

基于 *Chs* 基因序列的茎瘤芥起源进化研究

陈发波 姚启伦* 董二飞 方平

(长江师范学院生命科学与技术学院, 重庆 408100)

摘要: 为探讨我国茎瘤芥的起源、进化, 克隆、测序了 30 份茎瘤芥及其近缘种的 *Chs* 基因序列, 并构建系统发育树、系统发育网络及网状支系结构。结果表明: 系统发育树将茎瘤芥及其近缘种 *Chs* 基因序列分成 3 个亚支, 9 个支系。系统发育网络分析结果表明, 茎瘤芥与其他芥菜变种之间不仅存在树状的进化关系, 还大量存在非树状的进化史。网状支系分析结果表明, 伊犁野生油菜可能是茎瘤芥 A 基因组的供体, 黑芥可能是茎瘤芥 B 基因组的供体。茎瘤芥为芸薹属芥菜种的一个变种, 与薹芥的亲缘关系较近, 可能是由薹芥进化而来。单拷贝的 *Chs* 基因可作为一个理想的候选基因用于茎瘤芥及其近缘植物多倍体系统发育关系的研究。

关键词: 茎瘤芥; *Chs* 基因; 起源进化; 分子系统学

茎瘤芥 (*Brassica juncea* var. *tumida* Tsen et Lee) 属十字花科芸薹属芥菜种, 是异源四倍体植物 ($2n=4x=AABB=36$), 仅在中国有栽培, 其分化年代较晚。茎瘤芥从何种芥菜分化而来? 至今尚不清楚。关于茎瘤芥最早的记载是清乾隆 51 年, 在《涪陵县续修涪州志》中有“青菜有苞有簋盐腌名五香榨菜”, 说明 18 世纪中叶以前在四川盆地的长江流域地区已经分化出茎瘤芥; 1936 年, 毛宗良将茎瘤芥变种定名为 *B. juncea* var. *tsatsai*; 1942 年, 曾勉和李曙轩将茎瘤芥重新命名为 *B. juncea* var. *tumida* Tsen et Lee (刘佩英, 1996)。虽然 20 世纪 40 年代初农业科学工作者对榨菜原料曾有过植物学的拉丁文命名, 但未确定出一个准确的汉文名称; 80 年代前期, 育种家杨以耕、陈材林等经过进一步的研究和鉴定, 将榨菜原料的植物学名称定为茎瘤芥, 仍沿用曾勉和李曙轩的拉丁文命名 (刘佩英, 1996)。周源等 (1990) 对野生芥菜、栽培芥菜及其原始亲本野生黑芥 (*B. nigra*) 与白菜 (*B. campestris*) 的过氧化物酶和细胞色素氧化酶同工

酶的分析表明, 中国西北地区可能是芥菜的起源地。童南奎和陈世儒 (1990) 研究表明, 芥菜的酸性磷酸酶同工酶酶谱与其原始亲本种白菜、黑芥具有较强的同源性, 认为菜用芥菜的原始亲本种很可能是起源于中国的野生型黑芥 (伊犁油菜) 和白菜。陈材林等 (1992) 研究表明, 中国是芥菜原生起源中心或起源中心之一, 西北地区是中国的芥菜起源地, 中国的栽培芥菜是由原生中国的野生芥菜进化而来, 最早出现年代在公元前 6 世纪以前, 其中茎瘤芥最早发现于四川盆地。基于 SSR 分子标记技术, Fang 等 (2013) 对我国茎瘤芥种质资源进行了遗传多样性分析, 推测长江中游的重庆市可能是茎瘤芥的起源地或遗传多样性中心, 在其传播过程中主要是以重庆市为中心, 沿长江流域向其上游和下游传播。

查尔酮合成酶基因 (*Chs*) 主要调控类黄酮物质的合成, 为单拷贝基因 (Durbin et al., 1995)。*Chs* 基因普遍存在于植物中, 现认为最早在陆生植物中出现, 例如轮藻纲和苔藓植物 (Jiang & Cao, 2008; Lu et al., 2009)。Lanz 等 (1991) 指出 *Chs* 在植物的不同类群中是很保守的, 已有数据表明 *Chs* 基因是一个较大的基因家族, 其编码区比较保守, 长约 1.2 kb, 不同科之间的氨基酸同源性为 70~90 个。Niesbach-Klöggen 等 (1987) 首次尝试利用 *Chs* 基因编码区的 DNA 序列来研究物种的进

陈发波, 男, 博士, 副教授, 专业方向: 作物遗传育种, E-mail: chenfabo963@126.com

* 通讯作者 (Corresponding author): 姚启伦, 男, 教授, 硕士生导师, 专业方向: 作物遗传育种, E-mail: yql641@aliyun.com

收稿日期: 2015-07-04; 接受日期: 2015-10-12

基金项目: 教育部科技司资助项目 (Z2011143), 重庆市教委资助项目 (KJ121304), 重庆市涪陵区科委计划项目 (FLKJ2012ABB1085)

化关系, 结果表明毛茛属植物与欧芹属植物的分类结果与基于表型的分类结果不一致。Zhao 等(2010)利用 *Chs* 基因分析了十字花科 60 个属间的系统关系, 认为 *Chs* 基因序列可作为十字花科不同属间系统关系分析的候选基因。但对茎瘤芥起源进化的分子系统学研究至今未见报道, 为此本试验克隆、测序了 30 份茎瘤芥及其近缘植物的 *Chs* 基因, 构建茎瘤芥及其近缘植物的系统发育树、系统发育网络及网状支系结构, 探讨茎瘤芥及其近缘植物(芸薹

属)的起源进化, 为茎瘤芥远缘杂交和种质扩增提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为茎瘤芥及其近缘种和外类群萝卜属的不同栽培种 30 份, 材料编号、来源及序列 GenBank 登录号见表 1, 分类及拉丁名主要参考周太炎等(1987)、刘佩瑛(1996)及王建林等(2006)

表 1 供试材料名称、来源及 GenBank 登录号

编号	材料名称	类型	染色体倍型	拉丁名	来源	GenBank 登录号
01	雅安白菜	普通白菜	AA	<i>B. rapa</i> var. <i>pekinensis</i>	四川雅安市	KP301145
02	山东白菜	大白菜	AA	<i>B. rapa</i> var. <i>pekinensis</i>	山东济南市	KP301146
03	伊犁野生油菜	野生油菜	AA	<i>B. rapa</i> var. <i>sinapis arvensis</i>	新疆伊犁市	KP301155
04	涪陵野生油菜	野生油菜	AA	<i>B. rapa</i> var. <i>oleifera</i>	重庆市涪陵区	KP301156
05	黑芥	黑芥	BB	<i>B. nigra</i>	新疆伊犁市	KP301157
06	山东甘蓝	结球甘蓝	CC	<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i>	山东济南市	KP301158
07	西园 4 号	结球甘蓝	CC	<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i>	重庆市北碚区	KP301159
08	中油 1 号	甘蓝型油菜	AACC	<i>B. napus</i>	北京市	A: KP301171, C: KP301172
09	Y8	野生芥菜	AABB	<i>B. juncea</i> var. <i>juncea</i>	甘肃酒泉市	A: KP301242, B: KP301175
10	圆叶大头菜	大头芥	AABB	<i>B. juncea</i> var. <i>megarrhiza</i>	四川万源县	A: KP301244, B: KP301177
11	内江棒菜	笋子芥	AABB	<i>B. juncea</i> var. <i>carassicaulis</i>	四川内江市	A: KP301179, B: KP301178
12	垫江抱儿菜	抱子芥	AABB	<i>B. juncea</i> var. <i>gemmifera</i>	重庆市垫江县	A: KP301246, B: KP301182
13	郫县榨菜	茎瘤芥	AABB	<i>B. juncea</i> var. <i>tumida</i>	四川郫县	A: KP301183, B: KP301184
14	藁市草腰子	茎瘤芥	AABB	<i>B. juncea</i> var. <i>tumida</i>	重庆市涪陵区	A: KP301186, B: KP301185
15	冬菜	大叶芥	AABB	<i>B. juncea</i> var. <i>rugosa</i>	重庆市大足县	A: KP301194, B: KP301193
16	白杆青菜	小叶芥	AABB	<i>B. juncea</i> var. <i>foliosa</i>	四川泸州市	A: KP301197, B: KP301198
17	白花菜	白花芥	AABB	<i>B. juncea</i> var. <i>leucanthus</i>	四川泸县	B: KP301201, A: KP301202
18	花叶芥菜	花叶芥	AABB	<i>B. juncea</i> var. <i>multisecta</i>	湖北鄂州市	A: KP301252, B: KP301204
19	梁平香菜	长柄芥	AABB	<i>B. juncea</i> var. <i>longepetiolata</i>	重庆市梁平县	A: KP301206, B: KP301253
20	宽叶凤尾菜	凤尾芥	AABB	<i>B. juncea</i> var. <i>linearifolia</i>	四川自贡市	A: KP301212, B: KP301211
21	大耳朵青菜	叶瘤芥	AABB	<i>B. juncea</i> var. <i>strumata</i>	湖南沅江县	A: KP301254, B: KP301215
22	大片片青菜	宽柄芥	AABB	<i>B. juncea</i> var. <i>latipa</i>	四川美姑县	A: KP301216, B: KP301217
23	青叶包包菜	卷心芥	AABB	<i>B. juncea</i> var. <i>involuta</i>	重庆市垫江县	A: KP301219, B: KP301220
24	鸡心芥菜	结球芥	AABB	<i>B. juncea</i> var. <i>capitata</i>	广东潮州市	A: KP301222, B: KP301223
25	独棵雪里蕻	分蘖芥	AABB	<i>B. juncea</i> var. <i>multiceps</i>	江苏南通市	A: KP301227, B: KP301226
26	小叶冲菜	薹芥	AABB	<i>B. juncea</i> var. <i>utilis</i>	重庆市巴南区	A: KP301231, B: KP301232
27	马尾丝	芥菜型油菜	AABB	<i>B. juncea</i> Czern. et Coss	四川遂宁市	A: KP301233, B: KP301258
28	埃塞俄比亚芥	埃塞俄比亚芥	BBCC	<i>B. carinata</i>	埃塞俄比亚	A: KP301235, B: KP301234
29	元谋白萝卜	普通萝卜	RR	<i>Raphanus sativus</i>	云南元谋县	KP301236
30	涪陵区红心萝卜	红心萝卜	RR	<i>Raphanus sativus</i>	重庆市涪陵区	KP301240

注: 表中 GenBank 登录号一栏 A、B、C 表示异源四倍体材料分别来自于 A、B、C 基因组序列。

对中国茎瘤芥植物的分类研究。

1.2 DNA 提取

试验于 2013 年 5 月在长江师范学院三峡库区特色作物工程中心进行, 将供试 30 份材料种子分别置于培养箱中发芽, 取幼苗叶片约 3 g 在液氮

中研磨, 采用 2×CTAB 法提取并纯化基因组 DNA (Doyle & Doyle, 1987)。

1.3 PCR 扩增及 DNA 测序

PCR 扩增片段为 *Chs* 基因第 1 和第 2 外显子约 1 200 bp 序列, 扩增通用引物序列为 CHS-F:

5'-CTTCATCTGCCCCGTCCATCATACC-3', CHS-R: 5'-GGAACGCTGTGCAAGAC-3' (Zhao et al., 2010), 引物由上海英俊生物技术有限公司合成。PCR 体系 (25 μ L) 包含: 2 \times Taq MasterMix 12.5 μ L, 上、下游引物 (10 nmol \cdot mL⁻¹) 各 2 μ L, DNA 1 μ L (含 50 ng DNA), RNase Free Water 7.5 μ L。2 \times Taq MasterMix 由北京康为世纪生物技术有限公司提供。PCR 反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 55 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。采用爱思进生物技术 (杭州) 有限公司生产的 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒进行目的 DNA 回收、纯化。将扩增产物连接到质粒载体 PMD18-T (TaKaRa) 后, 再转染感受态大肠杆菌 DH5 α 菌株, 在含有氨苄青霉素的培养基上培养感受态菌株, 挑取 3~5 个阳性克隆, DNA 测序由上海英俊生物技术有限公司完成。利用 DNAMAN 6.0 软件进行序列比对, 分析异源四倍体得到的拷贝类型, 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 PA-F: 5'-GGAACGCTGTGCAAGAC-3', PA-R: 5'-GCATTGATCAACCTCTTGTAAC-3'; B 基因组特异引物为 PB-F: 5'-GGAACGCTGTGCAAGAC-3', PB-R: 5'-TTGCATAAAGTCACACATCC-3'。

1.4 数据分析

利用 ClustalX (2.0) 软件对获得的 *Chs* 基因序列进行多重排定, 序列排好后辅以手工校正 (Thompson et al., 1997)。使用 DNAMAN 软件包 (version 6.0, Lynnon Biosoft) 进行序列比对分析。系统发育分析采用最大似然法 (maximum likelihood, ML), ML 分析采用 PAUP 4.0b10 软件, 贝叶斯推断采用 MrBayes 3.1.2 软件进行模型和参数估计 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001), 基于 hLRT 标准选择的最适碱基替代模型为 TIM+I+G。ML 分析采用启发式搜索 (heuristic searches) 和树二等分再连接 (tree-bisectionreconnection, TBR) 进行系统树构建, 并采用自展值分析 (bootstraps, BS) 进行检验, 自展分析进行 500 次。利用 Splits tree 4 软件, 采用二分裂法构建茎瘤芥及其近缘植物系统发育网络。采用系统网状重建法 (phylogenetic network reconstruction method) 分析种群单体型的系谱关系。首先利用 HyPhy 软件的 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状支系图 (Bandelt et al., 1999; Pond et al., 2005)。采用 Network 5.4.4.0 软件 (Fluxus Technology Ltd, Clare, Suffoik, UK) 的中介连接网络法 (median-joining network method) 进行网状支系分析。

2 结果与分析

2.1 系统发育树分析

将获得的 52 个 *Chs* 基因 DNA 序列 (含外类群) 多重排定, 可以得到 1 454 个排列位点 (total site), 其中保守位点 (conserved site) 1 132 个, 占总位点的 77.85%; 可变位点 (variable sites) 321 个, 占总位点的 22.08%; 简约信息位点 (parsimony information) 188 个, 占可变位点的 58.57%。采用最大似然法 (ML) 构建系统发育树, 4 种核苷酸的碱基频率分别为: A=23.36%, T=21.46%, C=27.20%, G=27.98%, 似然值为 -3 585.631, γ 形值 (gamma shape parameter) 为 0.099 3。

从图 1 可知, 供试材料分为芸薹属和萝卜属两大分支, 芸薹属又分为 A、B、C 3 个亚支。其中 EF408922 为 GenBank 下载的 A 基因组序列。A 亚支包括 A1、A2、A3 和 A4 支系, 均为 A 基因组 *Chs* 基因序列。A1 支系只包括涪陵野生油菜, 为二倍体材料; A2 支系包括宽柄芥和甘蓝型油菜, 为异源四倍体材料; A3 支系包括结球芥、卷心芥、大头芥、野生芥菜、凤尾芥、笋子芥、小叶芥、分蘖芥、芥菜型油菜、白花芥、伊犁野生油菜和花叶芥, 除伊犁野生油菜为二倍体外, 其余都为异源四倍体材料; A4 支系包括大白菜、大叶芥、普通白菜、叶瘤芥、茎瘤芥、薹芥、长柄芥和抱子芥, 除大白菜和普通白菜为二倍体外, 其余都为异源四倍体材料。B 亚支包括 B1、B2、B3 和 B4 支系, 均为 B 基因组 *Chs* 基因序列。B1 支系只包括分蘖芥, 为异源四倍体材料; B2 支系只包括芥菜型油菜, 为异源四倍体材料; B3 支系包括大头芥和埃塞俄比亚芥, 为异源四倍体材料; B4 支系包括白花芥、卷心芥、野生芥菜、笋子芥、茎瘤芥、小叶芥、花叶芥、长柄芥、黑芥、宽柄芥、结球芥、薹芥、叶

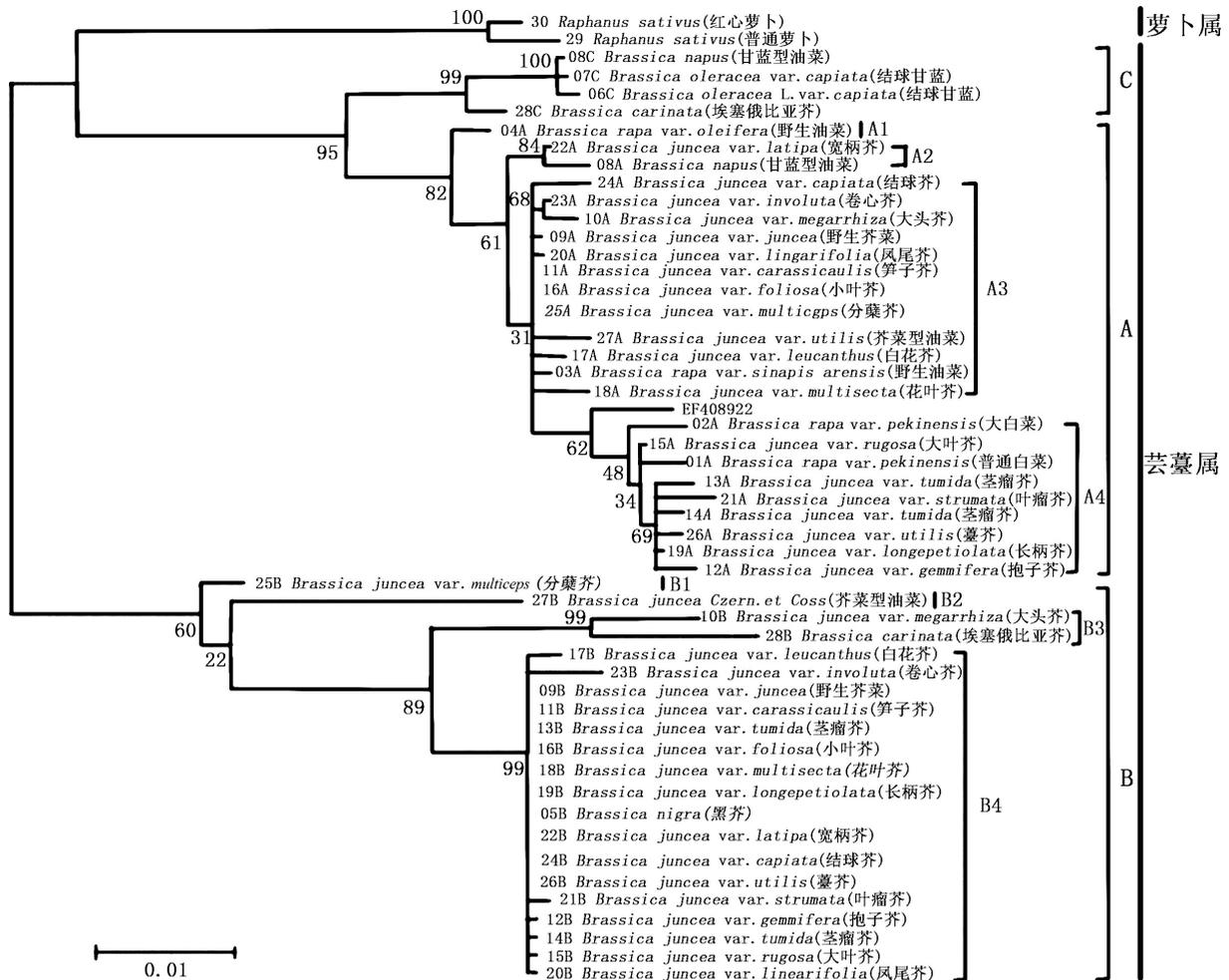


图1 基于中国茎瘤芥及其近缘种 *Chs* 基因序列的 ML 系统发育树

分支下为自展值 (> 50%); 材料编号后面的字母 A、B、C 表示来源于同一异源四倍体材料的不同基因组序列, 下同。

瘤芥、抱子芥、大叶芥和风尾芥, 除黑芥为二倍体外, 其余都为异源四倍体材料。C 亚支包括甘蓝型油菜、结球甘蓝和埃塞俄比亚芥, 都为 C 基因组 *Chs* 基因序列。从以上分析可以看出, *Chs* 基因能够将茎瘤芥及其近缘植物与外类群萝卜属很好地分开, 而且不同基因组间分化程度不一样, A 基因组分化相对较大, B 基因组分化相对较小, *Chs* 基因可作为一个理想的候选基因用于茎瘤芥及其近缘植物系统关系的研究。

2.2 系统发育网络进化分析

从图 2 可知, 52 个 *Chs* 基因序列分成 4 个明显的分支。第 I 分支都为 A 基因组 *Chs* 基因序列; 第 II 分支都为 B 基因组 *Chs* 基因序列; 第 III 分支为芸薹属外类群萝卜属 *Chs* 基因序列; 第 IV 分支都为 C 基因组 *Chs* 基因序列。从分支数看, B 基因组分化相对较小, A 基因组分化相对较大, 与系统发育

树结果基本一致。从图 2 还可以看出, 茎瘤芥及其近缘植物间不仅存在树状的进化关系, 还存在非树状的进化史, 在茎瘤芥及其近缘植物进化史上可能存在较多的网状进化事件。单拷贝的 *Chs* 基因可作为一个较好的候选基因用于茎瘤芥及其近缘植物多倍体系统发育关系的研究。

2.3 网状进化关系分析

Chs 基因序列网状结构为 4 个主要的星状结构, 不同基因组 *Chs* 基因能较好的形成直系同源系列 (图 3)。第 I 个星状结构都为 A 基因组 *Chs* 基因序列, 其中茎瘤芥与薹芥位于同一个变异位点, 伊犁野生油菜、野生芥菜、笋子芥、小叶芥、白花芥和分蘖芥处于星状结构的中心, 伊犁野生油菜为二倍体, 说明伊犁野生油菜可能是芥菜 A 基因组亲本的供体。第 II 个星状结构都为 B 基因组 *Chs* 基因序列, 其中茎瘤芥与白花芥、野生芥菜、笋子芥、

3 结论与讨论

3.1 关于利用 *Chs* 基因研究茎瘤芥起源进化的可行性分析

在植物中,建立在物种生物系统学基础上的基因组分析已被大多数研究者所接受(Kroon et al., 2004; Yockteng & Nadot, 2004)。单拷贝核基因很少发生协同进化且含有更多的系统发生信息,这使得单拷贝核基因在植物分子系统学研究中可作为理想的载体来演示多倍体物种的形成过程和供体来源等(Straub et al., 2006; Sun et al., 2008)。由于能提供较多的信息和较高重组性(Kano et al., 1999),*Chs* 基因已应用于十字花科植物系统发育研究(Zhao et al., 2010)。另外,由于具有双亲遗传的特点,*Chs* 基因序列已应用于植物起源进化和多倍体物种起源进化的研究(Zhao et al., 2010)。本试验获得了 52 个 *Chs* 基因序列,共得到 1 454 个排列位点,其中保守位点 1 132 个,占总位点的 77.85%;可变位点 321 个,占总位点的 22.08%;简约信息位点 188 个,占可变位点的 58.57%。系统发育树将茎瘤芥及其近缘种 *Chs* 基因序列分成 3 个亚支、9 个支系。茎瘤芥系统分类地位与前人研究相同(刘佩英, 1996),应为芸薹属芥菜种的一个变种。系统发育网络分析结果表明,茎瘤芥及其近缘植物间不仅存在树状的进化关系,还大量存在非树状的进化史,在茎瘤芥及其亲缘植物进化史上存在较多的网状进化事件。网状支系分析结果表明,不同基因组 *Chs* 基因能较好的形成直系同源系列。因此,单拷贝的 *Chs* 基因可作为一个理想的候选基因用于茎瘤芥及其近缘植物多倍体系统发育关系的研究。

3.2 茎瘤芥起源进化的探讨

茎瘤芥仅在中国有栽培,其起源于中国的何地?是从哪一种芥菜中分化出来的?至今研究报道较少。一些学者根据形态上的差异,认为茎瘤芥最初由野生芥菜(*B. juncea*)进化而来,其进化次序是野生芥菜(*B. juncea*)→大叶芥(*B. juncea* var. *rugosa*)→笋子芥(*B. juncea* var. *crassicaulis*)→茎瘤芥(*B. juncea* var. *tumida*)(刘佩英, 1996)。本试验中,从系统发育树分析可知,茎瘤芥为芸薹属芥菜种的一个变种,茎瘤芥 A 基因组 *Chs* 基因序

列与薹芥、叶瘤芥、长柄芥、抱子芥和薹芥为一个姊妹组(自展值为 89%),茎瘤芥 B 基因组 *Chs* 基因序列与薹芥、白花芥、卷心芥、野生芥菜、笋子芥、小叶芥、花叶芥、长柄芥、宽柄芥、结球芥、叶瘤芥、抱子芥、大叶芥和凤尾芥在一个姊妹组(自展值为 99%)。系统发育网络分析表明,茎瘤芥与其他芥菜变种之间不仅存在树状的进化关系,还存在非树状的进化史,这可能与芥菜不同变种之间可以自由授粉有关。星状结构表明,茎瘤芥 A 基因组与薹芥位于同一个变异位点,茎瘤芥 B 基因组也与薹芥位于同一个变异位点;伊犁野生油菜可能是茎瘤芥 A 基因组的供体,黑芥可能是茎瘤芥 B 基因组的供体,这与 Song 等(1988)、童南奎和陈世儒(1990)、周源等(1990)、Truco 等(1996)的研究结果一致,都认为中国芥菜的原始亲本种可能是黑芥和白菜。据记载,中国芥菜产生的时间距今约 8 000 年,而关于茎瘤芥的历史记载仅数百年(刘佩英, 1996)。因此,笔者推测茎瘤芥不是由白菜和黑芥杂交后直接进化而来的,而是由白菜和黑芥杂交后产生的某种芥菜发生天然突变、再经人工驯化选择产生的。薹芥与茎瘤芥亲缘关系最近,推测茎瘤芥可能是由薹芥分化而来的。

参考文献

- 陈材林,周源,周光凡,陈学群,范永红. 1992. 中国的芥菜起源探讨. 西南农业学报, 5(3): 6-10.
- 刘佩英. 1996. 中国芥菜. 北京: 中国农业出版社: 15-23, 45-49, 52-55.
- 童南奎,陈世儒. 1990. 芥菜及其原始亲本种的酸性磷酸酶同工酶分析. 园艺学报, (4): 293-298.
- 王建林,何燕,栾运芳,大次卓嘎,张永青. 2006. 中国芸薹属植物的起源、演化与散布. 中国农学通报, 22(8): 489-494.
- 周太炎,郭荣麟,蓝永珍,陆莲立,关克俭,安静夕. 1987. 中国植物志. 33 卷. 北京: 科学出版社: 156-159.
- 周源,陈学群,周光凡. 1990. 栽培芥菜、野生芥菜及其基本祖种的同工酶分析. 西南农业学报, 3(4): 42-46.
- Bandelt H J, Forster P, Röhl A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. Molecular Biology and Evolution, 16(1): 37-48.
- Doyle J J, Doyle J L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem Bull, 19(1): 11-15.
- Durbin M L, Learn G H, Huttley G A, Clegg M T. 1995. Evolution of the chalcone synthase gene family in the genus *Ipomoea*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States

- of America, 92 (8): 3338–3342.
- Fang P, Chen F B, Yao Q L, Yang K C, Zhou G F, Fan Y H, Zhang Z R, Shen J J, Zhang H. 2013. Analysis of genetic diversity in the tuber mustard (*Brassica juncea* var. *tumida* Tsen et Lee) in the Yangtze river basin of China. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 60 (1): 129–143.
- Huelsenbeck J P, Ronquist F R. 2001. MrBayes: bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17 (8): 754–755.
- Jiang M, Cao J S. 2008. Sequence variation of chalcone synthase gene in a spontaneous white-flower mutant of Chinese cabbage-pakchoi. *Molecular Biology Reports*, 35 (4): 507–512.
- Kano R, Nakamura Y, Watanabe S, Tsujimoto H, Hasegawa A. 1999. Phylogenetic relation of *Epidermophyton floccosum* to the species of *Microsporium* and *Trichophyton* in chitin synthase 1 (CHS1) gene sequences. *Mycopathologia*, 146: 111–113.
- Kroon L P N M, Bakker F T, Bosch G B M, Bonants P J M, Fliera W G. 2004. Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Fungal Genetics and Biology*, 41 (8): 766–782.
- Lanz T, Tropf S, Marnier F J, Schroder J, Schroder G. 1991. The role of cysteines in polyketide synthase: site-directed mutagenesis of resveratrol and chalcone synthases, two key enzymes in different plant-specific pathways. *Journal Biological Chemistry*, 266 (15): 9971–9976.
- Lu X, Zhou W, Gao F. 2009. Cloning, characterization and localization of *Chs* gene from blood orange, *Citrus sinensis* (L.) *Osbeck* cv. *Ruby*. *Molecular Biology Reports*, 36 (7): 1983–1990.
- Niesbach-Klößen U, Barzen E, Bernhardt J, Rohde W, Schwarz-Sommer Z, Reif H J, Wienand U, Saedler H. 1987. Chalcone synthase gene in plants: a tool to study evolutionary relationships. *Journal of Molecular Evolution*, 26 (3): 213–225.
- Pond S L, Frost S D, Muse S V. 2005. HyPhy: hypothesis testing using phylogenies. *Bioinformatics*, 21 (5): 676–679.
- Song K M, Osborn T C, Williams P H. 1988. Brassica taxonomy based on nuclear restriction fragment length polymorphisms (RFLP) 1. genome evolution of diploid and amphidiploid species. *Theoretical and Applied Genetics*, 75 (5): 784–794.
- Straub S C K, Pfeil B E, Doyle J V J. 2006. Testing the polyploid past of soybean using a low-copy nuclear gene—Is Glycine (Fabaceae: Papilionoideae) an auto- or allopolyploid? *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 39 (2): 580–584.
- Sun G L, Ni Y, Daley T. 2008. Molecular phylogeny of *RPB2* gene reveals multiple origin, geographic differentiation of H genome, and the relationship of the Y genome to other genomes in *Elymus* species. *Molecular Phylogenetics Evolution*, 46 (3): 897–907.
- Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, Jeanmougin F, 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.
- Truco M J, Hu J, Sadowski J, Quiros C F. 1996. Inter- and intra-genomic homology of the *Brassica* genomes: implication for their origin and evolution. *Theoretical and Applied Genetics*, 93 (8): 1225–1233.
- Yockteng R, Nadot S. 2004. Phylogenetic relationships among *Passiflora* species based on the glutamine synthetase nuclear gene expressed in chloroplast (ncpGS). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 31 (1): 379–396.
- Zhao B, Liu L, Tan D Y, Wang J B. 2010. Analysis of phylogenetic relationships of *Brassicaceae* species based on *Chs* sequences. *Biochemical Systematics and Ecology*, 38 (4): 731–739.

Studies on Origin and Evolution of Tuber Mustard (*Brassica juncea* var. *tumida* Tsen et Lee) based on *Chs* Gene Sequences

CHEN Fa-bo, YAO Qi-lun*, Dong Er-fei, FANG Ping

(Department of Life Sciences and Technologies, Yangtze Normal University, Chongqing 408100, China)

Abstract: In order to explore the origin and evolution of tuber mustard (*Brassica juncea* var. *tumida* Tsen et Lee), we cloned and sequenced the *Chs* gene sequences of tuber mustard and its close relative species. As illustrated in the phylogenetic tree, the sequences from all *Brassica* taxa were separated into three well supported clades and nine sub-clades. Splits tree analysis indicated that there existed not only tree evolution, but also reticulate evolution among tuber mustard and its related plants. Median-joining (MJ) network analysis showed that *B. rapa* and *B. nigra* were the parental donors of A genome and B genome in allotetraploid *B. juncea tumida*, respectively. Tuber mustard, as a variety of *B. juncea*, was closely related to *B. juncea* var. *utilis*, indicating that *B. juncea tumida* might originate from *B. juncea* var. *utilis*. In addition, the single copy gene *Chs* could be efficiently applied to evaluate the phylogenetic relationships of tuber mustard and its related plants.

Key words: Tuber mustard; *Chs* gene; Origin and evolution; Molecular systematics