

甘蓝一代杂种 S 单元型的分布

苗雯雯 田磊 庄木* 刘玉梅 杨丽梅 张杨勇 方智远

(中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

摘要: 利用 *SRK* 基因激酶区的 3 对特异性引物, 对 23 份甘蓝一代杂种进行 PCR 扩增, 经过克隆测序、Blast 分析初步鉴定甘蓝一代杂种的 S 单元型。结果表明: 供试 23 份材料中共出现了 11 个 S 单元型, 分别是 S7、S16、S28、S35、S45、S57、S68 和未知的 Sn 等 8 个 I 类 S 单元型及 S2、S5、S15 等 3 个 II 类 S 单元型。其中, II 类 S 单元型的 S5 出现频率最高, 达到 19.6%; 其次为 I 类 S 单元型的 S28, 达到 17.4%。相比甘蓝类作物中存在的 50 多个 S 单元型而言, 本试验材料涉及的 S 单元型并不多, 预示在遗传育种中利用更多的 S 单元型是十分必要的。

关键词: 甘蓝; S 单元型; 一代杂种; 分布

中图分类号: S635.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-6346 (2013) 10-0023-06

Distribution of S-haplotypes in Cabbage F₁ Hybrid

MIAO Wen-wen, TIAN Lei, ZHUANG Mu*, LIU Yu-mei, YANG Li-mei, ZHANG Yang-yong, FANG Zhi-yuan

(Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: DNA fragments corresponding to kinase domain of S locus kinase (*SRK*) gene were amplified by PCR with 3 pairs of specific primers in all of the 23 cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L.) F₁ hybrids. The S haplotypes of cabbage F₁ hybrid were preliminary identified via DNA sequencing and Blast analysis. The results indicated that 11 S haplotypes were found in cabbage F₁ hybrid, including class I haplotypes, S7, S16, S28, S35, S45, S57, S68 and an unknown one named Sn, and class II haplotypes S2, S5 and S15. The highest frequency of S haplotypes was S5 with 19.6% and followed by S28 with 17.4% in this study. Compared over 50 S haplotypes in *Brassica*, the 11 S haplotypes in cabbage F₁ hybrid suggests that it is very necessary for exploiting more S haplotypes in cabbage breeding programs.

Key words: Cabbage; S haplotype; F₁ hybrid; Distribution

当前, 甘蓝 (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L.) 的商业栽培品种中几乎都是利用自交不亲和系或雄性不育系配制的一代杂种。在甘蓝育种实践中, 一代杂种的结实性对新品种的示范推广进程具有重要的影响, 且与亲本材料的自交不亲和性 (self-incompatibility, SI) 存在着密切的联系。甘蓝属于典型的孢子体型自交不亲和体系, 在遗传上由一个具有多个复等位基因的 S

收稿日期: 2013-03-06; 接受日期: 2013-04-09

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (ICS, CAAS) (1610032011011), 农业部大宗蔬菜产业技术体系项目 (hycytx-35), 农业部园艺作物遗传改良重点开放实验室项目

作者简介: 苗雯雯, 硕士研究生, 专业方向: 蔬菜遗传育种, E-mail: miaowenwen2009@yahoo.cn

* 通讯作者 (Corresponding author): 庄木, 研究员, 硕士生导师, 专业方向: 甘蓝遗传育种及生物技术, E-mail: zhuangmu@caas.cn

位点控制, 又称 S 单元型 (S haplotype) (Nasrallah & Nasrallah, 1993)。目前已鉴定的涉及自交不亲和识别反应的重要 S 基因包括: S 位点糖蛋白基因 (S-locus glycoprotein, *SLG*)、S 位点受体激酶基因 (S-locus receptor kinase, *SRK*)、S 位点富半胱氨酸蛋白基因 (S-locus cysteine-rich protein, *SCR*) 或 S 位点蛋白 11 基因 ((S-locus protein 11, *SP11*)), 其中 *SRK* 是雌蕊柱头中表达的雌性决定因子 (Kusaba et al., 2000), 而 *SCR/SP11* 是花粉中的雄性决定因子 (Schopfer et al., 1999)。在甘蓝类作物 (包括结球甘蓝、羽衣甘蓝、抱子甘蓝、球茎甘蓝、花椰菜等) 中, 前人研究已鉴定出存在 50 多个 S 单元型 (Ockendon, 2000)。明确甘蓝一代杂种中 S 单元型, 有助于了解育成品种中优势 S 单元型的分布, 并可为引入新的 S 单元型以及配制新组合提供参考依据。因此, 在田磊等 (2011) 的研究基础上, 本试验利用一套特异引物对 *SRK* 基因进行 PCR 扩增、克隆测序及 Blast 分析序列信息, 鉴定了 23 份甘蓝一代杂种的 S 单元型, 为甘蓝新品种选育提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为中国农业科学院蔬菜花卉研究所育成的 23 份甘蓝一代杂种, 包括京丰、庆丰等 20 个通过全国 (或北京市) 审定 (或鉴定) 的不同类型的商业品种, 以及 06-28、06-88 等 4 个新组合 (表 1)。所有材料均于 2012 年在本所科研基地种植, 并进行统一的栽培管理。

1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 取适量 (约 2 g) 供试材料幼嫩的叶片, 液氮研磨后利用改良的 CTAB 法 (Doyle & Doyle, 1990) 提取 DNA。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 浓度和纯度; 根据浓度大小分别稀释到 $50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 作为 PCR 扩增的模板。

1.2.2 基因组 DNA 的 PCR 扩增 *SRK* 基因激酶区的 DNA 片段由 I 类特异引物 PK1/PK4 (Nishio et al., 1997) 和 II 类特异引物 KD4/KD7 (Park et al., 2002) 进行扩增; 若这 2 对引物均无目标扩增片段, 则利用 *SRK* 基因激酶区的通用引物 DF/DR 进行扩增 (表 2)。

I 类特异引物 PK1/PK4 扩增片段为 *SRK* 基因激酶区 2~5 外显子序列, II 类特异引物 KD4/KD7 扩增片段为 *SRK* 基因激酶区 4~7 外显子序列, 引物 DF/DR 的扩增片段为 *SRK* 基因激酶区 5~7 外显子序列。

以基因组 DNA 为模板, 利用以上 3 对引物进行 PCR 扩增。PK1/PK4 的 PCR 扩增程序为: 94 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 变性 30 s, 55 ℃ 退火 1 min, 72 ℃ 延伸 1.5 min, 35 个循环; 72 ℃ 延伸 10 min, 4 ℃ 保存。KD4/KD7 的 PCR 扩增程序为: 94 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 变性 30 s, 60 ℃ 退火 1 min, 72 ℃ 延伸 1.5 min, 34 个循环; 72 ℃ 延伸 10 min, 4 ℃ 保存。DF/DR 的 PCR 扩增程序为: 94 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 变性 30 s, 55 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 1 min, 35 个循

表 1 供试甘蓝一代杂种的特征特性

品种名称	栽培类型	球形	叶色	是否通过审定或鉴定
京丰 1 号	春晚熟	扁圆	绿	是
庆丰	春晚熟	近圆	深绿	是
晚丰	秋晚熟	扁圆	灰绿	是
中甘 8 号	秋中早熟	扁圆	灰绿	是
中甘 9 号	秋中熟	扁圆	深绿	是
8398	春早熟	圆	绿	是
中甘 11	春早熟	近圆	深绿	是
中甘 12	春极早熟	近圆	绿	是
中甘 15	春中早熟	近圆	浅绿	是
中甘 17	春早熟	近圆	绿	是
中甘 18	春、秋早熟	圆	深绿	是
中甘 19	秋晚熟	扁圆	深绿	是
中甘 21	春早熟	圆	绿	是
中甘 22	秋中早熟	近圆	绿	是
中甘 23	春中早熟	近圆	绿	是
中甘 25	春中熟	近圆	深绿	是
中甘 96	秋中熟	圆	绿	是
中甘 192	春中早熟	圆	绿	是
中甘 196	春中熟	圆	深绿	是
06-28	春中早熟	近圆	绿	否
06-88	秋早熟	圆	绿	否
06-103	春极早熟	圆	绿	否
08-28	春中早熟	近圆	深绿	否

表 2 *SRK* 基因激酶区特异引物

引物类型	引物名称	引物序列 (5'-3')	T _m 值/℃	参考文献
Class I <i>SRK-K</i>	PK1	CTGCTGATCATGTTCTGCCTCTGG	55	Nishio et al., 1997
	PK4	CAATCCCAAAATCCGAGATCT		
Class II <i>SRK-K</i>	KD4	GAGGGCGAGAAGATCTTAATT	60	Park et al., 2002
	KD7	AAGACKATCATATTACCGAGC		
<i>SRK-K</i>	DF	GGTGTTCGCTCGAGGGCTTTTAT	55	田磊 等, 2011
	DR	CTGCCGCTTTAGGCTGAGGA		

环; 72℃ 延伸 7 min, 4℃ 保存。PCR 扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶中进行电泳, 恒压 130 V。利用紫外凝胶成像仪系统进行拍照。PCR 反应体积为 20 μL: 模板 DNA 4.0 μL, dNTPs (2.5 mmol · L⁻¹) 1.6 μL, 10 × Buffer (含 Mg²⁺) 2.0 μL, *Taq* 酶 (2.5 U · μL⁻¹) 0.4 μL, 上游引物 (5 mmol · L⁻¹) 1.0 μL, 下游引物 (5 mmol · L⁻¹) 1.0 μL, ddH₂O 10 μL。

1.2.3 目的片段的回收克隆及序列分析 利用 EasyPure Quick Gel Extraction Kit (北京全式金生物技术有限公司) 回收目标片段, 连接到 pGEM-T Easy (Promega 公司) 载体上, 4℃ 过夜。连接产物利用 Trans1-T1 Phage Resistant 感受态细胞 (北京全式金生物技术有限公司) 转化, 进行蓝白斑筛选。挑取阳性克隆进行 PCR 扩增鉴定, 每个目标片段的转化样品选 3 个阳性克隆由生工生物工程 (上海) 有限公司测序。利用 DNASTar 软件进行序列拼接后, Blast 以及 BlastX 在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 在线进行, 比对的 Organism 为 *Brassica oleracea* (taxid: 3712)。

2 结果与分析

2.1 甘蓝一代杂种 S 单元型的鉴定

SRK 激酶区引物 PK1/PK4 的扩增片段大小约为 950 bp (图 1), 引物 KD4/KD7 的扩增片段大小约为 1 100 bp (图 2)。PK1/PK4 仅能扩增 I 类甘蓝材料, 在 18 份材料中有目标片段的扩增; KD4/KD7 仅能扩增 II 类甘蓝材料, 在 15 份材料中有目标片段的扩增。因此, 在 23 份供试

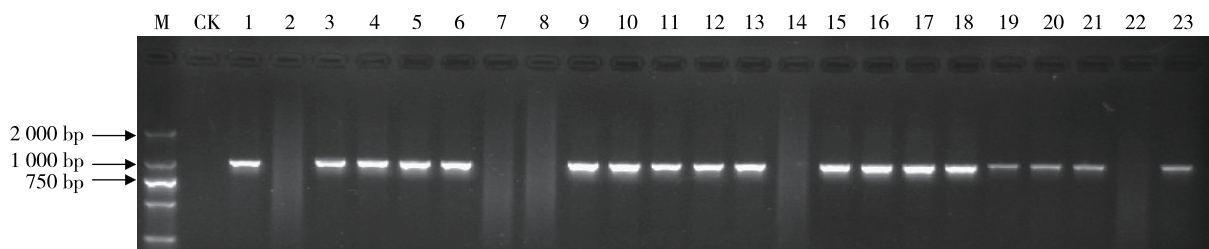


图 1 特异引物 PK1/PK4 的 PCR 扩增结果

M, BM2000 (北京博迈得公司); CK, 负对照; 1~23 分别是京丰 1 号、晚丰、庆丰、中甘 8 号、中甘 9 号、8398、中甘 11、中甘 12、中甘 15、中甘 17、中甘 18、中甘 19、中甘 21、中甘 22、中甘 23、中甘 25、中甘 96、中甘 192、中甘 196、06-28、06-88、06-103、08-28。

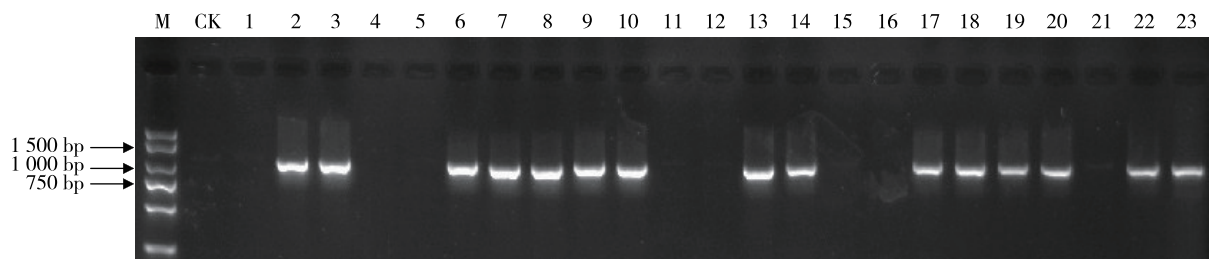


图 2 特异引物 KD4/KD7 的 PCR 扩增结果

M, BM2000+1.5K (北京博迈得公司), CK 与 1~23 同图 1。

甘蓝一代杂种中,初步推断庆丰、中甘 15、8398 等 10 份材料属于 I 类和 II 类杂合体,京丰 1 号、中甘 8 号、中甘 9 号等 8 份材料属于 I 类杂合体,中甘 11、中甘 12、中甘 22 等 5 份材料属于 II 类杂合体。

对于属 I 类和 II 类杂合体的庆丰、中甘 15、8398 等,利用以上两对引物分别扩增出的激酶区片段,进行回收、克隆及测序分析确定其 S 单元型。中甘 15、中甘 17、中甘 21 和 8398 的母本具有相同的来源,它们的 PK1/PK4 扩增片段克隆测序结果完全相同(918 bp),Blast 比对表明,与 *Brassica oleracea* SRK28 基因(GenBank: AB0190355.1)在序列覆盖率为 100% 下核苷酸序列相似性为 100% (E 值为 0)。因此,这 4 份甘蓝一代杂种均含有 S28 单元型。8398 和中甘 21 的父本虽然来源不同,但它们的 KD4/KD7 扩增片段克隆测序结果完全相同(1 043 bp),BlastX 比对表明,可能的氨基酸序列均与 *Brassica oleracea* SRK5 (GenBank: CAB41878.1) 的氨基酸序列相似性为 99% (序列覆盖率 98%, E 值为 0),仅 415~417 bp 处的氨基酸 F (苯丙氨酸) 与 SRK5 蛋白的氨基酸 L (亮氨酸) 不同,二者均属于非极性疏水氨基酸。因此,推测 8398 和中甘 21 含有 S5 单元型。采用同样的方法,鉴定了其余属 I 类和 II 类杂合体的甘蓝品种的 S 单元型(表 3)。其中,庆丰的 PK1/PK4 扩增片段克隆测序未能确定其具体的 I 类 S 单元型,将其暂命名为 S_n。

本试验中,供试甘蓝一代杂种的亲本材料均为高代自交系或雄性不育系,理论上是同一 S 单元型的纯合体,因此,杂种的 S 单元型同时含有双亲的 S 单元型。以上推测在属 I 类和 II 类杂合体的庆丰、中甘 15、8398 等 S 单元型测定中得到验证。对于同属 I 类(或 II 类)杂合类型的材料,扩增条带为单一条带,少量的克隆测序难以区分其中含有不同的 S 单元型,在未知 S 单元型的情况下设计仅扩增杂合体中的每个 I 类 S 单元型的特异引物比较困难。因此 I 类杂合体的京丰 1 号、中甘 8 号等,以及属于 II 类杂合体的中甘 11、中甘 12 等材料,通过对其父、母本纯合体的 S 单元型进行鉴定,推测配制的一代杂种的 S 单元型(表 3)。

晚丰仅在 KD4/KD7 扩增得到目标条带,起初推测其为 II 类杂合体。利用其父母本鉴定其 S 单元型时,首先确定其中一个亲本为 S2,而另一个亲本在 PK1/PK4 和 KD4/KD7 中均没有扩增产物,由此推测可能是该亲本的 S 单元型中 SRK 基因的激酶区不能用以上两对引物扩增得到。因此,利用在 I 类和 II 类 S 单元型中均有扩增产物的引物 DF/DR 进行扩增(图 3),扩增片段大小为 750 bp,测序分析鉴定该材料的 S 单元型为 S68,因此属 I 类和 II 类杂合类型(S68S2)。

2.2 S 单元型在甘蓝一代杂种中的分布

通过序列分析鉴定 S 单元型,供试 23 个甘蓝一代杂种中有 8 个 I 类 S 单元型 S7、S16、S28、S35、S45、S57、S68 和未知的 S_n, II 类 S 单元型有 S2、S5、S15。其中 I 类和 II 类杂合

表 3 23 个甘蓝一代杂种 S 单元型的鉴定结果

品种	S 单元型	杂合类型
京丰 1 号	S16S _n	I 类
晚丰	S68S2	I 类和 II 类
庆丰	S15S _n	I 类和 II 类
中甘 8 号	S68S7	I 类
中甘 9 号	S68S45	I 类
8398	S28S5	I 类和 II 类
中甘 11	S2S15	II 类
中甘 12	S2S5	II 类
中甘 15	S28S2	I 类和 II 类
中甘 17	S28S2	I 类和 II 类
中甘 18	S28S57	I 类
中甘 19	S68S35	I 类
中甘 21	S28S5	I 类和 II 类
中甘 22	S15S5	II 类
中甘 23	S28S7	I 类
中甘 25	S28S7	I 类
中甘 96	S15S57	I 类和 II 类
中甘 192	S5S7	I 类和 II 类
中甘 196	S5S7	I 类和 II 类
06-28	S5S28	I 类和 II 类
06-88	S57S57	I 类
06-103	S2S5	II 类
08-28	S5S57	I 类和 II 类

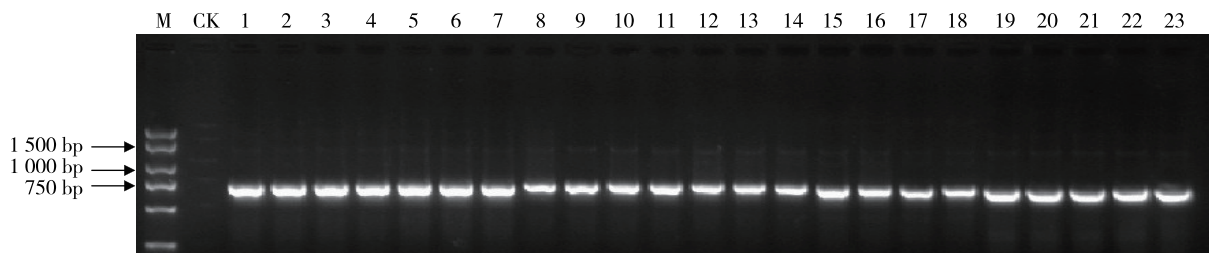


图 3 利用特异引物 DF/DR 对甘蓝一代杂种的 PCR 扩增

M, BM2000+1.5K (北京博迈得公司), CK 与 1~23 同图 1。

体所占的比例最大, 约占 47.8%; 其次为 I 类杂合体, 约占 34.8%; 而 II 类杂合体, 约占 17.4%。S 单元型中出现频率最高的是 II 类的 S5, 达到 19.6%; 其次为 I 类的 S28, 约占 17.4%。由此可知, II 类 S5 单元型是组成供试甘蓝一代杂种的主要 S 单元型, 这可能与骨干亲本的应用频率较高有关。总体来说, 与甘蓝类作物已鉴定的 50 多个 S 单元型相比, 供试品种中出现的 S 单元型的数目不多, 为了避免配制的杂交组合出现杂交不结实现象, 在今后的甘蓝遗传育种中引进和利用更多的 S 单元型是十分重要的。

表 4 23 个甘蓝一代杂种 S 单元型的分布

S 单元型	类型	S 单元型的数量	比例/%
S2	II 类	6	13.0
S5	II 类	9	19.6
S7	I 类	5	10.9
S15	II 类	4	8.7
S16	I 类	1	2.2
S28	I 类	8	17.4
S35	I 类	1	2.2
S45	I 类	1	2.2
S57	I 类	5	10.9
S68	I 类	4	8.7
Sn	I 类	2	4.3

3 结论与讨论

在本试验中, 根据庆丰的 PK1/PK4 扩增片段序列未能确定该品种的 I 类 S 单元型 (序列已登录到 GenBank: JX840774), 表明该 S 单元型 (暂命名为 Sn) 可能是已鉴定的 S 单元型中未公开序列的, 也可能是甘蓝中尚未被鉴定的新 S 单元型, 进一步测定其 *SRK* 的 S 区、*SCR*/*SP11*、*SLG* 等基因序列的分析鉴定工作正在进行中。

本试验中, 大部分甘蓝一代杂种的亲本为自交不亲和系, 如中甘 18, 其亲本为 S28 和 S57, 都属于 I 类 S 单元型, 表现为强自交不亲和性; 而有的亲本材料则为自交亲和系, 如中甘 21 的父本, 属于 II 类的 S5 单元型, 表现为强自交亲和性。以上结果验证了 I 类 S 单元型具有较强的 SI 性, 而 II 类 S 单元型的 SI 性相对较弱, 与 Ockendon (1982) 提出的甘蓝中 S5 和 S15 纯合体的自交不亲和性更弱, 更容易出现自交亲和材料的结论基本一致。

在选育甘蓝自交系时, 需要经过自交分离以及定向选择的过程, 自交多代后才能获得具有稳定的、优良性状的自交系, 这就容易造成一些 S 单元型的丢失。方智远等 (1983) 利用花期杂交授粉的方法研究金早生、黑叶小平头等 15 份自交不亲和系间的亲和关系, 指出这 15 份材料中涉及到 13 个不同的 S 单元型。Ockendon (1982) 利用荧光显微法对 197 份甘蓝类材料 (包括紫甘蓝、皱叶甘蓝) 的 S 单元型进行鉴定, 共发现了 31 个 S 单元型, 其中在甘蓝中发现了 21 个 S 单元型。Sakamoto 等 (2000) 对 31 个甘蓝一代杂种的 *SLG* 基因进行 PCR-RFLP 分析, 鉴定出 15 个 S 单元型, 但比 Ockendon (1982) 多了 4 个新的 S 单元型 (S33、S35、S51、S57)。在甘蓝类作物中已鉴定出的 S 单元型有 50 多个, 而甘蓝栽培品种中仅约占一半, 表明在甘蓝栽培品种的选育过程中 S 单元型的丢失十分严重。本试验中甘蓝一代杂种中涉及的 S 单元型仅有 11 个, 可能与在培育新品种时利用骨干亲本的频率比其他材料的频率高有关。育种材料中 S 单

元型类型少,会增加配制杂种的亲本间杂交不亲和的发生频率。06-88是由两个来源不同的优良高代自交不亲和系配制而成的优良品种,但在利用蜜蜂繁殖一代杂种时结实率很低,致使繁种不成功。本试验中S单元型鉴定结果揭示,这是由于双亲S单元型相同引起的严重杂交不亲和所致。因此,开展甘蓝材料的S单元型鉴定研究,并在今后的甘蓝遗传育种中引进和利用更多的S单元型是十分重要的。

参考文献

- 方智远,孙培田,刘玉梅. 1983. 甘蓝杂种优势利用和自交不亲和系选育的几个问题. 中国农业科学, (3): 51-62.
- 田磊,庄木,刘玉梅,杨丽梅,张扬勇,方智远. 2011. 两个甘蓝自交系自交不亲和S单元型的初步鉴定. 中国蔬菜, (4): 8-12.
- Doyle J J, Doyle J L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, 12: 13-15.
- Kusaba M, Matsushita M, Okazaki K, Satta Y, Nishio T. 2000. Sequence and structural diversity of the S locus genes from different lines with the same self-recognition specificities in *Brassica oleracea*. Genetics, 154: 413-420.
- Nasrallah J B, Nasrallah M E. 1993. Pollen-stigma signalling in the sporophytic self-incompatibility response. Plant Cell, 5: 1325-1335.
- Nishio T, Kusaba M, Sakamoto K, Ockendon D J. 1997. Polymorphism of the kinase domain of the S-locus receptor kinase gene (*SRK*) in *Brassica oleracea* L. Theoretical and Applied Genetics, 95: 335-342.
- Ockendon D J. 1982. An S-allele survey of cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*). Euphytica, 31: 325-331.
- Ockendon D J. 2000. The S-allele collection of *Brassica oleracea*. Acta Horticultural, 539: 25-30.
- Park J I, Lee S S, Watanabe M, Takahata Y, Nou I S. 2002. Identification of S-alleles using polymerase chain reaction-cleaved amplified polymorphic sequence of the S-locus receptor kinase in inbreeding lines of *Brassica oleracea*. Plant Breeding, 121: 192-197.
- Sakamoto K, Kusaba M, Nishio T. 2000. Single-seed PCR-RFLP analysis for the identification of S haplotypes in commercial F₁ hybrid cultivars of broccoli and cabbage. Plant Cell Reports, 19: 400-406.
- Schopfer C R, Nasrallah M E, Nasrallah J B. 1999. The male determinant of self-incompatibility in *Brassica*. Science, 286: 1697-1700.

《中国蔬菜》参考文献著录格式

著录采用著者-出版年编码制,按GB/T 7714—2005要求列出各项,文献的作者全部著录,一律姓在前,名在后。西文或俄文等作者姓的首字母大写,名可缩写为首字母(大写)。如为译文,则作者处著录原作者姓名,译者姓名置于题名或书名之后。专著的出版地不详时要注明“〔出版地不详〕”或“〔S. l.〕”;出版者不详时应注明“〔出版者不详〕”或“〔s. n.〕”,但不能同时出现。页码应著录引文所在的起止页码。

期刊的著录格式: 王玉峰. 2007. VA菌根真菌在马铃薯上的应用效果. 中国蔬菜, (2): 30-31.

van Doorn W G. 2003. Flower opening and closure: a review. Journal of Experimental Botany, 54: 1801-1812.

专著的著录格式: Krumbein A, Schonhof I. 2001. Influence of temperature and irradiation on glucosinolates in broccoli heads//Pfannhauser W, Fenwick G R, Khokhar S. Biologically-active phytochemicals in food. Cambridge: Royal Society of Chemistry: 477-479.

论文集的著录格式: Restaino F, Perrone D, Correale A. 1998. New parthenocarpic genotypes of eggplant suitable for greenhouse cultivation//Palloix A, Daunay M C. Xth Meeting on Genetics and Breeding of *Capsicum* and Eggplant. Paris: INRA Paris: 273.

学位论文的著录格式: 陈新娟. 2006. 中国芸薹属蔬菜硫代葡萄糖苷及其影响因子研究〔博士论文〕. 杭州: 浙江大学.