

青花菜基因型和环境互作对花球 4-甲基亚磺酰丁基硫苷含量的影响

谢祝捷^{1,*}, 李媛^{1,2}, 姚雪琴¹, 邱海荣^{1,2}

(¹上海农业科学院园艺研究所, 上海市设施园艺技术重点实验室, 上海 201106; ²南京农业大学园艺学院, 南京 210095)

摘要: 为深入了解青花菜基因型、环境及其互作对花球 4-甲基亚磺酰丁基硫苷含量的影响, 分析了生长在 2006—2008 年 3 个不同栽培年度和 2008 年内 3 个不同栽培地点共 5 种不同栽培环境条件下, 11 个基因型青花菜花球的 4-甲基亚磺酰丁基硫苷含量, 基因型、栽培年份、栽培地点等环境因素对 4-甲基亚磺酰丁基硫苷含量的影响及基因与环境互作效应进行了方差分析。结果表明, 在不同环境中, 各参试材料间的 4-甲基亚磺酰丁基硫苷含量均存在差异。同年份不同地点硫苷含量的稳定性普遍较不同年份不同地点的稳定性高。在 3 年内 5 种不同环境条件下, 基因型、地点、年份、基因型与地点互作、基因型与年份互作效应的变异来源分别占总变异的 67.3%、0.8%、0.2%、3.8% 和 1.4%。基因型对青花菜 4-甲基亚磺酰丁基硫苷含量的影响极显著 ($P < 0.01$), 栽培地点的影响及与基因型的互作效应均显著 ($P < 0.05$), 而栽培年份的影响及其相关互作效应均不显著。研究结果为筛选稳定性好的高 4-甲基亚磺酰丁基硫苷含量材料来培育具保健功能的优质青花菜新品种提供了参考。

关键词: 青花菜; 4-甲基亚磺酰丁基硫苷; 基因型; 环境; 互作

中图分类号: S 635

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2010) 04-0625-06

Effects of Genotype, Environment and Interaction on Glucoraphanin Content in Broccoli

XIE Zhu-jie^{1,*}, LI Yuan^{1,2}, YAO Xue-qin¹, and QIU Hai-rong^{1,2}

(¹Horticultural Research Institute, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai Key Laboratory of Protected Horticultural Technology, Shanghai 201106, China; ²College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: In order to understand comprehensively the effects of genotype, environment and their interaction on glucoraphanin content in the florets of broccoli, eleven genotypes broccoli were grown under 5 different culture conditions including the 3 different years from 2006 to 2008 and 3 different locations in 2008. The glucoraphanin contents in the florets of above broccoli materials were determined. The effects of genotype, environment factors including growth years and locations and their interaction on the glucoraphanin contents were statistic analyzed. The results showed that there were genotype difference among tested materials in the glucoraphanin content. On the whole, the glucoraphanin contents were more

收稿日期: 2009-11-30; 修回日期: 2010-03-01

基金项目: 上海市科委科技攻关计划项目 (08DZ1906304, 09391911300)

* E-mail: xiezj8@163.com; Tel: 021-62207986

stable in the same growth year and different location than in the same location and different years. Under the 5 different conditions of three years, the percentage of glucoraphanin content variability attributable to genotype, growth location, growth year, interactions between genotype and location and between genotype and year were 67.3%, 0.8%, 0.2%, 3.8% and 1.4%, respectively. The effects of genotype, growth location and interaction on glucoraphanin content were extremely significant ($P < 0.01$) or significant ($P < 0.05$). The effects of growth year and its related interactions were not significant. The results suggest that the broccoli material with the higher and more stable glucoraphanin content can be selected to develop breeding new cultivars with healthy function feasible.

Key words: broccoli; glucoraphanin; genotype; environment; interaction

大量研究表明,青花菜是十字花科蔬菜中 4-甲基亚磺酰丁基硫苷含量最丰富的蔬菜之一(何洪巨等, 2002; Vallejo et al., 2002; Liang et al., 2006; 邱海荣等, 2008), 4-甲基亚磺酰丁基硫苷含量约占青花菜脂肪族硫苷含量的 80%, 总硫苷含量的 62% (Brown et al., 2002; 谢祝捷等, 2008)。已有研究证实其降解产物——萝卜硫素对人体提高自身防癌能力具有重要作用 (Farnham et al., 2000; Rosa & Rodrigus, 2001)。如何提高青花菜中 4-甲基亚磺酰丁基硫苷含量成为园艺学界关注的热点问题之一。

国外学者对影响青花菜 4-甲基亚磺酰丁基硫苷含量的基因型和环境因素开展了研究 (Shelp et al., 1993; Farnham et al., 2000, 2004; Rosa & Rodrigus, 2001; Brown et al., 2002), 初步表明, 相对于环境因素而言, 基因型对青花菜 4-甲基亚磺酰丁基硫苷含量的影响更加重要。但前人的研究结论或者基于同一年份不同地点的硫苷含量数据, 或者基于同一地域不同年份的数据, 未分析比较不同年份和不同地点的栽培环境的结果。

作者通过比较 2006—2008 年连续 3 个不同栽培年份和 2008 年 3 个不同栽培地点共 5 个不同栽培环境条件下 11 个不同基因型青花菜材料的 4-甲基亚磺酰丁基硫苷的含量, 以及在不同年份、不同地点栽培环境中的稳定性, 旨在分析环境条件对青花菜 4-甲基亚磺酰丁基硫苷含量的影响, 以及基因型与环境的互作效应。

1 材料与方法

1.1 试验材料

11 个青花菜基因型材料: LBS、MTL、LF、241、97-10、SL、S2、S5、S4、16-7-2、SJL, 均为上海市农业科学院园艺研究所从多个不同品种分离出的自交多代纯化系, 2006、2007 年种植在上海市农业科学院国家蔬菜改良上海分中心引种场, 2008 年分别种植在上海市农业科学院闵行区华漕园艺场、上海市农业科学院奉贤区庄行综合试验站及上海市农业科学院国家蔬菜改良上海分中心引种场等 3 个地点。

播种期分别为 2006 年 8 月 9 日, 2007 年 8 月 3 日, 2008 年 8 月 1 日, 苗期 1 个月, 待幼苗具有 5 片真叶后定植。

随机区组设计, 设置 3 次重复, 每个重复种植 15 株, 株行距为 40 cm × 50 cm。花球达到商品成熟(花球直径达到 12 ~ 14 cm)时, 在每个小区每个品种选取生长正常的 3 株植株, 对花球顶部中心直径 3 cm 的相同部位小花和枝梗取鲜样 30 g。样品迅速用液氮冷冻、-80 °C 下保存, 经真空冷冻干燥后粉碎均匀, 置于干燥器中 -20 °C 下保存备用。

1.2 高效液相色谱法分析 4-甲基亚磺酰丁基硫苷

4-甲基亚磺酰丁基硫苷的提取、脱硫及 HPLC 分析按 Magrath 等 (1994)、邱海荣等 (2008) 的方法进行。

精确称取 200 mg 冻干样品至离心管中, 于 75 °C 水浴中保温杀活 1 min, 加入 2 mL 70% 甲醇后于 75 °C 水浴中提取 10 min, 然后加 200 μL 0.6 mol \cdot L⁻¹ 乙酸钡, 在 Sigma 3K30 型高速冷冻离心机 8 000 r \cdot min⁻¹、4 °C 下离心 10 min。转移上清液于刻度试管中并冰浴。沉淀再加入 2 mL 70% 甲醇提取并离心, 重复 3 次。混合上清液, 加入 70% 甲醇定容至 5 mL。同时做一个平行重复, 在样品中加入 100 μL 5 mmol \cdot L⁻¹ 2-丙烯基硫苷 (美国 Sigma-Aldrich 公司) 作为内标, 其它操作同上。

脱硫于醋酸型 DEAE-Sephadex A-25 阴离子交换柱 (瑞典 Amersham Biosciences 公司) 中进行。将 1 mL DEAE-Sephadex A-25 : 2 mol \cdot L⁻¹ 醋酸 (体积比为 1 : 1) 悬浮液倾入 3 mL 的层析柱中, 最终柱床体积为 0.5 mL。向制备好的层析柱 (内径 10 mm, 长度 15 cm; 上海锦华层析设备厂) 中加入 2 mL 6 mol \cdot L⁻¹ 咪唑甲酸, 接着用 2 mL 超纯水清洗两遍。取 2 mL 提取液缓慢流经层析柱, 加入 1 mL 0.1 mol \cdot L⁻¹ 醋酸钠 (pH 4.0) 将层析柱清洗两遍, 去除未结合的物质, 同时也调整了树脂的 pH 值, 有利于脱硫反应的进行。取 100 μL (含 5.0 U) 硫酸酯酶液缓慢流经层析柱, 室温下反应 12 h 后用 1 mL 超纯水洗脱两次。混合洗脱液, 置于 -20 °C 下保存直至 HPLC 分析。

HPLC 分析测定使用美国 Waters 高效液相色谱仪 (2695 型分离单元, 2487 型双波长紫外检测器, 717 自动进样器, Millennium 色谱管理系统)。4-甲基亚磺酰丁基硫苷获得较好分离的最佳色谱条件为: 色谱柱: ProntoSIL ODS2 柱 (250 mm \times 4.0 mm, 5 μm ; Bischoff Germany); 流动相: A (超纯水) 和 B (乙腈); 流速: 1.3 mL \cdot min⁻¹; 检测波长: 229 nm; 柱温: 30 °C; 进样量: 20 μL 。流动相梯度洗脱液时间和组成详见文献 (邱海荣 等, 2008)。

目前能够作商品使用的高纯度硫苷标准品有 2-丙烯基硫苷 (sinigrin) 和苯甲基硫苷 (glucotropaeolin)。有国外文献数据表明, 大多数青花菜品种经测定分析均未检出 2-丙烯基硫苷, 少数的青花菜品种中含有微量 2-丙烯基硫苷, 且其含量远低于萝卜硫苷 (glucoraphanin), 两者差异在 30 ~ 50 倍以上 (Ilona et al., 2004), 故本试验中采用 2-丙烯基硫苷作为内标对结果的可靠性影响很小, 对应内标色谱图和国际标准化组织的 ISO9167-1:1992 (E) 硫苷高效液相色谱测定的标准色谱图, 应用保留时间进行 4-甲基亚磺酰丁基硫苷定性分析, 根据峰面积以及 4-甲基亚磺酰丁基硫苷相对于内标的响应因子进行定量分析 (Farnharm et al., 2000, 2004)。

1.3 数据分析

按同一年 3 个不同地点、3 年同一地点和 3 年 5 个不同环境计算 4-甲基亚磺酰丁基硫苷含量的不稳定参数各品种 4-甲基亚磺酰丁基硫苷含量的变异系数与所有参试品种的平均变异系数的比值。

数据处理分析使用 SPSS11.5 统计软件。

2 结果与分析

2.1 HPLC 分析结果

由图 1 的色谱结果可以看出, 在所设定条件下, 4-甲基亚磺酰丁基硫苷与样品中的其它非目的性成分得到很好地分离, 重现性好, 保证了流出曲线的峰对称性及基线的全分离。内标 2-丙烯基硫苷峰保留时间为 6.324 min, 4-甲基亚磺酰丁基硫苷峰保留时间为 7.005 min。

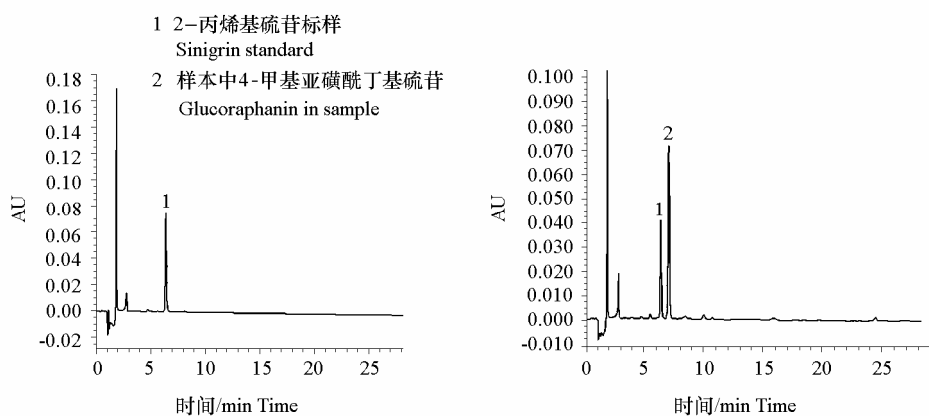


图 1 标样及样品色谱图
Fig. 1 HPLC graph of the standard and the sample

2.2 不同基因型不同环境中 4 - 甲基亚磺酰丁基硫苷含量及稳定性的分析

表 1 为不同基因型青花菜花球在同一年份 3 个不同地点（2008 年华漕园艺场、庄行试验站和中心引种场，下同）、3 年间同一地点（2006—2008 年中心引种场，下同）以及以上 3 年 5 个不同环境（2006—2008 年中心引种场，2008 年华漕园艺场、庄行试验站，下同）中 4 - 甲基亚磺酰丁基硫苷含量的平均值排序及稳定性分析结果，不稳定参数值较高的材料 4 - 甲基亚磺酰丁基硫苷含量稳定性较低。表明，大多数参试材料间 4 - 甲基亚磺酰丁基硫苷含量存在显著的差异，而同一基因型在同一年份 3 个不同地点、3 年间同一地点以及以上 3 年 5 个不同环境中 4 - 甲基亚磺酰丁基硫苷含量平均值的排序变化不大。而在同一年份 3 个不同地点、3 年间同一地点以及在 5 个不同环境中，各参试材料间的 4 - 甲基亚磺酰丁基硫苷含量变化即不稳定参数均存在基因型差异。表 1 中还显示，除 16-7-2 外，其他材料的同年度不同地点硫苷含量的不稳定参数均较不同年度不同地点的不稳定参数低，即稳定性均较高；且除 MTL 外，其他材料的同地点不同年度硫苷含量的不稳定参数均较不同年度不同地点的不稳定参数低，即稳定性均较高。

表 1 11 个青花菜材料 4 - 甲基亚磺酰丁基硫苷平均含量及不稳定参数
Table 1 The glucoraphanin content and non-stability parameter in 11 broccoli genotypes

基因型 Genotype	2008年3个地点 3 locations in 2008		2006—2008同一地点 The same location in 2006—2008		2006—2008年5个不同环境条件 5 conditons in 2006—2008	
	含量平均值/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \text{DW}$) Means	不稳定参数 Non-stability parameter	含量平均值/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \text{DW}$) Means	不稳定参数 Non-stability parameter	含量平均值/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \text{DW}$) Means	不稳定参数 Non-stability parameter
S2	0.437a	0.054	0.750a	0.022	0.309a	0.2
LF	0.460a	0.038	1.597b	0.165	0.671a	12.6
97-10	0.891ab	0.186	1.605b	0.205	0.688a	0.4
16-7-2	0.929ab	9.762	0.700a	0.455	0.922a	0.3
241	0.978ab	0.067	2.745c	0.091	0.870a	0.2
S4	1.199b	0.411	0.883a	0.120	1.288a	0.6
SJL	1.223b	1.235	0.783a	0.135	0.718a	1.6
SL	3.033c	0.697	0.430a	0.414	3.099b	0.7
S5	5.184d	1.770	6.085d	0.275	5.692cd	3.3
MTL	5.280d	0.143	5.212d	0.967	5.183c	0.2
LBS	6.060e	0.807	7.453e	7.450	7.162e	11.8

注：不同字母表示在5%水平上差异显著。
Note: Different letters mean significant differences at 5% level.

2.3 影响青花菜 4 - 甲基亚磺酰丁基硫苷含量的变异来源的方差分析

表 2 为影响青花菜 4 - 甲基亚磺酰丁基硫苷含量的基因型、地点、年份效应及互作效应的方差分析 (F 值) 和相应的变异来源占总变异的百分比例。基因型效应在 3 年 5 个不同环境、3 年同一个地点、同一年 3 个地点的 3 组数据中的 F 值都极显著, 相应的变异来源占总变异的百分比例也均显著; 地点效应及相应的变异来源占总变异的百分比在 3 年 5 个不同环境中显著, 在同一年 3 个地点中极显著; 而年份及与年份相关的互作效应的影响极小, 年份效应及占总变异的百分比仅在 3 年同一个地点中显著, 而基因型 \times 年份、地点 \times 年份及三者间互作效应都不显著; 基因型 \times 地点互作效应及占总变异的百分比在 3 年 5 个不同环境中显著, 同一年 3 个地点中极显著。

表 2 11 个青花菜 4 - 甲基亚磺酰丁基硫苷含量的基因型、地点、年份效应及互作的 F 值分析

Table 2 F value analyzing for the effects of genotype, years location and factors interaction on glucoraphanin contents in 11 broccoli genotypes						
变异来源 Source of variance	3年5个环境条件 5 conditions in 3 years		3年同一地点 1 location in 3 years		2008年3个地点 3 locations in 2008	
	F	%	F	%	F	%
基因型 Genotype	82.197**	67.3**	47.720**	72.6**	204.416**	95.1**
地点 Location	5.198*	0.8*	0		7.148**	0.6**
年份 Year	1.532	0.2	4.450*	1.3*	0	
基因型 \times 地点 Genotype \times Location	3.231*	3.8*	0		3.032**	2.8**
基因型 \times 年份 Genotype \times Year	0.866	1.4	2.868	6.1	0	
地点 \times 年份 Location \times Year	<0.1		0		0	
基因型 \times 地点 \times 年份 Genotype \times Location \times Year	0		0		0	

注: *为 $P<0.05$, **为 $P<0.01$ 。%数值为变异来源占总变异的百分比例。
Note: * $P<0.05$, ** $P<0.01$. %: Percentage of each variance source of total variance accounted.

3 讨论

Shelp 等 (1993) 比较了同一年内安利略湖周围 3 个不同栽培地点的两个早熟青花菜栽培种, 发现基因与环境均对 4 - 甲基亚磺酰丁基硫苷有显著的影响。近年来, Farnharm 等 (2000) 比较了两年间同一地点 9 种青花菜材料, Rosa 和 Rodrigus (2001) 比较了在同一年两种不同栽培季节环境 11 个基因型材料, Brown 等 (2002) 对同一栽培地点 3 年内不同生长季节共 4 种不同环境下生长的 10 种青花菜进行比较分析, Farnham 等 (2004) 对 3 年间生长在同一生长地点的 3 种不同环境条件下的 32 个不同基因型青花菜材料的硫苷进行研究, 以上研究均发现基因型对青花菜 4 - 甲基亚磺酰丁基硫苷的影响超过环境对其的影响。但以上研究或者仅针对同一年份不同地点下的土壤因素或者仅针对同一地点不同年份的气候因素, 而并未将不同年份的气候因素和不同地点的土壤因素结合, 分析和比较影响青花菜 4 - 甲基亚磺酰丁基硫苷含量的具体环境因素。

本研究结果与前人一致, 参试材料中同一种青花菜基因型 4 - 甲基亚磺酰丁基硫苷含量在不同环境中趋于一致。还同时发现: 同年度不同地点硫苷含量的稳定性均较不同年度不同地点的稳定性高, 且同年度不同地点硫苷含量的稳定性排序与不同年度不同地点的稳定性排序相近, 而与不同年度同一地点的稳定性排序有明显差异。比较在同一年份不同地点、不同年份同一地点的 4 - 甲基亚磺酰丁基硫苷的稳定性有助于选择含量稳定性较高的材料。

结果亦表明, 4 - 甲基亚磺酰丁基硫苷含量显著地受到基因型的影响, 其相应的变异来源占总变异的百分比为 67.3%, 大于前人报道的 54.2%(Brown et al., 2002)和 53.8% (Farnham et al., 2004),

而地点、年份及分别与基因型的互作效应分别为 0.8%、0.2%、3.8%和 1.4%，基因型对 4-甲基亚磺酰丁基硫苷的影响远超过地点、年份的影响，与 Brown 等（2002）的环境效应和基因型与环境互作效应很低的结果基本一致或更低，这与试验所用材料及环境的存在差异有关。

研究还表明，在 3 年同一地点下的不同年度气候条件对 4-甲基亚磺酰丁基硫苷含量影响显著；在同一年 3 个地点下的不同地点土壤条件对 4-甲基亚磺酰丁基硫苷含量影响极其显著；且 3 年 5 个不同环境中，地点效应、基因型与地点的互作效应均高于年份效应、基因型与年份的互作效应。因此，在本试验体系中，土壤条件对 4-甲基亚磺酰丁基硫苷含量的影响比气候条件的影响更大。

4-甲基亚磺酰丁基硫苷的水解产物萝卜硫素是最强烈的 Phase II 酶诱导剂，具有很高的抗癌功效。在青花菜整个生育期内人为创造不同温度或湿度等某种或某几种环境因素相对难以控制和实现，尽管本试验中不同基因型与大田环境互作的分析意义有其局限性，但大田条件下不同栽培年份和地点的试验能够比较贴近生产和育种实际（Farnham et al., 2000; Rosa & Rodrigus, 2001; Brown et al., 2002），本研究条件下的多年多点试验结果表明基因型是影响 4-甲基亚磺酰丁基硫苷含量的最重要因素，同时比较 4-甲基亚磺酰丁基硫苷含量在不同地点和不同年份的稳定性，可以选择出高含量的育种材料，并在栽培中调控其含量，从而能将高 4-甲基亚磺酰丁基硫苷含量更加稳定地表达在材料和新品种中。

References

- Brown A F, Yousef G G, Jeffery E H, Klein B P, Wallig M A, Kushad M M. 2002. Glucosinolate profiles in broccoli: Variation in levels and implication in breeding for cancer chemoprotection. *Journal of American Society Horticultural Science*, 127: 807 - 813.
- Farnham M W, Stephenson K K, Fahey J W. 2000. The capacity of broccoli to induce a mammalian chemoprotective enzyme varies among inbred lines. *Journal of American Society Horticultural Science*, 125: 482 - 488.
- Farnham M W, Wilson P E, Stephenson K K. 2004. Genetic and environmental effects on glucosinolate content and chemoprotective potency of broccoli. *Plant Breeding*, 123: 60 - 65.
- He Hong-ju, Chen Hang, Schnitzler W H. 2002. Glucosinolate composition and contents in *Brassica* vegetables. *Scientia Agricultura Sinica*, 35 (2): 192 - 197. (in Chinese)
- 何洪巨, 陈杭, Schnitzler W H. 2002. 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*, 35 (2): 192 - 197.
- Ilona S, Angelika K, Bernhard B. 2004. Genotypic effects on glucosinolates and sensory properties of broccoli and cauliflower, *Food*, 48 (1): 25 - 33.
- Liang H, Yuan Q P, Dong H R, Liu Y M. 2006. Determination of sulforaphane in broccoli and cabbage by high-performance liquid chromatography. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19: 473 - 476.
- Magrath R, Bano F, Morgner M, Parkin I, Sharpe A, Lister C, Dean C, Turner J, Lydiate D, Mithen R. 1994. Genetics of aliphatic glucosinolates. I. side-chain elongation in *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana*. *Heredity*, 72: 290 - 299.
- Qiu Hai-rong, Yao Xue-qin, Xie Zhu-jie, Shi Yuan-ji, Qiao Yong-jin, Wu Zhen. 2008. Determination of glucoraphanin contents in broccoli and cauliflower by reversed-phase HPLC. *Acta Agriculturae Shanghai*, 24 (4): 72 - 74. (in Chinese)
- 邱海荣, 姚雪琴, 谢祝捷, 施元吉, 乔永进, 吴震. 2008. 反相高效液相色谱法检测青花菜和花椰菜中 4-甲基亚磺酰丁基硫苷. *上海农业学报*, 24 (4): 72 - 74.
- Rosa E A S, Rodrigues A S. 2001. Total and individual glucosinolate content in 11 broccoli cultivars grown in early and late seasons. *HortScience*, 36: 56 - 59.
- Shelp B J, Liu L, McLellan D. 1993. Glucosinolate composition of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) grown under various boron treatments at three Ontario sites. *Canada Plant Science*, 73: 885 - 888.
- Vallejo F, Barberan F A T, Viguera C G. 2002. Potential bioactive compounds in health promotion from broccoli cultivars grown in Spain. *Science Food Agriculture*, 82: 1293 - 1297.
- Xie Zhu-jie, Qiu Hai-rong, Yao Xue-qin. 2008. A review of factors that influence the component and content of glucosinolates in the crucifer vegetables // *Advances in crucifer vegetables of China*: Beijing: China Agriculture Science and Technology Press: 55 - 59. (in Chinese)
- 谢祝捷, 邱海荣, 姚雪琴. 2008. 影响十字花科蔬菜中硫代葡萄糖苷组分和含量的因素 // *中国十字花科蔬菜研究进展*. 北京: 中国农业科学技术出版社: 55 - 59.