

四个芸薹属物种硫苷含量与种类分析及特殊硫苷成分的种间导入

秦 晗¹, 张文姗¹, 王 猛¹, 熊思灿², 胡丹丹¹, 孙秀丽¹,
胡莲莲¹, 孟金陵¹, 邹 珺¹

(¹华中农业大学/作物遗传改良国家重点实验室, 武汉 430070; ²东华理工大学理学院, 南昌 330013)

摘要: 硫代葡萄糖苷(简称硫苷)是在十字花科植物中广泛存在的一类次级代谢物,在植物防御体系中发挥着重要的作用。本研究通过高效液相色谱(HPLC)技术,检测分析了十字花科芸薹属4个油用物种(甘蓝型油菜、埃塞俄比亚芥、芥菜型油菜、白菜型油菜)67个代表性品种3个器官(根、叶、种子)3个环境(2014年湖北武汉、2016年湖北武汉、2016年湖北襄阳)下的硫苷种类及含量。共检测到11种主要的硫苷,显著性检验结果显示:不同年份间硫苷含量分布差异极显著,但在同一年武汉与襄阳两个地点间差异不显著;不同物种间硫苷的类型差异明显;甘蓝型油菜、埃塞俄比亚芥不同品种间硫苷含量分布差异极显著,但受测的芥菜型油菜、白菜型油菜不同品种间硫苷含量分布差异不显著;同一个品种不同器官间的硫苷总量差异极显著;同一器官不同硫苷的含量差异也极为显著。这些结果表明硫苷在不同物种、不同器官、不同品种间都展现了丰富的变异,同时硫苷也受到了极显著的环境影响。每个物种或物种的不同器官内都有其代表性的特殊硫苷成分,如甘蓝型油菜中的2-羟基-3-丁烯基硫苷,埃塞俄比亚芥以及芥菜型油菜中的2-丙烯基硫苷,白菜型油菜中的3-丁烯基硫苷。其中一些特殊硫苷成分具有有益的生物学功能,它们的存在为通过种间杂交的方式将其向甘蓝型油菜中聚集提供了可能性。我们以在埃塞俄比亚芥与芥菜型油菜中所检测到的具有抗病功能的2-丙烯基硫苷为例进行展示,这种硫苷成分在高、中、低硫苷的甘蓝型油菜品种中含量都几乎为0,而在含有埃塞俄比亚芥与白菜型油菜亚基因组导入片段包含3个世代183个株系的再合成甘蓝型油菜(新型甘蓝型油菜)中,有170个株系检测到了显著高于品种材料的2-丙烯基硫苷成分,这说明了通过种间交流的方式向目标物种中导入特殊硫苷成分的可行性。以上这些结果将为分析利用芸薹属不同油用作物中的硫苷,并创建具有特殊硫苷成分的芸薹属作物提供信息和新的视角。

关键词: 硫代葡萄糖苷;物种特异性;器官特异性;芸薹属作物;基因导入

Characterizing Glucosinolates of Four *Brassica* Species and Interspecific Transferring of Specific Glucosinolates

QIN Han¹, ZHANG Wen-shan¹, WANG Meng¹, XIONG Si-can², HU Dan-dan¹,
SUN Xiu-li¹, HU Lian-lian¹, MENG Jin-ling¹, ZOU Jun¹

(¹Huazhong Agricultural University/National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Wuhan 430070;

²East China University of Technology, School of Science, Nanchang 330013)

Abstract: Glucosinolates (GSL) are important secondary metabolites in Brassicaceae, with favorable biological functions such as resistance to plant diseases and insect pests. In this paper, we investigated and compared the content of 11 major GSL among three major organs (roots, leaves and seeds) of 67 cultivars using high-performance liquid chromatography (HPLC). These cultivars were from four *Brassica* L. oilseed species (*B. napus* L., *B. carinata* A. Braun, *B. juncea* (L.) Czern. and *B. rapa* L.) and cultivated at three environments (Wuhan

收稿日期: 2019-10-24 修回日期: 2019-11-14 网络出版日期: 2019-11-06

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20191024003>

第一作者研究方向为油菜种质资源创新, E-mail: qh@webmail.hzau.edu.cn; 张文姗为共同第一作者

通信作者: 邹珺, 研究方向为油菜种质资源创新与基因组学, E-mail: zoujun@mail.hzau.edu.cn

基金项目: 中德合作研究项目 (Sino-German Research Project, GZ 1362)

Foundation project: The Sino-German Research Project (GZ 1362)

Hubei, 2014; Wuhan Hubei, 2016; Xiangyang Hubei, 2016). In general, the difference between years resulted in extremely significant variation of GSL content. Cultivars from different species showed significant difference on type of GSL. In comparison to the cultivars from *B. napus* L. and *B. carinata* A. Braun that showed extremely significant variation of GSL content, no significant variations were observed in cultivars from *B. juncea* (L.) Czern. and *B. rapa* L.. For the same cultivar, the total content of GSL among different organs varied significantly and for the same organ, the content of different GSL varied significantly as well. These results showed that there is abundant variation of GSL content or types among different species, organs, and cultivars as well as environmental factors. There are a few special individual GSL in certain species and organs, and some of them showed beneficial biological functions, which would be transferred and accumulated in *B. napus* L. via hybridization between species. For instance, sinigrin, which confers resistance to microorganisms, was typically detected in *B. carinata* A. Braun and *B. juncea* (L.) Czern., but almost undetectable in normal *B. napus* L. cultivars which can be divided into low-sulfur, middle-sulfur and high-sulfur types. These compounds were found in the resynthesized lines of *B. napus* L. with subgenomic introgression from *B. carinata* A. Braun and *B. rapa* L.. Out of 183 lines including three generations, 170 showed an elevation in sinigrin content relative to normal cultivars. Taken together, these results would provide new insights for deploying GSL in different oilseeds crops in future breeding for new *Brassica* crops.

Key words: glucosinolates; species-specific; organ-specific; *Brassica* L. oilseed; introgression

硫代葡萄糖苷 (Glucosinolate, 简称硫苷) 是主要存在于十字花科植物中的一大类次级代谢物^[1], 其水解产物被广泛证明在人体和植物中具有重要的生化功能和生物学活性^[2]。迄今为止, 人们在十字花科植物中已发现了近 200 种具有不同侧链结构的硫苷, 根据合成前体氨基酸的结构, 硫苷可以被分为三大类: 脂肪族硫苷、吲哚族硫苷以及芳香族硫苷^[3]。大部分硫苷水解产物对植物微生物以及昆虫具有毒害作用, 因此硫苷在植物抗病抗虫方面发挥了重要的作用^[4-5]。而某些特殊硫苷的水解产物赋予了植物的叶片、根部和种子一定的抗性。例如, 主要存在于根部有较高含量的 2- 苯乙基硫苷具有很高的抗植物病原线虫的作用^[6-7]。另外, 吲哚族硫苷对于油菜重要病害菌核病具有重要的抵抗作用^[8]。然而, 还有一部分硫苷, 例如 2- 羟基-3- 丁烯基硫苷 (致甲状腺肿素), 在很早就被证明对动物和人体具有毒害作用^[9]。因此, 在 20 世纪 60-70 年代的双低育种进程中, 油菜育种家们培育出了低硫苷的油菜品种以降低 2- 羟基-3- 丁烯基硫苷的含量, 并进行了大规模的推广。在这一过程中, 油菜籽粒的硫苷含量从 $>100 \mu\text{mol/g}$ 大幅降低到了 $<20 \mu\text{mol/g}$ ^[10]。

芸薹属隶属于十字花科, 该属包含了许多重要的农业及园艺作物, 人们在芸薹属作物中共发现了约 30 种硫苷^[5, 11]。芸薹属作物包括 3 个二倍体基本种, 白菜型油菜 (AA, $2n=20$)、黑芥 (BB, $2n=16$)

以及甘蓝 (CC, $2n=18$), 还包括 3 个异源四倍体复合种, 芥菜型油菜 (AABB, $2n=36$)、甘蓝型油菜 (AACC, $2n=38$)、埃塞俄比亚芥 (BBCC, $2n=34$), 它们都起源于 3 个基本种的种间杂交^[12]。这些物种大多具有丰富的遗传资源, 例如白菜型油菜、甘蓝、芥菜型油菜等^[13-15]。在以上 6 个物种中, 白菜型油菜、甘蓝型油菜、芥菜型油菜以及埃塞俄比亚芥早已被人类驯化并且作为重要的油料作物进行种植, 统称为油菜。20 世纪油菜的双低育种大大激发了油菜的利用潜能, 但随着油菜籽粒硫苷含量的减少, 叶片等其他组织器官中的硫苷含量也会相应地减少, 进而导致油菜抗病性的减弱^[16]。因此, 减少油菜籽粒中的有害硫苷成分, 提高根、茎、叶等营养器官中具有抗性功能的硫苷含量, 将对提高油菜植株抗性以及籽粒及其副产品品质具有重要的意义。基于此, 我们拟研究不同的芸薹属作物中的硫苷在不同器官中的分布规律, 从而为寻求改良甘蓝型油菜中有益的硫苷成分提供信息。对这 4 种作物, 人们通过不同的检查手段在不同的环境下先后分别发现了 15 种硫苷, 其中: 甘蓝型油菜有 11 种, 白菜型油菜有 14 种, 埃塞俄比亚芥有 8 种, 芥菜型油菜有 7 种^[11, 17-18]。然而却鲜有研究比较分析在同一环境下 4 个物种的物种特异性以及器官特异性的硫苷分布规律。芸薹属作物同一基因组因为物种的分化产生了不同的亚基因组, 而亚基因组水平的显著差异将会导致表型的显著变化^[19-20]。为了进一步比较 4

个物种中硫苷的构成是否有分化,在每个物种硫苷含量和种类的测定基础上,检测并比较了3个环境下根、茎、叶的硫苷构成,分析了这些硫苷成分的物种特异性与器官特异性。

我们曾通过种间杂交的方式,将甘蓝型油菜与合成自埃塞俄比亚芥和白菜型油菜的六倍体油菜融合形成了新型甘蓝型油菜种质资源库^[21],这些新型甘蓝型油菜含有丰富的外源导入片段。为了进一步探讨特定的硫苷成分是否能通过种间交流的方式从其他油菜物种中向甘蓝型油菜中转移并创造出拥有优异硫苷组成的新型甘蓝型油菜,对新型甘蓝型油菜的一个群体3个世代材料的2个器官(叶、种子)的硫苷成分进行了检测,以探究是否存在来自白菜型油菜和埃塞俄比亚芥的特殊硫苷成分的导入。通过以上研究,我们将对芸薹属作物不同时空下硫苷成分的变异与变化有更为深刻的理解,同时也为基于种间交流的外源导入特殊硫苷成分并改造甘蓝型油菜硫苷组成提供新的视角。

1 材料与方法

1.1 植物材料

本研究的第1部分使用了来自4个芸薹属物种的67个品种材料,其中甘蓝型油菜15种,白菜型油菜16种,芥菜型油菜17种,埃塞俄比亚芥19种,分别收集自亚洲、欧洲、非洲与北美洲(详见<http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20191024003>,附表1)。这些材料分别在2014年种植于湖北武汉,2016年种植于湖北武汉、湖北襄阳,每个株系3行区种植,小区面积1.8 m²,行间距30 cm,株间距17 cm,每小区种植36个单株。本课题组通过种间杂交和分子标记辅助选择,构建了包含122份白菜型油菜A^r亚基因组成分和75份埃塞俄比亚芥C^e亚基因组成分导入的新型甘蓝型油菜(A^rA^rC^eC^e),通过引入显性核不育性状构建了新型甘蓝型油菜轮回选择群体,并对该群体进行了5轮轮回选择。本研究的第2部分从新型甘蓝型油菜轮回选择群体第1、3、5轮轮回选择群体中各随机挑选了80个株系,分别记为RS1、RS3和RS5,这些株系都含有丰富的埃塞俄比亚芥与白菜型油菜导入片段^[21]。将总计240个株系于2014年种植于湖北武汉,每个株系3行区种植,小区面积1.8 m²,行间距30 cm,株间距17 cm,每小区种植36个单株。

1.2 样品准备

在10叶期对本研究全部材料进行样本采集,每

个材料选取6个单株并采集待测的植物器官样本。将从上至下第3片新叶与清洗过的根部组织放置于-80℃冰箱中。待植株成熟,将收获后的籽粒彻底晒干保证充分成熟。脱硫硫苷的提取按照官方流程ISO 9167-1(ISO 9167, 1992)来进行。叶片和根放入20 mL 90%的甲醇溶液中捣碎并充分混匀,然后将样品放入水浴锅中90℃下恒温水浴10 min便可以分离出脱硫硫苷。种子在捣碎并充分混匀后,将其放入沸腾的90%甲醇溶液中10 min便可分离出脱硫硫苷。

将2-丙烯基硫苷溶液(1.25 mmol/L, 0.2 mL)加入到甘蓝型油菜和白菜型油菜样品中。在离心之后,将分离出的上清液通过DEAE-Sepadex A-25毛细管^[22]。使用5种含量梯度的2-丙烯基硫苷溶液(0.1 mg/mL)来构建标准曲线,从而检测埃塞俄比亚芥和芥菜型油菜中的硫苷含量,并分别适用DEAE阴离子交换柱对其进行脱硫化处理。在交换柱经过90%的甲醇溶液2次冲洗以及超纯水的2次冲洗后,加入硫酸酯酶用于酶解,并将溶液在室温下放置16 h。脱硫反应进行完毕之后,使用1 mL的去离子水对脱硫硫苷进行洗脱。将洗出液通过0.45 μm的聚四氟乙烯过滤器进行过滤,然后立即进行检测或将其贮存于-20℃冰箱中^[23]。

1.3 利用高效液相色谱对脱硫硫苷进行分析

所有脱硫硫苷的成分与含量都由高效液相色谱(安捷伦科技有限公司, CA, 美国)的TC-C18色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm; 安捷伦科技有限公司, CA, 美国)检测得到。柱温设定至30℃,流速设定至0.8 mL/min,波长设定至229 nm,分析时间设定为38 min。溶剂系统的设定如下:A: 20%(v/v)的乙腈;B: 去离子水。梯度洗脱参数为100%的B洗脱1 min,按照24 min的线性梯度降至100%A,然后在7 min内返回至0%A,最后以100%的B形式保持运行6 min。脱硫硫苷的含量参照2-丙烯基硫苷的标准含量计算。

1.4 数据分析

用于67个品种材料硫苷多样性分析的数据包括年份、地点、器官、物种、品种和硫苷分量等6个不同的因素。其中,年份包括2014年和2016年2个水平;地点包括武汉和襄阳2个水平;器官包括种子、叶片和根3个水平;物种包括甘蓝型油菜(*B. napus* L.)、埃塞俄比亚芥(*B. carinata* A. Braun)、芥菜型油菜(*B. juncea* (L.) Czern.)、白菜型油菜(*B. rapa* L.)等4个水平;品种包括宁油7号等共67个

水平;而硫苷包括 2-羟基-3-丁烯基硫苷等 11 个水平。不同因素所处各个水平下的硫苷含量,经 3 次生物学重复测量,得到 3 个重复数据。利用软件 SPSS 25.0 对所有试验数据进行分析。经异常值检测,所有不同水平下的 3 个重复数据之间不存在异常值。故而,本研究对 3 个生物学重复数据的均值进行分析。为了比较各个因素所得硫苷含量的差异大小,采取只分析单一因素,而固定其他多个因素的策略进行样本配对,以最大限度地消除其他混杂因素对要比较因素不同水平之间的差异性的影响。因为年份(2014 年和 2016 年)和地点(武汉和襄阳)仅有 2 个类别,故而采取配对样本 t 检验进行分析。其余因素所处水平数日均大于或者等于 3 个,故而采取多样本的非参数弗里德曼检验进行分析。此外,为了剔除缺失值的影响,在考察品种以及硫苷之间的差异时,从中选取了部分缺失比例较小的代表类型进行分析。

2 结果与分析

2.1 芸薹属 4 大物种 3 个器官的硫苷概况

在 3 种环境下 4 种作物的叶、根、种子中共检测到了 11 种硫苷(表 1 及 <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20191024003> 附表 2、附表 3),其中甘蓝型油菜中有 10 种,芥菜型油菜中有 8 种,埃塞俄比亚芥中有 8 种,白菜型油菜中有 9 种。有 5 种硫苷同时存在于 4 个物种中:脂肪族的 3-丁烯基硫苷、芳香族的 2-苯乙基硫苷、吡啶族的 3-吡啶甲基硫苷、4-羟基-3-吡啶甲基硫苷以及 4-甲氧基-3-吡啶甲基硫苷。1-甲氧基-3-吡啶甲基硫苷属于吡啶族 4 种硫苷之一,在本次检测的材料中含量最低,并且只在 2014 年武汉环境下甘蓝型油菜的种子中检测到微量,这也说明在 4 个物种中甘蓝型油菜有着最丰富的硫苷种类。在白菜型油菜和甘蓝型油菜中没有检测到 2-丙烯基硫苷,但它是芥菜型油菜和埃塞俄比亚芥中独有且含量最丰富的硫苷,在这 2 个含有 B 基因组的物种中,没有检测到 2-羟基-4-戊烯基硫苷。另外,只有埃塞俄比亚芥中没有检测到 4-戊烯基硫苷和苯甲基硫苷。

在 3 个受检测的器官中,代表贮藏器官的种子有着最高的硫苷含量,而叶片硫苷含量则最低。对于甘蓝型油菜中的高硫(种子硫苷含量 $>100 \mu\text{mol/g}$)与中硫(种子硫苷含量介于 $45\sim 100 \mu\text{mol/g}$)品种,种子硫苷的主要成分为 2-羟基-3-丁烯基硫苷与 3-丁烯基硫苷,而在低硫品种中(种子硫苷含量 $<45 \mu\text{mol/g}$),种子硫苷的主要成分为 2-羟基-3-丁

烯基硫苷。各个物种代表性硫苷的含量在不同环境下也表现出了较大的差异。作为代表性硫苷,2-丙烯基硫苷在芥菜型油菜和埃塞俄比亚芥中含量较高,这一规律在种子与叶片中尤为明显,但在 2016 年襄阳环境芥菜型油菜的叶片中,3-丁烯基硫苷的含量超过了 2-丙烯基硫苷;3-丁烯基硫苷在白菜型油菜和芥菜型油菜中含量较高,但在 2016 年武汉与襄阳环境白菜型油菜的根部,该硫苷含量低于 4-戊烯基硫苷;2-苯乙基硫苷在 4 种油菜的根部含量普遍很高;苯甲基硫苷只在 2014 年武汉环境下的根部被检测到(表 1,图 1)。

2.2 芸薹属 4 个物种硫苷的多样性

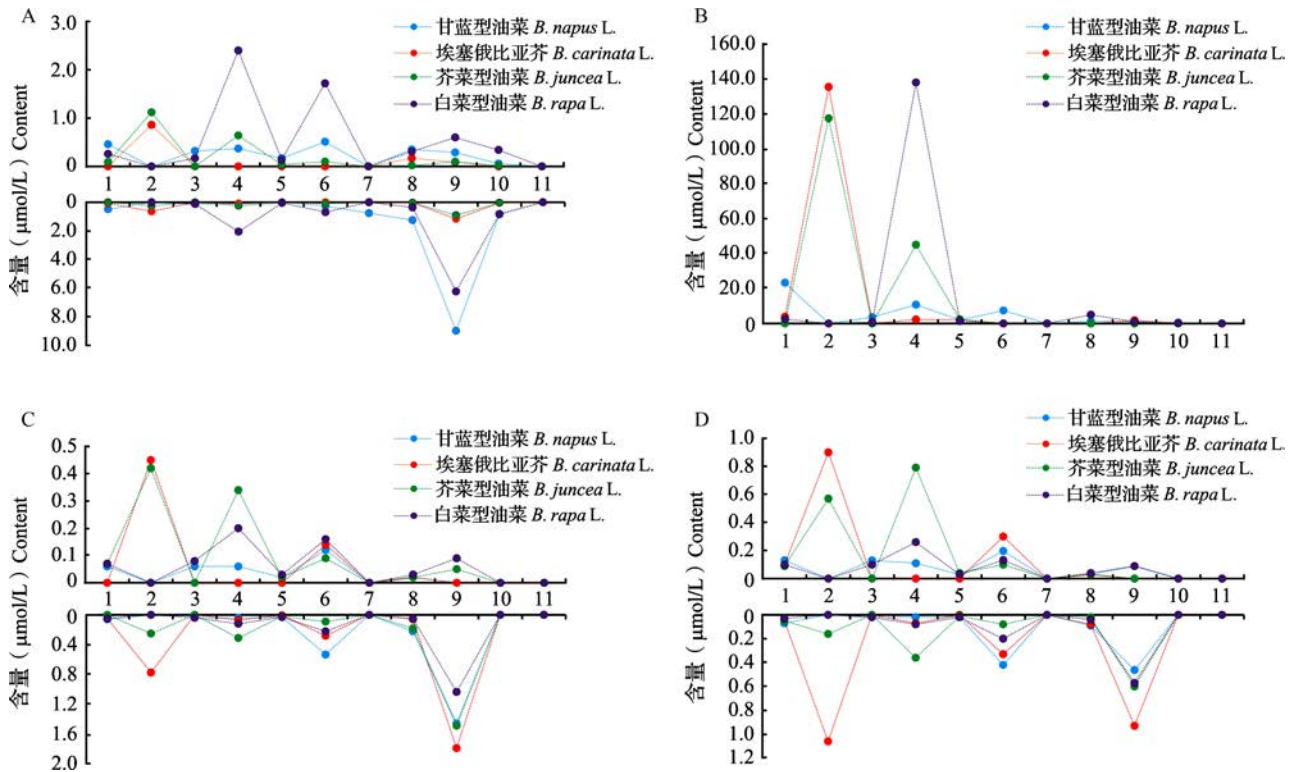
对于本研究所涉及的 4 个芸薹属物种,无论是总硫苷、代表性硫苷(此处指某物种某一个器官的主要硫苷成分),还是其他硫苷都表现出了丰富的多样性(表 2 及 <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20191024003> 附表 4)。2-羟基-3-丁烯基硫苷为甘蓝型油菜的代表型硫苷,2014 年武汉环境下其种子和叶片的总硫苷与该硫苷都有着最丰富的多样性,但在 2016 年襄阳环境下叶片的总硫苷与该硫苷表现出了最低的多样性,2016 年武汉环境下的根部总硫苷与代表性硫苷 2-苯乙基硫苷表现出了最高的多样性。在 2014 年武汉环境下埃塞俄比亚芥的种子中,无论是总硫苷还是代表性硫苷 2-丙烯基硫苷都有着最低的多样性,而在 2016 年武汉环境下的叶片中,总硫苷和与 2-丙烯基硫苷却有着最高的多样性。芥菜型油菜在 2014 年武汉环境下的总硫苷与代表性硫苷 2-丙烯基硫苷都表现出了较低的多样性,在 2014 年武汉环境下的种子和 2016 年武汉环境下的根部中,其总硫苷表现出了最低的多样性,在 2016 年武汉与襄阳 2 个环境下其根部 2-苯乙基硫苷都表现出了最低的多样性。对于白菜型油菜,2014 年武汉环境与 2016 年武汉环境下叶片的总硫苷都展现出了最丰富的多样性,并且 3 个环境下叶片的代表性硫苷 3-丁烯基硫苷的多样性都很高,但根部代表性硫苷 2-苯乙基硫苷的多样性明显较低。总体来看,与种子相比,2014 年武汉环境 4 个物种的叶片在硫苷总量和代表性硫苷上都有着最高的多样性。

显著性检验结果从更多维度详细地展现了硫苷复杂又丰富的多样性(表 3)。配对样本 t 检验对环境因素的分析结果显示,2014 年、2016 年 2 个年份之间硫苷的含量分布呈现极显著的差异,但武汉与襄阳 2 个地点没有显著的差异,这一结果与表 3 中变异系数的总体分布情况相吻合。当年份、地点、物

表 1 2014 年不同物种与器官的硫苷分量
Table 1 GSL content in different species and organs in Wuhan, 2014

硫苷种类 Glucosinolate categories	系统名 Semisystemic name	种子 Seeds			叶片 Leaves			根 Roots				
		甘蓝型油菜 <i>B. napus</i> L.	埃塞俄比亚芥 <i>B. carinata</i> A. Braun	芥菜型油菜 <i>B. juncea</i> (L.) Czern.	甘蓝型油菜 <i>B. napus</i> L.	埃塞俄比亚芥 <i>B. carinata</i> A. Braun	芥菜型油菜 <i>B. juncea</i> (L.) Czern.	甘蓝型油菜 <i>B. napus</i> L.	埃塞俄比亚芥 <i>B. carinata</i> A. Braun	芥菜型油菜 <i>B. juncea</i> (L.) Czern.		
脂肪族硫苷	2- 羟基-3- 丁烯基硫苷	23.34 ± 16.86	3.84 ± 1.83	-	2.41 ± 5.02	-	0.09 ± 0.03	0.26 ± 0.11	0.49 ± 0.37	0.08 ± 0.03	-	0.22 ± 0.20
Aliphatic glucosinolates	Progoitrin	-	135.32 ± 30.23	117.42 ± 61.02	-	0.86 ± 0.63	1.12 ± 0.92	-	-	0.64 ± 0.35	0.25 ± 0.17	-
	2- 丙烯基硫苷	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Sinigrin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2- 羟基-4- 戊烯基硫苷	3.55 ± 1.57	-	-	0.74 ± 0.68	-	-	0.17 ± 0.13	0.13 ± 0.06	-	-	0.12 ± 0.05
	Gluconapoleiferin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3- 丁烯基硫苷	10.72 ± 10.38	2.26 ± 1.12	45.01 ± 36.82	137.88 ± 73.44	-	0.64 ± 0.50	2.40 ± 1.69	0.10 ± 0.06	0.09 ± 0.03	0.24 ± 0.18	2.06 ± 3.45
	Gluconapin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4- 戊烯基硫苷	7.37 ± 2.55	-	-	-	-	0.10 ± 0.02	1.72 ± 1.11	0.26 ± 0.14	-	0.10 ± 0.04	0.69 ± 0.54
	Glucobrassicinapin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
吡啶族硫苷	4- 羟基-3- 吡啶甲基硫苷	1.98 ± 0.99	2.23 ± 1.08	2.34 ± 0.94	1.32 ± 0.46	-	0.04 ± 0.01	0.14 ± 0.11	0.04 ± 0.03	0.03 ± 0.01	0.08 ± 0.06	0.05 ± 0.04
Indole glucosinolates	4-Hydroxyglucobrassicin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3- 吡啶甲基硫苷	1.35 ± 1.35	-	-	4.99 ± 5.31	0.17 ± 0.08	0.02	0.31 ± 0.22	1.25 ± 0.88	0.04 ± 0.02	0.03 ± 0.01	0.36 ± 0.24
	Glucobrassicin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4- 甲氧基-3- 吡啶甲基硫苷	0.16 ± 0.13	-	-	0.49 ± 0.27	-	0.02	0.34 ± 0.27	0.85 ± 0.50	0.05 ± 0.02	0.03 ± 0.01	0.82 ± 0.57
	4-Methoxyglucobrassicin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1- 甲氧基-3- 吡啶甲基硫苷	0.04 ± 0.03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Neoglucobrassicin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
芳香族硫苷	苯甲基硫苷	-	-	-	-	-	-	-	0.76 ± 0.53	-	0.03 ± 0.05	0.40 ± 0.68
Aromatic glucosinoaltes	Glucotropaeolin	1.05 ± 0.70	1.80 ± 0.83	-	0.98 ± 0.59	0.09 ± 0.03	0.10 ± 0.03	0.60 ± 0.35	8.98 ± 4.86	1.16 ± 0.71	0.91 ± 0.40	6.23 ± 2.51
	2- 苯乙基硫苷	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Gluconasturtiin	49.56 ± 7.59	145.44 ± 59.39	164.77 ± 54.43	148.81 ± 51.45	1.12 ± 0.42	2.13 ± 0.40	5.94 ± 0.84	12.86 ± 6.16	2.09 ± 1.01	1.67 ± 0.60	10.95 ± 6.55
	Total glucosinolates content	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

“-” 代表在某一物种中未检测到该硫苷成分
“-” represents a certain glucosinolate which was not detected in a certain species



A: 2014 年武汉环境 4 个物种叶片与根部硫苷含量; B: 2014 年武汉环境 4 个物种种子硫苷含量; C: 2016 年武汉环境 4 个物种叶片与根部硫苷含量; D: 2016 年襄阳环境 4 个物种叶片与根部硫苷含量。其中, A、C、D 中的坐标系分上下两个部分, 上半部分代表叶片, 下半部分代表根部。图中 1~11 为 11 种硫苷分量, 分别为: 2- 羟基 -3- 丁烯基硫苷、2- 丙烯基硫苷、2- 羟基 -4- 戊烯基硫苷、3- 丁烯基硫苷、4- 羟基 -3- 吡啶甲基硫苷、4- 戊烯基硫苷、苯甲基硫苷、3- 吡啶甲基硫苷、2- 苯乙基硫苷、4- 甲氧基 -3- 吡啶甲基硫苷、1- 甲氧基 -3- 吡啶甲基硫苷

A: GSL content of leaves and roots among four *Brassica* L. species in Wuhan, 2014, B: GSL content of seeds among four *Brassica* L. species in Wuhan, 2014, C: GSL content of leaves and roots among four *Brassica* L. species in Wuhan, 2016, D: GSL content of leaves and roots among four *Brassica* L. species in Xiangyang, 2016. There are two parts of each coordinates in A, C and D. The upper part represents leaves and another part represents roots. The numbers 1~11 in the figure represents 11 glucosinolates separately: Progoitrin, Sinigrin, Gluconapoleiferin, Gluconapin, 4-Hydroxyglucobrassicin, Glucobrassicinapin, Glucotropaeolin, Glucobrassicin, Gluconasturtiin, 4-Methoxyglucobrassicin, Neoglucobrassicin

图 1 不同环境下不同物种、器官的硫苷含量

Fig.1 GSL content of different *Brassica* L. species and organs in different environments

种、品种、硫苷类型相同时, 种子的硫苷含量明显高于叶片与根的含量, 且叶片的硫苷含量最低, 3 个器官之间的硫苷水平存在极显著的差异; 对于不同的品种, 我们对重复缺失较少的甘蓝型油菜、埃塞俄比亚芥品种间的硫苷水平进行了检验发现品种间差异极显著, 但白菜型油菜与芥菜型油菜品种间的硫苷水平差异不显著; 对重复缺失较少的 6 种硫苷分量 (2- 羟基 -3- 丁烯基硫苷、3- 丁烯基硫苷、4- 戊烯基硫苷、2- 苯乙基硫苷、3- 吡啶甲基硫苷、4- 羟基 -3- 吡啶甲基硫苷) 数据进行了显著性检验, 结果显示这 6 种硫苷的含量差异极显著, 其中 4- 戊烯基硫苷含量最高, 4- 羟基 -3- 吡啶甲基硫苷的含量最低。

2.3 物种特异性硫苷向甘蓝型油菜中的种间导入

根据以上结果, 芥菜型油菜与埃塞俄比亚芥中

含有具抗癌功能的 2- 丙烯基硫苷, 而甘蓝型油菜和白菜型油菜均没有该成分。利用种间杂交合成了含有埃塞俄比亚芥和白菜型油菜基因组成分的新型甘蓝型油菜, 对新型甘蓝型油菜轮回选择群体 183 个株系进行了硫苷测定。总共有 170 个株系检测到了 2- 丙烯基硫苷, 其中有 143 个株系的叶片、58 个株系的种子中检测到了 2- 丙烯基硫苷, 叶片的含量范围为 0.01~0.13 $\mu\text{mol/g}$ (图 2A, 及 <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20191024003> 附表 5), 种子中的含量范围为 0.19~9.42 $\mu\text{mol/g}$ (图 2B, 及 <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20191024003> 附表 6)。作为一种代表性硫苷, 在本研究的品种材料中, 2014 年武汉环境下 3- 丁烯基硫苷占白菜型油菜种子总硫苷含量占比为 74%~96%, 在低硫甘蓝型油菜种子中含量占比为 7%~20%, 在中硫甘蓝型油菜种子中

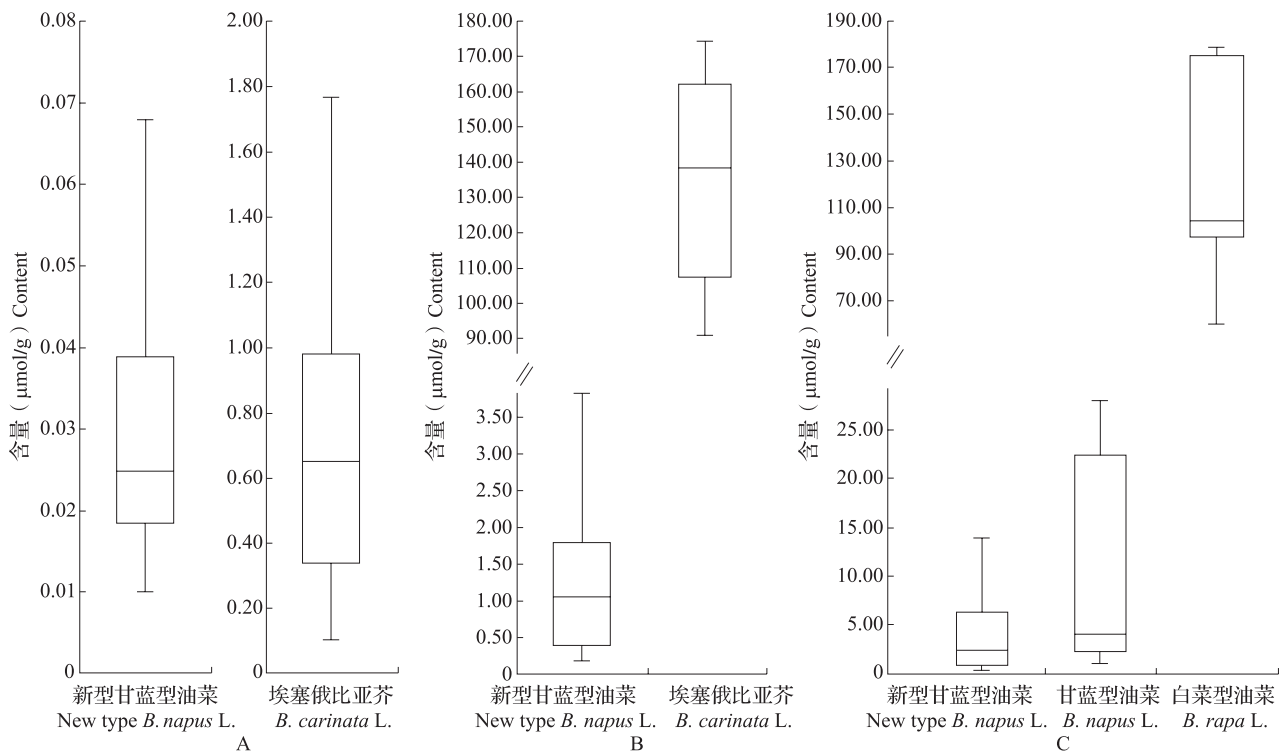
表 2 2014 年不同物种与器官硫苷含量的分布情况
Table 2 The GSL content profile of different species and organs in 2014

物种 Species	种子 Seeds				叶片 Leaves				根 Roots			
	总硫苷含量 范围 ($\mu\text{mol/g}$) Total GSL range	总硫苷变异 系数 (%) CV of total GSL	代表性硫苷 含量范围 ($\mu\text{mol/g}$) Representative range	代表性硫苷 变异系数 (%) CV of representative GSL	总硫苷含量 范围 ($\mu\text{mol/g}$) Total GSL range	总硫苷变异 系数 (%) CV of total GSL	代表性硫苷 含量范围 ($\mu\text{mol/g}$) Representative range	代表性硫苷 变异系数 (%) CV of representative GSL	总硫苷含量 范围 ($\mu\text{mol/g}$) Total GSL range	总硫苷变异 系数 (%) CV of total GSL	2-苯乙基硫苷 变化范围 ($\mu\text{mol/g}$) Gluconasturtiin range	2-苯乙基硫苷 变异系数 (%) CV of gluconasturtiin
甘蓝型油菜 <i>B. napus</i> L.	13.58~104.09	66	5.48~61.63	73	0.62~6.64	80	0.05~1.98	115	3.56~21.99	48	2.41~18.00	54
埃塞俄比亚芥 <i>B. carinata</i> A. Braun	148.62~185.58	7	138.04~174.24	8	0.60~3.26	60	0.39~2.72	65	0.91~3.70	48	0.23~2.74	61
芥菜型油菜 <i>B. juncea</i> (L.) Czern.	124.58~224.52	23	53.26~217.38	54	1.13~3.06	33	0.24~2.53	74	0.76~2.55	38	0.41~1.46	44
白菜型油菜 <i>B. rapa</i> L.	81.10~278.12	46	60.21~257.64	49	2.07~18.42	63	0.72~13.06	111	4.77~28.23	60	3.04~12.47	40

表 3 不同因素影响下的芸薹属 4 个物种硫苷含量差异显著性检验
Table 3 Significant difference test of GSL content among four *Brassica* species under different factors

因素 Factors	品种 Cultivars				器官 Organs
	年份 Years	地点 Locations	甘蓝型油菜 (第 1 组) <i>B. napus</i> L. (Group 1)	甘蓝型油菜 (第 2 组) <i>B. napus</i> L. (Group 2)	
T 值或卡方	6.685	1.834	27.050	26.742	芥菜型油菜 <i>B. juncea</i> (L.) Czern.
T value or chi-square			13.789	45.140	埃塞俄比亚芥 <i>B. carinata</i> A. Braun
自由度	426	472	7	5	白菜型油菜 <i>B. rapa</i> L.
Degree of freedom					硫苷 Glucosinolates
均值差	0.677	0.034	—	—	
Mean difference			0**	0**	
显著性概率	0**	0.067	0**	0.055	
Significant probability			0.250	0**	

* 代表显著性概率在 0.01~0.05 之间; ** 代表显著性概率不超过 0.01
* represents the significant probability is between 0.01-0.05, ** represents the significant probability is no more than 0.01



A: 新型甘蓝型油菜与埃塞俄比亚芥叶片的 2- 丙烯基硫苷含量; B: 新型甘蓝型油菜与埃塞俄比亚芥种子的 2- 丙烯基硫苷含量; C: 新型甘蓝型油菜、甘蓝型油菜、白菜型油菜种子的 3- 丁烯基硫苷含量。其中, B、C 纵坐标轴的“//”符号将纵轴分割为单位长度不同的两个部分, 以确保数据在大跨度范围内可以被直观展示

A: Content distribution of sinigrin in leaves of new type *B. napus* L. and *B. carinata* A. Braun accessions, B: Content distribution of sinigrin in seeds of new type *B. napus* L. and *B. carinata* A. Braun accessions, C: Content distribution of gluconapin in seeds of new type *B. napus* L., *B. napus* L. and *B. rapa* L. accessions. In B and C, we used a symbol “//” to divide the vertical axis into two parts which have the different length unit so all data can be visually displayed within a large range

图 2 特殊硫苷在新型甘蓝型油菜及其亲本物种材料中的含量分布

Fig.2 The content profile of special GSL in new type *B. napus* L. and its parental species accessions

含量占比为 25%~38%, 在高硫甘蓝型油菜种子中含量占比为 28%。在新型甘蓝型油菜中同样检测到了这种硫苷, 但其含量范围比甘蓝型油菜品种材料更广, 其中有 3 个株系的种子中 3- 丁烯基硫苷的含量范围高达 41.51~43.98 $\mu\text{mol/g}$, 远远高于甘蓝型油菜品种材料 3- 丁烯基硫苷的最高值(图 2C, 及 <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20191024003> 附表 6)。

3 讨论

硫代葡萄糖苷是芸薹属作物中十分重要的一类次级代谢物, 在植物整个生长发育过程中, 它始终发挥着抗病、抗虫的生物学作用, 帮助植物建立应对胁迫的防御体系。这些生物学功能不断吸引着植物遗传育种学家的目光^[3]。为了深入探究和了解芸薹属 4 种主要的作物(甘蓝型油菜、埃塞俄比亚芥、芥菜型油菜、白菜型油菜)中的硫苷构成, 以及由于亚基因组的分化所导致的硫苷差异, 我们通过 HPLC

技术对 3 个环境下 4 个物种的叶片、根和种子 3 个器官的硫苷进行了检测与结果比较。根据结果, 共检测到了 11 种主要的硫苷, 其中只有 5 种硫苷(1 种脂肪族硫苷, 1 种芳香族硫苷, 3 种吡啶硫苷)在这 4 种作物中都被检测到, 而在甘蓝型油菜和白菜型油菜中我们检测到了大部分的硫苷种类。埃塞俄比亚芥和芥菜型油菜中含量最为丰富的 2-丙烯基硫苷, 在 2 个含有 A 基因组的作物(白菜型油菜、甘蓝型油菜)中没有被检测到。

不同器官中的硫苷构成呈现出了非常显著的差异, 而这些差异恰恰可能反映了不同硫苷组分在这些器官中行使着不同的生物学功能(表 4)。在本研究中, 我们发现所有作物的根部硫苷中, 2-苯乙基硫苷都有最高的含量占比, 这种硫苷被广泛地认为是一种具有辛辣气味、抗病原菌、抗植物病原线虫的物质^[7]。而在本研究未涉及的芸薹属其余 2 个物种甘蓝与黑芥的根部, 这种硫苷的含量也非常丰富^[12, 26]。

表 4 各种硫苷成分的基因组特异性与生物学功能及利用价值

Table 4 Genome specificity, biological function and utilization value of all kinds of GSL

硫苷种类 Glucosinolate categories	被检测含有该成分的物种 Species (detected in)	基因组特异性 Genome specificity	生物学功能 Biological function	参考文献 References
3- 丁烯基硫苷 Gluconapin	甘蓝型油菜, 芥菜型油菜, 埃塞俄比亚芥, 白菜型油菜, 甘蓝, 黑芥	A, B, C	具有辛辣气味	[24-26]
2- 羟基 -3- 丁烯基硫苷 Progoitrin	甘蓝型油菜, 芥菜型油菜, 埃塞俄比亚芥, 白菜型油菜, 甘蓝	A, B, C	对动物有毒害作用, 会导致人甲状腺肿	[9, 24, 27-28]
2- 丙烯基硫苷 Sinigrin	埃塞俄比亚芥, 芥菜型油菜, 黑芥, 甘蓝	B, C	具有抗癌作用, 可被开发成为新型抗菌剂	[5, 24, 29-30]
4- 戊烯基硫苷 Gluco Brassicanapin	甘蓝型油菜, 芥菜型油菜, 白菜型油菜,	A	具有辛辣气味	[25]
2- 羟基 -4- 戊烯基硫苷 Gluconapoleiferin	甘蓝型油菜, 芥菜型油菜, 白菜型油菜	A	具有抗线虫作用	[5-6, 31]
3- 吲哚甲基硫苷 Gluco Brassicicn	甘蓝型油菜, 芥菜型油菜, 埃塞俄比亚芥, 白菜型油菜, 黑芥, 甘蓝	A, B, C	具有抗肿瘤作用, 特别对乳腺癌治疗有帮助	[24, 26, 32]
4- 羟基 -3- 吲哚甲基硫苷 4-Hydroxygluco Brassicicn	甘蓝型油菜, 芥菜型油菜, 埃塞俄比亚芥, 白菜型油菜, 黑芥, 甘蓝	A, B, C	—	[24, 26]
4- 甲氧基 -3- 吲哚甲基硫苷 4-Methoxygluco Brassicicn	甘蓝型油菜, 芥菜型油菜, 埃塞俄比亚芥, 白菜型油菜, 黑芥, 甘蓝	A, B, C	抗氧化作用; 强烈的抗昆虫作用; 抗微生物作用	[24, 26, 33-34]
1- 甲氧基 -3- 吲哚甲基硫苷 Neoglucobrassicin	甘蓝型油菜, 芥菜型油菜, 埃塞俄比亚芥, 白菜型油菜, 甘蓝	A, B, C	抗肿瘤、抗癌作用	[24, 26, 35]
苯甲基硫苷 Glucotropaeolin	甘蓝, 甘蓝型油菜, 白菜型油菜	A, C	可以用于昆虫叮咬、胆囊疾病以及慢性病治疗, 并且具有抗癌作用	[36-37]
2- 苯乙基硫苷 Gluconasturtiin	甘蓝型油菜, 芥菜型油菜, 埃塞俄比亚芥, 白菜型油菜, 黑芥, 甘蓝	A, B, C	具有辛辣气味; 明显的抗微生物、抗线虫作用	[7, 24-26, 38]

为了探究这 4 个物种的硫苷多样性, 首先从变异系数方面分析与比较了 67 种品种材料的硫苷数据。对于 4 个物种的不同器官, 我们都检测到了较大的硫苷变异范围, 而纵观每一个物种的同一器官, 硫苷含量也有跨度很大的变异差异。在 2014 年武汉环境下埃塞俄比亚芥的种子中, 总硫苷变异系数为 7%, 而在同一环境下甘蓝型油菜的叶片中, 2- 羟基 -3- 丁烯基硫苷的变异系数高达 115% (表 2)。总硫苷和代表性硫苷 (2- 羟基 -3- 丁烯基硫苷) 最显著的变异出现在甘蓝型油菜的种子和叶片中。这种现象很有可能是在 20 世纪 90 年代中期“双低油菜”大规模的推广造成的, 在这个过程中, 旧的高硫苷油菜逐渐被新育成的低硫苷油菜取代, 油菜籽粒的品质也因此发生了很大的改观^[10]。在本研究所选用的甘蓝型油菜材料中, 涵盖了高硫、中硫、低硫 3 种硫苷含量水平, 从高硫到低硫水平变化并没有

导致硫苷种类的变化, 但 2- 羟基 -3- 丁烯基硫苷的含量却随之大幅下降, 这一变化趋势与双低育种过程相吻合。

显著性检验的结果很好地解释了影响硫苷含量变化的具体因素。环境的差异对硫苷含量的影响尤为明显, 本研究中 2014 年、2016 年之间的差异导致了硫苷水平的全局性改变, 这一结果从 2 个年份间硫苷含量的变异系数分布中也能得到很好的印证。对于同一物种不同品种硫苷水平的差异, 甘蓝型油菜与埃塞俄比亚芥更为显著, 这可能与两者在进化过程中所受到的选择压力有关, 但此结果也受到我们所选择的品种材料多样性的影响, 例如芥菜型油菜中存在一些人工选育的低硫品种, 但我们并没有将这类材料收集到试验材料中。不同器官间的显著差异不仅说明硫苷在空间分布上的特异性, 更说明在长期的进化选择过程中, 植物体演变出了一套

“因时因地制宜”的硫苷动态分布策略以应对多变的环境,这集中体现在植株地上部分与地下部分硫苷水平的差别,以及营养生长与生殖生长时期的差别。不同硫苷分量的显著差异反映了不同硫苷成分可能履行着不同的生物学功能,与空间特异性、器官特异性以及物种特异性对应起来,在适应性进化过程中承受着不同的选择压力,以保证植物应对复杂多变的外界环境。

2-丙烯基硫苷是芸薹属中带有 B 基因组作物的代表性硫苷,而在甘蓝的某些特定品种中也含有这种硫苷^[5]。它被认为具有较强的抗癌作用并且有可能被开发成为一种广谱抗菌剂(表 4)。在甘蓝型油菜中,人们检测不到这种硫苷的存在。在本研究中,我们对曾经构建的一个由埃塞俄比亚芥和白菜型油菜种间杂交而来的新型甘蓝型油菜群体^[21]进行了硫苷测定,发现该群体中很多株系的叶片和种子中含有 2-丙烯基硫苷。因此,这意味着控制合成该硫苷的某些特定基因经过种间杂交从埃塞俄比亚芥中转移到了新型甘蓝型油菜中。我们还没有证实这些基因是来源于埃塞俄比亚芥的 B 基因组的部分同源染色体交换还是来源于 C 基因组的染色体片段的交换或替换。在新型甘蓝型油菜的一些株系中的种子中,我们检测到了与普通甘蓝型油菜相比更高的 3-丁烯基硫苷含量以及更广的含量分布(附表 6)。总之,这些在芸薹属不同物种中控制合成不同种类特殊硫苷的位点和基因片段可以被开发成为特殊硫苷相关的分子标记用于材料选择。增加新型甘蓝型油菜中 2-丙烯基硫苷和 3-丁烯基硫苷的成分,将有可能提高植株的抗虫抗病能力,并且将为提升油菜的品质提供崭新的遗传资源。除了传统的杂交方式,我们还可以利用转基因、CRISPR 等现代生物技术手段对目标作物实施定向硫苷改造,更快速地实现目标硫苷成分向目标作物中的导入与聚集,更大程度地发挥特殊硫苷成分的有益功能,拓展芸薹属作物的开发与利用潜力。以上这些结果不仅仅意味着亲代物种特异性硫苷成功的跨物种转移,还说明通过检测分析和提高油菜新种质资源的质量来优化油菜中的硫苷种类以及含量具有巨大的开发潜力。

参考文献

- [1] Hansen B G, Rachel E K, James A O, Virginia M L, Thomas M O, Jonathan G, Barbara A H, Daniel J K. A novel 2-oxoacid-dependent dioxygenase involved in the formation of the goiterogenic 2-hydroxybut-3-enyl glucosinolate and generalist insect resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 2008, 148 (4): 2096-2108
- [2] Richard M. Glucosinolates-Biochemistry, genetics and biological activity. *Plant Growth Regulation*, 2001, 34(1): 91-103
- [3] Fahey J W, Zalcmann A T, Talalay P. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry*, 2001, 56(1): 5-51
- [4] Barbara A H, Jonathan G. Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annual Review of Plant Biology*, 2006, 57(1): 303-333
- [5] Ishida M, Hara M, Fukino N, Kakizaki T, Morimitsu Y. Glucosinolate metabolism, functionality and breeding for the improvement of *Brassicaceae* vegetables. *Breeding Science*, 2014, 64(1): 48-59
- [6] Kirkegaard J A, Rebetzke G J, Richards R A. Inheritance of root glucosinolate content in canola. *Australian Journal of Agricultural Research*, 2001, 52(7): 745-753
- [7] Potter M J, Vivien A V, Kerrie A D, Anthony J R. Breeding to increase the concentration of 2-phenylethyl glucosinolate in the roots of *Brassica napus*. *Journal of Chemical Ecology*, 2000, 26(8): 1811-1820
- [8] Rahmanpour S, David B, Heather M N. Reaction of glucosinolate-myrosinase defence system in *Brassica* plants to pathogenicity factor of *Sclerotinia sclerotiorum*. *European Journal of Plant Pathology*, 2010, 128(4): 429-433
- [9] Wooding S, Howard G, Purita R, Sophie T, Chao X, Wolfgang M. Genetics and bitter taste responses to goitrin, a plant toxin found in vegetables. *Chemical Senses*, 2010, 35(8): 685-692
- [10] Toroser D, Thormann C E, Osborn T C, Mithen R. RFLP mapping of quantitative trait loci controlling seed aliphatic-glucosinolate content in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 1995, 91(5): 802-808
- [11] Bellostas N, Jens C S, Hilmer S. Profiling glucosinolates in vegetative and reproductive tissues of four *Brassica* species of the U-triangle for their biofumigation potential. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2007, 87(8): 1586-1594
- [12] Nagaharu U. Genome-analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization. *Japanese Journal of Botany*, 1935, 7: 389-452
- [13] 杨华, 刘灶长, 陈海荣, 陈亮, 罗利军. 上海地区芸薹属蔬菜遗传多样性研究. *植物遗传资源学报*, 2006, 7(3): 264-269
Yang H, Liu Z C, Chen H R, Chen L, Luo L J. Genetic diversity analyses based on SSR markers of *Brassica* vegetable germplasm distributed in Shanghai. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2006, 7(3): 264-269
- [14] 唐章林, 李加纳. 羽衣甘蓝种子主要品质性状的表现及其相关性. *植物遗传资源学报*, 2012, 13(6): 963-967
Tang Z L, Li J N. Performance and correlation of main quality traits in kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) seed. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2012, 13(6): 963-967
- [15] 刘淑艳, 刘忠松, 官春云. 芥菜型油菜种质资源研究进展. *植物遗传资源学报*, 2007, 8(3): 351-358
Liu S Y, Liu Z S, Guan C Y. Advances in germplasm of oilseed *Brassica juncea*. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2007, 8(3): 351-358

- [16] Mithen R. Leaf glucosinolate profiles and their relationship to pest and disease resistance in oilseed rape. *Euphytica*, 1992, 63 (1-2): 71-83
- [17] Velasco P, Pilar S, Marta V, Maria E C, Mercedes D R. Comparison of glucosinolate profiles in leaf and seed tissues of different *Brassica napus* crops. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 2008, 133 (4): 551-558
- [18] Bo Y, Carlos F Q. Survey of glucosinolate variation in leaves of *Brassica rapa* crops. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2010, 57 (7): 1079-1089
- [19] Chalhoub B, Denoeud F, Liu S, Parkin I A, Tang H, Wang X, Chiquet J, Belcram H, Tong C, Samans B, Corréa M, Da Silva C, Just J, Falentin C, Koh C S, Le Clainche I, Bernard M, Bento P, Noel B, Labadie K, Alberti A, Charles M, Arnaud D, Guo H, Daviaud C, Alamey S, Jabbari K, Zhao M, Edger P P, Chelaifa H, Tack D, Lassalle G, Mestiri I, Schnell N, Le Paslier M C, Fan G, Renault V, Bayer P E, Golicz A A, Manoli S, Lee T H, Thi V H, Chalabi S, Hu Q, Fan C, Tollenaere R, Lu Y, Battail C, Shen J, Sidebottom C H, Wang X, Canaguier A, Chauveau A, Bérard A, Deniot G, Guan M, Liu Z, Sun F, Lim Y P, Lyons E, Town C D, Bancroft I, Wang X, Meng J, Ma J, Pires J C, King G J, Brunel D, Delourme R, Renard M, Aury J M, Adams K L, Batley J, Snowdon R J, Tost J, Edwards D, Zhou Y, Hua W, Sharpe A G, Paterson A H, Guan C, Wincker P. Early allopolyploid evolution in the post-neolithic *Brassica napus* oilseed genome. *Science*, 2014, 345 (6199): 950-953
- [20] Zou J, Hu D, Liu P, Raman H, Liu Z, Liu X, Parkin I A, Chalhoub B, Meng J. Co-linearity and divergence of the A subgenome of *Brassica juncea* compared with other *Brassica* species carrying different A subgenomes. *BMC Genomics*, 2016, 17: 18
- [21] Hu D, Zhang W, Zhang Y, Chang S, Chen L, Chen Y, Shi Y, Shen J, Meng J, Zou J. Reconstituting the genome of a young allopolyploid crop, *Brassica napus*, with its related species. *Plant Biotechnology Journal*, 2019, 17 (6): 1106-1118
- [22] Park M H, Mariadhas V A, No Y P, Yun J C, Sang W L, Naif A A D, Jung B K, Sun J K. Variation of glucoraphanin and glucobrassicin: Anticancer components in *Brassica* during processing. *Food Science and Technology*, 2013, 33 (4): 624-631
- [23] Hong E, Gun H K. Variation of glucosinolate composition during seedling and growth stages of *Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*. *Korean Journal of Horticultural Science and Technology*, 2014, 32 (5): 730-738
- [24] Sarvan I, Valerio F, Lonigro S L, de Candia S, Verkerk R, Dekker M, Lavermicocca P. Glucosinolate content of blanched cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) fermented by the probiotic strain *Lactobacillus paracasei* LMG-P22043. *Food Research International*, 2013, 54 (1): 706-710
- [25] Uda Y, Yoshida S, Goto M, Egashira H. Glucosinolate-derived volatiles in row vegetables, Fujisawakabu [*Brassica rapa*] and Yukina, and their pickled or salted products. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology*, 2007, 54 (12): 559-562
- [26] Bellostas N, Sørensen J C, Sørensen H. Profiling glucosinolates in vegetative and reproductive tissues of four *Brassica* species of the U - triangle for their biofumigation potential. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2007, 87 (8): 1586-1594
- [27] Liu Z, Hirani A H, McVetty P B E, Daayf F, Quiros C F, Li G. Reducing progoitrin and enriching glucoraphanin in *Brassica napus* seeds through silencing of the GSL-ALK gene family. *Plant Molecular Biology*, 2012, 79 (1-2): 179-189
- [28] Xie Z, Shi Y, Wang Z, Wang R, Li Y. Biotransformation of glucosinolates epiprogoitrin and progoitrin to (R)- and (S)-goitrin in *Radix isatidis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59 (23): 12467-12472
- [29] Rangkadilok N, Nicolas M E, Bennett R N, Premier R R, Eagling D R, Taylor P W. Developmental changes of sinigrin and glucoraphanin in three *Brassica* species (*Brassica nigra*, *Brassica juncea* and *Brassica oleracea* var. *italica*). *Scientia Horticulturae*, 2002, 96 (1-4): 11-26
- [30] Popova I E, Morra M J. Sinigrin and sinalbin quantification in mustard seed using high performance liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2014, 35 (2): 120-126
- [31] Hol W H G, De Boer W, Termorshuizen A J, Meyer K M, Schneider J H, Van der Putten W H, Van Dam N M. *Heterodera schachtii* nematodes interfere with aphid-plant relations on *Brassica oleracea*. *Journal of Chemical Ecology*, 2013, 39 (9): 1193-1203
- [32] Galletti S, Barillari J, Iori R, Venturi G. Glucobrassicin enhancement in woad (*Isatis tinctoria*) leaves by chemical and physical treatments. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2006, 86 (12): 1833-1838
- [33] Kim S J, Ishii G. Glucosinolate profiles in the seeds, leaves and roots of rocket salad (*Eruca sativa* Mill.) and antioxidative activities of intact plant powder and purified 4-methoxyglucobrassicin. *Soil Science and Plant Nutrition*, 2006, 52 (3): 394-400
- [34] Zang Y X, Kim D H, Park B S, Hong S B. Metabolic engineering of indole glucosinolates in Chinese cabbage hairy roots expressing *Arabidopsis* CYP79B2, CYP79B3, and CYP83B1. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2009, 14 (4): 467-473
- [35] Valverde J, Reilly K, Villacreces S, Gaffney M, Grant J, Brunton N. Variation in bioactive content in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) grown under conventional and organic production systems. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2015, 95 (6): 1163-1171
- [36] Ares A M, Nozal M J, Bernal J L, Bernal J. Optimized extraction, separation and quantification of twelve intact glucosinolates in broccoli leaves. *Food Chemistry*, 2014, 152: 66-74
- [37] Bloem E, Haneklaus S, Schnug E. Comparative effects of sulfur and nitrogen fertilization and post-harvest processing parameters on the glucotropaeolin content of *Tropaeolum majus* L.. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2007, 87 (8): 1576-1585
- [38] Saavedra M J, Borges A, Dias C, Aires A, Bennett R N, Rosa E S, Simoes M. Antimicrobial activity of phenolics and glucosinolate hydrolysis products and their synergy with streptomycin against pathogenic bacteria. *Medicinal Chemistry*, 2010, 6 (3): 174-183