

# 大白菜和结球甘蓝硫苷及 *MAM* 基因表达分析

汪 珊<sup>1</sup>, 康俊根<sup>2</sup>, 冯大领<sup>1</sup>, 卢 银<sup>1</sup>, 杨 锐<sup>1</sup>, 史凯林<sup>1</sup>, 刘梦洋<sup>1</sup>, 王彦华<sup>1</sup>, 徐东辉<sup>3</sup>, 赵建军<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 华北作物改良与调控国家重点实验室 / 河北省蔬菜种质创新与利用重点实验室 / 河北省产业协同创新中心 / 河北农业大学园艺学院, 保定 071001; <sup>2</sup> 北京市农林科学院蔬菜研究中心 / 农业农村部华北地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室, 北京 100097;

<sup>3</sup> 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

**摘要:** 硫苷及其降解产物是十字花科蔬菜重要的次生代谢产物, 具有抗癌抗癌作用。硫苷合成基因 (*MAMs*, *methylthioalkylmalate synthases*) 负责硫苷侧链的延伸, *MAM1* 催化生成短链脂肪族硫苷而 *MAM3* 催化生成长链脂肪族硫苷, 因此 *MAM* 基因影响了硫苷成分的多样性。本研究利用大白菜和结球甘蓝自交系, 从苗期到莲座期取样测定硫苷含量及 *MAM* 的相对表达量, 分析有益硫苷在两者之间的积累差异以及 *MAM* 基因的表达调控作用。结果显示, 从苗期到莲座期结球甘蓝的硫苷含量平均值均高于大白菜, 大白菜中侧链长度为 5C 和 4C 脂肪族硫苷: 4- 戊烯基硫苷 (GBN, glucobrassicinapin) 和 3- 丁烯基硫苷 (NAP, gluconapin) 含量较高, 而结球甘蓝中 3C 和 4C 脂肪族硫苷: 3- 甲基硫氧丙基硫苷 (IBE, glucoiberin) 和 2- 丙烯基硫苷 (SIN, sinigrin) 和 4- 甲磺酰基丁基硫苷 (GRA, glucoraphanin) 含量较高, 有益硫苷 SIN 和 GRA 在结球甘蓝中的含量显著高于大白菜。在大白菜和结球甘蓝中分别发现 7 个 *MAM* 拷贝基因, 同源基因比较发现 *MAM1* 和 *MAM3* 的相对表达量在两者之间存在显著差异。大白菜中 *BraMAM1.1* 和 *BraMAM1.2* 的表达量显著低于结球甘蓝同源基因 *BoMAM1.1* 和 *BoMAM1.2* 的表达量, 而 *BraMAM3.2* 和 *BraMAM3.3* 的表达量显著高于结球甘蓝同源基因 *BoMAM3.1* 的表达量; 并且结球甘蓝中 3C 脂肪族硫苷含量与 *BoMAM1.1* 的表达量呈显著正相关, 大白菜中 5C 脂肪族硫苷含量与 *BraMAM3.2* 的表达量呈显著正相关。由此推测可能是 *BraMAM1.1* 的低表达而 *BraMAM3.2* 的高表达, 导致了大白菜中 3C 脂肪族硫苷 SIN 积累极少而 5C 脂肪族硫苷 GBN 积累较多。

**关键词:** 大白菜; 结球甘蓝; 硫苷; *MAM* 基因; 表达分析

## The Correlation Analysis of Glucosinolates Content and the *MAM* Gene Expression in *Brassica rapa* ssp. *pekinensis* and *B. oleracea* var. *capitata*

WANG Shan<sup>1</sup>, KANG Jun-gen<sup>2</sup>, FENG Da-ling<sup>1</sup>, LU Yin<sup>1</sup>, YANG Rui<sup>1</sup>, SHI Kai-lin<sup>1</sup>, LIU Meng-yang<sup>1</sup>,  
WANG Yan-hua<sup>1</sup>, XU Dong-hui<sup>3</sup>, ZHAO Jian-jun<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> State Key Laboratory of North China Crop Improvement and Regulation/Key Laboratory for Vegetable Germplasm Enhancement and Utilization of Hebei/Collaborative Innovation Center of Vegetable Industry in Hebei/ College of Horticulture, Hebei Agricultural University, Baoding 071001; <sup>2</sup> Beijing Vegetable Research Center, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences/Key Laboratory of Biology and Germplasm Creation of Horticultural Crops ( North China ), Ministry of Agriculture and Rural Areas, Beijing 100097; <sup>3</sup> Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

**Abstract:** Glucosinolates and their degradation products are important secondary metabolite of

收稿日期: 2022-02-19 修回日期: 2022-03-26 网络出版日期: 2022-03-30

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20220219001>

第一作者研究方向为蔬菜功能基因组学, E-mail: 1542293753@qq.com; 康俊根为共同第一作者

通信作者: 赵建军, 研究方向为蔬菜功能基因组学, E-mail: jjz1971@aliyun.com;

徐东辉, 研究方向为蔬菜产品营养品质与质量安全控制, E-mail: xudonghui@caas.cn

**基金项目:** 河北省国际科技合作基地建设专项 (20592901D); 河北省重点研发计划项目 (21326344D); 河北省研究生创新资助项目 (CXZZBS2017069); 国家自然科学基金项目 (31872947); 中国农业科学院科技创新工程协同创新任务 (CAAS-XTX2019025)

**Foundation projects:** The International Science and Technology Cooperation base Special Project of Hebei (20592901D); The Project of The Key Research and Development Program of Hebei (21326344D); The Graduate's Innovation Fund Project of Hebei (CXZZBS2017069); The National Natural Science Foundation of China (31872947); Science and Technology Collaborative Innovation Project of Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS-XTX2019025)

cruciferous vegetables with the anti-cancer function. The Methylthioalkylmalate synthases encoded by various *MAM* genes are involved in glucosinolate side-chain elongation. *MAM1* catalyzes the aliphatic glucosinolate synthesis with short-chain, while *MAM3* catalyzes that with long-chain. In this study, the glucosinolate content and the expression of *MAM* genes were analyzed in Chinese cabbage and cabbage inbred lines during seedling and rosette stages, in order to associate *MAM* gene expression with the accumulation of beneficial glucosinolates. The results showed that the average glucosinolate content in cabbage was higher than that of Chinese cabbage from seedling to rosette stage. The content of 5C and 4C aliphatic glucosinolates (GBN and NAP) were predominant in Chinese cabbage, whereas the main glucosinolates in cabbage were 3C and 4C aliphatic glucosinolates (IBE, SIN and GRA). The anti-cancer components SIN and GRA were significantly higher in cabbage than those of Chinese cabbage. The genome annotations of Chinese cabbage and cabbage revealed seven *MAM* paralogous genes respectively. By analyzing the expression levels of *MAMs*, a significant difference in the relative expression level of *MAM1* and *MAM3* between Chinese cabbage and cabbage was detected. The expression level of *BraMAM1.1* and *BraMAM1.2* in Chinese cabbage was significantly lower than that of *BoMAM1.1* and *BoMAM1.2* in cabbage, while the expression level of *BraMAM3.2* and *BraMAM3.3* was significantly higher than that of *BoMAM3.1*. Moreover, the content of 3C aliphatic glucosinolates in cabbage was positively correlated with the expression of *BoMAM1.1*, and the content of 5C aliphatic glucosinolates in Chinese cabbage was positively correlated with the expression of *BraMAM3.2*. Collectively we speculated that the low expression of *BraMAM1.1* and the high expression of *BraMAM3.2* may respond to the low accumulation of 3C aliphatic glucosinolates (SIN) and the high accumulation of 5C aliphatic glucosinolates (GBN) in Chinese cabbage.

**Key words:** Chinese cabbage; cabbage; glucosinolate; *MAM* genes; expression analysis

硫代葡萄糖苷简称硫苷 (GS, glucosinolates), 是十字花科植物中重要的次生代谢产物, 化学结构包括: (Z)-N-磺酸盐醛肟基团、 $\beta$ -D-葡萄糖残基和可变的 R 基团<sup>[1-2]</sup>; 据 R 基团的来源将硫苷分为 3 类<sup>[3]</sup>, 即来源于蛋氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸的脂肪族硫苷、来源于色氨酸的吲哚族硫苷和来源于苯丙氨酸和酪氨酸的芳香族硫苷。硫苷及其降解产物是十字花科蔬菜特殊风味的主要来源, 并具有抗氧化及防癌抗癌等生理功能。如脂肪族硫苷 4-甲磺酰基丁基硫苷 (GRA, glucoraphanin), 其降解产物萝卜硫素 (1-异硫氰酸-4-甲磺酰基丁烷) 不仅是蔬菜中的天然抗癌物质<sup>[4-6]</sup>, 还可以降低糖尿病和心血管疾病的发生率<sup>[7]</sup>。近年来由于 2-丙基硫苷 (SIN, sinigrin) 可以抑制癌细胞的生长而越来越被关注<sup>[8-9]</sup>, 此外 SIN 还具有抗动脉硬化和促进伤口愈合的活性<sup>[10-11]</sup>。因此了解硫苷含量及合成的分子机制, 对提高有益硫苷的积累, 培育高营养品质的蔬菜具有重要意义。

研究表明硫苷合成包括 3 个独立的步骤: 硫

苷侧链的延伸、硫苷核心结构的形成、硫苷侧链的修饰<sup>[12]</sup>。硫苷的生物活性很大程度上取决于侧链次级结构的修饰, 其中黄素单加氧酶 FMOGS-OX 负责侧链上的 S 发生氧化作用<sup>[13]</sup>, 催化生成有益硫苷 GRA; 而 AOP2 酶进一步催化 GRA 生成 3-丁烯基硫苷 (NAP, gluconapin)<sup>[14-15]</sup>。而甲基硫代烷烃基苹果酸合成酶 MAM 催化 2-羧酸与乙酰辅酶 A 进行加成反应, 使亚甲基基团加入到硫苷侧链中, 从而延伸侧链的长度<sup>[16]</sup>。在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) 中 *AtMAM1* 和 *AtMAM2* 催化短链脂肪族硫苷的形成, *AtMAM3* 催化所有长度脂肪族硫苷的合成<sup>[17-19]</sup>。

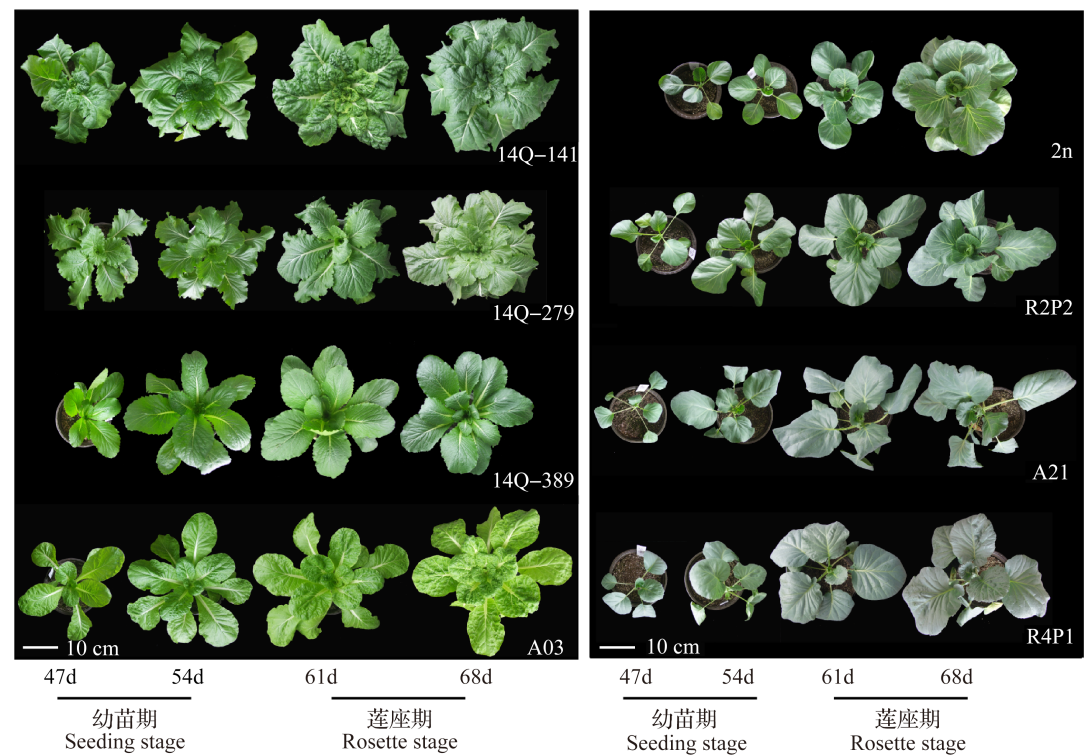
大白菜 (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis* Kitam.) 和结球甘蓝 (*B. oleracea* var. *capitata* L.) 是十字花科重要的蔬菜栽培作物, 不仅可以烹饪即食也可以腌制保存, 深受人们的喜爱。而先前报道中, 结球甘蓝中有益硫苷较大白菜含量高, 大白菜材料中几乎检测不到 GRA 和 SIN<sup>[20-22]</sup>, 因此提高大白菜中有益硫苷的积累, 增强其营养保健功能, 一直是蔬菜育种工作者的目标。已有证据表明甘蓝

中 2 个 *AOP2* 拷贝基因终止子提前而失去活性, 导致 GRA 在甘蓝体内积累增多<sup>[23]</sup>。此外甘蓝偏好生成短链脂肪族硫苷 SIN<sup>[24-27]</sup>, 这可能与侧链延伸基因 *MAM* 的调控有关, 但作用机制尚不十分清楚。大白菜和甘蓝中分别鉴定出 7 个 *MAM* 基因, 其中 5 个为共线性基因, 2 个为非共线性基因<sup>[28]</sup>。本研究以大白菜和结球甘蓝自交系为材料, 在苗期到莲座期取样进行硫苷含量的测定以及 *MAM* 不同拷贝基因的 RT-qPCR 分析, 分析了大白菜和结球甘蓝中有益硫苷含量的差异, 在表达水平上揭示了 *MAM* 基因对有益硫苷积累的影响, 为培育高有益硫苷含量的大白菜新品种提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料及取样

选取 4 份大白菜自交系 (14Q-141、14Q-279、14Q-189 和 A03) 和 4 份结球甘蓝自交系 (2n、R2P2、R4P1 和 A21) 为材料, 于 2016 年 7 月 1 日播种于育苗温室, 培养条件为白天 22±2 °C (16 h), 夜晚 18±2 °C (8 h)。长至 3 叶 1 心时, 定植于花盆中, 缓苗后进行硫苷和 RNA 样品的采集 (图 1)。如图所示播种后 47 d 开始取样, 取样部位为中间叶片, 3 个生物学重复, 每次取样间隔 7 d, 共 4 次取样, 样品液氮冷冻后置于 -80 °C 冰箱备用。



d 表示播种后的天数; 14Q-141 和 14Q-279 在播种后 54 d 进入莲座期  
d means the days after seeding; 14Q-141 and 14Q-279 is at rosette stage after 54 days after seeding

图 1 大白菜和结球甘蓝不同取样时间的表型性状  
Fig.1 The phenotypic characters of Chinese cabbage and cabbage at differen sampling time

1.2 试验方法

1.2.1 HPLC 法测定硫苷含量 准确称取 0.2 g 冷冻干燥样品于 15 mL 离心管中, 迅速加入 5 mL 煮沸的甲醇 (100%) 和 100 μL 内标物苯甲基硫苷 (TRO, glucotropaeolin), 83 °C 恒温水浴 20 min, 每隔 4~5 min 涡旋 1 次。离心 (3000 r/min, 10 min), 上清液导入另一离心管中, 冰浴保存。沉淀物再用 5 mL 70% 的甲醇重复上述过程两次, 合并上清液, 即得到样品

液。取 2 mL 上清液经 DEAE 离子交换柱, 然后用 2 mL 浓度为 0.02 mol/L 醋酸钠溶液冲洗柱子。把柱子转移至另一试管并加入 75 μL 硫酸酯酶 *Helix Pomatia* Type H-1 (Sigma, USA), 在室温下封口过夜。次日, 用 0.5 mL 双蒸水清洗柱子 3 次, 洗出液经 0.45 μm 滤膜过滤后用于高效液相色谱法 (HPLC, high-performance liquid chromatography) 分析, HPLC 分析系统同何洪巨等<sup>[29]</sup>。



**1.2.2 实时荧光定量 PCR 分析 MAM 基因的表达量** 根据 7 个 *BraMAM* 和 4 个 *BoMAM* 拷贝基因的序列设计引物, 序列从 BRAD 网站 (<http://brassicadb.org/brad>) 和 Bolbase 网站 (<http://www.ocri-genomics.org/bolbase>) 获得。引物信息见表 1。使用北京艾德莱生物科技有限公司提供的 EASY pin Plus 植物 RNA 快速提取试剂盒提取样品的总 RNA, 利用 TOYOBO 公司提供的反转录酶 (ReverTra Ace) 将 1  $\mu\text{g}$  RNA 反转录形成 cDNA。之后对 *MAM* 基因进行 qRT-PCR, qRT-PCR

反应体系为 20  $\mu\text{L}$ , 体系中各组分含量为: ddH<sub>2</sub>O 7  $\mu\text{L}$ , 正向、反向引物各 0.5  $\mu\text{L}$ , cDNA 模板 2  $\mu\text{L}$ , THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix 10  $\mu\text{L}$ 。qRT-PCR 反应程序: 预变性 95  $^{\circ}\text{C}$  2 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 退火 56~58  $^{\circ}\text{C}$  10 s, 延伸 68  $^{\circ}\text{C}$  10 s, 40 个循环; 65~95  $^{\circ}\text{C}$  进行熔解曲线分析。反应的阈值以及基线为仪器自动设置。每个扩增反应设置 3 个技术学重复以及不加模版的阴性对照, 反应结束后通过熔解曲线鉴定产物的特异性, 目标基因表达差异采用  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  法分析。

表 1 本研究中引物序列  
Table 1 Primer sequences in this study

种类 Type	基因名称 Gene name	基因编号 Gene ID	基因功能 Gene function	正向引物序列 (5'-3') Forward primer sequence	反向引物序列 (5'-3') Reverse primer sequence
大白菜 Chinese cabbage	<i>BrMAM1.1</i>	<i>Bra029355</i>	催化短链脂肪 族硫苷合成	ACTATCGTGGAACGGTGGC	TGTTTCCTCATCAACCTCGT
	<i>BrMAM1.2</i>	<i>Bra013007</i>		CGGCTGAAAGAGTTGGGATA	CGGTAGTGCCGTTTAGTG
	<i>BrMAM1.3</i>	<i>Bra018524</i>		GTGGGAATGCTTCGCTTGA	TACCTACTATGGGTTTATGTGG
	<i>BrMAM3.1</i>	<i>Bra029356</i>	催化长链脂肪 族硫苷合成	TAGGCTTCAAAGACATCG	TCTCACAAGTTCTCCGTAT
	<i>BrMAM3.2</i>	<i>Bra013009</i>		CAGCACTAGAAGAGGTCGTA	TGAACACGCAGCCCAGTA
	<i>BrMAM3.3</i>	<i>Bra013011</i>		CCTCAAAGCCAACACTCC	TTCCCACTTCTTTACCTAT
	<i>BrMAM3.4</i>	<i>Bra021947</i>		CCTCAAACCCGTCGTGGAA	TGGAGCGTCGTGTCTAAT
结球甘蓝 Cabbage	<i>BoMAM1.1</i>	<i>Bol020647</i>	催化短链脂肪 族硫苷合成	GATTTAACCAAGCAGAAAAAGAGAG	GTCGTTAGTGCCGTTTAATTTCT
	<i>BoMAM1.2</i>	<i>Bol017070</i>		AAATGAGGTGGATGAAGC	TATTAGTATCTTAGGTCTTTTCG
	<i>BoMAM3.1</i>	<i>Bol017071</i>	催化长链脂肪 族硫苷合成	TGGCAGTGAGTAGTGTTAGG	TCCAGGAGTGTTGGCTTT
	<i>BoMAM3.2</i>	<i>Bol037823</i>		CCCGTAAATGGGGCGACT	ACGGAGCGTCGTGTCTAAT
内参基因 Reference gene	<i>ACTIN</i>	<i>Bra022356</i> <i>Bol003004</i>		ACGTGGACATCAGGAAGGAC	GAACCACCGATCCAGACACT

2 结果与分析

2.1 大白菜和结球甘蓝硫苷含量分析

为了比较有益硫苷在大白菜和结球甘蓝中积累的差异, 测定两者自交系中的硫苷含量。从苗期到莲座期, 在大白菜和结球甘蓝中共检测到 12 种硫苷组分 (表 2), 其中包括 7 种脂肪族硫苷 (SIN、IBE、RAA、GRA、PRO、NAP、GBN), 4 种吡啶族硫苷 (GBC、4OH、4ME、NEO) 和 1 种芳香族硫苷 (NAS), 不同大白菜和结球甘蓝自交系各个时期总硫苷含量变化范围为 0.87~5.63  $\mu\text{mol/g}$ 。在播种 47 d

和 54 d 结球甘蓝 4 份自交系的总硫苷含量平均值显著高于大白菜; 播种 61 d 和 68 d 结球甘蓝 4 份自交系的总硫苷含量平均值略高但无显著差异 (图 2A)。同种自交系不同品系间也有差异, 大白菜 14Q-279 在 4 个取样时期的总硫苷含量平均值为 4.68  $\mu\text{mol/g}$ , 显著高于其他大白菜自交系; 而结球甘蓝 R2P2 在 4 个取样时期总硫苷含量平均值仅为 1.98  $\mu\text{mol/g}$ , 显著低于其他结球甘蓝自交系 (图 2B)。芳香族硫苷在大白菜和结球甘蓝中所占比例较低, 变化范围为 0~13%, 结球甘蓝 2n、R2P2、A21 中甚至检测不到芳香族硫苷。除了大白



菜 A03,其他大白菜和结球甘蓝中脂肪族硫苷所占比例较高,均在 60% 以上,其中 14Q-279、R4P1 和 A21 脂肪族硫苷含量较高,达到显著水平,分别为 3.51  $\mu\text{mol/g}$ 、3.98  $\mu\text{mol/g}$  和 3.00  $\mu\text{mol/g}$  (图 2C)。根据脂肪族硫苷侧链中碳链的长度,将其分为 3C、4C 和 5C 脂肪族硫苷(表 2)。大白菜中 4C 和 5C 脂肪族硫苷含量所占比例较高,3C 脂肪族硫苷不足 2%;而结球甘蓝 2n、R2P2 和 R4P1 中 3C 脂肪族硫苷所占比例均高于 90%,4C 脂肪族硫苷含量较低,未检测到 5C 脂肪族硫苷(图 2D),其中 2n

和 R2P2 有益硫苷 SIN 含量较高,达到显著水平,分别为 1.49  $\mu\text{mol/g}$  和 0.94  $\mu\text{mol/g}$ 。A21 中 4C 脂肪族硫苷所占比例较高为 68%,有益硫苷 GRA 含量极显著高于其他材料,为 1.94  $\mu\text{mol/g}$ ,SIN 含量仅为 0.04  $\mu\text{mol/g}$  (图 2E)。该结果表明在大白菜和结球甘蓝中,脂肪族硫苷均为主要的硫苷成分,所占比例较大,芳香族硫苷含量极低。且大白菜偏好合成 5C 脂肪族硫苷,结球甘蓝偏好合成 3C 脂肪族硫苷。有益硫苷 SIN 和 GRA 在结球甘蓝中的含量显著高于大白菜。

表 2 大白菜和结球甘蓝中测定出的主要硫苷成分  
Table 2 The GS profiles detected in Chinese cabbage and cabbage

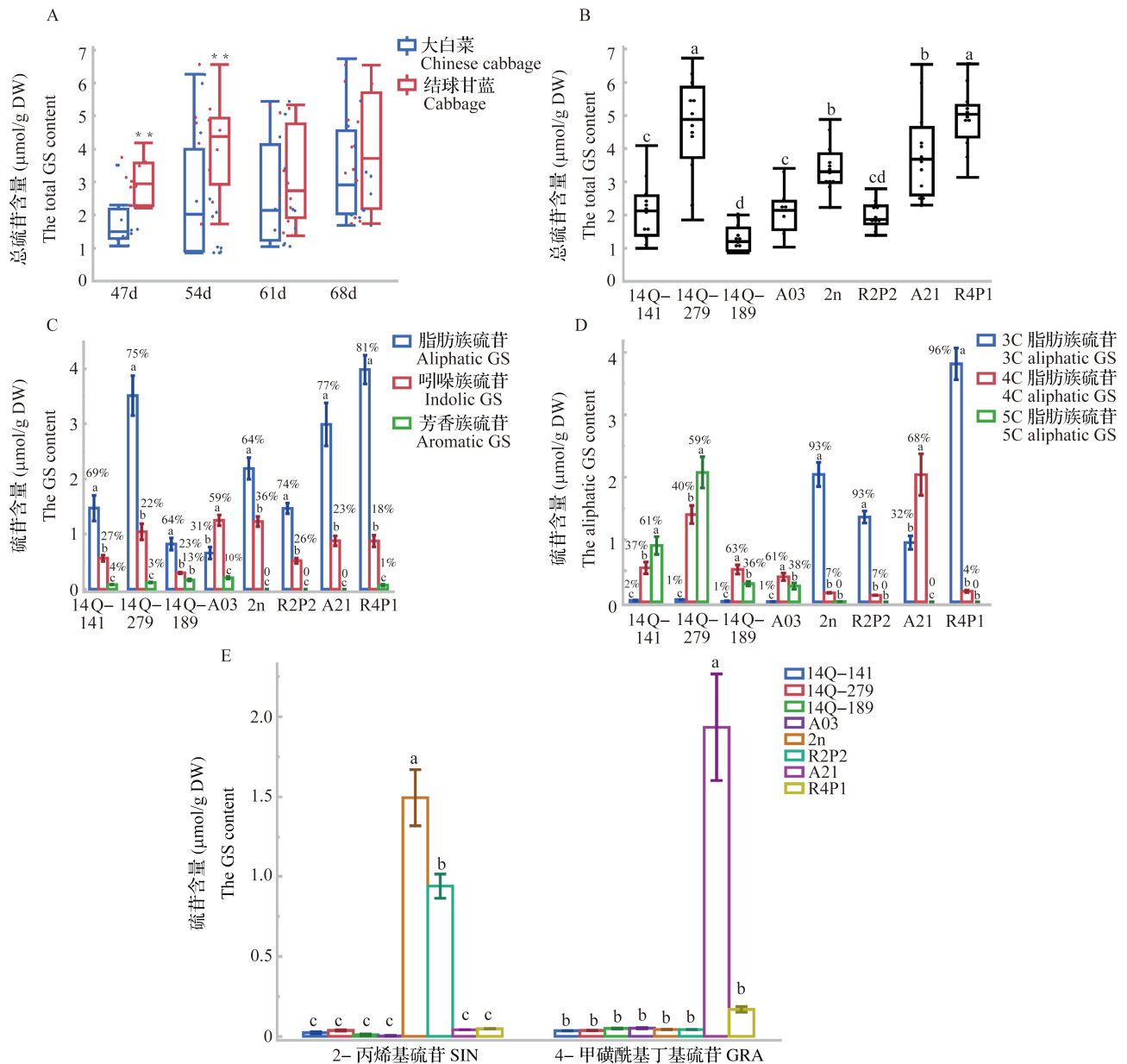
硫苷种类 Type	硫苷组分 GS profiles	侧链长度 Side-chain length
脂肪族硫苷 Aliphatic GS	3- 甲基硫氧丙基硫苷 (IBE, glucoiberin)	3C
	2- 丙烯基硫苷 (SIN, sinigrin)	3C
	4- 甲硫基丁基硫苷 (RAA, glucoerucin)	4C
	4- 甲磺酰基丁基硫苷 (GRA, glucoraphanin)	4C
	3- 丁烯基硫苷 (NAP, gluconapin)	4C
	2- 羟基 -3- 丁烯基硫苷 (PRO, progoitrin)	4C
	4- 戊烯基硫苷 (GBN, glucobrassicinapin)	5C
吲哚族硫苷 Indolic GS	3- 吲哚甲基硫苷 (GBC, glucobrassicin)	1C
	4- 羟基 -3- 吲哚甲基硫苷 (4OH, 4-hydroxyglucobrassicin)	1C
	1- 甲氧基 -3- 吲哚甲基硫苷 (NEO, neoglucobrassicin)	1C
	4- 甲氧基 -3- 吲哚甲基硫苷 (4ME, 4-methoxyglucobrassicin)	1C
芳香族硫苷 Aromatic GS	苯乙基硫苷 (NAS, gluconasturtin)	2C

2.2 硫苷含量的主成分分析

对不同组分硫苷进行主成分分析(图 3)。其中主成分 1(PC1)和主成分 2(PC2)分别解释了总硫苷 41.92% 和 20.40% 的变异。PC1 中 PRO、NAP 和 GBN(脂肪族硫苷)以及 4ME 和 NEO(吲哚族硫苷)和 NAS(芳香族硫苷)的特征向量为正值,SIN 和 IBE(脂肪族硫苷)以及 GBC(吲哚族硫苷)的特征向量为负值;PC2 中 GRA 和 RAA(脂肪族硫苷)以及 4OH(吲哚族硫苷)为主要的硫苷组分,特征向量为正值。

大白菜 14Q-141、14Q-279 和 14Q-189 分布于坐标系第四象限,PC1 得分为正值,PC2 得分为负值。由于 14Q-279 中 GBN(5C)和 NAP(4C)含量较高,分别为 2.07  $\mu\text{mol/g}$  和 1.17  $\mu\text{mol/g}$ ,因

此 14Q-279 的 PC1 得分最高。而 A03 则分布在坐标系第一象限,主要原因是吲哚族硫苷 4ME 和 4OH 含量在 A03 中较高,分别为 0.52  $\mu\text{mol/g}$  和 0.06  $\mu\text{mol/g}$ 。由于 SIN 和 IBE(3C)及吲哚族硫苷 GBC 含量高于其他材料,结球甘蓝 2n、R2P2 和 R4P1 分布于坐标系第三象限,而 A21 则分布于坐标系第二象限,主要是因为 GRA 和 RAA(4C)含量较高(表 3)。以上数据表明,除了脂肪族硫苷外,吲哚族硫苷在大白菜和结球甘蓝中也存在差异,吲哚族硫苷 GBC 在结球甘蓝中积累较多,而 4ME 和 NEO 在大白菜中积累较多。同种不同品系间也存在明显差异,如大白菜 A03 中吲哚族硫苷含量高,结球甘蓝 A21 中 4C 脂肪族硫苷含量极高。

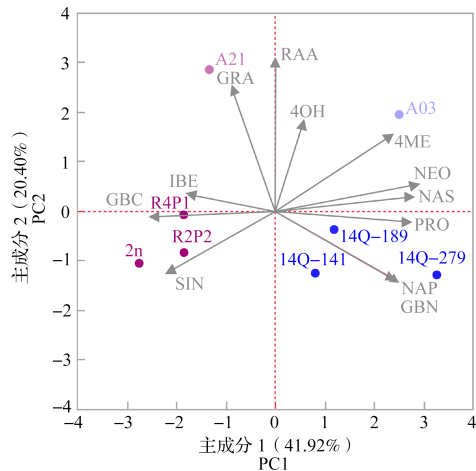


A: 从苗期到莲座期大白菜和结球甘蓝各 4 份材料的总硫苷含量分布; B: 不同自交系中 4 个取样时期的总硫苷含量分布; C: 不同自交系中 4 个取样时期的脂肪族、吲哚族和芳香族硫苷含量的平均值, % 表示占总硫苷含量的比例; D: 不同自交系中 4 个取样时期的 3C、4C 和 5C 脂肪族硫苷含量的平均值, % 表示占总脂肪族硫苷含量的比例; E: 不同自交系中 4 个取样时期的有益硫苷 SIN 和 GRA 含量的平均值; 不同字母表示在  $P<0.01$  水平上显著性差异 (Student's  $t$  检测); \*, \*\* 分别在  $P<0.05$ 、 $P<0.01$  水平上显著性差异 ( $t$  检测), 下同

A: The distribution of total GS content for 4 inbred lines of Chinese cabbage and cabbage respectively from seedling to rosette stage; B: The distribution of total GS content at 4 sampling times in different inbred lines; C: The average content of aliphatic, indolic and aromatic GS at 4 sampling times in different inbred lines, % means the proportion of different profiles in total GS content; D: The average content of 3C, 4C and 5C aliphatic GS at 4 sampling times in different inbred lines, % means the proportion of 3C, 4C and 5C in aliphatic GS content; E: The average content of SIN and GRA at 4 sampling time in different inbred lines; the different letters indicate significant difference  $P<0.01$  (Student's  $t$  test),

Significant difference \* $P<0.05$  and \*\* $P<0.01$  ( $t$  test), the same as below

图 2 大白菜和结球甘蓝硫苷含量  
Fig.2 The GS content in Chinese cabbage and cabbage



蓝色和品红色圆点分别表示大白菜和结球甘蓝自交系; 浅蓝和浅品红圆点表示 A03 和 A21; 箭头表示各硫苷组分在主成分 1 和 2 的特征向量值

Blue and magenta dots represent Chinese cabbage and cabbage inbred lines respectively; light blue and light magenta dots represent A03 and A21 specially, and arrows mean eigenvectors of GS profiles in PC1 and PC2

图 3 大白菜和结球甘蓝中不同硫苷组分含量的主成分分析  
Fig.3 The principal component analysis for the content of the different GS profiles in Chinese cabbage and cabbage

### 2.3 硫苷侧链延伸基因 *MAM* 的实时定量分析

为了探究 *MAM* 基因对 3C 和 5C 脂肪族硫苷积累的影响, 同时进行了 *MAM* 基因的实时荧光定量分析。大白菜中共检测了 7 个 *MAM* 拷贝基因的相对表达量(图 4A), *BraMAM3.2* 和 *BraMAM3.3* 表达量显著高于其他拷贝, 大白菜中几乎检测不到 *BraMAM3.1* 和 *BraMAM1.2* 的表达。与其他大白菜自交系相比, 在 14Q-279 中 *BraMAM1.1* 和 *BraMAM3.2* 的表达量较高, 达到显著水平, 14Q-189 中 *BraMAM3.4* 的表达量较高, 达到显著水平, 而 *BraMAM1.3* 的表达量在 14Q-141 中较高, 达到显著水平。结球甘蓝中, 共检测了 4 个 *MAM* 拷贝基因的相对表达量(图 4B), 基因 *BoMAM1.1* 的表达量显著高于其他拷贝, 而几乎检测不到 *BoMAM3.1* 的表达。与其他结球甘蓝自交系相比, 在 R4P1 中 *BoMAM1.1* 的表达量较高, 达到显著水平, 而 *BoMAM1.2* 的表达量在 A21 中较高, 达到显著水平。从苗期到莲座期, *BraMAMs* 基因的相对表达量变化趋势主要分为两种: 基因的相对表达量水平先上升后下降, 表达峰值大多数出现在 54 d

(图 5A~B); 基因的相对表达量水平总体下降(图 5C~E)。而大多数 *BoMAMs* 基因的相对表达量先下降后上升, 仅 *BoMAM3.2* 的相对表达量水平持续下降(图 5F~H)。

*MAM1* 催化短链脂肪族硫苷的合成, *MAM3* 催化所有长度脂肪族硫苷的合成<sup>[17-19]</sup>。因此将大白菜和结球甘蓝的直系同源基因 *MAMs* 进行比较(图 4C), 结果显示结球甘蓝中 *BoMAM1.1* 和 *BoMAM1.2* 的表达量显著高于大白菜 *BraMAM1.1* 和 *BraMAM1.2* 的表达量, 而大白菜 *BraMAM3.2* 和 *BraMAM3.3* 的表达量显著高于结球甘蓝 *BoMAM3.1*。由此可见, 大白菜和结球甘蓝中 *MAM1* 和 *MAM3* 基因的表达量存在显著差异。

### 2.4 硫苷含量及 *MAM* 基因表达量的相关性分析

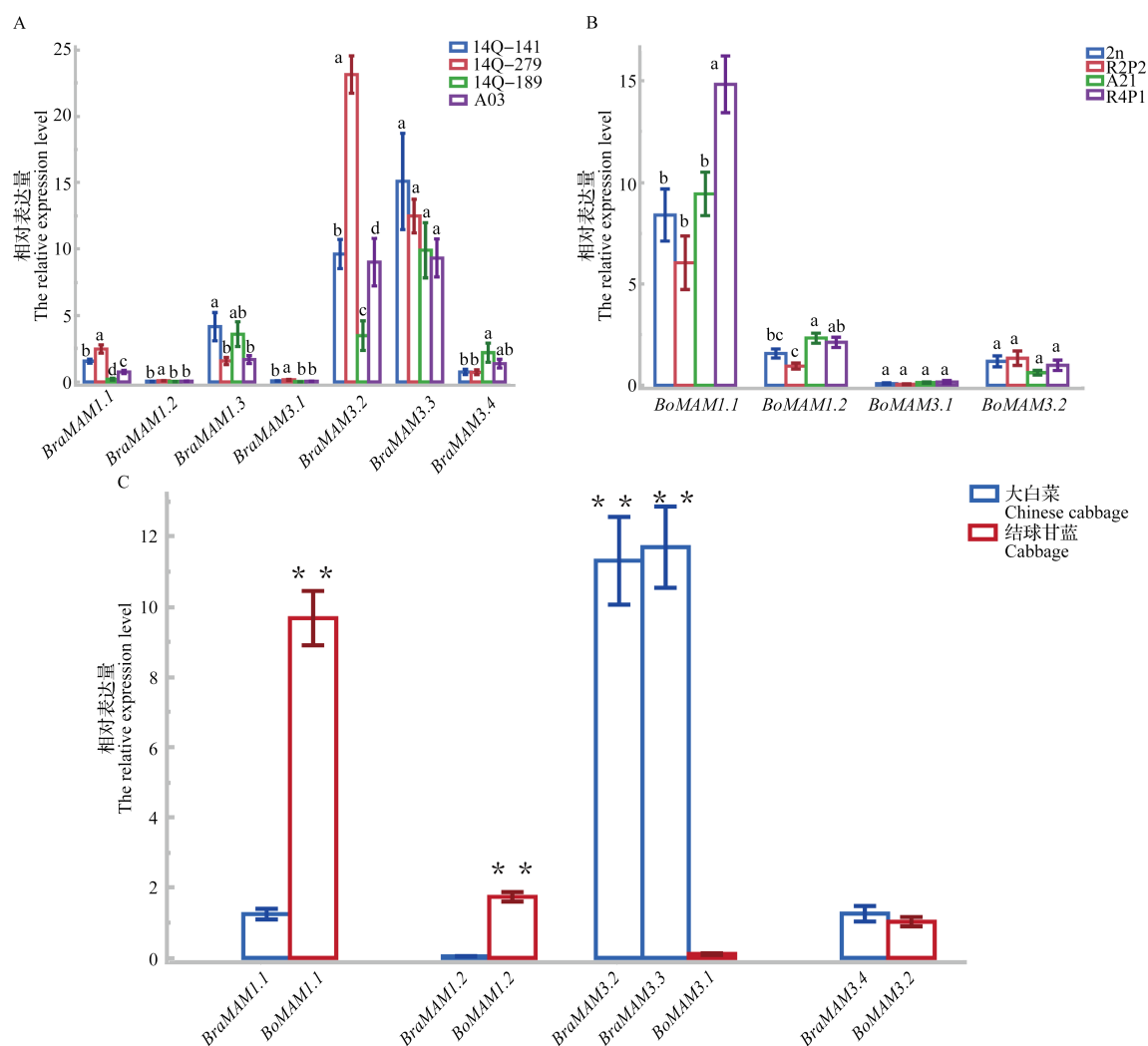
进一步将大白菜和结球甘蓝不同品系间的硫苷含量与 *MAM* 基因表达量进行相关性分析(表 4、表 5), 由于 *BraMAM1.2*、*BraMAM3.1* 和 *BoMAM3.1* 表达量极低, 并未进行相关性分析。结果表明 *BraMAM1.1* 和 *BraMAM3.2* 为大白菜硫苷含量的重要影响因子, 正向调节着脂肪族硫苷和总硫苷的含量, 并且 4C (NAP) 和 5C (GBN) 脂肪族硫苷含量与二者呈显著正相关, *BraMAM3.2* 还正向调节吲哚族硫苷的含量。此外 *BraMAM1.3* 和 *BraMAM3.4* 负向调节着脂肪族硫苷和总硫苷含量, 4C (NAP) 与二者呈显著负相关。而有益硫苷 GRA 与 *BraMAM1.1*、*BraMAM3.2* 和 *BraMAM3.3* 均呈显著负相关。

结球甘蓝中基因 *BoMAM1.2* 为重要影响因子, 不仅正向调节脂肪族硫苷和总硫苷含量, 而且与 GRA 硫苷含量显著正相关, 与 PRO 硫苷含量显著负相关, 说明它的高表达量可显著提高有益硫苷 GRA 的积累, 降低有害硫苷 PRO 的含量<sup>[30]</sup>。此外基因 *BoMAM1.1* 的表达量与 3C 脂肪族硫苷 (IBE) 的含量显著正相关, 但与 SIN 的含量显著负相关。

因此, 对大白菜和结球甘蓝硫苷含量贡献率较高的基因分别为 *BraMAM1.1*、*BraMAM3.2* 和 *BoMAM1.2*, 均可正向调节脂肪族硫苷和总硫苷的含量, 其中 *BoMAM1.2* 还可促进有益硫苷 GRA 的积累。







A: 大白菜中 *BraMAMs* 基因在 4 个取样时期的相对表达量平均值; B: 结球甘蓝中 *BoMAMs* 基因在 4 个取样时期的相对表达量平均值; C: 大白菜和结球甘蓝各 4 份材料中同源基因 *MAMs* 在 4 个取样时期的相对表达量平均值

A: The average relative expression level of the *BraMAM* copies at 4 sampling time in Chinese cabbage; B: The average relative expression level of the *BoMAM* copies at 4 sampling time in cabbage; C: The average relative expression level of the *MAM* paralogue genes of 4 inbred lines for Chinese cabbage and cabbage respectively at 4 sampling time

图 4 *MAM* 不同拷贝基因在大白菜和结球甘蓝中的相对表达量

Fig.4 The relative expression level of the *MAM* copies in Chinese cabbage and cabbage

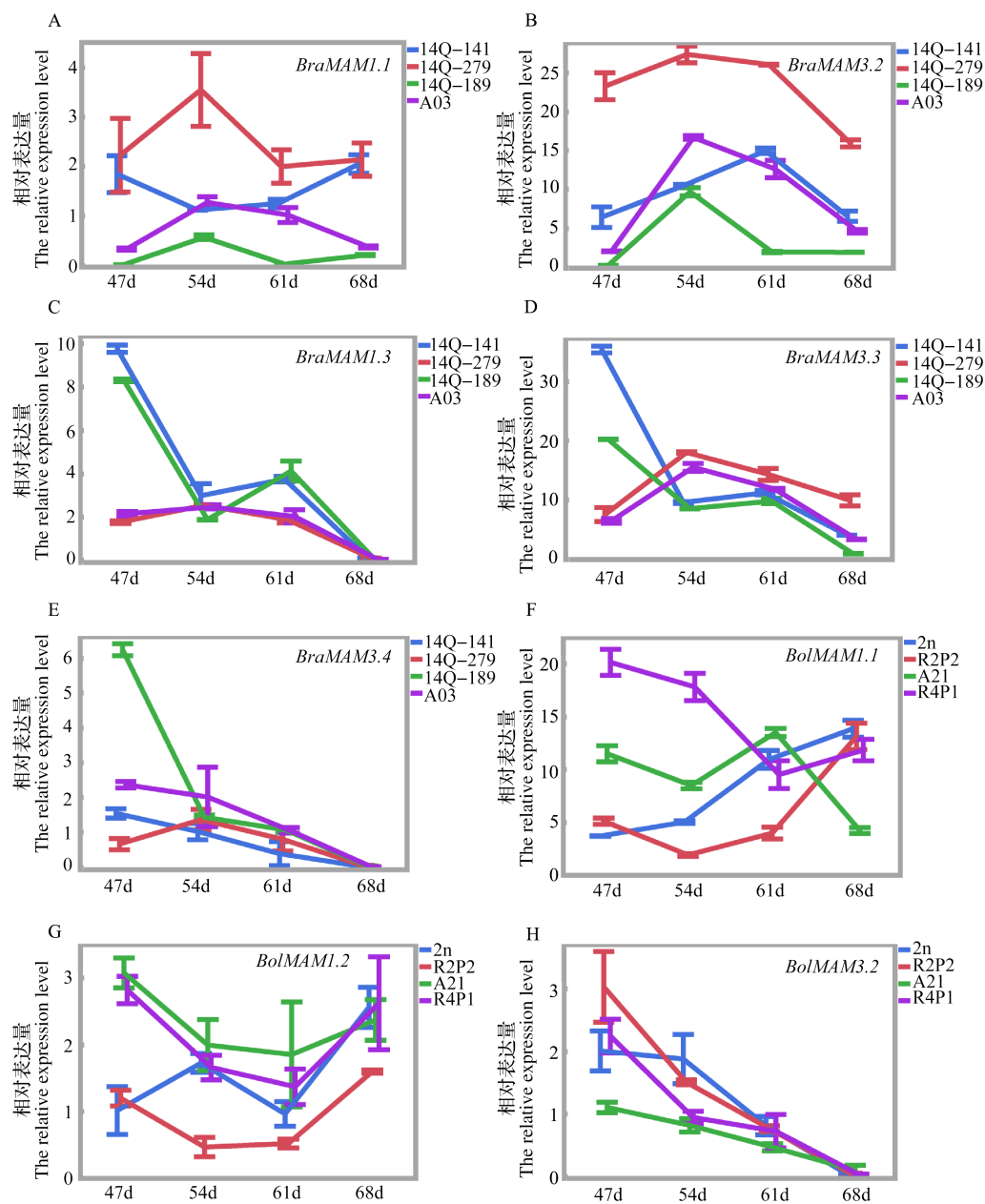


图 5 从苗期到莲座期 *MAM* 基因在大白菜和结球甘蓝中相对表达量变化趋势

Fig.5 The relative expression level of the *MAM* copies in Chinese cabbage and cabbage from seedling to rosette stage



表 4 *MAM* 基因的相对表达量与各组分硫苷含量的相关性分析  
Table 4 The correlation analysis between the relative expression level of *MAM* and the content of the different GS profiles

基因名称 Gene name	脂肪族硫苷 Aliphatic GS							吲哚族硫苷 Indolic GS			芳香族硫苷 Aromatic GS	
	SIN	IBE	RAA	GRA	NAP	PRO	GBN	GBC	NEO	4ME	4OH	NAS
<i>BraMAM1.1</i>	NA	NA	-0.38**	-0.54**	0.63**	-0.25	0.68**	0.32 <sup>*</sup>	0.35 <sup>*</sup>	-0.01	-0.05	-0.44**
<i>BraMAM1.3</i>	NA	NA	-0.35*	-0.14	-0.32*	-0.26	-0.28	-0.01	-0.20	-0.34 <sup>*</sup>	0.45**	0.15
<i>BraMAM3.2</i>	NA	NA	-0.38**	-0.47**	0.64**	-0.20	0.64**	0.36 <sup>*</sup>	0.47**	0.10	0.10	-0.30 <sup>*</sup>
<i>BraMAM3.3</i>	NA	NA	-0.44**	-0.31*	0.01	-0.32*	0.04	0.18	0.13	-0.18	-0.34 <sup>*</sup>	0.00
<i>BraMAM3.4</i>	NA	NA	-0.24	0.25	-0.31*	-0.03	-0.31*	-0.11	-0.10	-0.12	0.01	0.49**
<i>BoMAM1.1</i>	-0.42**	0.54**	-0.03	-0.14	-0.09	-0.57**	NA	-0.21	0.07	0.15	-0.42**	0.22
<i>BoMAM1.2</i>	-0.35*	0.24	0.37**	0.38**	0.10	-0.33*	NA	-0.06	0.28	0.42**	-0.08	0.06
<i>BoMAM3.2</i>	0.33*	-0.15	-0.26	-0.29*	-0.17	0.16	NA	0.14	-0.40**	-0.16	0.46**	-0.24

NA 表示该组分硫苷未进行相关性分析  
NA means the correlation has not been performed for this GS profiling

表 5 *MAM* 基因的相对表达量与各类硫苷含量的相关性分析  
Table 5 The correlation analysis between the relative expression level of *MAM* and the content of the different kinds of GS

基因名称 Gene name	脂肪族硫苷 Aliphatic GS	吲哚族硫苷 Indolic GS	芳香族硫苷 Aromatic GS	硫苷总量 Total GS
<i>BraMAM1.1</i>	0.65**	0.27	-0.44**	0.63**
<i>BraMAM1.3</i>	-0.33 <sup>*</sup>	-0.27	0.15	-0.37 <sup>*</sup>
<i>BraMAM3.2</i>	0.63**	0.41**	-0.30 <sup>*</sup>	0.66**
<i>BraMAM3.3</i>	-0.01	0.04	0.00	0.00
<i>BraMAM3.4</i>	-0.33 <sup>*</sup>	-0.14	0.49**	-0.30 <sup>*</sup>
<i>BoMAM1.1</i>	0.27	-0.17	0.22	0.21
<i>BoMAM1.2</i>	0.37**	0.06	0.06	0.36 <sup>*</sup>
<i>BoMAM3.2</i>	-0.21	0.03	-0.24	-0.19

3 讨论

芸薹属作物的硫苷含量差异较大,除了不同基因型的影响外,硫苷含量还与生长季节、不同组织器官及叶片年龄相关<sup>[31-35]</sup>。本研究旨在探究 *MAM* 基因对大白菜和结球甘蓝有益硫苷积累的影响,为了保证试验条件的可控性和一致性,选择了在人工气候室内培养,降低环境因子对硫苷含量和 *MAM* 基因表达的影响;而测定时期选择了苗期到莲座期而非结球期,一方面由于人工气候室的条件限制,另一方面基于试验设计的目的,只要保证硫苷和 RNA 样品采集时期一致即可。此外由于不同基因型以及不同生长阶段的硫苷含量存在差异,造成大白菜和结球甘蓝的总硫苷含量的标准差相对较大(图 2A、B)。本研究中不同时期的不同大白菜和结球甘蓝

自交系的总硫苷含量为 0.87~5.63 μmol/g,低于先前报道的测定结果<sup>[20-21,26]</sup>,这可能与取样时间和部位有关。从苗期到莲座期总硫苷含量的变化整体呈上升趋势,大白菜自交系在播种 68 d 的总硫苷含量高于播种 47 d 的总硫苷含量;结球甘蓝 R4P1 和 A21 在 68 d 的总硫苷含量也高于播种 47 d 的总硫苷含量,而 R2P2 则与之相反呈下降趋势,2n 在不同取样时期无明显变化(表 3)。这表明苗期到莲座期总硫苷含量大多数呈上升趋势,可能结球期的硫苷含量会更高。

大白菜中主要的硫苷成分为 GBN、NAP 和 NEO,总含量分别为 0.88 μmol/g、0.46 μmol/g 和 0.32 μmol/g。结球甘蓝中主要的硫苷成分为 IBE、GBC、SIN 和 GRA,总含量分别为 1.41 μmol/g、0.66 μmol/g、0.63 μmol/g 和 0.55 μmol/g(表 3)。在

大白菜中几乎检测不到 3C 脂肪族硫苷,而在结球甘蓝中没有 5C 脂肪族硫苷(表 3)。该研究与 Yang 等<sup>[36]</sup>和 Volden 等<sup>[37]</sup>报道的大白菜偏好合成 GBN 而甘蓝偏好合成 IBE 和 SIN 的结果基本一致。此外,同种内不同基因型的硫苷组分和含量也有明显差异,如 A21 合成的有益硫苷 GRA 的含量显著高于其他材料。

基因 *MAM* 为硫苷侧链延伸的关键基因,大白菜和结球甘蓝中 *MAM* 基因的拷贝数较多,表达调控较为复杂。刘锦<sup>[38]</sup>通过对 93 份白菜中 *MAM* 的表达分析,发现 *BraMAM1.1* 和 *BraMAM3.2* 具有较高的表达量;*BraMAM1.3* 和 *BraMAM3.4* 只在少数材料中存在极低表达,而在所有白菜中均未检测出 *BraMAM3.1* 的表达。因此 *BraMAM1.3*、*BraMAM3.1* 和 *BraMAM3.4* 可能并不行使功能。而在本研究中 *BraMAM1.2* 和 *BraMAM3.1* 的相对表达量极低,在大白菜中可检测到 *BraMAM1.3* 和 *BraMAM3.4* 的相对表达量。大白菜 *BraMAM3.2* 和 *BraMAM3.3* 的相对表达的量显著高于结球甘蓝同源基因 *BoMAM3.1*,且在大白菜中 5C 脂肪族硫苷含量与 *BraMAM3.2* 呈显著正相关,因此 *BraMAM3.2* 可能是一个关键因子,导致 5C 脂肪族硫苷在大白菜中积累。另一方面结球甘蓝 *BoMAM1.1* 和 *BoMAM1.2* 的相对表达量显著高于大白菜 *BraMAM1.1* 和 *BraMAM1.2*,且结球甘蓝中 3C 脂肪族硫苷含量与 *BoMAM1.1* 呈显著正相关,推测更有可能是 *BoMAM1.1* 提高了 3C 脂肪族硫苷在结球甘蓝中的含量。

#### 参考文献

- [1] 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
- [2] Lambrix V, Reichelt M, Mitchell-Olds T, Kliebenstein D J, Gershenzon J. The *Arabidopsis* epithiospecifier protein promotes the hydrolysis of glucosinolates to nitriles and influences *Trichoplusia ni* herbivory. *The Plant Cell*, 2001, 13(12): 2793-2808
- [3] Halkier B A, Gershenzon J. Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annual Review of Plant Biology*, 2006, 57: 303-333
- [4] Brooks J D, Paton V G, Vidanes G. Potent induction of phase 2 enzymes in human prostate cells by sulforaphane. *Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention*, 2001, 10(9): 949-954
- [5] Gao X, Dinkova-Kostova A T, Talalay P. Powerful and prolonged protection of human retinal pigment epithelial cells, keratinocytes, and mouse leukemia cells against oxidative damage: The indirect antioxidant effects of sulforaphane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(26): 15221-15226
- [6] Talalay P. Chemoprotection against cancer by induction of phase 2 enzymes. *Biofactors*, 2000, 12(1-4): 5-11
- [7] Fahey J W, Haristoy X, Dolan P M, Kensler T W, Scholtus I, Stephenson K K, Talalay P, Lozniewski A. Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular, and antibiotic-resistant strains of *Helicobacter pylori* and prevents benzo[*a*]pyrene-induced stomach tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(11): 7610-7615
- [8] Jie M, Cheung W M, Yu V, Zhou Y, Tong P H, Ho J W. Anti-proliferative activities of sinigrin on carcinogen-induced hepatotoxicity in rats. *PLoS ONE*, 2014, 9(10): e110145
- [9] 田艳, 邓放明, 赵玲艳, 廖安, 赖灯妮, 陈秋佳. 高菜硫代葡萄糖苷提取物对人结肠癌细胞 HCT116 的抑制作用. *食品科学*, 2020, 41(23): 172-180
- Tian Y, Deng F M, Zhao L Y, Liao A, Lai D N, Chen Q J. Inhibitory effect of glucosinolates from *Brassica juncea* var. *integrolifolia* on HCT116 human colon cancer cells. *Food Science*, 2020, 41(23): 172-180
- [10] Jang Y J, Pyo S. Anti-atherosclerotic effect of sinigrin in ApoE-deficient mice. *The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, 2015, 29: 6091
- [11] Mazumder A, Dwivedi A, du Plessis J. Sinigrin and its therapeutic benefits. *Molecules*, 2016, 21(4): 416
- [12] Sønderby I E, Geu-Flores F, Halkier B A. Biosynthesis of glucosinolates-gene discovery and beyond. *Trends in Plant Science*, 2010, 15(5): 283-290
- [13] Hansen B G, Kliebenstein D J, Halkier B A. Identification of a flavin-monooxygenase as the S-oxygenating enzyme in aliphatic glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 2007, 50(5): 902-910
- [14] Kliebenstein D J, Kroymann J, Brown P, Figuth A, Pedersen D, Gershenzon J, Mitchell-Olds T. Genetic control of natural variation in *Arabidopsis* glucosinolate accumulation. *Plant Physiology*, 2001, 126(2): 811-825
- [15] Kliebenstein D J, Lambrix V M, Reichelt M, Gershenzon J, Mitchell-Olds T. Gene duplication in the diversification of secondary metabolism: Tandem 2-oxoglutarate-dependent dioxygenases control glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 2001, 13(3): 681-693
- [16] Kroymann J, Textor S, Tokuhisa J G, Falk K L, Bartram S, Gershenzon J, Mitchell-Olds T. A gene controlling variation in *Arabidopsis* glucosinolate composition is part of the methionine chain elongation pathway. *Plant Physiology*, 2001, 127(3): 1077-1088
- [17] Field B, Cardon G, Traka M, Botterman J, Vancanneyt G, Mithen R. Glucosinolate and amino acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 2004, 135(2): 828-839
- [18] Textor S, Bartram S, Kroymann J, Falk K L, Hick A, Pickett J A, Gershenzon J. Biosynthesis of methionine-derived glucosinolates in *Arabidopsis thaliana*: Recombinant expression and characterization of methylthioalkylmalate synthase, the condensing enzyme of the chain-elongation cycle. *Planta*, 2004,

- 218(6): 1026-1035
- [19] Textor S, de Kraker J W, Hause B, Gershenzon J, Tokuhsa J G. MAM3 catalyzes the formation of all aliphatic glucosinolate chain lengths in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 2007, 144(1): 60-71
  - [20] Kim J K, Chu S M, Kim S J, Lee D J, Lee S Y, Lim S H, Ha S H, Kweon S J, Cho H S. Variation of glucosinolates in vegetable crops of *Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*. *Food Chemistry*, 2010, 119(1): 423-428
  - [21] 廖永翠, 宋明, 王辉, 徐东辉, 王晓武. 大白菜中硫代葡萄糖苷的鉴定及含量分析. *园艺学报*, 2011, 38(5): 963-969  
Liao Y C, Song M, Wang H, Xu D H, Wang X W. Glucosinolate profile and accumulation in *Brassica campestris* L. ssp. *Pekinensis*. *Acta Horticulture Sinica*, 2011, 38(5): 963-969
  - [22] 刘志远, 张冀芳, 武剑, 梁建丽, 王晓武. 大白菜 *BrAOP2* 基因的遗传多样性及其与硫甙含量的相关性分析. *中国蔬菜*, 2013(16): 14-21  
Liu Z Y, Zhang J F, Wu J, Liang J L, Wang X W. Genetic diversity of *BrAOP2* and analysis of its correlation with glucosinolates content in Chinese cabbage. *China Vegetables*, 2013(16): 14-21
  - [23] Liu S, Liu Y, Yang X, Tong C, Edwards D, Parkin I A, Zhao M, Ma J, Yu J, Huang S, Wang X, Wang J, Lu K, Fang Z, Bancroft I, Yang T J, Hu Q, Wang X, Yue Z, Li H, Yang L, Wu J, Zhou Q, Wang W, King G J, Pires J C, Lu C, Wu Z, Sampath P, Wang Z, Guo H, Pan S, Yang L, Min J, Zhang D, Jin D, Li W, Belcram H, Tu J, Guan M, Qi C, Du D, Li J, Jiang L, Batley J, Sharpe A G, Park B S, Ruperao P, Cheng F, Waminal N E, Huang Y, Dong C, Wang L, Li J, Hu Z, Zhuang M, Huang Y, Huang J, Shi J, Mei D, Liu J, Lee T H, Wang J, Jin H, Li Z, Li X, Zhang J, Xiao L, Zhou Y, Liu Z, Liu X, Qin R, Tang X, Liu W, Wang Y, Zhang Y, Lee J, Kim H H, Denoeud F, Xu X, Liang X, Hua W, Wang X, Wang J, Chalhoub B, Paterson A H. The *Brassica oleracea* genome reveals the asymmetrical evolution of polyploid genomes. *Nature Communications*, 2014, 5: 3930
  - [24] Bhandari S R, Rhee J, Choi C S, Jo J S, Shin Y K, Lee J G. Profiling of individual desulfo-glucosinolate content in cabbage head (*Brassica oleracea* var. *capitata*) germplasm. *Molecules*, 2020, 25(8): 1860
  - [25] Charron C S, Saxton A M, Sams C E. Relationship of climate and genotype to seasonal variation in the glucosinolate-myrosinase system. I. Glucosinolate content in ten cultivars of *Brassica oleracea* grown in fall and spring seasons. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2005, 85(4): 671-681
  - [26] 董莉, 任雪松, 李成琼, 司军, 宋洪元. 甘蓝硫甙组分和含量分析. *西南大学学报: 自然科学版*, 2012, 34(12): 34-38  
Dong L, Ren X S, Li C Q, Si J, Song H Y. Analysis of components and content of glucosinolates in *Brassica oleracea*. *Journal of Southwest University: Natural Science Edition*, 2012, 34(12): 34-38
  - [27] 胡丽萍, 刘光敏, 康俊根, 赵学志, 马越, 何洪巨. 不同结球甘蓝品种硫代葡萄糖苷组分及含量分析. *中国蔬菜*, 2015(6): 42-47  
Hu L P, Liu G M, Kang J G, Zhao X Z, Ma Y, He H J. Analysis on components and content of glucosinolates in different cabbage varieties. *China Vegetable*, 2015(6): 42-47
  - [28] Wang H, Wu J, Sun S, Liu B, Cheng F, Sun R, Wang X. Glucosinolate biosynthetic genes in *Brassica rapa*. *Gene*, 2011, 487(2): 135-142
  - [29] 何洪巨, 陈杭, W.H.Schnitzler. 芸薹属蔬菜中硫代葡萄糖苷鉴定与含量分析. *中国农业科学*, 2002, 35(2): 192-197  
He H J, Chen H, Schnitzler W H. Glucosinolate composition and contents in *Brassica* vegetables. *Scientia Agricultura Sinica*, 2002, 35(2): 192-197
  - [30] Griffiths D W, Birch A N, Hillman J R. Antinutritional compounds in the brasi analysis, biosynthesis, chemistry and dietary effects. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 1998, 73(1): 1-8
  - [31] Cartea M E, Velasco P, Obregón S, Padilla G, de Haro A. Seasonal variation in glucosinolate content in *Brassica oleracea* crops grown in northwestern Spain. *Phytochemistry*, 2008, 69(2): 403-410
  - [32] Choi S H, Park S, Lim Y P, Kim S J, Park J T, An G. Metabolite profiles of glucosinolates in cabbage varieties (*Brassica oleracea* var. *capitata*) by season, color, and tissue position. *Horticulture, Environment and Biotechnology*, 2014, 55(3): 237-247
  - [33] Kabouw P, Biere A, van der Putten W H, van Dam N M. Intra-specific differences in root and shoot glucosinolate profiles among white cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58(1): 411-417
  - [34] Zhao Y, Yue Z, Zhong X, Lei J, Tao P, Li B. Distribution of primary and secondary metabolites among the leaf layers of headed cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*). *Food Chemistry*, 2020, 312: 126028
  - [35] 秦晗, 张文珊, 王猛, 熊思灿, 胡丹丹, 孙秀丽, 胡莲莲, 孟金陵, 邹珺. 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. *植物遗传资源学报*, 2020, 21(1): 94-104  
Qin H, Zhang W S, Wang M, Xiong S C, Hu D D, Sun X L, Hu L L, Meng J L, Zhou J. Characterizing glucosinolates of four *Brassica* species and interspecific transferring of specific glucosinolates. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2020, 21(1): 94-104
  - [36] Yang B, Quiros C F. Survey of glucosinolate variation in leaves of *Brassica rapa* crops. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2010, 57(7): 1079-1089
  - [37] Volden J, Borge G I, Hansen M, Wicklund T, Bengtsson G B. Processing (blanching, boiling, steaming) effects on the content of glucosinolates and antioxidant-related parameters in cauliflower (*Brassica oleracea* L. ssp. *botrytis*). *LWT-Food Science and Technology*, 2009, 42(1): 63-73
  - [38] 刘锦. 白菜 MAM 基因进化研究及 MAM1.2 基因启动子活性分析. 北京: 中国农业科学院, 2014  
Liu J. Evolutionary study of MAM genes and analysis of MAM1.2 gene promoter activity in *Brassica rapa*. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2014