

山定子抗苹果褐斑病菌侵染过程中 DNA ladder 与类 caspases 活性的检测

范 涛,任 斌,韩青梅,黄丽丽

(旱区作物逆境生物学国家重点实验室,西北农林科技大学植物保护学院,陕西 杨凌 712100)

摘 要: 接种褐斑病菌分生孢子悬浮液于山定子与富士苹果叶片,接种后 1、3 d 和 5 d 取样,提取 DNA,检测 DNA ladder;提取样品粗蛋白,用特异性荧光底物检测粗蛋白中类 caspase 活性,探索山定子受褐斑病菌侵染过程中引起的细胞程序性死亡(PCD)与抗性的关系,检测 DNA ladder 和类 caspases 活性变化的规律。研究发现:在接种后 1、3 d 和 5 d,山定子和富士苹果叶片中没有明显 DNA ladder 的产生;受检测的 YVADase、DEVDase、IETDase 和 VEI-Dase 活性在接种后 1 d 和 3 d 没有显著变化,但在接种后 5 d,活性均降低 30% 左右,显著低于对照。研究表明,山定子在褐斑病菌侵染过程中并没有 DNA ladder 产生,但却伴随着类 caspase 活性的下降。

关键词: 山定子;苹果褐斑病菌;侵染;DNA ladder;类 caspases

中图分类号: S436.611.1 文献标志码: A

Detection of DNA ladder and caspase-like activities in *Malus baccata* during infection of *Diplocarpon mali*

FAN Tao, REN Bin, HAN Qing-mei, HUANG Li-li

(State Key Laboratory of Crop Stress Biology for Arid Areas, College of Plant Protection,
Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Detached leaves of *Malus baccata* and *Malus domestica* cv. Fuji were inoculated with conidia suspension of *Diplocarpon mali*. Samples were harvested one day after inoculation (dai), 3 dai and 5 dai, respectively. DNA of the samples was extracted for detection of DNA ladder. Gross proteins of the samples were extracted for detection of caspase-like activities using special fluorescent substrate. DNA ladder and caspase-like activities were examined to explain the relationship between programmed cell death (PCD) and resistance of *M. baccata* infected by *D. mali*. The results showed that DNA ladder was barely detected in *M. baccata* 1 dai, 3 dai or 5 dai. Activities of YVADase, DEVDase, I-ETDase and VEIDase in leaves of *M. baccata* were shown to have no variations 1 dai and 3 dai, while became decreased 5 dai to about 30% of those 1 dai, which was significantly lower than those of the control group. This study showed that DNA ladder was not generated in *M. baccata* during the infection of *D. mali* with the accompany of declining caspase-like activities.

Keywords: *Malus baccata*; *Marssonina coronaria*; infection; DNA ladder; caspases-like

由 *Diplocarpon mali* 侵染引起的苹果褐斑病主要侵染叶片引起苹果树早期大量落叶,造成严重产量和经济损失。抗性资源的开发和利用是防治苹果褐斑病菌最经济的方法。目前种植的苹果品种对苹果褐斑病的抗性虽存在明显差异,但缺乏免疫或高抗材料^[1]。作为苹果育种的砧木苹果属山定子(*Malus baccata*)被发现对褐斑病具有高水平抗性,其抗性表现在受相同致病力褐斑病菌侵染时,叶片上产生非常小的病斑,且繁殖体数量非常稀少^[2]。组织学观察发现,在接种后 3 d,褐斑病菌在山定子内的扩展受到抑制,病原菌被局限在角质层下,致使病菌生长发育推迟。在接种后 7 d,受侵染山定子叶肉细胞出现细胞死亡,表现出细胞质皱缩、细胞核和液泡解体、叶绿体肿胀等特征^[3],但山定子细胞死亡的原因

收稿日期: 2014-05-05
基金项目: 国家自然科学基金(31071650, 31301608)
作者简介: 范 涛(1991—),男,安徽阜阳人,在读硕士研究生,研究方向为植物病害综合防治。E-mail: houziaibama@qq.com。
通信作者: 黄丽丽(1961—),女,陕西西安人,教授,主要从事植物病害综合防治研究。E-mail: huanglili@nwsuaf.edu.cn。

及其与山定子抗性机理的关系仍然未知。

细胞程序性死亡(programmed cell death, PCD)被定义为发生在真核生物生长发育阶段或逆境胁迫响应过程,产生的由基因控制的细胞自动消除的现象^[4]。发生 PCD 细胞常见有液泡破裂、细胞器解体、染色质皱缩和 DNA 的片段化等特征。DNA 片段化过程是由于位于细胞核的 CAD(caspase-activated deoxyribonuclease)受类 caspase-3 激活^[5],进而在核小体连接处特异地切断 DNA 链。被切断的 DNA 片段呈 180~200 bp 倍数增加,通过琼脂糖凝胶电泳可检测到 DNA 片段呈明显的梯状排列,被称为“DNA ladder”^[6]。类 caspase 活性则广泛参与到植物 PCD 过程的信号传导和执行中,其中具有类 caspase-1 活性的 VPEs(vacuolar processing enzymes)与液泡的裂解直接相关,已被证明参与 TMV 诱导的携带 N 抗性基因烟草叶片抗性 PCD 反应中^[7]。

现有研究结果表明,不同苹果材料对褐斑病菌的抗性机理存在共性特征,如主效基因效应的数量性状抗性遗传^[8-9]和几丁质酶、 β -1,3 葡聚糖酶等 PR 蛋白的参与^[10-11]。因此,本研究旨在探索山定子褐斑病菌侵染扩展过程中发生的细胞死亡机理,检测 DNA ladder 和类 caspases 活性变化的规律,为阐明山定子抗褐斑病菌机理提供重要依据,同时也对苹果抗褐斑病机理的研究具有借鉴意义。

1 材料与方法

1.1 植物材料与菌株

植物叶片来自山定子和富士苹果(感病材料)两年生幼苗。幼苗栽培于人工温室,光照充足,设有隔虫网,每周一次用 10×Hoagland's 培养液灌根。选择一年生枝条 3~7 位完全展开叶作为离体接种材料。

供试苹果褐斑病菌株 Hph-141 由西北农林科技大学植物病害综合治理实验室提供,经离体叶片接种鉴定为高致病力菌株^[2]。菌株纯培养品保存于-80℃。活化过程将菌体接种于 PDA 培养基,25℃培养 20 d。

1.2 主要试剂

荧光底物 Ac-YVAD-AMC、Ac-DEVD-AMC、Ac-IETD-AMC 与 Ac-VEID-AMC 购买于 Merck 公司。

蛋白提取缓冲液:25 mM MOPS(pH 7.5),1 mM EDTA,5 mM DTT、10% 蔗糖 2 mM PMSF。

Caspase 反应缓冲液:100 mM NaAc、10% 蔗糖、0.1% CHAPS(pH 5.5)

3% CTAB 裂解液:3% CTAB、100 mmol·L⁻¹ Tris-HCl(pH 8.0)、25 mmol·L⁻¹ EDTA(pH 8.0)、2 mol·L⁻¹ NaCl,用前加入 2% PVP 和 2% β -巯基乙醇。

1.3 菌株复壮与孢子悬浮液制备

采集健康的富士苹果叶片用 0.6% 次氯酸钠溶液表面消毒 3 min,无菌水冲洗 3 次,用于菌株复壮。将活化菌落从培养基上刮下,用研钵轻轻研磨后制成菌悬液。用移液枪接种于处理过的叶片上,每滴 10~20 μ L 菌悬液,用饱和无菌水的脱脂棉包裹叶柄。转移叶片到用 0.6% 次氯酸钠溶液消毒后的托盘中,覆盖保鲜膜保湿,于 25℃放置 14 d。待叶片表面涌出病菌分生孢子团,用含 0.1% 吐温 80 无菌水反复冲洗并收集,调整浓度到 5×10^5 个孢子·mL⁻¹,孢子悬浮液 4℃保存待用。

1.4 离体叶片接种与样品收集

待接种富士与山定子叶片用 0.6% NaClO 溶液表面消毒。叶片正面用记号笔对称位置标记 7 mm 直径接种点 8~10 个,每个接种点用移液枪点接 10 μ L 分生孢子悬浮液,空白对照样品接种 10 μ L 无菌水。接种后的叶片放置到托盘中保湿,之后置于 25℃环境培养,每日光照 16 h。叶片接种后 1、3 d 和 5 d 收集样品。样品收集时,随机选择接种叶片,利用 7 mm 打孔器对接种点取样,每 16 个接种点为一组样品。样品收集后即刻浸入液氮中处理,之后-80℃保存。

1.5 样品 DNA 提取

山定子与富士苹果样品 DNA 提取参照 CTAB 法^[12]进行。取样品约 100 mg,放入液氮充分研磨。之后样品粉末与 850 μ L 预热 3% CTAB 裂解液充分混合,65℃温育 30 min 后再加入 850 μ L 酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)充分混合。12 000 rpm,4℃离心 15 min。转移上清并加入等体积氯仿,稍稍混匀后 4℃离心 15 min。再转移上层清液并加入 2 倍体积无水乙醇,-20℃沉淀 30 min。4℃离心收集 DNA 析出物,并用 450 μ L 75% 乙醇(v/v)洗涤沉淀两次,即获得纯净 DNA 样品。加水溶解后,样品加入 10 mg·mL⁻¹ RNase A,37℃温育 30 min,以去除 RNA 残留。

1.6 DNA ladder 检测

利用 5×TAE buffer 和琼脂糖制备 2% 琼脂糖凝胶,向胶槽中点入处理组与对照组样品 DNA 及 marker,150 V 电泳 30 min 用于检测。电泳结果经 EB 染色并照相。试验重复 3 次。

1.7 样品粗蛋白提取

山定子与富士叶片样品活性粗蛋白提取参照文

献[13]的方法。取 100 mg 样品借助液氮充分研磨,收集粉末并加入到 200 μ L 蛋白提取缓冲液中。轻轻混匀后,加入 2 mM PMSF 并于冰上静置 30 min。之后 4℃ 离心 20 min,转移上清并分装到小管中,即刻保存于 -80℃。

蛋白浓度测定参照 Bradford 法^[14]进行。利用梯度稀释 BSA 和考马斯亮蓝 G-250 结合,测量吸光度并建立标准曲线,用于提取蛋白浓度测定。

1.8 类 caspases 活性检测

类 caspase 活性测定参照 Maurice 方法^[15]进行。向酶标板反应孔中加入 200 μ L 反应缓冲液,10 μ g 粗蛋白和 50 μ M 荧光底物 AC-YVAD-AMC、AC-DEVD-AMC、AC-IETD-AMC 或 AC-VEID-AMC。37℃ 水浴 30 min 后,利用 Infinite200 酶标仪(360 nm 激发光,460 nm 吸收光)测定样品中荧光强度。AC-YVAD-AMC 特异检测 YVADase(caspase-1-like)活性;AC-DEVD-AMC 特异检测 DEV-Dase(caspase-3-like)活性;AC-IETD-AMC 特异检测 IETDase(caspase-8-like)活性;AC-VEID-

AMC 特异检测 VEIDase(caspase-6-like)活性。试验重复 3 次。

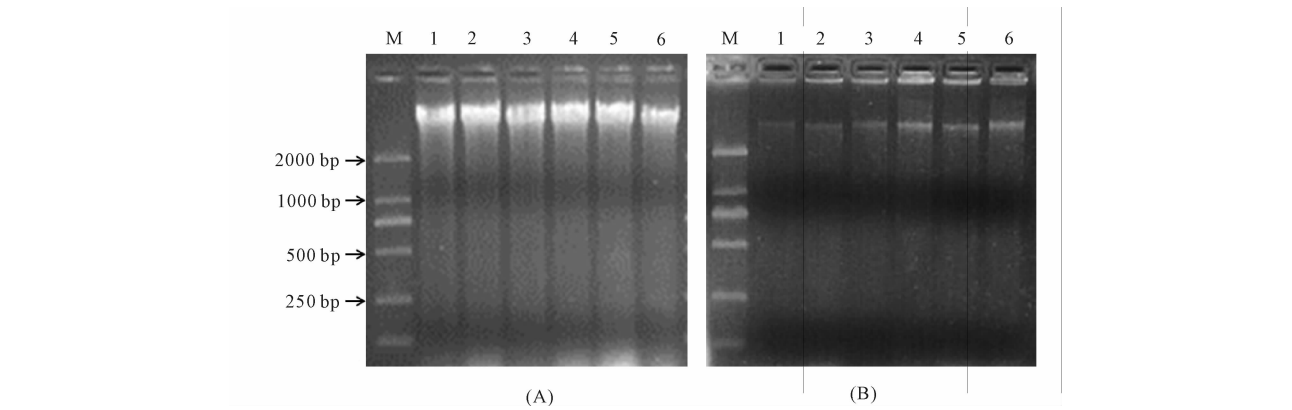
1.9 反应体系 pH 值对类 caspases 活性检测的影响

利用醋酸钠/醋酸缓冲液调整反应缓冲液 pH 值到 3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5 和 7.0,以检测 pH 值对类 caspases 活性的影响。向 200 μ L 不同 pH 值反应缓冲液中加入 10 μ g 粗蛋白和 50 μ M 荧光底物 AC-YVAD-AMC、AC-DEVD-AMC、AC-IETD-AMC 或 AC-VEID-AMC。37℃ 水浴 30 min 后,测定样品中荧光强度。试验重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 山定子叶片受褐斑病菌侵染过程 DNA ladder 检测

结果显示,山定子叶片在接种后 1、3 d 和 5 d 均未产生明显的 DNA ladder(图 1)。同样检测富士苹果叶片在相同时间点也未表现出明显 DNA ladder 现象。图中所检测核酸条带单一,也未发生明显的降解。



注:(A)图为富士苹果中 DNA ladder 检测,泳道 1~3 为富士苹果叶片接种病菌分生孢子 1、3、5 d 后样品,泳道 4~6 为对应的接种无菌水空白对照;(B)图为山定子中 DNA ladder 检测,泳道 1~3 为山定子叶片接种病菌分生孢子 1、3、5 d 后样品,泳道 4~6 为对应的接种无菌水空白对照;M 为 marker。

Note: (A) Detection of DNA ladder in *M. domestica* cv. Fuji; Lane 1~3 were Fuji samples harvested 1, 3, and 5 day with inoculation of conidia of *D. mali*; Lane 4~6 were negative controls harvested 1, 3, and 5 day with inoculation of sterilized water. (B) Detection of DNA ladder in *M. baccata*; Lane 1~3 were *M. baccata* samples harvested 1, 3, and 5 day with inoculation of conidia of *D. mali*; Lane 4~6 were negative controls harvested 1, 3, and 5 d with inoculation of sterilized water. M was the marker.

图 1 褐斑病菌侵染过程山定子及富士苹果叶片 DNA ladder 检测

Fig.1 Detection of DNA ladder in *Malus baccata* and *M. domestica* cv. Fuji leaves during infection of *Diplocarpon mali*

2.2 类 caspases 活性变化

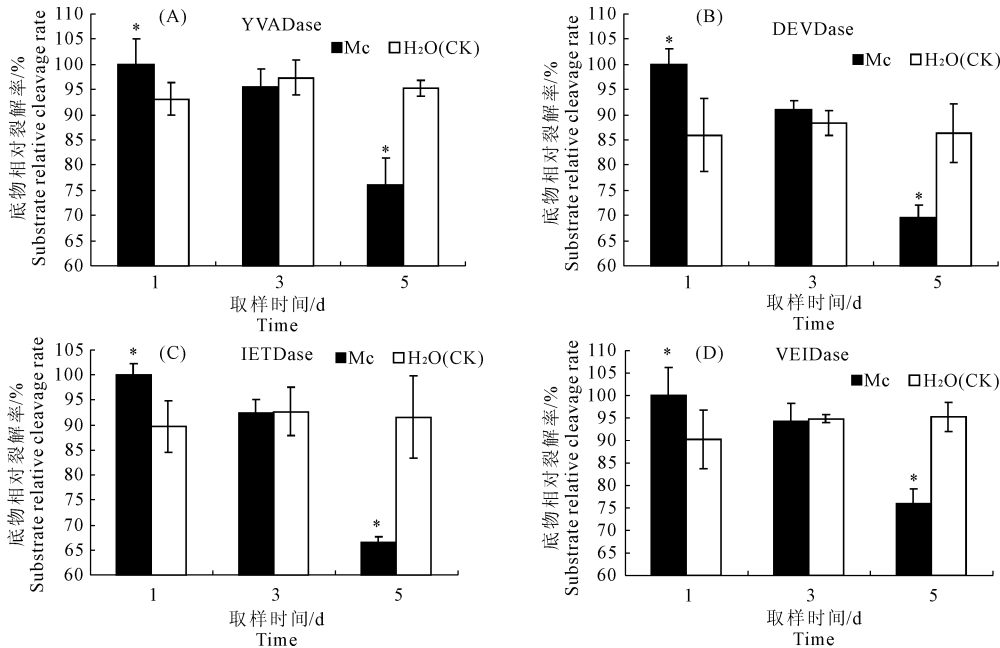
如图 2 所示,接种无菌水的空白对照山定子叶片中受检测的 YVADase、DEV-Dase、IETDase 和 VEI-Dase 活性在接种后 5 d 一直没有显著变化。与对照组结果相比,在接种病原菌的山定子叶片中,接种 1 d 和 3 d 时 4 种类 caspase 活性没有变化,但在接种 5 d 时,4 种类 caspase 活性显著降低。对比接种后 1 d

的活性,YVADase 活性下降 24.9%,DEV-Dase 活性下降 30.5%,IETDase 活性下降 33.6%,IETDase 活性下降 24.1%。同时检测富士叶片接种病原菌后 4 种类 caspase 活性变化,结果显示(图 3)在所有取样时间点,4 种类 caspase 活性都没有显著变化,说明山定子中类 caspase 活性的变化与山定子抗性反应相关。

2.3 反应体系 pH 值对类 caspases 活性检测的影响

为测试反应体系 pH 值对类 caspase 活性测定的影响,实验设置了 pH 3.5~pH 7.0 范围的 caspase 反应 pH 梯度缓冲液。结果如图 4 所示,4 种类 caspase

活性随着 pH 值接近中性而逐渐增高的趋势,但有些许差异。其中 YVADase 对 pH 值变化不敏感,DEVADase 和 IETDase 在 pH 5.0~pH 7.0 有最适活性,而 VEIDase 活性逐步增高,在 pH 7.0 达最高活性。



注:底物相对裂解率=(各时间点样品的裂解活性/接种病原菌 1 天后样品的裂解活性)×100%。A. YVADase 活性检测;B. DEVADase 活性检测;C. IETDase 活性检测;D. VEIDase 活性检测。每个时间点数据都是三个独立试验的平均值,试验结果经三次重复。* 表示数据差异显著,显著性分析通过 Student *t*-test (*P* < 0.05)完成。下同。

Note: Substrate relative cleavage rate = (cleavage activity of samples/ cleavage activity of pathogen – inoculated sample in 1 day) × 100%. A. Activity of YVADase; B. Activity of DEVADase; C. Activity of IETDase; D. Activity of VEIDase. Data of each time point were the mean values of three independent experiments. The test was repeated for three times. * in each draw meant significant difference using Student – *t* test analysis (*P* < 0.05). The same below.

图 2 褐斑病侵染过程山定子中类 caspases 活性检测

Fig.2 Detection of caspase-like activities in *M. baccata* during infection of *D. mali*

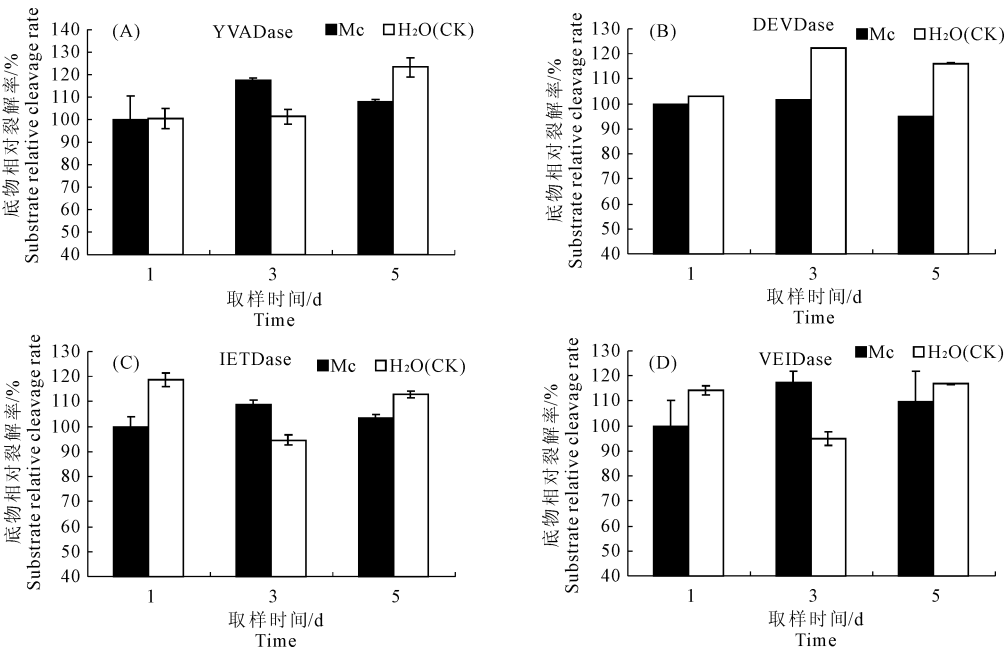
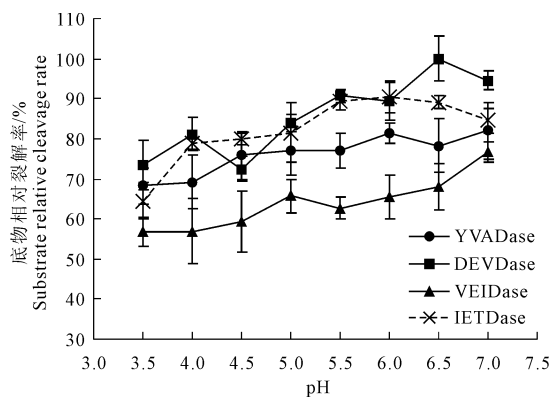


图 3 褐斑病侵染过程富士苹果中类 caspases 活性检测

Fig.3 Detection of caspase – like activities in Fuji during infection of *D. mali*



注:底物相对裂解率 = (各样品的裂解活性/最大裂解活性) × 100%; 试验所用蛋白粗样品为富士苹果和山定子叶组织粗蛋白 1:1 混合物; 每个时间点结果都是三个独立试验的平均值。

Note: Substrate relative cleavage rate = (cleavage activity of samples/maximum cleavage activity) × 100%; Protein samples used in the tests were protein extractions of Fuji and *M. baccata* mixed with a 1:1 ratio; Data of each time point were mean values of three independent experiments.

图 4 pH 值对 *Malus* 材料叶组织中的类 caspases 活性的影响
Fig.4 Influence of pH on caspase-like activities for *Malus* leaves

3 讨 论

山定子对于苹果褐斑病具有显著抗性。离体接种实验发现山定子叶片在接种后 10 d 出现肉眼可见病斑,比富士苹果叶片发病推迟 3 d 左右。王洁^[3]认为山定子对褐斑病菌的扩展表现出抗性,并利用显微技术在接种后 7 d 检测到叶肉细胞死亡。本研究选择在接种后 1,3 d 和 5 d 取样,检测山定子细胞死亡过程 DNA 片段化和类 caspases 活性变化规律,借以分析山定子抗褐斑病菌扩展的机理。

DNA 片段化是植物 PCD 过程一个重要特征。在植物 PCD 过程中, Ca^{2+} 或 Mg^{2+} 依赖的 CAD 被激活并特异地切断 DNA 是 DNA ladder 产生的直接原因。但并不是所有的植物抗性 PCD 反应都伴随有 DNA ladder 的产生,如金刚^[16]在研究黑松与松材线虫互作过程 PCD 反应中虽通过 TUNEL 技术检测到 DNA 片段化存在,但却没有 DNA ladder 产生。此外,在研究受 TMV 诱导的烟草叶片 HR 反应过程中, DNA 被检测到裂解成约 50 kb 长度片段^[7,17]。本研究虽未检测到 DNA ladder 的产生,但并不能排除 DNA 片段化的产生。

类 caspase 活性变化是植物 PCD 过程另一特征反应。研究表明具有类 caspase - 1 活性的 VPEs 是 TMV 诱导的携带 N 抗性基因烟草叶片抗性 PCD 反应中的关键因子,但另有研究发现 VPE 同样参与真菌毒素 FB1 诱导的拟南芥叶片感病细胞坏死过

程^[18],这说明 VPEs 同样参与了植物的抗性反应和病原菌致病反应。本研究在接种后 5 d 检测到山定子叶片中类 caspase - 1 活性降低,可以推测此时由 VPE 介导的液泡崩溃型细胞死亡过程是受到抑制的。此外,在锈菌和鹰嘴豆 (*Vigna unguiculata*) 互作体系中检测到类 caspase - 3 活性的存在,并发现多聚(ADP - 核糖)聚合酶 (poly (ADP - ribose) polymerase, PARP) 是类 caspase - 3 活性的天然底物^[5]。植物类 caspase - 3 活性可剪切 PARP,使 PARP 失去活性,进而细胞内 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 依赖 CAD 受 PARP 负调控诱导激活,特异性降解 DNA。类 caspase - 3 活性受抑制可阻断 CAD 激活过程^[5]。本研究在接种后 5 d 检测到山定子叶片中类 caspase - 3 活性降低,这或许解释了此过程没有出现 DNA ladder 现象的原因。

组织学观察发现,在接种后 5 d 山定子受侵染组织中并没有胞内菌丝的产生,说明褐斑病菌此时仍处在寄生阶段。此时的山定子细胞死亡对褐斑病菌的扩展和侵染是不利的,因此可以推测,此时类 caspases 活性降低是褐斑病菌抑制山定子细胞死亡的结果。然而在本研究中,山定子叶片中 YVADase、DEVDase、IETDase 和 VEIDase 在接种后 5 d 活性显著降低,推测褐斑病菌是通过作用于 YVADase、DEVDase、IETDase 和 VEIDase 活性途径的瓶颈位置,从而实现对 4 种类 caspase 活性的无差别抑制。受此影响,山定子细胞死亡现象推迟^[3]。

本研究证明了山定子在褐斑病菌侵染过程中并没有 DNA ladder 的产生,但却伴随着类 caspase 活性的下降,对研究山定子的抗性机理提供新的方向。研究中类 caspase 活性的下降发生在接种后 5 d,因此对于山定子抗性机理的前期表现仍需进一步研究。

参 考 文 献:

- [1] Yin L, Li M, Ke X, et al. Evaluation of *Malus* germplasm resistance to marssonina apple blotch[J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2013, 136(3): 597-602.
- [2] 赵 华. 苹果褐斑病病原学、组织细胞学和化学防治研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2012.
- [3] 王 洁. 利用组织细胞学技术研究苹果褐斑病菌对富士、山定子的侵染过程差异[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2012.
- [4] Lockshin R A, Zakeri Z. Apoptosis, autophagy, and more[J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2004, 36(12): 2405-2419.
- [5] D'Silva I, Poirier G G, Heath M C. Activation of cysteine proteases in cowpea plants during the hypersensitive response form of programmed cell death[J]. *Experimental Cell Research*, 1998, 245(2): 389-399.

[6] Ryerson D E, Heath M C. Cleavage of nuclear DNA into oligonucleosomal fragments during cell death induced by fungal infection or by abiotic treatments [J]. The Plant Cell Online,1996,8(3):393-402.

[7] Hatsugai N, Kuroyanagi M, Yamada K, et al. A plant vacuolar protease, VPE, mediates virus-induced hypersensitive cell death[J]. Science, 2004,305(5685):855-858.

[8] 党志国,赵政阳,万怡震,等.苹果杂交 F1 代抗褐斑病遗传趋势及抗性选择研究[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2010,38(5):137-142.

[9] 寿园园.苹果抗褐斑病性遗传分析与 SSR 分子标记[D].哈尔滨:东北农业大学,2009.

[10] Li M, Xu J, Qiu Z, et al. Screening and identification of resistance related proteins from apple leaves inoculated with *Marssonina coronaria* (EII. & JJ Davis)[J]. Proteome science, 2014,12(1):7.

[11] 殷丽华.苹果属资源对苹果褐斑病的抗性机理及抗性诱导研究[D].杨凌:西北农林科技大学,2013.

[12] 田 伟,田义朝,王彩虹,等.苹果组织总 RNA 提取方法的比较研究[J].青岛农业大学学报(自然科学版),2010,27(2):122-125.

[13] Bozhkov P, Filonova L, Suarez M, et al. VEIDase is a principal caspase-like activity involved in plant programmed cell death and essential for embryonic pattern formation [J]. Cell Death & Differentiation, 2004,11(2):175-182.

[14] Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding [J]. Anal Biochem, 1976,72:248-254.

[15] Maurice B, Veronica E F T. Temporal and spatial activation of caspase-like enzymes induced by self-incompatibility in Papaver pollen [J]. Proceedings of The National Academy of Sciences, 2007,104(62):18327-18332.

[16] 金 刚.黑松与松材线虫互作过程中细胞程序性死亡的研究[D].南京:南京林业大学,2007.

[17] Mittler R, Shulaev V, Seskar M, et al. Inhibition of programmed cell death in tobacco plants during a pathogen-induced hypersensitive response at low oxygen pressure [J]. The Plant Cell Online, 1996,8(11):1991-2001.

[18] Kuroyanagi M, Yamada K, Hatsugai N, et al. Vacuolar processing enzyme is essential for mycotoxin-induced cell death in Arabidopsis thaliana [J]. Journal of Biological Chemistry, 2005,280(38):32914-32920.

(上接第 41 页)

[2] Hu K L, Zhu Z J, Zang Y X. Accumulation of glucosinolates and nutrients in pakchoi (*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* var. *Communis*) two cultivar plants exposed to sulfur deficiency[J]. Horticulture, Environ Biote, 2011,52(2):121-127.

[3] Higdon J V, Delage B, Williams D E, et al. Cruciferous vegetables and human cancer risk: epidemiologic evidence and mechanistic basis [J]. Pharmacol Res, 2007,55:224-236.

[4] Hwang E S, Jang M R, Kim G H. Effects of storage condition on the bioactive compound contents of korean cabbage[J]. Food Sci Biotechnol, 2012,21(6):1655-1661.

[5] Halkier BA, Gershenzon J. Biology and biochemistry of glucosinolates [J]. Annu Rev Plant Biol, 2006,57:303-333.

[6] Clarke DB. Glucosinolates, structures and analysis in food[J]. Anal Methods – UK, 2010,2:310-325.

[7] Augustine R, Majee M, Gershenzon J, et al. Four genes encoding MYB28, a major transcriptional regulator of the aliphatic glucosinolate pathway, are differentially expressed in the allopolyploid. *Brassica juncea* [J]. J Exp Bot, 2013,64(16):4907-4921.

[8] Zhao Y D. Auxin biosynthesis and Its role in plant development[J]. Annu Rev of Plant Biol, 2010,61:49-64.

[9] Wittstock U, Halkier B A. Glucosinolate research in the Arabidopsis era [J]. Trends Plant Sci, 2002,7:263-270.

[10] 陈晓亚,汤显城.植物生理与分子生物学[M].北京:高等教育出版社,2007.

[11] Sugawara S, Hishiyama S, Jikumaru Y, et al. Biochemical analyses of indole – 3 – acetaldoxime – dependent auxin biosynthesis in Arabidopsis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009,106:5430-5435.

[12] Bak S, Tax F E, Feldmann K A, et al. CYP83B1, a cytochrome P450 at the metabolic branch point in auxin and indole glucosinolate biosynthesis in Arabidopsis[J]. Plant Cell, 2001,13:101-111.

[13] Schreiner M, Krumbein A, Knorr D, et al. Enhanced glucosinolates in root exudates of *Brassica rapa* ssp *rapa* mediated by salicylic acid and methyl jasmonate[J]. J Agr Food Chem, 2011,59(4):1400-1405.

[14] 陈新娟,朱祝军,钱琼秋,等.硫代葡萄糖苷的提取、分离和鉴定[J].中国食品学报,2007,7:43-48.

[15] Mithen R. Glucosinolates-biochemistry, genetics and biological activity[J]. Plant Growth Regul, 2001,34:91-103.

[16] Brader G, Mikkelsen M D, Halkier B A, et al. Altering glucosinolate p rofiles modulates disease resistance in plants[J]. The Plant Journal, 2006,46:758-767.

[17] Mikkelsen M D, Petersen B L, Glawischneg E, et al. Modulation of CYP79 genes and glucosinolate profiles in *Arabidopsis* by defense signaling pathways[J]. Plant Physiol, 2003,131:298-308.

[18] Kim Y B, Li X, Kim S J, et al. MYB transcription factors regulate glucosinolate biosynthesis in different organs of Chinese Cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*) [J]. Molecules, 2013,18:8682-8695.

[19] 胡克玲,朱祝军.苯乙酸对小白菜硫代葡萄糖苷的影响[J].植物生理学报,2013,49(11):1221-1227.

[20] Mithen R. Leaf glucosinolate profiles and their relationship to pest and disease resistance in oilseed rape[J]. Euphytica, 1992,63:71-83.