elong 位点相关基因 *BcBCAT4*、*BcMAM1* 显著上调,脂肪族硫苷的合成也显著增加,GBN 的响应尤为强烈,说明脂肪族硫苷尤其是 GBN 参与了白菜对甜菜夜蛾幼虫的防御反应。然而,*BcBCAT4*、*BcMAM1* 的表达水平与相应脂肪族硫苷的质量摩尔浓度存在一定差异,说明除了硫苷生物合成基因的直接影响

外,可能还涉及其他机制来参与十字花科芸薹属作物次级代谢产物硫苷的生物合成和积累。此外,吲哚族的 4OH、NEO、GBC 在甜菜夜蛾幼虫取食过程中显著增加,说明吲哚族硫苷可能在白菜抵御甜菜夜蛾幼虫取食过程中发挥着重要的作用。KUMAR 等^[39]在研究害虫的质量与芥菜 *Brassica juncea* 中硫苷各组分的关系时,发现棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 幼虫的增重与芥菜中 GNA 和 GBN 的含量呈负相关,而斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 幼虫的增重与 GNA、GBN 和黑芥子硫苷酸钾 (SIN) 的含量呈负相关,进一步研究发现硫苷介导的芥菜对棉铃虫和斜纹夜蛾的抗性差异与 *BjuMYB28* 同源物在芥菜叶片中的差异表达相关。本研究中,甜菜夜蛾幼虫取食胁迫下,白菜 4OH、NEO、GBC 的增加与幼虫体内解毒酶 GSTs 活性及白菜硫苷合成相关基因 *BcSOT16* 呈正相关,说明 *BcSOT16* 活性的提高可能是甜菜夜蛾幼虫取食下白菜吲哚族硫苷合成增加的原因,进而提高了白菜对甜菜夜蛾的抗性。需进一步验证 *BcSOT16* 的生物学功能,以明确 *BcSOT16* 在白菜抵御甜菜夜蛾幼虫取食胁迫过程中所起到的重要作用。

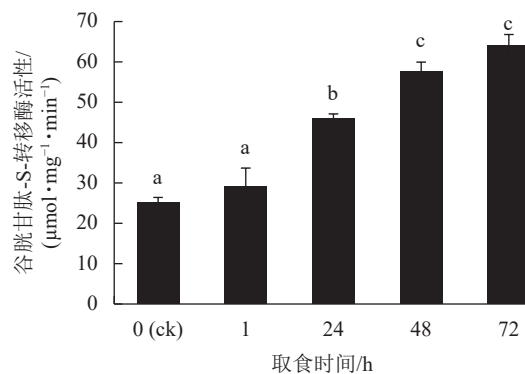
在长期进化过程中,为抵御植食性昆虫的取食,植物形成了多种防御机制,如产生各种次级代谢物^[40]。硫苷及其降解产物对昆虫具有阻食、影响其生长发育及繁殖,甚至毒杀的作用^[11],然而,硫苷也能诱导昆虫体内细胞色素 P450s 和 GSTs 等主要解毒酶系基因的表达,增强昆虫对硫苷等植物次生物质的代谢能力^[23-24, 41]。如草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 幼虫的细胞色素 P450s 活性可以被吲哚族硫苷降解产物吲哚-3-甲醇所诱导^[42];食用含硫苷、异硫氰酸酯的饲料或直接取食十字花科植物时,桃蚜体内 GSTs 活性会被诱导增加^[24];与对照相比,取食含硫苷的桃蚜,食蚜蝇 GSTs 活性亦有所提高^[43]。本研究中甜菜夜蛾幼虫取食白菜后,其体内 GSTs 活性不断增强,与白菜中总硫苷及吲哚类硫苷质量摩尔浓度增加趋势的一致性,表明了硫苷对甜菜夜蛾幼虫 GSTs 活性的诱导作用,也说明吲哚族硫苷可能在白菜抵御杂食性害虫甜菜夜蛾幼虫取食过程中发挥更为重要的作用。

4 结论

甜菜夜蛾幼虫取食能上调白菜 *BcSOT16*、*BcBCAT4*、*BcMAM1* 等硫苷合成关键基因的表达,从而促进白菜硫苷质量摩尔浓度的增加,提高白菜对甜菜夜蛾幼虫取食胁迫的抗性,吲哚族的 4OH、NEO、GBC 和脂肪族的 GBN 的反应尤为强烈,但硫苷质量摩尔浓度的升高又会诱导甜菜夜蛾幼虫体内 GSTs 活性的增强,提高甜菜夜蛾幼虫对硫苷的解毒能力。

5 参考文献

- [1] 徐园园,李竹帛,周贺芳,等.不结球白菜 *BrABF1* 基因的克隆与功能分析[J].核农学报,2021,35(10):2241-2249.
XU Yuanyuan, LI Zhubo, ZHOU Hefang, et al. Cloning and functional analysis of *BrABF1* gene in non-heading Chinese cabbage [J]. *Journal Nuclear Agricultural Science*, 2021, 35(10): 2241-2249.
- [2] BLAZEV I, MONTAUT S, BURCUL F, et al. Glucosinolate structural diversity, identification, chemical synthesis and



不同字母表示不同时间差异显著 ($P < 0.05$)

图2 取食白菜后甜菜夜蛾幼虫 GSTs 活性的变化

Figure 2 Changes of GSTs activity in *S. exigua* larvae after feeding on *B. campestris* ssp. *chinensis*

- metabolism in plants[J/OL]. *Phytochemistry*, 2020, 169, 112100 [2022-01-20]. doi:10.1016/j.phytochem.2019.112100.
- [3] AGERBIRK N, OLSEN C E. Glucosinolate structures in evolution [J]. *Phytochemistry*, 2012, 77: 16 – 45.
- [4] SONDERBY 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.
- [5] KECK A S, FINLEY J W. Cruciferous vegetables: cancer protective mechanisms of glucosinolate hydrolysis products and selenium [J]. *Integrative Cancer Therapies*, 2004, 3(1): 5 – 12.
- [6] BONGONI R, VERKERK R, STEENBEKKERS B, *et al.* Evaluation of different cooking conditions on broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) to improve the nutritional value and consumer acceptance [J]. *Plant Foods for Human Nutrition*, 2014, 69(3): 228 – 234.
- [7] NOVOTNY C, SCHULZOVA V, KRMELA A, *et al.* Ascorbic acid and glucosinolate levels in new czech cabbage cultivars: effect of production system and fungal infection[J/OL]. *Molecules*, 2018, 23(8): 1855 [2022-02-03]. doi: 10.3390/molecules23081855.
- [8] MUGFORD S G, YOSHHIMOTO N, REICHELT M, *et al.* Disruption of adenosine-59-phosphosulfate kinase in arabidopsis reduces levels of sulfated secondary metabolites [J]. *The Plant Cell*, 2009, 21(3): 910 – 927.
- [9] RASK L, ANDREASSON E, EKBOM B, *et al.* Myrosinase: gene family evolution and herbivore defense in Brassicaceae [J]. *Plant Molecular Biology*, 2000, 42(1): 93 – 113.
- [10] 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.
- [11] 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, 2007.
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, 2007.
- [12] CHHAJED S, MOSTAFA I, HE Y, *et al.* Glucosinolate biosynthesis and the glucosinolate-myrosinase system in plant defense[J/OL]. *Agronomy*, 2020, 10(11): 1786 [2022-02-03]. doi: 10.3390/agronomy10111786.
- [13] HOPKINS R J, van DAM N M V, van LOON J J. Role of glucosinolates in insect-plant relationships and multitrophic interactions [J]. *Annual Review Entomology*, 2009, 54: 57 – 83.
- [14] SANTOLAMAZZA-CARBONE S, SOTELO T, VELASCO P, *et al.* Antibiotic properties of the glucosinolates of *Brassica oleracea* var. *acephala* similarly affect generalist and specialist larvae of two lepidopteran pests[J]. *Journal of Pest Science*, 89(1): 195 – 206.
- [15] BADENES-PEREZ F R, REICHELT M, GERSHENZON J, *et al.* Interaction of glucosinolate content of *Arabidopsis thaliana* mutant lines and feeding and oviposition by generalist and specialist lepidopterans [J]. *Phytochemistry*, 2013, 86: 36 – 43.
- [16] AUGUSTINE R, BISHT N C. Biotic elicitors and mechanical damage mod-ulate glucosinolate accumulation by coordinated interplay of glucosinolate biosynthesis regulators in polyploid *Brassica juncea* [J]. *Phytochemistry*, 2015, 117(1): 43 – 50.
- [17] BORGES A, ABREU A C, FERREIRA C, *et al.* Antibacterial activity and mode of action of selected glucosinolate hydrolysis products against bacterial pathogens [J]. *Journal of Food Science & Technology*, 2015, 52(8): 4737 – 4748.
- [18] LAMOTTE O, JEANDROZ S. Plant responses to biotic/abiotic stresses: lessons from cell signaling[J/OL]. *Frontiers in Plant Science* 2017, 8: 1772 [2022-02-03]. doi:10.3389/fpls.2017.01772.
- [19] SONTOWSKI R, GORRINGE N J, PENC S, *et al.* Same difference? low and high glucosinolate *Brassica rapa* varieties show similar responses upon feeding by two specialist root herbivores[J/OL]. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10: 1451 [2022-02-03]. doi: 10.3389/fpls.2019.01451.
- [20] MEWIS I, TOKUHISA J G, SCHULTA J C, *et al.* Gene expression and glucosinolate accumulation in *Arabidopsis thaliana* in response to generalist and specialist herbivores of different feeding guilds and the role of defense signaling pathways [J]. *Phytochemistry*, 2006, 67(22): 2450 – 2462.
- [21] KOORNNEEF M, ALONSO-BLANCO C, VREUGDENHIL D. Naturally occurring genetic variation in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2004, 55(1): 141 – 172.
- [22] KUHLMANN F, MULLER C. Independent responses to ultraviolet radiation and herbivore attack in Broccoli [J]. *Journl of Experimental Botany*, 2009, 60(12): 3467 – 3475.
- [23] PFALZ M, VOGEL H, KROYMANN J. The gene controlling the indole glucosinolate modifier1 quantitative trait locus alters indole glucosinolate structures and aphid resistance in *Arabidopsis* [J]. *The Plant Cell*, 2009, 21(3): 985 – 999.

- [24] 陈澄宇, 康志娇, 史雪岩, 等. 昆虫对植物次生物质的代谢适应机制及其对昆虫抗药性的意义[J]. *昆虫学报*, 2015, **58**(10): 1126 – 1139.
- CHEN Dengyu, KAMNG Zhijiao, SHI Xueyan, *et al.* Metabolic adaptation mechanisms of insects to plant secondary metabolites and their implications for insecticide resistance of insects [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2015, **58**(10): 1126 – 1139.
- [25] KRUMBEIN A, SCHONHOF I, SCHREINER M. Composition and contents of phytochemicals (glucosinolates, carotenoids and chlorophylls) and ascorbic acid in selected *Brassica* species (*B. juncea*, *B. rapa* subsp. *nipposinica* var. *chinoleifera*, *B. rapa* subsp. *chinensis* and *B. rapa* subsp. *rapa*) [J]. *Journal of Applied Botany & Food Quality*, 2005, **79**(3): 168 – 174.
- [26] ZHU Biao, YANG Jing, HE Yong, *et al.* Glucosinolate accumulation and related gene expression in pak choi (*Brassica rapa* L. ssp. *chinensis* var. *communis* [N. Tsen & S.H. Lee] Hanelt) in response to insecticide application [J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2015, **63**(44): 9683 – 9689.
- [27] BJÖRKMAN M, KLINGEN I, BIRCH A N, *et al.* Phytochemicals of Brassicaceae in plant protection and human health-Influences of climate, environment and agronomic practice [J]. *Phytochemistry*, 2011, **72**(7): 538 – 556.
- [28] LIANG Ying, YU Youjian, SHEN X Piuping, *et al.* Dissecting the complex molecular evolution and expression of polygalacturonase gene family in *Brassica rapa* ssp. *chinensis* [J]. *Plant Molecular Biology*, 2015, **89**(6): 629 – 646.
- [29] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method [J]. *Methods*, 2001, **25**: 402 – 408.
- [30] KIM J H, DURRETT T P, LAST R L, *et al.* Characterization of the *Arabidopsis* TU8 glucosinolate mutation, an allele of *TERMINAL FLOWER2* [J]. *Plant Molecular Biology*, 2004, **54**(5): 671 – 682.
- [31] MALITSKY S, BLUM E, LESS H, *et al.* The transcript and metabolite networks affected by the two clades of *Arabidopsis* glucosinolate biosynthesis regulators [J]. *Plant Physiology*, 2008, **148**(4): 2021 – 2049.
- [32] MÜLLER R, de VOS M, SUN J Y, *et al.* Differential effects of indole and aliphatic glucosinolates on lepidopteran herbivores [J]. *Journal of Chemical Ecology*, 2010, **36**(8): 905 – 913.
- [33] ZHUROV V, NAVARRO M, BRUINSMA K A, *et al.* Reciprocal responses in the interaction between *Arabidopsis* and the cell-content-feeding chelicerate herbivore spider mite [J]. *Plant Physiology*, 2014, **164**(1): 384 – 399.
- [34] SANTOLAMAZZA-CARBONE S, SOTELO T, VELASCO P, *et al.* Antibiotic properties of the glucosinolates of *Brassica oleracea* var. *acephala* similarly affect generalist and specialist larvae of two lepidopteran pests [J]. *Journal of Pest Science*, 2016, **89**(1): 195 – 206.
- [35] KLIEBENSTEIN D J, GERSHENZON J, MITCHELL-OLDS T. Comparative quantitative trait loci mapping of aliphatic, indolic and benzylic glucosinolate production in *Arabidopsis thaliana* leaves and seeds [J]. *Genetics*, 2001, **159**(1): 359 – 370.
- [36] KLIEBENSTEIN D J, KROYMANN J, BROWN P, *et al.* Genetic control of natural variation in *Arabidopsis* glucosinolate accumulation [J]. *Plant Physiology*, 2001, **126**(2): 811 – 825.
- [37] KLIEBENSTEIN D J, LAMBRIX V M, REICHEL T, *et al.* Gene duplication in the diversification of secondary metabolism: tandem 2-oxoglutarate-dependent dioxygenases control glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis* [J]. *The Plant Cell*, 2001, **13**(3): 681 – 693.
- [38] ZÜST T, HEICHINGER C, GROSSNIKLAUS U, *et al.* Natural enemies drive geographic variation in plant defenses [J]. *Science*, 2012, **338**(6103): 116 – 119.
- [39] KUMAR P, AUGUSTINE R, SINGH A K, *et al.* Feeding behaviour of generalist pests on *Brassica juncea*: implication for manipulation of glucosinolate biosynthesis pathway for enhanced resistance [J]. *Plant, Cell and Environment*, 2017, **40**(10): 2109 – 2120.
- [40] LIU Z, WANG H, XIE J, *et al.* The roles of cruciferae glucosinolates in disease and pest resistance[J/OL]. *Plants*, 2021, **10**(6): 1097[2022-02-03]. doi:10.3390/plants10061097.
- [41] HECKEL D G. Insect detoxification and sequestration strategies [J]. *Annual Plant Reviews*, 2014, **47**: 77 – 114.
- [42] GIRAUDO M, HILLIOU F, FRICAUX T, *et al.* Cytochrome P450s from the fall armyworm(*Spodoptera frugiperda*): response to plant allelochemicals and pesticides [J]. *Insect Molecular Biology*, 2015, **24**(1): 115 – 128.
- [43] VANHAELEN N, HAUBRUGE E, LOGNAY G, *et al.* Hoverfly glutathione S-transferases and effects of Brassicaceae secondary metabolites [J]. *Pesticide Biochemistry Physiology*, 2001, **71**(3): 170 – 177.