



## 研究报告

## Research Report

# 白菜类蔬菜 Chs 基因克隆及分析

熊正贵<sup>2</sup>, 姚启伦<sup>1</sup>, 方平<sup>1</sup>, 敖向建<sup>1</sup>, 陈发波<sup>1</sup>

1 长江师范学院生命科学与技术学院, 重庆, 408100;

2 重庆市黔江区种子管理站, 黔江, 409000

✉ 通讯作者, [chenfabo963@126.com](mailto:chenfabo963@126.com); ✉ 作者

分子植物育种, 2016年, 第14卷, 第11篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2016.14.00011

这是一篇采用 Creative Commons Attribution License 进行授权的开放取阅论文。只要对本原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

引用格式(中文):

熊正贵等, 2016, 白菜类蔬菜 Chs 基因克隆及分析, 分子植物育种(online), 14(11): 1072-1079 (doi: 10.5376/mpb.cn.2016.14.00011)

引用格式(英文):

Xiong et al., 2016, Effects of  $\gamma$  Ray Irradiation with Different Dosages on Strawberry Seeds and their Genetic Diversity Revealed by ISSR, Fenzi Zhiwu Yuzhong (online) (Molecular Plant Breeding), 14(11): 1072-1079 (doi: 10.5376/mpb.cn.2016.14.0011)

**摘要** 为探讨我国白菜蔬菜的起源及遗传多样性, 克隆、测序白菜类蔬菜不同变种的 Chs 基因序列。结果表明, 白菜类蔬菜 Chs 基因序列没有大于 3 bp 的插入/缺失, 白菜类蔬菜 Chs 基因是一个非常保守的基因, 揭示出白菜类蔬菜之间遗传差异较小, 亲缘关系较近。系统发育树将白菜类蔬菜分成 2 个分支: 第 1 分支包括山东白菜、塌棵菜、雅安白菜、紫菜苔、重庆白菜和伊犁野生油菜, 相对较进化; 第 2 分支包括广西菜心、青菜、雅安黄油菜、芜菁和涪陵野生油菜, 相对较原始。网状支系分析没有显示明显的星状结构, 说明所选材料中没有白菜类蔬菜进化的共同祖先。网状进化式样分析表明供试的白菜类蔬菜间不仅存在树状的进化关系, 还存在大量的非树状进化史。研究结果支持白菜起源的“分化起源”假说, 认为现代栽培的白菜类蔬菜是由更加原始的祖先进化而来, 在白菜类蔬菜进化史上存在较多的网状进化事件。

**关键词** 白菜类蔬菜, Chs 基因, 遗传多样性

## Cloning and Analysis of Chs Gene in Cabbage (*Brassica rapa*) Vegetables

Xiong Zhenggui<sup>2</sup>, Yao Qilun<sup>1</sup>, Fang Ping<sup>1</sup>, Ao Xiangjian<sup>1</sup>, Chen Fabo<sup>1</sup>

1 Life Science and Technology Institute, Yangtze Normal University, Chongqing, 408100;

2 Seed Administrative Station of Qianjiang District, Chongqing, 408100

✉ Corresponding author, [chenfabo963@126.com](mailto:chenfabo963@126.com); ✉ Authors

**Abstract** To explore the DNA polymorphism and evolution of Chs genes in Chinese cabbage vegetables, the Chs DNA sequences from Brassica were cloned and sequenced. By aligning these sequences and analyzing DNA variations in Chs loci, no insertion/deletion more than 3 bp occurred in the Chs sequences, indicating a low level of DNA polymorphism in Chinese *B. rapa* vegetables. A maximum likelihood analysis showed that the *B. rapa* sequences were separated into two well-supported groups. Clade one included Shandong Chinese cabbage, broadbeaked mustard, Yaan Chinese cabbage, purplepakchoi, Chongqing Chinese cabbage, and Yili wild rapeseed, which were more evolutionary. Clade two included Guangxi flowering cabbage, pakchoi, Yaan Yellow rapeseed, turnip, and Fuling wild rapeseed, which were ancestral types. Median-joining (MJ) network analysis showed that no obvious star like structure was found. It indicated that no common ancestor was found among the *B. rapa*. A Splits Tree analysis indicated that both tree and reticulate evolution existed among Chinese *B. rapa* and its related plants. This supported the evolution hypothesis of “Differentiation Origin” model in Chinese cabbage. The modern Chinese cabbage vegetables were evolved from more primitive ancestors. Many reticulate evolution events occurred during the evolutionary of Chinese cabbage vegetables.

**Keywords** Cabbage vegetables, Chs gene, Genetic diversity

收稿日期: 2016年04月22日

接受日期: 2016年05月24日

发表日期: 2016年05月27日

基金项目: 本研究由教育部科技司资助项目(Z2011143)、重庆高校创新团队建设计划资助项目(KJTD20132)、重庆市教委资助项目(KJ121304)和重庆市涪陵区科委计划资助项目(FLKJ, 2012ABB1085)共同资助。

## 研究背景

基白菜类蔬菜是十字花科(Brassicaceae)芸薹属(*Brassica*)植物中重要的蔬菜作物, 是人们所需营养的重要来源之一, 其栽培面积居中国各类蔬菜之首, 在蔬菜周年生产和供应上有着极其重要的地位, 在全国蔬菜年供应量中达到了 30% (张德双等, 2015)。中国是白菜类蔬菜的起源及分化中心之一,



在长期的栽培驯化中形成了很多亚种或变种, 主要包括白菜、塌棵菜、紫菜苔、油菜、菜心、青菜和芜菁等(郭晶心等, 2002; 林建丽等, 2008)。为了满足市场对白菜类蔬菜日益增长的需求, 如何有效利用我国丰富的白菜类蔬菜种质资源, 优化其种质资源、提高白菜类蔬菜的产量成为科研工作者研究的热点。从分子水平探究白菜类蔬菜的起源、进化及遗传多样性, 不仅可以为白菜类蔬菜的保护与利用提供依据, 还可以为芸薹属蔬菜间远缘杂交创制白菜类蔬菜新材料提供指导。孙德岭等(2001)和郭晶心等(2002)分别利用 AFLP 标记分析了不同白菜类蔬菜品种之间的分类关系, 均认为芜菁与其他白菜类蔬菜遗传距离较远。何余堂等(2003)研究认为北方小油菜较南方油白菜原始, 冬油菜较春油菜原始, 关中蔓菁较北方小油菜原始。宋顺华等(2006)利用 RAPD 标记将 64 份大白菜资源分为 6 个类群, 小白菜和芜菁各分成 1 类。基于 RAPD 分子标记, 林建丽等(2008)将白菜类蔬菜分成 2 类 10 组, 认为应将白菜和芜菁作为白菜类蔬菜的两个亚种, 大白菜为白菜的一个变种。刘冬媛等(2014)利用 SSR 标记将 191 份不结球白菜分成 6 类, 聚类结果与材料地理来源密切相关。方彦等(2015)利用 SSR 和 InDel 标记将 19 份白菜型油菜分成 2 大类群、4 个小群。马晓静等(2015)利用 SSR 分子标记分析了来自中国和日本的 20 个青菜品种间的亲缘关系, 将 20 个青菜品种可分为 3 大类。但尚未见白菜类蔬菜起源进化及遗传多样性的分子系统学研究。

查尔酮合成酶基因(*Chs*)是单拷贝核基因, 是植物类黄酮物质合成的第一个关键性基因, 查尔酮合成酶在植物花粉育性、生长素运输、UV 防护、抗病机制等方面有着十分重要的作用。植物的基因组中都有 *Chs* 基因, 现认为在陆生植物中最早出现 *Chs* 基因。自第一个荷兰芹的 *Chs* 序列被发表后, 科研工作者已经陆续在多种植物中发现并克隆了 *Chs* 基因, 如玉米、矮牵牛、兰花、金鱼草、拟南芥、大豆和松树等(张必弦等, 2012)。Zhang 等(2010)利用 *Chs* 基因分析了十字花科 60 个属 106 个种之间的系统关系, 基于 ML 系统发育树的聚类结果能将十字花科不同种较好的区分开。本研究通过对中国白菜类蔬菜 *Chs* 基因的克隆、测序, 分析 *Chs* 基因的遗传多态性, 研究白菜类蔬菜不同变种间的分子系统发育关系, 为白菜类蔬菜的起源进化提供分子证据, 为白菜类蔬菜远缘杂交及品种改良提供依据。

## 1 结果与分析

### 1.1 *Chs* 基因序列多态性分析

将获得 16 份 *Chs* 基因进行比对, 结果表明白菜类蔬菜 *Chs* 序列长度变异范围为 1 203~1 477 bp,

平均长度为 1 433 bp。*Chs* 基因序列排序后, 共得到 1 504 个排列位点, 其中保守位点 1 246 个, 占 82.84%, 可变位点 236 个, 占 15.69%, 简约信息位点 100 个, 占 6.64%。序列比对分析表明(图 1), 黑芥在 1 004~1 007 bp 处、1 374~1377 bp 处分别发生了 3 bp (AAA)和 3 bp (CGA)的插入, 在 1 297~1 303 bp 处发生 6 bp (AGTTAC)缺失; 涪陵红心萝卜和胭脂萝卜在 995~1 000 bp、1 037~1 042 bp 处分别发生了 5 bp (TATTA)和 5 bp (CAAAT)的插入, 在 1 341~1 351 bp 处发生 10 bp (TGTGTATATA)缺失; 胭脂萝卜在 1 009~1 018 bp 处和 1 020~1 023 bp 处发生了变异; 山东甘蓝在 1 310~1 328 bp 处发生 18 bp (TGATCAATGCGTGACTTT)缺失。

### 1.2 系统发育树分析

采用最大似然法(ML)构建系统发育树, 其中 4 种碱基频率为: A 为 23.78%, T 为 24.11%, C 为 25.05%, G 为 27.05%, 似然值为-2832.654,  $\gamma$  形值 (gamma shape parameter)为 0.06321。将 18 个 *Chs* 基因序列成 4 个分支(图 2)。其中 EF408922.1 为 A 基因组(*B. rapa*)序列, GB983033.1 为 B 基因组(*B. nigra*)序列, 均从 NCBI 网站下载。R 分支为外类群萝卜属不同种。A、B 和 C 分支为芸薹属植物, 其中 B 分支为黑芥(*B. nigra*), C 分支为甘蓝(*B. oleracea*), B、C 分支为白菜类蔬菜的近缘植物。A 分支为不同类型的白菜类(*B. rapa*)蔬菜。A 分支可分为 A1 和 A2 两个亚支, A1 分支又可分为 a 和 b 两个支系, a 支系包括山东白菜、序列 EF408922.1、塌棵菜、雅安白菜和紫菜苔, b 支系包括重庆白菜和伊犁野生油菜; A2 分支分为 c 和 d 两个支系, c 支系只包括广西菜心, d 支系包括青菜、雅安黄油菜、芜菁和涪陵野生油菜。结果表明, 不同基因组 *Chs* 序列能较好聚在一起, 但同一基因组内变种间有相近的遗传关系, 多数变种聚居在同一支系, 不同白菜类蔬菜间的亲缘关系较近。

### 1.3 系统发育网络分析

用 Splitstree 4 软件, 采用二分裂法, 构建白菜类蔬菜不同变种、近缘植物和外类群萝卜属的网状进化式样。可将 18 个 *Chs* 基因序列分成 4 个明显的分支。A1 和 A2 分支全为 A 基因组 *Chs* 序列, A1 分支包括雅安白菜、重庆白菜、山东白菜、塌棵菜、青菜和涪陵野生油菜, A2 分支包括广西菜心、芜菁、雅安黄油菜、紫菜苔和伊犁野生油菜。B 分支包括黑芥和序列 GQ983033.1, R 分支包括涪陵红心萝卜和胭脂萝卜。聚类结果与系统发育树的聚类结果基本一致。除了支状的进化关系外, 不同白菜类蔬菜变种间还存在大量的网状进化关系, 在白菜类蔬菜栽培、驯化中存在较多的杂交事件(图 3)。

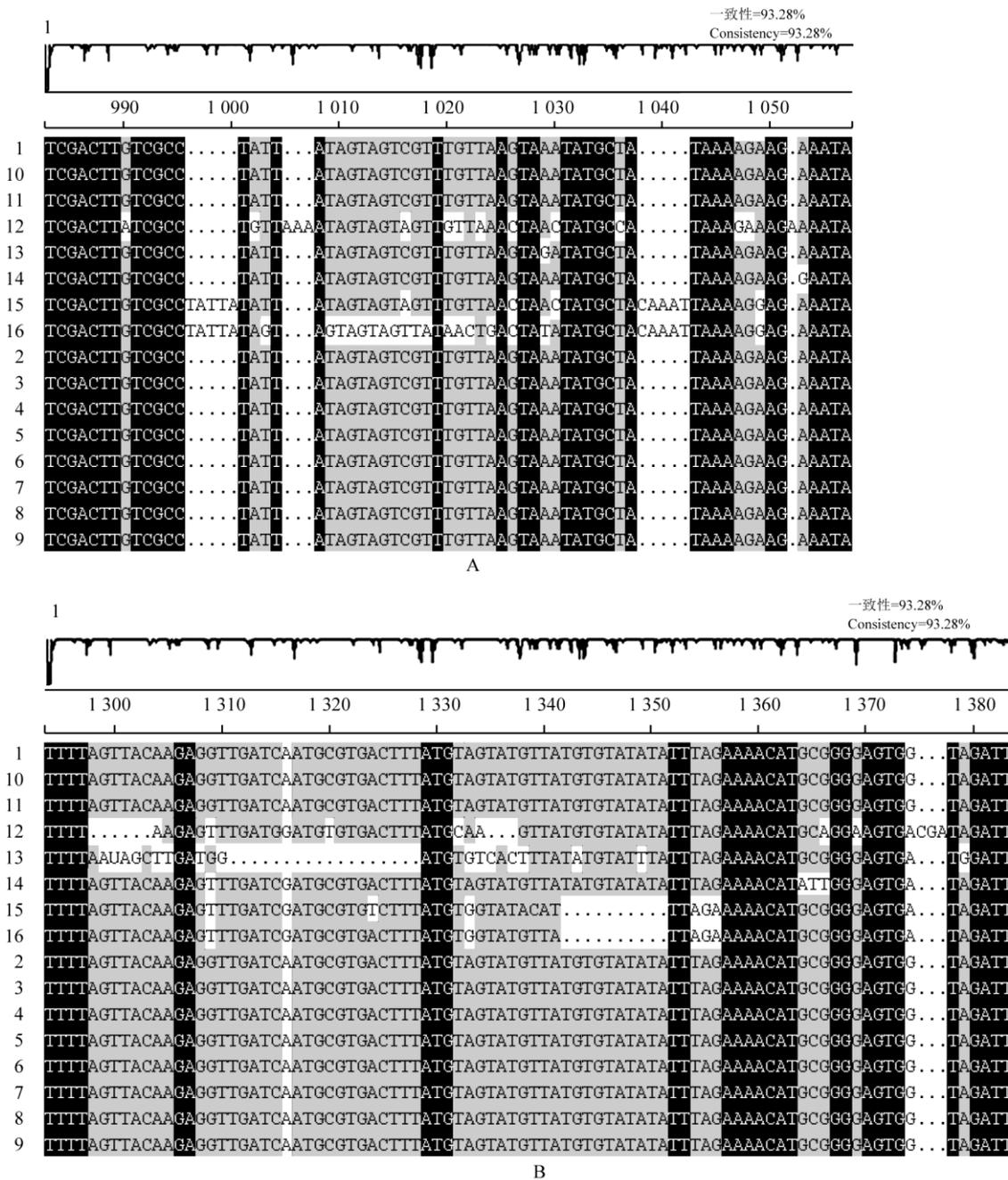


图 1 *Chs* 基因序列对比部分分析

注: A: 发生在 996~1 054 bp 之间的插入/缺失; B: 发生在 1 297~1 378 bp 之间的插入/缺失

Figure 1 Partial analysis of the *Chs* sequences comparison

Note: A. The insertion/deletion occurred at 996~1 054 bp; B: The insertion/deletion occurred at 1 297~1 378 bp

#### 1.4 网状进化关系分析

白菜类蔬菜 *Chs* 基因序列网状结构显示了 4 个主要的分支(图 4), R 分支为外类群萝卜属, B 和 C 分支为白菜类蔬菜近缘植物, A 分支全为白菜类蔬菜。A 分支可分为 A1、A2 两个亚支, A1 亚支包括广西菜心、青菜、雅安黄油菜、芜菁和涪陵野生油菜, A2 亚支包括山东白菜、塌棵菜、雅安白菜、紫菜苔、重庆白菜和伊犁野生油菜。A1 亚

支中的白菜类蔬菜亲缘之间关系较近, A2 亚支中除了标准序列 EF408922.1 之外, 其它品种之间亲缘关系较近。

## 2 讨论

### 2.1 白菜类蔬菜遗传多样性评价

育种材料的遗传多样性是育种者较关心的问题, 丰富的遗传多样性意味着在在品种改良和选育

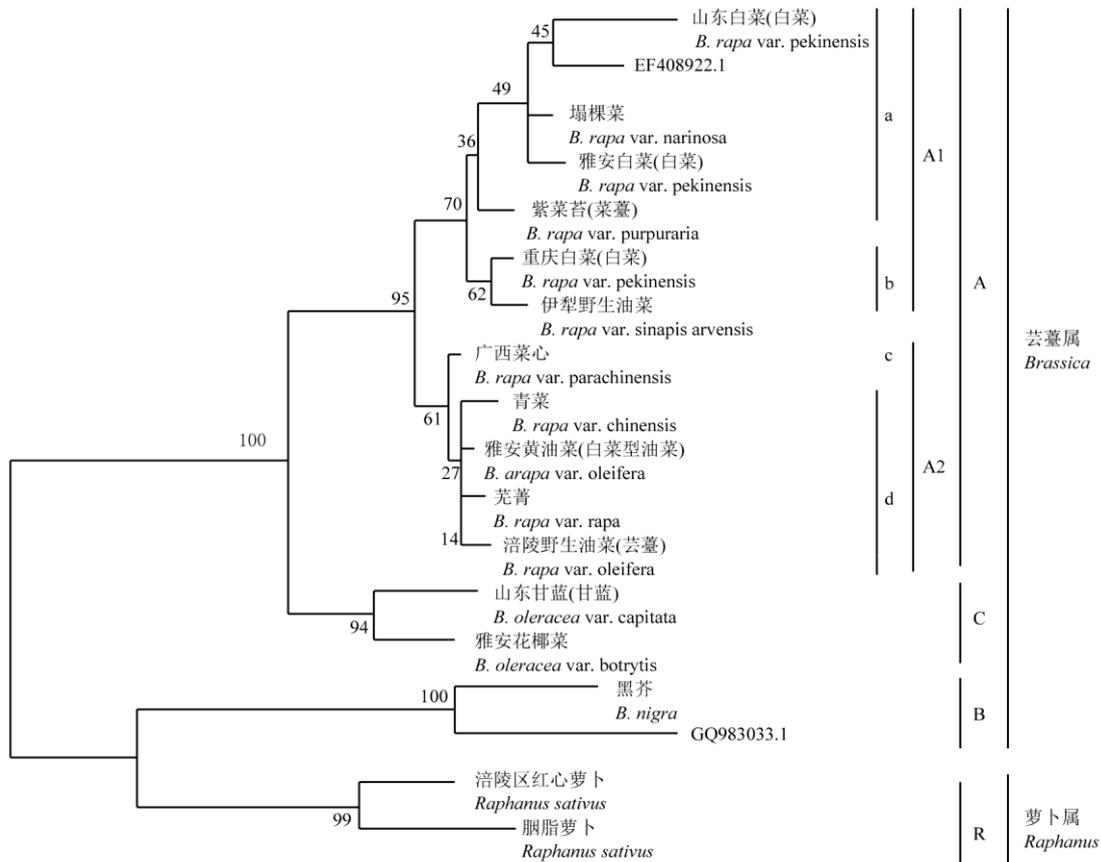


图 2 白菜类蔬菜 ML 系统发育树  
 Figure 2 Phylogenetic tree of Chinese cabbage vegetable

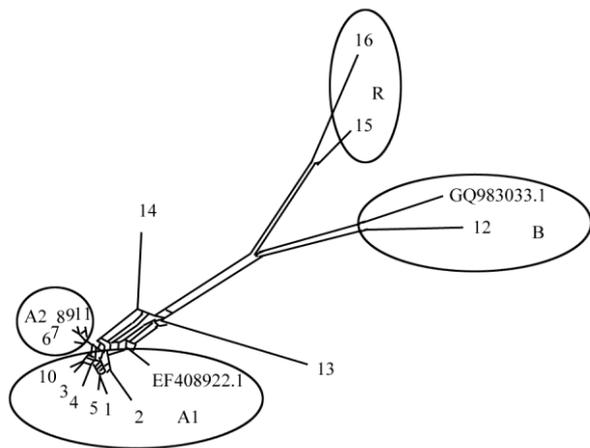


图 3 白菜类蔬菜的网状进化式样  
 Figure 3 The reticulate evolution pattern based on *Chs* sequences

过程中有更多可供选择和利用的基因, 了解育种材料的遗传差异, 有利于育种中扩大种质来源以及更好地利用种质资源(楼珺张等, 2015)。从 *Chs* 基因序列对比结果来看, 11 份白菜类蔬菜的 *Chs* 基因序列没有大于 3 bp 的插入/缺失, 说明白菜类蔬菜的 *Chs* 基因是一个非常保守的基因, 在进化过程中发生变

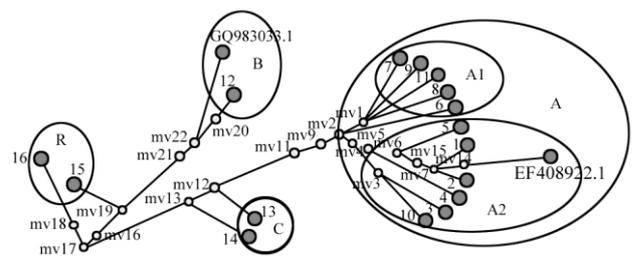


图 4 基于 *Chs* 基因序列构建的 MJ 网状支系  
 注: 各节点间的数字表示突变位点数, mv 后的数字是假定缺失的单体模本

Figure 4 Median-joining (MJ) network derived from the sequences of *Chs* gene

Note: The numbers between points indicate the number of mutation steps; The numbers after mv is the missing intermediate haplotypes that were not found in the analyzed individuals

异的可能性小。从系统发育树来看, 11 份白菜类蔬菜材料分为两大类。从网状进化式样的分析看, 11 份白菜类蔬菜也被分为两类, 但它们的网状支系距离都很短。从 MJ 网状支系分析结果看, 可将 11 份白菜类蔬菜分为两类且每个品种之间的变异结点较近。以上研究结果均表明, 11 份白菜类蔬菜之间



的遗传差异较小, 亲缘关系较近, 遗传背景相对狭窄。研究结果与郭晶心等(2002)、刘冬媛等(2014)和楼钰张等(2015)研究认为白菜类蔬菜之间的遗传背景很复杂的观点相反, 这可能与采用的标记技术不同和所选的材料不同有关。由于原始的白菜类蔬菜品种已经在自然选择过程中被淘汰, 加之人们在种植过程中倾向性地选择, 从而导致了其遗传背景相对狭窄。在今后的白菜类蔬菜的育种过程中, 应注重育种材料遗传基础的扩增, 并加强白菜类蔬菜与其近缘植物的基因交流以扩宽其种质基础。

过程中有更多可供选择和利用的基因, 了解育种材料的遗传差异, 有利于育种中扩大种质来源以及更好地利用种质资源(楼钰张等, 2015)。从 *Chs* 基因序列对比结果来看, 11 份白菜类蔬菜的 *Chs* 基因序列没有大于 3 bp 的插入/缺失, 说明白菜类蔬菜的 *Chs* 基因是一个非常保守的基因, 在进化过程中发生变异的可能性小。从系统发育树来看, 11 份白菜类蔬菜材料分为两大类。从网状进化式样的分析看, 11 份白菜类蔬菜也被分为两类, 但它们的网状支系距离都很短。从 MJ 网状支系分析结果看, 可将 11 份白菜类蔬菜分为两类且每个品种之间的变异结点较近。以上研究结果均表明, 11 份白菜类蔬菜之间的遗传差异较小, 亲缘关系较近, 遗传背景相对狭窄。研究结果与郭晶心等(2002)、刘冬媛等(2014)和楼钰张等(2015)研究认为白菜类蔬菜之间的遗传背景很复杂的观点相反, 这可能与采用的标记技术不同和所选的材料不同有关。由于原始的白菜类蔬菜品种已经在自然选择过程中被淘汰, 加之人们在种植过程中倾向性地选择, 从而导致了其遗传背景相对狭窄。在今后的白菜类蔬菜的育种过程中, 应注重育种材料遗传基础的扩增, 并加强白菜类蔬菜与其近缘植物的基因交流以扩宽其种质基础。

## 2.2 白菜类蔬菜系统发育关系分析

白菜类蔬菜在中国广泛种植且与人们的生活息息相关。许多学者在白菜类蔬菜的分类及起源等方面做了大量研究。本研究将供试的白菜类蔬菜材料分为两大类, 第一类包括山东白菜、塌棵菜、雅安白菜、紫菜苔、重庆白菜和伊犁野生油菜, 相对较进化; 第二类包括广西菜心、青菜、雅安黄油菜、芜菁和涪陵野生油菜, 相对较原始。结果表明结球白菜和不结球白菜并未完全的分开, 塌棵菜和结球白菜聚在一起, 重庆白菜和伊犁野生油菜聚在一起, 这与孙德岭等(2001)认为结球白菜与不结球白菜遗传差异较大的结果不一致。芜菁和不结球白菜聚在一起, 与孙德岭等(2001)、郭晶心等(2002)和林建丽等(2008)的研究认为芜菁与其它白菜类蔬菜遗传差异较大的观点不一致。在大白菜的起源、进化方面有两种观点, 一种观点认为大白菜是由小

白菜与芜菁自然杂交进化而来, 另一种观点认为大白菜是从普通白菜中分化而来(郭晶心, 2002)。本研究网状支系分析中网状结构图没有显示明显的星状结构, 说明所选材料中没有白菜类蔬菜进化的共同祖先, 11 份白菜类蔬菜之间都是平行进化的。从网状进化式样分析中发现供试的不同白菜类蔬菜变种间除了支状的进化关系外, 不同白菜类蔬菜变种间还存在大量的网状进化关系, 说明在白菜类蔬菜栽培、驯化中存在较多的杂交事件。这可能与白菜类蔬菜品种之间不存在生殖隔离, 可以相互杂交有关。研究结果支持谭起猛的“分化起源”假说, 认为现代栽培的白菜类蔬菜是由更加原始祖先进化而来。

## 3 材料与方法

### 3.1 试验材料

以 11 份具代表性的白菜类蔬菜品种、1 份新疆黑芥品种、2 份甘蓝类蔬菜品种和 2 份萝卜属品种作为研究材料(表 1)。

### 3.2 DNA 提取

在培养箱中发芽供试材料种子, 各材料取黄化幼苗叶片约 3 g 在液氮中研磨, 采用 2×CTAB 法抽提并纯化基因 DNA (Doyle and Doyle, 1986)。

### 3.3 PCR 扩增及 DNA 测序

经过 PCR 扩增后, 得到的片段是 *Chs* 基因的第 1 和 2 外显子, 序列长度大在 1 200 bp 左右。*Chs* 基因扩增引物序列为: *Chs*-F: 5'-CTTCATCTG CCGTCCATCATAACC-3', *Chs*-R: 5'-GGAACGCT GTGCAAG AC-3'(Zhang 等, 2010), PCR 扩增体系为: 12.5 μL 2×*Taq* MasterMix, 上、下引物各 2 μL, DNA 1 μL, RNase Free Water 7.5 μL, 共 25 μL。将 PCR 扩增程序为: 95°C 变性 5 min, 1 个循环; 95°C 变性 60 s, 55°C 退火 60 s, 72°C 延伸 2 min, 35 个循环; 72°C 延伸 10 min; 12°C 保存。电泳后利用 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒对目的 PCR 产物进行回收和纯化。并将纯化后的扩增产物连接到质粒载体 PMD18-T(TaKaRa)上, 再转染感受态大肠杆菌菌株 DH5a, 在含有氨苄青霉素的培养基上培养大肠杆菌感受态菌株, 挑取 3~5 个阳性克隆, 最后再进行 DNA 测序。测序由上海生工生物工程有限公司完成。

用 DNAMAN6.0 进行序列比对, 设计不同基因组 *Chs* 基因的特异引物。筛选到 A 基因组特异引物为 5'-GCA TTG ATC AAC CTC TTG TAA CT-3' (上引物), 5'-GGA ACG CTG TGC AAG AC-3' (下引物)。B 基因组特异引物为: 5'-TTG CAT AAA GTC ACA CAT CC-3' (上引物), 5'-GGA ACG CTG TGC AAG AC-3' (下引物)。



表 1 材料来源及 *Chs* 基因序列登录号

Table 1 Geographical origin of the *Brassica rapa* accessions and Genebank number of *Chs* sequences

编号 No.	材料名称 Name	染色体倍型 Chromosome	拉丁名 Latin name	材料来源 Source	Genbank 登录号 Accession No.
1	雅安白菜(白菜) Yaan Cabbage	AA	<i>B. rapa</i> var. <i>pekinensis</i>	四川省雅安市 Yaan, Sichuan	KP301145
2	山东白菜(白菜) Shandong Cabbage	AA	<i>B. rapa</i> var. <i>pekinensis</i>	山东省济南市 Shandong, Jinan	KP301146
3	重庆白菜(白菜) Chongqing Cabbage	AA	<i>B. rapa</i> var. <i>pekinensis</i>	重庆市渝北区 Yubei, Chongqing	KP301147
4	紫菜苔(菜薹) Purple Caitai	AA	<i>B. rapa</i> var. <i>purpuraria</i>	四川省雅安市 Yaan, Sichuan	KP301148
5	塌棵菜 Takecai	AA	<i>B. rapa</i> var. <i>narinosa</i>	四川省雅安市 Yaan, Sichuan	KP301149
6	青菜 Qingcai	AA	<i>B. rapa</i> var. <i>chinensis</i>	四川省西昌市 Xichang, Sichuan	KP301150
7	广西菜心 Guangxi Caixin	AA	<i>B. rapa</i> var. <i>parachinensis</i>	广西省桂林市 Guilin, Guangxi	KP301151
8	芜菁 Wuqing	AA	<i>B. rapa</i> var. <i>rapa</i>	四川省雅安市 Yaan, Sichuan	KP301152
9	雅安黄油菜(白菜型油菜) Yaan huangyoucai	AA	<i>B. rapa</i> var. <i>oleifera</i>	四川省雅安市 Yaan, Sichuan, China	KP301153
10	伊犁野生油菜 Yili yueyoucai	AA	<i>B. rapa</i> var. <i>sinapis arvensis</i>	新疆省伊犁市 Yili, Xinjiang	KP301155
11	涪陵野生油菜(芸薹) Fuling wild rape	AA	<i>B. rapa</i> var. <i>oleifera</i>	重庆市涪陵区 Fuling, Chongqing	KP301156
12	黑芥 Heijie	BB	<i>B. nigra</i>	新疆省伊犁市 Yili, Xinjiang	KP301157
13	山东甘蓝(甘蓝) Shandong Ganlan	CC	<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i>	山东省济南市 Shandong, Jinan	KP301158
14	雅安花椰菜 Yaan Cauliflower	CC	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	四川省雅安市 Yaan, Sichuan	KP301162
15	涪陵区红心萝卜 Fulinghongxinluobo	RR	<i>Raphanus sativus</i>	重庆市涪陵区 Fuling, Chongqing	KP301240
16	胭脂萝卜	RR	<i>Raphanus sativus</i>	重庆市丰都县	KP301241

### 3.4 数据分析

利用 ClustalX(2.0)对白菜类蔬菜 *Chs* 基因序列进行多重排定和手工校正(Thompson et al., 1997), 将获得的序列上传至 NCBI 网站, 获得白菜类蔬菜的 Genebank 号(表 1)。使用 DNAMAN 软件包(version 6.0; Lynnon Biosoft)进行序比对分析。采用 PAUP4.0b10(Swofford D L, Sinauer Associates, <http://www.sinauer.com>) 软件中的最大似然法

(Maximum likelihood, ML)构建系统发育树, 利用 MrBayes3.1.2 软件分析进行模型和参数估计(Huelsenbeck and Ronquist, 2001)。采用系统网状重建法(The phylogenetic network reconstruction method)分析种群单体的系谱关系。首先利用 HyPhy 软件中的 GARD 方法分别检测 *Chs* 基因外显子、内含子及外显子+内含子的重组信息, 结果表明 *Chs* 基因外显子为非重组 DNA 序列(Log



Likelihood=-5816.39, AIC=47251.54), 利用外显子序列数据资料构建网络支系图((Bandelt et al., 1999; Pond et al., 2005))。采用 Network 5.4.4.0 软件(Fluxus Technology Ltd, Clare, Suffoik, UK)中的中介连接网络法(The median-joining network method)进行网状支系分析。

## 作者贡献

陈发波是本研究的实验设计和实验研究的执行人; 方平完成数据分析, 论文初稿的写作; 熊正贵和敖向建参与实验设计、实验结果分析; 姚启伦是项目的构思者及负责人, 指导实验设计, 数据分析, 论文写作与修改; 毛毅和李红艳参与 Chs 基因克隆与测序。全体作者都阅读并同意最终的文本。

## 致谢

本研究由教育部科技司资助项目(Z2011143)、重庆高校创新团队建设计划资助项目(KJTD20132)、重庆市教委资助项目(KJ121304)和重庆市涪陵区科委计划资助项目(FLKJ, 2012ABB1085)共同资助。

## 参考文献

- Bandelt H.J., Forster P., and Röhl A., 1999, Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies, *Molecular Biology and Evolution*, 16(1): 37-48  
<http://dx.doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036>
- Doyle J.J., and Doyle J.L., 1986, A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue, *Phytochemistry*, 19(1): 11-15
- Fang Y., Yang G., Sun W.C., Wang L.P., Zhang S.J., Yang J.S., Liu L.B., Liu Z.G., and Zeng X.C., 2015, Genetic diversity of winter -type and spring -type turnip rape (*Brassica rapa* L.) in north China by In Del and SSR marker. *Zhongguo Youliao Zuowu Xuebao (Chinese Journal of Oil Crop Sciences)*, 37(1):21-26 (方彦, 杨刚, 孙万仓, 王丽萍, 张树娟, 杨建胜, 刘林波, 刘自刚, 曾秀存, 武军艳, 2015, 北方地区白菜型冬油菜与春油菜的 SSR 和 InDel 遗传多样性分析, *中国油料作物学报*, 37(1):21-26)
- Guo J.C., Zhou N.Y., Ma R.C., and Cao L.Q., 2002, Genetic diversity of *Brassica rapa* revealed by AFLP molecular marker. *Nongye Shengwu Keji Xuebao (Journal of Agricultural Biotechnology)*, 10(2):138-143 (郭晶心, 周乃元, 马荣才, 曹鸣庆, 2002, 白菜类蔬菜遗传多样性的 AFLP 分子标记研究, *农业生物科技学报*, 10(2): 138-143)
- He Y.T., Chen B.Y., Fu T.D., Li D.R., and Tu J.X., 2003, Origins and evolution of *Brassica campestris* L. in China, *Yichuan Xuebao (Acta Genetica Sinica)*, 30(11):

1003-1012 (何余堂, 陈宝元, 傅廷栋, 李殿荣, 涂金星, 2003, 白菜型油菜在中国的起源与进化, *遗传学报*, 30(11): 1003-1012)

- Huelsenbeck J.P., and Ronquist F.R., 2001, MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees, *Bioinformatics*, 17(8): 754-755  
<http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/17.8.754>
- Lin J.L., Zhu Z.G., Wang J.C., and Gao J.W., 2008, Relative analysis of cabbage germplasm resources by RAPD, *Huabei Nongxuebao (Acta Agriculturae Boreali Sinica)*, 23(Suppl.): 183-189 (林建丽, 朱正歌, 王建成, 高建伟, 2008, 白菜类蔬菜种质资源亲缘关系的 RAPD 分析, *华北农学报*, 23(增刊): 183-189)
- Liu D.Y., Wang X.H., Liu Y., Zhang J., and Chen H.Y., 2014, Analysis of genetic diversity and relationship of Pakchoi accessions based on SSR markers, *Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding)*, 12(3): 499-508 (刘冬媛, 王新华, 刘杨, 张峻, 陈火英, 2014, 不结球白菜品种(系)遗传多样性与亲缘关系的 SSR 分析, *分子植物育种*, 12(3): 499-508)
- Lou J., Zhang X.L., Luo T.K., He T.T., Jing Z.G., Zhu S.Y., Liu Q., and Tang Z., 2015, Analysis of the genetic diversity in cauliflower inbred lines by SSR and SRAP markers, *Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding)*, 13(3): 605-614 (楼珏张, 小玲, 罗天宽, 何婷婷, 荆赞革, 朱世杨, 刘庆, 唐征, 2015, 利用 SSR 和 SRAP 标记分析花椰菜自交系的遗传多样性, *分子植物育种*, 13(3): 605-614)
- Ma X.J., Li G.P., Zheng X.J., Lin D.Z., and Dong Y.J., 2012, Genetic diversity analysis of twenty *Brassica chinensis* L. Cultivars, *Changjiang Shucui (Journal of Changjiang Vegetable)*, (22): 13-16 (马晓静, 李广平, 郑晓静, 林冬枝, 董彦君, 2012, 20 个青菜品种的遗传多样性分析, *长江蔬菜*, (22): 13-16)
- Pond S.L., Frost S.D., and Muse S.V., 2005, HyPhy: hypothesis testing using phylogenies, *Bioinformatics*, 21(5): 676-679  
<http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/bti079>
- Sun D.L., Zhao Q.C., Song W.Q., and Chen R.Y., 2001, Relationships analysis of Chinese cabbage species by AFLP, *Yuanyi Xuebao (Acta Horticulturae Sinica)*, 28(4):331-335 (孙德岭, 赵前程, 宋文芹, 陈瑞阳, 2001, 白菜类蔬菜亲缘关系的 AFLP 分析, *园艺学报*, 28(4): 331-335)
- Song S.H., Zheng X.Y., Xu J.B., and Yu Y.J., 2006, Use of random amplified polymorphic DNA(RAPD) markers for the identification of genetic diversity in Chinese cabbage, *Huabei Nongxuebao (Acta Agriculturae Boreali Sinica)*,



- 21(3): 86-90 (宋顺华, 郑晓鹰, 徐家炳, 余阳俊, 2006, 大白菜种质资源的遗传多样性分析, 华北农学报, 21(3): 86-90)
- Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., and Higgins D.G., 1997, The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools, *Nucleic Acids Research*, 25(24): 4876-4882  
<http://dx.doi.org/10.1093/nar/25.24.4876>
- Zhao B., Liu L., Tan D.Y., and Wang J.B., 2010, Analysis of phylogenetic relationships of Brassicaceae species based on Chs sequences, *Biochemical Systematics and Ecology*, 38(4): 731-739  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bse.2010.06.003>
- Zhang B.X., Zhu Y.M., Lai Y.C., Hu X.M., Li W., Li W., Bi Y.D., Xiao J.L., and Zhang L.L., 2012, Research Progress of plant chalcone synthase (*CHS*) and its gene, *Anhui Nongye Kexue (Journal of Anhui Agriculture Science)*, 40(20): 10376-10379 (张必弦, 朱延明, 来永才, 胡小梅, 李炜, 李琬, 毕影东, 肖佳雷, 张俐俐, 2012, 植物查尔酮合酶(*CHS*)及其基因的研究进展, 安徽农业科学, 40(20): 10376-10379)
- Zhang D.S., Zhang F.L., Yu Y.J., Zhao X.Y., Yu S.C., Wang W.H., Su T.B., and Lu G.X., 2015, Effects of black mulch on seedling growth of seeds existing in the soil and parent seeds for Chinese cabbage vegetables, *Zhongguo Shucai (China Vegetables)*, (3): 33-37(张德双, 张凤兰, 余阳俊, 赵岫云, 于拴仓, 汪维红, 苏同兵, 卢桂香, 2015, 黑色地膜对白菜类蔬菜落地种子和亲本种子幼苗生长的影响, 中国蔬菜, (3): 33-37)