

大白菜 - 甘蓝易位系 A-4 硫苷及 *BrAOP2* 表达和序列分析

郑熙晓, 王 罡, 王培培, 王彦华, 马 卫, 轩淑欣, 赵建军, 陈雪平, 申书兴, 顾爱侠

(河北农业大学园艺学院 / 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 /

河北省蔬菜产业协同创新中心, 保定 071000)

摘要: 硫苷是十字花科植物中一类重要的次生代谢产物, 硫苷及其降解产物在植物风味、抗虫抗逆以及防癌抗癌方面具有重要作用。4- 甲磺酰基丁基硫苷 (GRA, glucoraphanin) 的降解产物萝卜硫素是迄今为止已知的抗癌活性最强的物质之一。 *BrAOP2* 基因是影响 GRA 含量的关键基因。为了探究大白菜 - 甘蓝易位系 A-4 与亲本大白菜 85-1 中硫苷含量的差异, 本研究以 84 株 A-4 自交后代植株和 85-1 为材料, 通过高效液相色谱法测定其莲座期莲座叶、结球初期莲座叶、结球初期球叶、收获期莲座叶和收获期球叶的硫苷含量, 并进行 *BrAOP2* 基因表达量和序列分析。结果表明: A-4 自交后代植株总硫苷含量、脂肪族硫苷含量、PRO、GBN、GRA、NAP、GBC 含量平均值在不同时期的球叶和莲座叶中始终高于 85-1, 且均在结球初期球叶中含量最高; 除 NEO 含量外, 总硫苷含量和其他硫苷组分在球叶中的含量高于莲座叶。A-4 自交后代植株 *BrAOP2* 基因表达量显著低于 85-1, 且二者 *BrAOP2* 基因序列存在 SNP 和 InDel 的变异。由此推测, A-4 自交后代植株 GRA 含量升高与 *BrAOP2* 低表达有关。以上研究为进一步分析大白菜 - 甘蓝易位系 GRA 含量与 85-1 的差异奠定基础。

关键词: 大白菜; 甘蓝; 易位系; 硫苷; GRA; *BrAOP2*

Analysis of Glucosinolates Content and the *BrAOP2* Gene Expression and Sequence in Chinese Cabbage-Cabbage Translocation Line A-4

ZHENG Xi-xiao, WANG Gang, WANG Pei-pei, WANG Yan-hua, MA Wei, XUAN Shu-xin, ZHAO Jian-jun, CHEN Xue-ping, SHEN Shu-xing, GU Ai-xia

(College of Horticulture, Hebei Agricultural University/ 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, Baoding 071000)

Abstract: Glucosinolates (GSLs) are a type of important secondary metabolites in cruciferous plants. GSLs and their degradation products are known with important roles in plant flavor, insect resistance and anti-cancer. Sulforaphane, the degradation product of glucoraphanin (GRA), is one of the most important anti-cancer substances. The *BrAOP2* gene is a key factor that modulates the GRA content. To analyze if the GSLs content

收稿日期: 2022-05-13 修回日期: 2022-06-09 网络出版日期: 2022-06-22

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20220513002>

第一作者研究方向为蔬菜分子染色体工程, E-mail: 1783209791@qq.com

通信作者: 申书兴, 研究方向为蔬菜遗传育种, E-mail: shensx@hebau.edu.cn

顾爱侠, 研究方向为蔬菜遗传育种, E-mail: aixiagu@126.com

基金项目: 国家自然科学基金 (31930098, 32172560); 河北省杰出青年科学基金 (C2020204063); 河北省自然科学基金和重点基础研究专项 (18966925D); 河北省自然科学创新研究群体 (Grant No.C2020204111); 河北省重点研发计划项目 (21326311D-2); 河北省创新能力提升计划项目 (20567610H)

Foundation projects: The National Natural Science Foundation of China (31930098, 32172560); Science Foundation for Distinguished Youth of Hebei Province (C2020204063); The Natural Science Foundation and Key Basic Research Project of Hebei Province (18966925D); The Natural Science Innovation Research Group of Hebei Province (Grant No.C2020204111); The Key Research and Development Program of Hebei (21326311D-2); Innovation Capability Enhancement Program Project of Hebei Province (20567610H)

between the Chinese cabbage-cabbage translocation line A-4 was different with that of their parent Chinese cabbage 85-1, 84 selfing progenies plants of A-4 and 85-1 were subjected to measure the GSLs content by High Performance Liquid Chromatography in rosette leaves and heading leaves at rosette, early heading and harvest head stage. The genomic and transcriptional diversity of the *BrAOP2* gene were analyzed. The results showed that the average contents of total GSLs, aliphatic GSLs, PRO, GBN, GRA, NAP and GBC of A-4 selfing progenies plants were always higher than those of 85-1 in heading leaves and rosette leaves at all stages. Especially, the highest value on contents were observed in heading leaves at early heading stages. Except the content of NEO, the contents of total GSLs and other GSLs components in heading leaves were higher than those in rosette leaves. The lower expression, SNP and InDel of the *BrAOP2* gene in A-4 selfing progenies plants if compared to 85-1 were observed. With these results, it is speculated that the increase on GRA content in A-4 selfing progenies plants associates with the expression of *BrAOP2*. Collectively, these results provided insights for further analyzing the GRA content in 85-1 and Chinese cabbage-cabbage translocation lines.

Key words: Chinese cabbage; cabbage; translocation line; glucosinolates; GRA; *BrAOP2*

大白菜 (*Brassica rapa* subsp. *pekinensis* (Lour.) Hanelt, AA, n=10) 原产于中国并被广泛栽培, 是重要的蔬菜作物之一。甘蓝 (*Brassica oleracea* var. *capitata* L., CC, n=9) 与大白菜是同属不同种蔬菜, 具有抗逆性强和有益硫苷含量高优良性状^[1-2]。基于远缘杂交创制易位系能够促进种属间基因交流, 产生新性状, 甚至产生前所未有的新物种。迄今为止, 易位系在小麦、水稻、棉花和黄瓜等植物上已广泛应用^[3-6]。已有研究表明, 芸薹属 A 基因组和 C 基因组的同源性很高, 这为 C 基因组导入到 A 基因组提供了机会^[7]。因此, 通过创建导入甘蓝染色体片段的大白菜 - 甘蓝易位系, 可以获得具有甘蓝优良性状的大白菜新种质。

硫代葡萄糖苷 (GSLs, glucosinolates), 简称硫苷, 又称芥子油苷, 是一类含氮硫的次生代谢产物, 在十字花科植物中广泛存在。研究发现所有的硫苷均具有相同的核心结构, 即 β -D- 硫代葡萄糖基、磺酸酐和侧链 R 基团, 并根据其 R 侧链来源氨基酸的不同可以分为脂肪族硫苷、吲哚族硫苷和芳香族硫苷, 目前在十字花科已有 200 多种硫苷被发现并鉴定出来^[8-10]。硫苷及其降解产物在植物风味品质的形成、抗虫抗逆以及抗癌防癌中具有重要作用^[11-15]。硫苷的生物合成分为 3 步: 侧链的延伸、核心结构的形成和侧链的修饰^[16]; 其中 *BrAOP2* 在硫苷侧链的修饰中起作用, 是影响 4- 甲磺酰基丁基硫苷 (GRA, glucoraphanin) 含量的关键基因, GRA 在 *BrAOP2* 基因编码酶的作用下变为中间产物 3- 丁烯基硫苷 (NAP, gluconapin)。GRA 的降解产物萝卜硫素有抗氧化和防癌抗癌的作用, 是蔬菜中已知最强的抗癌防癌活性物质之一, 因此十字花科植

物中的 GRA 含量受到广泛关注, 并且提高蔬菜中的 GRA 含量一直是重要的育种目标之一^[17-19]。

本实验室基于大白菜和甘蓝的种间杂交, 并结合回交、自交和游离小孢子培养, 创制了添加甘蓝片段的大白菜 - 甘蓝易位系 A-4。本研究以亲本大白菜 85-1 和 84 株 A-4 自交后代植株为材料, 利用高效液相色谱法测定其硫苷含量, 同时进行 *BrAOP2* qRT-PCR 分析和基因克隆测序, 通过进一步分析不同时期、部位硫苷总含量和各组分含量差异, 揭示 *BrAOP2* 基因对 GRA 含量积累的影响, 旨在为大白菜营养品质改良、高有益硫苷育种提供新种质。

1 材料与方法

1.1 试验材料及取样

本研究以大白菜 - 甘蓝易位系 A-4 自交后代植株 (84 株, 均取样) 和亲本大白菜 85-1 (AA, n=10) (8 株, 3 株取样) 为试材, 两份试材均由河北省蔬菜种质创新与利用重点实验室提供。

于 2021 年 8 月初播种于穴盘中育苗, 当幼苗有 3~5 片真叶时定植在塑料大棚, 整个生长期环境一致, 田间管理精细。为保证植株正常生长和留种, 在莲座期 (9 月 27 日)、结球初期 (10 月 18 日)、收获期 (11 月 4 日) 上午分别选取位置、大小、长势相对一致的叶片取样, 用作硫苷含量测定和基因组 DNA 的提取, 莲座期取样叶片是莲座叶, 结球初期和收获期的取样叶片为球叶、莲座叶。为防止硫苷降解, 用锡箔纸包严后迅速放入液氮中冷冻, 取样后用冻干机真空冷冻干燥, 再用组织研磨仪研磨成粉末备用。同时在结球初期选取位置、大小和长势相对一致的幼嫩叶片取样, 用作 qRT-PCR, 取样部位与硫苷的

样品采集部位一致,用锡箔纸包裹后迅速放入液氮中, -80 ℃保存备用。

1.2 试验方法

1.2.1 HPLC 法分析分离硫苷 硫苷提取参考何洪巨等^[20]的方法,并做部分修改。具体操作如下:准确称取 0.2 g 研磨后的样品粉末于 2 mL 离心管中,同时向管中加入 3 个 2 mm 的小钢珠和 1.5 mL 90% 的甲醇溶液,并迅速加入 100 μ L 5 mmol/L 的内标物苯甲基硫苷 (TRO, glucotropaeolin) 溶液 (源叶, 上海, 中国), 充分震荡混匀, 室温静置 1 h 后, 室温离心 (12000 r/min, 15 min); 称取 0.02 g DEAE-Sephadex A-25 chloride (Merck KGaA, 德国) 装入 96-Well Plates (Merck KGaA, 德国) 中, 并向每一个孔中加入 300 μ L 超纯水, 室温静置 1 h 后, 室温离心 (1000 r/min, 2 min); 从 2 mL 离心管中吸取 150 μ L 的上清液加入离心后的 96-Well Plates 孔中, 室温离心 (290 G/min, 3 min), 弃滤液; 依次加入 150 μ L 90% 的甲醇、150 μ L 超纯水至孔中, 室温离心 (同上), 弃滤液; 最后加入 120 μ L 2 mg/mL 的硫酸酯酶溶液 (Merck KGaA, 德国), 放入暗环境中酶解 16 h 后离心收集提取液。

HPLC 分析: 利用高效液相色谱仪 (Agilent Technologies, 美国), HPLC 分析系统同赵学志等^[21]

的报道。

1.2.2 RNA 的提取和 cDNA 的合成 使用 Eastep® Super 总 RNA 提取试剂盒 (普洛麦格, 上海, 中国) 提取 RNA, 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳和超微量紫外分光光度计检测其纯度和浓度后, 放 -80 ℃保存备用。取 1 μ g RNA 用 EasyScript® One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix 反转录试剂盒 (全式金, 北京, 中国) 合成 cDNA, 放 -20 ℃保存备用。以上操作均按照试剂盒说明书进行。

1.2.3 基因组 DNA 的提取 采用改良十六烷基三甲基溴化铵法提取基因组 DNA, 检测其纯度和浓度后, 放 -20 ℃保存备用。

1.2.4 BrAOP2 基因引物设计 白菜 *BrAOP2* 有 3 个拷贝, 分别是 *BrAOP2.1* (*Bra034180*)、*BrAOP2.2* (*Bra000848*) 和 *BrAOP2.3* (*Bra018521*)^[19]。根据基因之间同源性关系, 利用白菜数据库 (BRAD, <http://brassicadb.cn/#/>) 将 1.5 版本的基因 ID 转换为 3.0 版本, 分别为 *BraA09g001270.3C*、*BraA03g028740.3C* 和 *BraA02g027370.3C*, 同时下载 CDS 序列和基因序列, 用 Primer Premier5 软件设计用于 qRT-PCR 和基因克隆的特异性引物 (表 1)。引物由上海生工生物股份有限公司合成。

表 1 引物信息

Table 1 Primers information

基因名称 Gene name	正向引物序列 (5'-3') Forward primer sequences	反向引物序列 (5'-3') Reverse primer sequences	用途 Usage
<i>actin</i>	ACGTGGACATCAGGAAGGAC	GAACCACCGATCCAGACACT	qRT-PCR 内参基因
<i>BrAOP2.1</i>	TCTCCAGCTCCCAGTCATAGA	GGTCTGAACCGCAAATCAAAAA	qRT-PCR
<i>BrAOP2.2</i>	TCCAGGATGCCAATGTTTT	ATCCTTTCGCTGGTACTCTTG	
<i>BrAOP2.3</i>	GGGTTCAGACAGTACTCCCC	GGAGACACGTTCTCCGTTT	
<i>BrAOP2.1</i>	TAGGTTTTTGCTCCTTTCCCTTTTCATGT	TGATTACAGATGCTAGCTTGAATTAGCTG	基因克隆
<i>BrAOP2.2</i>	CTAATCAAACCTTTTATTTAGTACTATAGAGGT	CAACTTTCCTCCCTTTGTATATTCATAAT	
<i>BrAOP2.3</i>	TCAACTAGTCAAAACCCCTTATTTAGTAGTAC	ACATTTGTAAATGTATTTTGGATTGCA	

1.2.5 BrAOP2 基因 qRT-PCR 分析 以 A-4 自交后代植株和 85-1 为材料, 进行 *BrAOP2* 基因的表达量分析, 选取 *actin* 作为内参基因。反应体系为 20 μ L, 其中 2 \times ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 10 μ L, 正反向引物各 0.4 μ L, 模板 cDNA 2 μ L, 灭菌水 7.2 μ L; 反应程序为: 95 ℃预变性 30 s; 95 ℃变性 10 s, 60 ℃退火 30 s, 共 40 个循环; 65~95 ℃进行反应熔解曲线分析。利用 PCR 仪 (Roche,

瑞士) 进行扩增, 根据熔解曲线确定产物的特异性。

1.2.6 BrAOP2 基因克隆 以 A-4 自交后代植株和 85-1 基因组 DNA 为模板扩增 *BrAOP2*, 反应体系为 25 μ L, 其中 2 \times Gflex PCR Buffer (Mg²⁺, dNTP plus) 12.5 μ L, 正反向引物各 0.5 μ L, 模板 DNA 2.5 μ L, Tks Gflex DNA Polymerase (1.25 U/ μ L) 0.5 μ L, 灭菌水 8.5 μ L; 反应程序为: 94 ℃预变性 5 min; 94 ℃变性 30 s, 53 ℃退火 30 s, 72 ℃延伸 5 min, 共 30 个循环。

利用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物大小,用普通离心柱型胶回收试剂盒(天根,北京,中国)对 PCR 产物进行纯化后,送生工生物股份有限公司进行测序。

1.2.7 数据处理 利用 Excel 分析 A-4 自交后代植株和 85-1 不同时期、部位的硫苷含量,取平均值,并绘制柱形图;采用相对定量法($2^{-\Delta\Delta CT}$ 法)进行基因表达量分析,利用 GraphPad Prism8 绘制柱形图并进行差异显著性分析;利用 DNAMAN 软件对 PCR 产物测序结果进行比对分析,同时利用 SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)对 BrAOP2.1 蛋白质的二级结构进行预测。

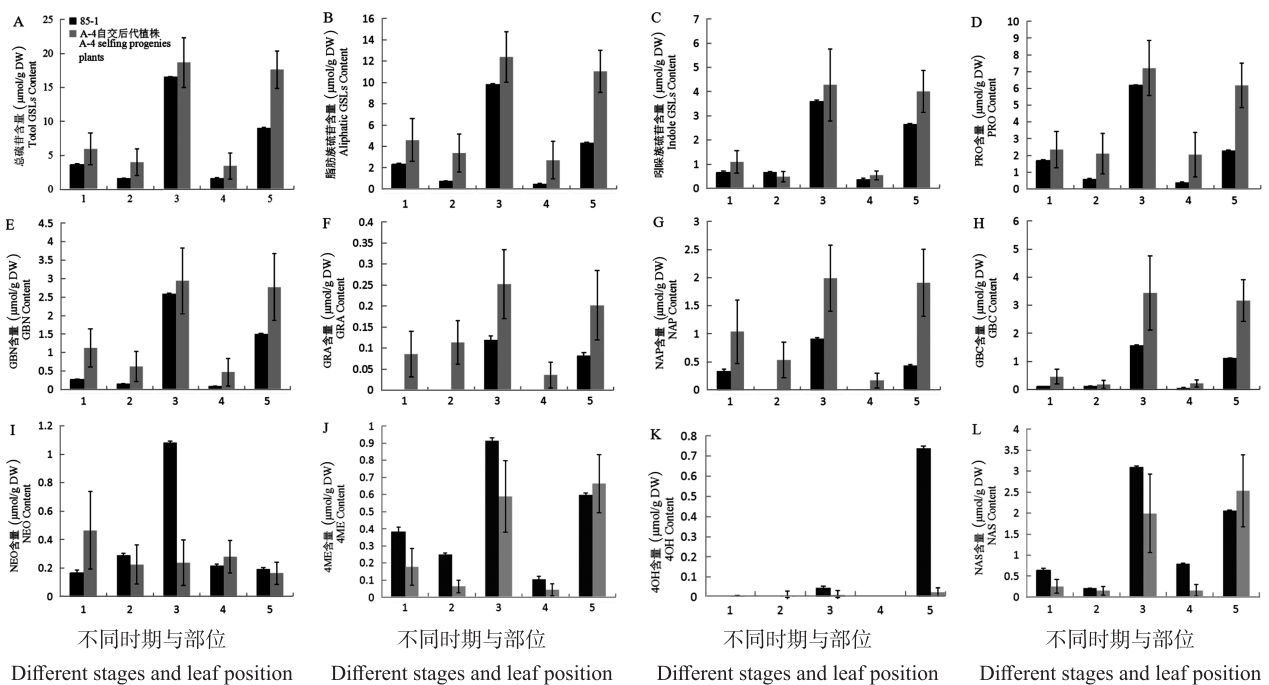
2 结果与分析

2.1 A-4 自交后代与 85-1 植株不同时期、部位的硫苷含量比较分析

为了比较易位系 A-4 自交后代和 85-1 硫苷含量在不同时期、部位中的积累变化,对 85-1 和 A-4 自交后代的 84 株植株进行硫苷含量测定,均检测到 9 种硫苷,包括 4 种脂肪族硫苷:2-羟基-3-丁烯基硫苷(PRO, progoitrin)、4-戊烯基硫苷(GBN, glucobrassicinapin)、GRA 和 NAP;

4 种吲哚族硫苷:3-吲哚基-甲基硫苷(GBC, glucobrassicin)、1-甲氧基-3-吲哚基甲基硫苷(NEO, neoglucobrassicin)、4-甲氧基-3-吲哚基甲基硫苷(4ME, 4-methoxyglucobrassicin)和 4-羟基-3-吲哚基甲基硫苷(4OH, 4-hydroxyglucobrassicin);1 种芳香族硫苷:2-苯乙基硫苷(NAS, gluconasturtin)。

A-4 自交后代植株总硫苷含量、脂肪族硫苷含量在不同时期的球叶和莲座叶中始终高于 85-1,结球初期莲座叶吲哚族硫苷含量低于 85-1,总硫苷含量、脂肪族硫苷和吲哚族硫苷含量均在结球初期球叶中达到最高(图 1A~C)。PRO、GBN、GRA、NAP、GBC 含量与总硫苷含量变化一致(图 1D~H)。除 NEO 含量外,A-4 自交后代植株和 85-1 球叶中的硫苷含量明显高于同时期的莲座叶和莲座期莲座叶。其中 85-1 GRA 含量在莲座叶中均为 0,仅在球叶中检测到较低含量,而 A-4 自交后代植株 GRA 含量在莲座期莲座叶、结球初期莲座叶、结球初期球叶、收获期莲座叶和收获期球叶中的含量分别为 0.086、0.113、0.252、0.036 和 0.202 $\mu\text{mol/g DW}$,均明显高于 85-1。A-4 自交后代植株的吲哚族硫苷 NEO 含量(图 1I)仅在莲座期莲座叶和收获期莲座叶中高于 85-1,A-4 自交后代的 NEO 含量在莲座期莲座叶中较高,而 85-1 在结球初期球叶中



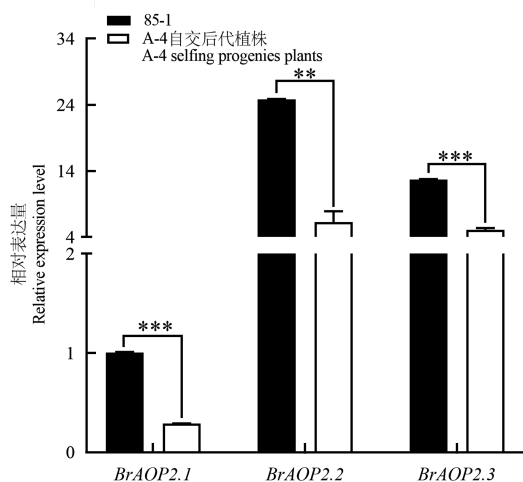
横坐标中的 1、2、3、4 和 5 分别指莲座期莲座叶、结球初期莲座叶、结球初期球叶、收获期莲座叶和收获期球叶
1, 2, 3, 4 and 5 in the horizontal coordinate refer to rosette leaf at rosette stages, rosette leaf at early heading stages, heading leaves at early heading stages, rosette leaf at harvest head and heading leaves at harvest head

图 1 A-4 自交后代植株和 85-1 不同时期、部位硫苷含量比较
Fig.1 Comparison of GSLs content between A-4 selfing progenies plants and 85-1 line at different stages and leaf positions

含量最高;而 4ME(图 1J)仅在收获期球叶中略高于 85-1, A-4 自交后代 4ME 含量在收获期球叶中最高,稍高于结球初期球叶, 85-1 则在结球初期球叶中含量最高; 85-1 和 A-4 自交后代植株 4OH 含量均在收获期球叶中最高(图 1K), NAS 含量分别在结球初期球叶和收获期球叶中最高(图 1L)。

2.2 A-4 自交后代植株与 85-1 *BrAOP2* 的 qRT-PCR 分析

与其他时期相比,结球初期球叶中 GRA 含量较高,因此,选取该时期样品做 qRT-PCR 分析,结果发现:A-4 自交后代植株和 85-1 *BrAOP2* 基因 3 个拷贝的表达量虽然存在差异,表达量关系为 *BrAOP2.2*>*BrAOP2.3*>*BrAOP2.1*,但 A-4 自交后代植株 *BrAOP2* 基因 3 个拷贝的表达量均低于 85-1;其中 A-4 自交后代植株 *BrAOP2.2* 表达量显著低于 85-1 ($P \leq 0.01$), *BrAOP2.3* 和 *BrAOP2.1* 表达量极显著低于 85-1 ($P \leq 0.001$)(图 2)。由此推测, A-4 自交后代植株的 GRA 含量较 85-1 明显升高(图 1F)与 A-4 的 *BrAOP2* 低表达(图 2)有关。



, * 代表在 $P \leq 0.01$ 、 $P \leq 0.001$ 水平上差异显著
 , * means significant difference at $P \leq 0.01$ 、 $P \leq 0.001$ level

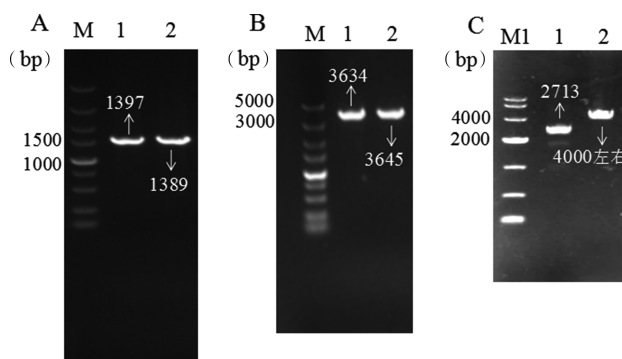
图 2 A-4 自交后代植株和 85-1 结球初期 *BrAOP2* 基因表达量分析

Fig.2 Analysis of *BrAOP2* gene expression between A-4 selfing progenies plants and 85-1 line in heading leaves at early heading stage

2.3 A-4 自交后代植株与 85-1 *BrAOP2* 基因序列克隆与分析

2.3.1 *BrAOP2.1* 序列克隆与分析 以 85-1 和 A-4 自交后代植株基因组 DNA 为模板,进行目的基因 *BrAOP2.1* 的克隆,PCR 产物琼脂糖凝胶电泳

结果显示,得到与目的片段(1616 bp)大小相似的片段(图 3A)。85-1 中目的基因全长为 1397 bp, A-4 自交后代植株为 1389 bp;与 85-1 相比, A-4 自交后代植株中 *BrAOP2.1* 基因在第二外显子存在 8 个 SNP 差异、第一内含子存在 2 个 SNP 差异、第二内含子存在 1 个 SNP 差异和 1 个 8 bp 缺失(图 4)。蛋白序列比对结果发现,外显子的 SNP 差异导致 4 个氨基酸的变化,85-1 中依次是苏氨酸(T)、赖氨酸(K)、苏氨酸(T)和天冬酰胺(N),而 A-4 自交后代植株依次是谷氨酸(E)、精氨酸(R)、丙氨酸(A)和组氨酸(H)(图 5)。可见,85-1 和 A-4 自交后代植株 *BrAOP2.1* 存在 SNP 和 InDel 变异,且外显子 SNP 变异引起了氨基酸序列的改变。



A-C: *BrAOP2.1* (A), *BrAOP2.2* (B), *BrAOP2.3* (C) PCR 产物电泳图;

M: DL-5000; M1: DL-10000; 泳道内模板 1 和 2 分别指 85-1 和 A-4 自交后代植株

A-C: Gel of *BrAOP2.1* (A), *BrAOP2.2* (B), *BrAOP2.3* (C) PCR products; M: DL-5000; M1: DL-10000; Templates 1 and 2 in lanes are 85-1 and A-4 selfing progenies plants, respectively

图 3 A-4 自交后代植株与 85-1 的 *BrAOP2* PCR 产物电泳图
 Fig.3 Gel of *BrAOP2* PCR products between A-4 selfing progenies plants and 85-1

85-1 和 A-4 自交后代植株 *BrAOP2.1* 基因编码氨基酸序列的二级结构预测结果表明, *BrAOP2.1* 二级结构均包含 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角和无规则卷曲四种类型,并且均匀分布在氨基酸残基中;其中,85-1 与 A-4 自交后代植株中 α -螺旋和无规则卷曲所占比例接近,分别为 36.45%、38.63%与 37.38%、40.19%,参与构成的氨基酸数分别为 117、124 与 120、129 个; β -折叠所占比例分别为 17.13%、15.89%,参与构成的氨基酸数分别为 55、51 个; β -转角所占比例最少,分别为 7.79%、6.54%,参与构成的氨基酸数分别为 25、21 个(图 6、图 7)。

85-1 A-4自交后代植株	ATGGATTCAGACTCTCTTCTCTCTTCTGAATCTCTCCAGCTCCGAGTCATAGATTCTCCGACGAGACTTACCAACAGSAGACTCAAGATGGGATAAAGTGAAGCTGATGTCGGT	120 120
85-1 A-4自交后代植株	AAAGCGTTAAGAAGCTACGGCTGTTCCACGATACGTTGACAAAGTGCACACATAGAGCTTGACAGTCTGTTTATGAAGCCATGGAAAGACTTTTATTGTCGCGGTGACGACAAA	240 240
85-1 A-4自交后代植株	CAGAGAAGCGTCTTCCAAACCTTTCATGGGTATCTAAGTACCAAGCTTTTACAGAGTTTAGAATGTGAAGATGCTAAATGTTGCAGAGAAGTCAACGACTTCATTCACCTGCTATGG	360 360
85-1 A-4自交后代植株	CCTGATCATGGAAACAGAGATTATAGctgactcttactcttttggagctctctaaatttaactatgctttttctcaaaaattgtttcttaagaatactatcttttaagtgaatgaataatt	480 480
85-1 A-4自交后代植株	gtaaaattctaaaaatttaactgtgtttatgaaatttaattgataaaaaataagaanaatgtaactcaaaaagataaatacttaataatacaactatctatcttttataatata	600 600
85-1 A-4自交后代植株	tatagagaactctttttctgttgggtcaaaatctgtgatatatttagctcttttaaaatggaggaggtatttatgtctatgatacaactatttggtgatcatttcggttgaaca	720 720
85-1 A-4自交后代植株	tctctcaaatagTGAATGATGCACAGTCTCTCGcCAACTATGTGGAAGCTGGATGATGTGAGAGTAATGATAATGGAGAGTTTGGATGAGAGAAGCTTTCGACGAGACTTAA	840 840
85-1 A-4自交后代植株	TTCTCAAACTATCTCTTTGCAATGATGAAGTACAGCAACTCTCTGATGAGAGTAGAAGAGcCAAGCTcGGTTTACGTTCTCATcGACAGAACAATCATCACCATCTTCATCA	960 960
85-1 A-4自交后代植株	GTATGAGTGTATGcTTGGAATTTATGACCAAGATGGAATATGATCAAGTGAAACCACTCAcATCTTTTCATCATATGTTGGAGAGTCTCTATGTGcgaattctctcaaac	1080 1080
85-1 A-4自交后代植株	tcacacactcgcacacactattaaaacaactactcaattgtttgttgatcgatctcctgcagctctgcagcCAGCTTTTGAATGTAGATTGTATCTCCATACCACGGAGTCATGATGGTG	1200 1200
85-1 A-4自交后代植株	CAAGAAGA CAGGTAATTGACTGCAATGTCTCTGTTCCAAATCAGAGATGTCATAGATTACCTGAAGAGAGTTTGTGACGAAGAAGTCTGATGTCTTCAACCCCTTTGAATATA	1320 1312
85-1 A-4自交后代植株	TGGATTCTCTTAATCTCTTCTCACTCGGAAGCAGGTGCGCAGAGTTGAATCTACTCTCCATGCTTTTTTGCTGCTCTG	1397 1389

大写字母表示外显子,小写字母表示内含子,下同

Uppercase letters denote exons and lowercase letters denote introns, the same as below

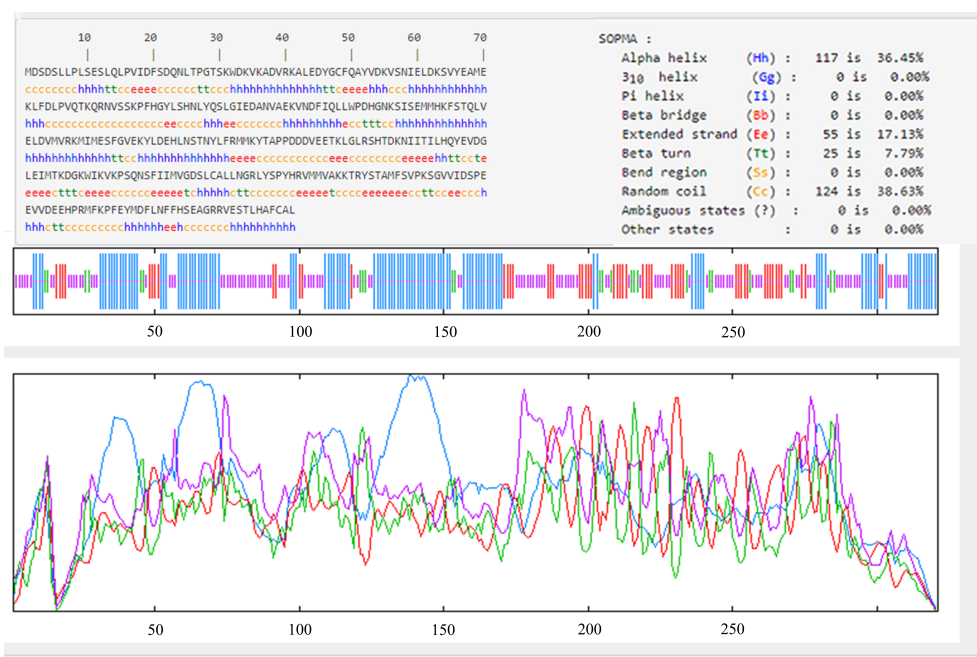
图4 A-4自交后代植株 *BrAOP2.1* 基因与85-1序列比对结果

Fig.4 Results of *BrAOP2.1* sequence alignment between A-4 selfing progenies plants and 85-1

85-1		MSDSILFLSESLQPLWDFSDGLNLTGTSRWRKRVADVRKALEYDFCGAYVIRKSNIELCRSVYAMERLFLFVQTQRQNSKPPFHGYSLNHYLSGLGILCANCAVKNDIFGLML	120
A-4自交后代植株		MSDSILFLSESLQPLWDFSDGLNLTGTSRWRKRVADVRKALEYDFCGAYVIRKSNIELCRSVYAMERLFLFVQTQRQNSKPPFHGYSLNHYLSGLGILCANCAVKNDIFGLML	120
85-1		PRGRNRSITSMHMFSSCLVELLVLDVWRNIMMSESGCYVLELHLSINNVIRKRVKATAPDFDEVEFLGLSHSHTKRIITILLHQVEDVGLGILITFGDGIWKVKESSFSITVNGVSTCA	240
A-4自交后代植株		PRGRNRSITSMHMFSSCLVELLVLDVWRNIMMSESGCYVLELHLSINNVIRKRVKATAPDFDEVEFLGLSHSHTKRIITILLHQVEDVGLGILITFGDGIWKVKESSFSITVNGVSTCA	240
85-1		LNLRLISFYSYHRVWRKARTYSTAMFVSVRSGVVISPELVVEEFLPRMFKFFPYEMGILNFFHSAGARVSTSLHAHCA	320
A-4自交后代植株		LNLRLISFYSYHRVWRKARTYSTAMFVSVRSGVVISPELVVEEFLPRMFKFFPYEMGILNFFHSAGARVSTSLHAHCA	320

图 5 A-4 自交后代植株与 85-1 *BrAOP2.1* 氨基酸序列比对

Fig.5 Comparison of *BrAOP2.1* amino acid sequence between A-4 selfing progenies plants and 85-1



蓝色、红色、绿色和黄色分别代表 α -螺旋、 β 折叠、 β -转角和无规则卷曲,下同

Blue, red, green and yellow represent alpha helix, extended strand, beta turn, random coil respectively, the same as below

图 6 85-1 BrAOP2.1 二级结构预测

Fig.6 Prediction of BrAOP2.1 secondary structure of 85-1

硫苷及其降解产物可以增强植物的抗虫和抗逆性, Hunziker 等^[28]发现植物嫩叶中的总硫苷含量高于老叶, 这符合植物最优防御理论预测。Zhao 等^[29]研究表明卷心菜从外到内 20 个不同叶层的 SIN、PRO、IBE、GBC、4ME 和 NEO 含量逐渐上升。本研究除 NEO 含量外, 其他硫苷组分及总硫苷含量在球叶和莲座叶中的变化均为球叶高于莲座叶, 与上述研究一致。

已有研究表明 *AOP2* 基因是影响 GRA 含量的关键基因, 在青花菜中, 与拟南芥 *AtAOP2* 基因同源的 *BoAOP2* 基因功能失活, 引起 GRA 含量的积累^[30]; 抑制 *BaAOP2* 表达, 会增加芥蓝的 GRA 含量^[31]; 甘蓝有 3 个 *BoAOP2* 拷贝, 其中 2 个由于提前终止失去活性, 导致 GRA 积累^[11]; 白菜的 3 个 *BrAOP2* 拷贝均有催化活性, 导致 GRA 含量很低^[19]; 在甘蓝型油菜中利用 RNAi 下调 *BnAOP2* 的 RNA 表达创制了增加有益硫苷的新种质^[32]。基于上述报道, 本研究对 A-4 自交后代植株和 85-1 进行 *BrAOP2* 基因表达量和序列分析, 结果表明, A-4 自交后代植株 *BrAOP2* 基因表达量显著低于 85-1, 且根据 *BrAOP2.1* 蛋白质二级结构预测结果中 85-1 和易位系材料 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角和无规则卷曲所占比例不同, 推测易位系材料 *BrAOP2.1* 中 4 个氨基酸的变化可能引起蛋白结构的改变, 影响 *BrAOP2.1* 基因的功能; A-4 自交后代植株 *BrAOP2.3* 较 85-1 长 1000 bp, 可能该基因插入了外源甘蓝染色体片段, 或者外源甘蓝对受体基因组的冲击, 造成白菜自身序列重组。可变剪切 (AS, alternative splicing) 可以产生多种功能相似的转录本亚型, 不仅影响基因表达的转录后调控, 也可以增加转录组和蛋白质组的复杂性, 影响植物的生长发育^[33]; A-4 自交后代植株与 85-1 *BrAOP2* 基因序列中的 SNP 和 InDel 变异是否引起可变剪切仍需进一步进行验证。

参考文献

- [1] 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, Chalhou B, Paterson A H. The *Brassica oleracea* genome reveals the asymmetrical evolution of polyploid genomes. *Nature Communications*, 2014, 5 (1): 3930
- [2] 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
- [3] 陈发棣, 陈佩度, 王苏玲. 普通小麦 - 大赖草 - 簇毛麦异附加、易位系的选育和鉴定. 植物学报, 2001, 43 (4): 359-363
Chen F D, Chen P D, Wang S L. Development of wheat-alien lines with added *Leymus racemosus* chromosomes and 6VS/6AL translocation chromosomes. *Acta Botanica Sinica*, 2001, 43 (4): 359-363
- [4] 傅强, 颜辉煌, 胡慧英, 张志涛. 栽培稻与紧穗野生稻回交后代的细胞学与褐飞虱抗性鉴定. 西南农业大学学报, 1998, 20 (5): 12-14
Fu Q, Yan H H, Hu H Y, Zhang Z T. Cytology and brown plant hopper resistance of backcross progenies from *oryza sativa*-*o. eichingeri*. *Journal of Southwest Agricultural University*, 1998, 20 (5): 12-14
- [5] 王莹莹. 陆地棉与澳洲棉异染色体系创制及其黄萎病抗性鉴定. 南京: 南京农业大学, 2018
Wang Y Y. Development of *Gossypium hirsutum*-*g. australe* alien chromosome lines and its evaluation of resistance to *verticillium wilt*. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2018
- [6] 曹清河, 陈劲枫, 钱春桃. 黄瓜抗霜霉病异源易位系 CT-01 的筛选与鉴定. 园艺学报, 2005, 32 (6): 1098-1101
Cao Q H, Chen J F, Qian C T. Identification and characterization of a cucumber alien translocation line CT-01 possessing resistance to downy mildew. *Acta Horticulturae Sinica*, 2005, 32 (6): 1098-1101
- [7] Lysak M A. Chromosome triplication found across the tribe *Brassicaceae*. *Genome Research*, 2005, 15 (4): 516-525
- [8] Halkier B A, Gershenzon J. Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annual Review of Plant Biology*, 2006, 57: 303-333
- [9] Fahey J W, Zalcman A T, Talalay P. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry*, 2001, 56 (1): 5-51
- [10] Clarke D B. Glucosinolates, structures and analysis in food. *Analytical methods*, 2010, 2 (4): 310-325
- [11] Mcnaughton S A, Marks G C. Development of a food composition database for the estimation of dietary intakes of glucosinolates, the biologically active constituents of cruciferous vegetables. *British Journal of Nutrition*, 2003, 90 (3): 687-697
- [12] Ediage E N, Mavungu J, Scippo M L, Schneider Y J, Larondelle Y, Callebaut A, Robbens J, Peteghem C, Saeger S. Screening, identification and quantification of glucosinolates in black radish (*Raphanus sativus* L. *niger*) based dietary supplements using liquid chromatography coupled with a photodiode array and liquid chromatography - mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2011, 1218 (28):

- 4395-4405
- [13] Fahey J W, Wehage S L, Holtzclaw W D, Kensler T W, Egner P A, Shapiro T A, Talalay P. Protection of humans by plant glucosinolates: Efficiency of conversion of glucosinolates to isothiocyanates by the gastrointestinal microflora. *Cancer Prevention Research*, 2012, 5 (4): 603-611
 - [14] Kliebenstein D, Pedersen D, Barker B, Mitchell-Olds T. Comparative analysis of quantitative trait loci controlling glucosinolates, myrosinase and insect resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, 2002, 161 (1): 325-332
 - [15] Jianping C, Georg J, Racki L R, Kim P D, Pierce N E, Ausubel F M. Signals involved in *Arabidopsis* resistance to *Trichoplusia ni* caterpillars induced by virulent and avirulent strains of the phytopathogen *Pseudomonas syringae*. *Plant physiology*, 2002, 129 (2): 551-64
 - [16] 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
 - [17] 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. 武汉: 华中农业大学, 2015
Zhang Y Y. Function analyses of several genes involved in biosynthesis and regulation of glucosinolate in *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana*. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2015
 - [18] 毛舒香, 王军伟, 徐浩然, 邹苗, 黄英娟, 柏艾梅, 王圣泽, 黄科, 吴秋云. 十字花科蔬菜萝卜硫素合成代谢相关基因及外源调控. *中国细胞生物学学报*, 2018, 40 (8): 1415-1423
Mao S X, Wang J W, Xu H R, Zou M, Huang Y J, Bo A M, Wang S Z, Huang K, Wu Q Y. Anabolism relative genes and allogenic material regulation of sulforaphane in cruciferous vegetables. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2018, 40 (8): 1415-1423
 - [19] 张冀芳. 白菜硫甾生物合成关键基因 *BrMAM-3* 和 *BrAOP2* 进化与功能研究. 北京: 中国农业大学, 2015
Zhang J F. The evolution and function analyses of *BrMAM-3* and *BrAOP2* genes involved in glucosinolate biosynthesis in *Brassica rapa*. Beijing: China Agricultural University, 2015
 - [20] 何洪巨, 陈杭, Schnitzler W. 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 (2): 192-197
He H J, Chen H, Schnitzler W. Glucosinolate composition and contents in *Brassica* vegetables. *Scientia Agricultura Sinica*, 2002 (2): 192-197
 - [21] 赵学志, 何洪巨, 刘庞源, 王文琪, 宋曙辉. 芜菁不同生长期硫代葡萄糖苷的变化. *北方园艺*, 2018 (5): 27-32
Zhao X Z, He H J, Liu P Y, Wang W Q, Song S H. Glucosinolates contents in different stages of *Brassica rapa*. *Northern Horticulture*, 2018 (5): 27-32
 - [22] 雷建军, 陈长明, 陈国菊, 曹必好, 邹丽芳, 吴双花, 朱张生. 硫苷及其生物合成分子生物学机理研究进展. *华南农业大学学报*, 2019, 40 (5): 59-70
Lei J J, Chen C M, Chen G J, Cao B H, Zou L F, Wu S H, Zhu Z S. Progress in glucosinolates and its molecular mechanism of biosynthesis. *Journal of South China Agricultural University*, 2019, 40 (5): 59-70
 - [23] 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
 - [24] 汪珊, 康俊根, 冯大领, 卢银, 杨锐, 史凯林, 刘梦洋, 王彦华, 徐东辉, 赵建军. 大白菜和结球甘蓝硫苷及 *MAM* 基因表达分析. *植物遗传资源学报*, 2022, DOI: 10.13430/j.cnki.jpgr.20220219001
Wang S, Kang J G, Feng D L, Lu Y, Yang R, Shi K L, Liu M Y, Wang Y H, Xu D H, Zhao J J. The correlation analysis of glucosinolates content and the *MAM* gene expression in *Brassica rapa* ssp. *pekinensis* and *B. oleracea* var. *capitata*. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2022, DOI: 10.13430/j.cnki.jpgr.20220219001
 - [25] 王音, 冯志威, 葛川, 赵佳佳, 乔玲, 武棒棒, 闫素仙, 郑军, 郑兴卫. 普通小麦 - 六倍体中间偃麦草易位系的抗条锈鉴定及应用评估. *作物学报*, 2021, 47 (8): 1511-1521
Wang Y, Feng Z W, Ge C, Zhao J J, Qiao L, Wu B B, Yan S X, Zheng J, Zheng X W. Identification of seedling resistance to stripe rust in wheat-*Thinopyrum intermedium* translocation line and its potential application in breeding. *Acta Agronomica Sinica*, 2021, 47 (8): 1511-1521
 - [26] 吕婷婷, 张珍悦, 姚晓妮, 张寒冰, 李家创, 刘淑会, 杨群慧, 武军, 陈新宏. 小麦 - 黑麦 1RS-1BS/1BL 小片段易位系抗赤霉病鉴定及分子细胞遗传学分析. *农业生物技术学报*, 2020, 28 (7): 1193-1202
Lv T T, Zhang Z Y, Yao X N, Zhang H B, Li J C, Liu S H, Yang Q H, Wu J, Chen X H. Identification and molecular cytogenetic analysis of Wheat-rye (*Triticum aestivum*-*Secale cereale*) 1RS-1BS/1BL small fragment translocation lines against *Fusarium* head blight. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2020, 28 (7): 1193-1202
 - [27] Zhang L, Li X S, Chang L C, Wang T P, Liang J L, Lin R M, Wu J, Wang X W. Expanding the genetic variation of *Brassica juncea* by introgression of the *Brassica rapa* genome. *Horticulture Research*, 2022, DOI: 10.1093/HR/UHAB054
 - [28] Hunziker P, Lambert S K, Weber K, Crocoll C, Schulz A. Herbivore feeding behavior validates optimal defense theory for specialized metabolites within plants. *Biorxiv*, 2021, DOI: 10.1101/2021.06.27.450062
 - [29] 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
 - [30] Neal C S, Fredericks D P, Griffiths C A, Neale A D. The characterisation of *AOP2*: A gene associated with the biosynthesis of aliphatic alkenyl glucosinolates in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology*, 2010, 10 (1): 170
 - [31] Qian H M, Sun B, Miao H Y, Cai C X, Xu C J, Wang Q M. Variation of glucosinolates and quinone reductase activity among different varieties of Chinese kale and improvement of glucoraphanin by metabolic engineering. *Food Chemistry*, 2015, 168: 321-326
 - [32] Liu Z, Hirani A H, Mcvetty P B, Daayf F, Quiros C F, Li G. Reducing progoitrin and enriching glucoraphanin in *Braassica napus* seeds through silencing of the *GSL-ALK* gene family. *Plant Molecular Biology*, 2012, 79 (1-2): 179-189
 - [33] Reddy A S N, Marquez Y, Kalyna M, Andrea B. Complexity of the alternative splicing landscape in plants. *Plant Cell*, 2013, 25 (10): 3657-3683